

루푸스 환자의 면역글로블린 λ 경쇄 레파토리 분석

이화여자대학교 의과대학 내과학교실

장 지 은 · 이 지 수

Analysis of Immunoglobulin λ Light Chain Repertoire in Systemic Lupus Erythematosus

Ji Eun Chang and Jisoo Lee

Department of Internal Medicine, Ewha Womans University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Immunoglobulin (Ig) light chain repertoire has been implicated as a critical determinant in regulation of autoreactive B cells and production of pathogenic anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus (SLE). We analyzed the impact of Ig λ chain repertoire on development of autoimmunity in patients with SLE. **Methods:** We obtained genomic DNA from individual peripheral CD19+ B cells of 3 untreated active SLE patients, and amplified V λ rearrangements from each single cell by polymerase chain reaction. **Results:** A total number of 208 V λ J λ rearrangements were analyzed. Analyzed sequences included 158 productive rearrangements and 50 nonproductive rearrangements. The differences in V λ gene usage in the productive and nonproductive repertoire of SLE patients were found compared to the non-autoimmune individuals. V λ gene, 9A was significantly overrepresented in nonproductive repertoire of SLE patients ($P=0.016$). In the productive repertoire, V λ genes, 3L and 1E were found more often in the SLE patients ($P=0.001$, $P=0.043$). When the productive and the nonproductive repertoires were compared, 9A was found significantly less in the productive repertoire in the SLE patients ($P=0.000$). There were no significant differences in the J λ gene usage between SLE patients and non-autoimmune individuals, but J λ 2/3 gene was the most frequently used in SLE, whereas J λ 7 gene was the most frequently used in the normal subjects. In the productive SLE V λ repertoire, 9.4% of the total sequences employed identical CDR3. It was particularly striking to find 7 identical versions of the 1G-J λ 2/3 V λ J λ rearrangements from one patient and 3 of the same sequence from another patient. Notably, identical V λ junctions in the SLE patients utilized significantly more homologous joining compared to V λ junctions of the normal adults ($P=0.044$). **Conclusion:** These data demonstrate regulation of λ light chain expression in the SLE patients by selection of unique V λ genes. Also, biased selection and clonal expansion of particular V λ rearrangements are apparent in the SLE λ repertoire. (*Immune Network* 2003;3(3):227-234)

Key Words: SLE, immunoglobulin light chain, λ repertoire

서 론

루푸스는 B 세포의 활동 과다와 핵산에 존재하는 항원에 대한 다양한 자가 항체의 생성을 특징으로 하는 전신성 자가면역질환이다(1). 루푸스에서 출현하

는 자가 항체는 장기 특이 조직 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(2). 자가 항체가 조직 손상에 관여한다는 증거가 제시됨에도 불구하고 자가항체를 생성하는 기전은 잘 알려져 있지 않다.

면역글로블린 레파토리 생성에 관여하는 분자 생물학적 기전의 이상이 전신성 자가면역 질환에서 자가 항체 생성의 가능성 있는 기전으로 제시되고 있다. 먼저 중쇄의 경우 joining (J), diversity (D), variable (V) 유전자 분절의 순차적 재배합에 의해, 경쇄의 경우 V,

책임저자 : 이지수, 이화여자대학교 의과대학 내과학교실
☎ 158-710, 서울특별시 양천구 목동 911-1
Tel: 02-2650-6164, Fax: 02-2655-2076
E-mail: leejisoo@mm.ewha.ac.kr

J 유전자 분절의 순차적 재배합에 의해 형성되어(3), 이러한 재배합 동안 결합 부위에 뉴클레오타이드의 추가와 엑소뉴클레아제 활성으로 인한 뉴클레오타이드의 제거로 다양성이 추가된다. 또한 중쇄와 경쇄의 무작위 재배합(4,5), 체세포 돌연변이, 면역 글로불린 class switching과 수용체 편집이 다양성 형성에 기여하게 된다(4,6). 이러한 면역 글로불린 레파토리의 형성 단계 중 어느 한 단계의 이상이 자가 면역성 발현에 기여할 수 있다.

많은 연구에서 특히 면역 글로불린 경쇄가 자가 항체를 생산하는 B 세포의 조절에 중요한 결정 인자로 작용한다는 증거가 제시되고 있다. 항DNA 항체의 이디오타입이 V κ I과 V λ II 유전자계에 속하는 유전자들에 의해 형성된다고 알려졌고(7-10), 항DNA 항체의 DNA 결합 특이성을 위해 제한된 λ 경쇄를 사용함이 알려져 있다(11,12). 구조적으로 경쇄 배아 유전자의 구성 요소가 DNA 결합 특이성을 결정하는 데 중요한 역할을 하며(13), 경쇄의 수용체 편집이 자가 면역성 B 세포의 운명을 결정할 수 있다고 보고하였다(14). 하지만 아직까지 λ 경쇄의 자가 면역성 형성에 미치는 영향에 대한 포괄적인 분석은 미미하다.

본 연구에서는 루푸스 환자에서 자가면역성 형성에 면역글로불린 λ 경쇄의 역할에 대해 살펴보고자 면역 억제제 치료의 과거력이 없는 3명의 활동성 루푸스 환자와 2명의 정상군에서 λ 경쇄의 생산적 재배합과 비생산적 재배합의 레파토리를 비교하였다. 비생산적 재배합으로 형성된 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄는 발현되지 않으므로 비생산적 재배합의 분석은 선택적 영향이 없는 V λ J λ 재배합 과정을 분석할 수 있고, 생산적 재배합은 선택에 의한 영향을 받는 레파토리로 실제 발현하는 레파토리에 대한 정보를 얻을 수 있다(15). 이에 생산적 재배합과 비생산적 재배합의 레파토리를 비교함으로써 면역글로불린 레파토리에 미치는 선택적 영향을 분석하고자 한다.

대상 및 방법

연구 대상. 면역 억제제 치료의 과거력이 없는 활동성 인 루푸스 환자 3명과 대조군으로 정상 성인 2명을 대상으로 하였다. 환자군은 모두 1982년도 미국류마티스학회 루푸스 분류 기준을 충족하였다(16). 환자의 성별 분포는 모두 여자였고, 내원 당시 연령은 32, 36, 47세였다. 정상 성인은 모두 남자였고, 연령은 26, 45세였다.

연구 방법.

림프구 분리: 항응고 처리를 한 말초혈액 10 ml로부터 ficoll hypaque gradient를 이용한 원심분리법을 이용해(17,18) 단핵구를 분리한 후 phycoerythrin (PE) 표지 항

CD19 항체(Sigma Chemical Co, Louis, MO, USA)로 염색하였다. 단일 CD19+ B 림프구는 microAmp base (Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)에 조립된 96 well PCR plate (Robbins Scientific, Sunnyvale, CA, USA)의 각각의 well에 자동세포 보관 단위를 보유하고 있는 FACStar 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하여 분리하였다. 각각의 well은 10 μ l의 PCR 완충액(50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 9, 0.1% Triton X-100)으로 처리하였다.

시발체 연장 전증폭(Primer extension preamplification):

분리된 세포는 0.4 mg/ml의 proteinase K (Sigma Chemical Co, Louis, MO, USA)에 1시간 동안 55°C에서 배양하였고 효소의 불활성화를 위해 10분 동안 95°C에서 배양하였다. Genomic DNA의 무작위 증폭을 위해 자동화 hot start 기법(19)을 사용하였다. 용해된 표본에 20 μ l의 반응액(7.5 mM MgCl₂, 300 μ M dATP, dCTP, dGTP, dTTP)을 첨가하고 wax pellet으로 봉하였다. 30 μ l의 2번째 반응액 [20 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.2% Triton X-100, 66.7 μ M 15-base random oligonucleotides, 5U Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA)]을 넣고 PTC-100 programmer thermal cycler (MJ Research, Waltham town, MA, USA)로 60주기 증폭시켰다. 이 증폭은 95°C에서 10분간 초기 변성과정, 37°C에서 2분간 냉각, 55°C까지 10 s/deg로 램핑 단계, 중합효소 연장을 위해 55°C에서 4분간 배양으로 이루어졌다. 다음의 변성 과정은 94°C에서 1분간 이루어졌다.

재배합된 V λ J λ 유전자의 증폭: 증폭 시 사용된 시발체

각각의 염기서열은 Table 1에 표시하였다. 초기 PCR 증폭을 위해 deoxynucleoside triphosphate 100 μ M, 외측 시발체 0.5 μ M, 2 mM MgCl₂를 포함하는 하층 반응액 25 μ l를 96-well PCR plate의 각각 well에 첨가하였다. 하층 반응액은 wax pellet로 봉하여 분리시켰다. 10 \times PCR 완충액과 Taq DNA polymerase 2 U를 포함하는 상층 반응액 50 μ l를 각각의 well에 첨가한 후 시발체 연장 전증폭 단계에서 형성된 주형 5 μ l를 첨가하였다. 다음 단계 1은 10분간 95°C, 단계 2는 30초간 50°C, 단계 3은 1분 30초 간 72°C, 단계 4는 1분간 94°C에서 증폭 후 단계 2에서 4까지 35회 반복하였다. 2번째 PCR은 내측 시발체를 이용하여 초기 PCR과 같은 방법으로 시행되었다. 2번째 PCR 과정의 단계 2의 변성 온도는 62°C였다.

직접 염기 서열 분석: 모든 PCR 생성물은 1.5% Agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA)에서 전기영동으로 분리하였다. 양성 밴드는 GenElute agarose spin columns (Supelco, Bellefonte, PA, USA)을 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 생성물은 ABI PRISM Dye Termination Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Nor-

Table I. Sequences of oligonucleotide primers for amplification of $V\lambda\lambda$ rearrangements*

External primers	
VL1E	5'-CCTGGGCCAGTCTGTG-3'
VL2E	5'-CTCCTCA(GC)(TC)CTCCTCACT-3'
VL3E	5'-TC(CT)TATG(TA)GCTGAC(TA)CAG-3'
VL4E	5'-C(TA)GC(CT)TGTGCTGACTCA-3'
VL59E	5'-CCCTCTC(CG)CAG(CG)CTGTG-3'
VL6E	5'-TCTTGGGCCAATTTTATGC-3'
VL78E	5'-ATTC(CT)CAG(GA)CTGTGGTGAC-3'
VL10E	5'-CAGTGGTCCAGGCAGGG-3'
JLE	5'-AGGACGGT(CG)A(CG)CT(TG)GGT-3'
Nested primers	
VL1N	5'-CCAGTCTGTG(TC)TGAC(TG)CAGC
VL2N	5'-CAGTCTGCCCTGACTCAGCC-3'
VL3N1	5'-TGACTCAGGACCCTGCTGTGTC-3'
VL3N2	5'-TGAC(TA)CAGCCAC(CT)CTC(GA)GTGTC-3'
VL4N1	5'-TCTGCCCTGTC(TC)TCCCTGGG-3'
VL4N2	5'-TCTGCATCTGCCCTGCTGGG-3'
VL59N	5'-CAG(CG)CTGTGCTGACTCAGCC-3'
VL6N	5'-CCAATTTTATGCTGACTCAGCCC-3'
VL78N	5'-CTGTGGTGAC(TC)CAGGAGCC-3'
VL10N	5'-CAGGCAGGGC(AT)GACTCAGC-3'
JL1N	5'-GGT(CG)ACCTGGT(CG)CCA(CG)T(TG)CC-3'
JL23N	5'-GGTCAGCT(GT)GGT(CG)CCTCC(TG)CC-3'

*External primers hybridize to the 5' leader sequences and the 5' end of framework region 1. Nested primers hybridize to the 5' end of framework region 1. Nucleotides in parentheses indicate mixed base pairs at that position.

wark, CT, USA)를 이용한 dedeoxy termination method (20)를 사용하여 염기 서열을 배열하였다. 염기서열은 automated DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 분석하였다.

면역 글로블린 경쇄 레파토리 분석: $V\lambda$ 의 염기 서열은 Sequencer software (Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA), Gene Works (Release 2.45: IntelliGenetics, Mountain View, CA, USA)와 V BASE Sequence Directory (21)를 사용하여 확인하였다.

Stop codon이 없고 $V\lambda\lambda$ 의 결합부분에 $J\lambda$ 유전자 분절까지 reading frame을 유지하고 있는 경우 생산적 재배합으로 정의하였다. $V\lambda\lambda$ 의 결합부위에서 염기 서열은 P-nucleotide와 N-nucleotide로 구분하였다. 클론성 염기 서열은 동일한 제 3 상보성 결정 부위, $V\lambda$, $J\lambda$ 유전자 분절을 사용하는 재배합된 경쇄 서열로 정의하였다. N-nucleotide가 없는 결합부위에서 $V\lambda$ 또는

Table II. Rearranged $V\lambda$ genes amplified from individual CD19+ B cell

	Amplified		Analyzed	
	SLE	Normal	SLE	Normal
Productive	185	172	158	146
Nonproductive	50	55	50	55
Total	235	227	208	201

Table III. Comparison of $V\lambda$ gene family usage in the SLE patients and normal subjects*

$V\lambda$ Family	Nonproductive		Productive	
	SLE	Normal	SLE	Normal
$V\lambda 1$	9 (18)	14 (25.5)	65 (41.1) [†]	43 (29.5)
$V\lambda 2$	14 (28)	17 (30.9)	45 (28.5)	49 (33.6)
$V\lambda 3$	5 (10)	2 (3.6)	26 (16.5)	27 (18.5)
$V\lambda 4$	7 (14)	10 (18.2)	8 (5.1)	8 (5.5)
$V\lambda 5$	3 (6)	4 (7.3)	3 (1.9)	5 (3.4)
$V\lambda 6$	1 (2)	2 (3.6)	8 (5.1)	5 (3.4)
$V\lambda 7$	0 (0)	1 (1.8)	0 (0)	5 (3.4)
$V\lambda 8$	0 (0)	1 (1.8)	0 (0)	2 (1.4)
$V\lambda 9$	9 (18) [†]	2 (3.6)	2 (1.3)	0 (0)
$V\lambda 10$	2 (4)	2 (3.6)	1 (0.6)	2 (1.4)
Total	50	55	158	146

*: No. (%) of total rearrangements. [†]: $P < 0.05$, significant difference between the nonproductive repertoire of the SLE patients compared to the nonproductive normal repertoire. [‡]: $P < 0.05$, significant difference between the productive repertoire of the SLE patients compared to the productive normal repertoire.

$J\lambda$ 유전자 분절의 뉴클레오타이드로 구분할 수 없는 경우를 H-nucleotide로 정의하였다.

Taq polymerase 분석 오류 빈도: 최대 PCR 오류율은 1.0×10^{-4} 이었다.

통계 분석. 모든 자료는 SPSS (version 10.0)을 이용하여 통계처리 하였다. χ^2 test를 사용하여 루푸스 환자군과 정상군에서 $V\lambda$ 와 $J\lambda$ 의 분포와 사용 빈도를 분석하였다. 처리된 결과는 $P < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

단일 CD19+ B 세포로부터 증폭된 재배합된 $V\lambda$ 유전자. 루푸스 환자에서 $V\lambda$ 재배합은 235개, 정상군에서 $V\lambda$ 재배합은 227개 얻었다. 루푸스 환자군에서는 185개의 생산적 재배합과 50개의 비생산적 재배합을 포함하였고 정상군은 172개 생산적 재배합과 55개의

비생산적 재배합을 포함하고 있었다. 이 중 클론성 팽창을 한 염기 서열은 하나로 간주하여 루푸스 환자군에서 158개의 생산적 재배합과 50개의 비생산적 재배합을, 정상군에서는 146개 생산적 재배합과 55개의 비생산적 재배합을 분석하였다(Table II).

Vλ 유전자 사용.

Vλ 유전자계의 사용: 루푸스 환자군과 정상군에서 Vλ 유전자의 분포에 있어 생산적 재배합과 비생산적 재배합의 레파토리에서 두 군 간에 차이를 보였다. 비생산적 재배합의 레파토리에서는 Vλ9계가 루푸스군에서 정상군보다 빈번히 사용되었고($P=0.016$), 생산적 재배합의 레파토리에서는 Vλ1계가 루푸스 군에서 정상군보다 빈번히 사용되었다($P=0.033$)(Table III).

개별 Vλ 유전자의 사용: 각각의 유전자를 살펴보았을 때 비생산적 재배합의 레파토리에서 Vλ 유전자 사용의 분포는 루푸스 환자군과 정상군에서 비교적 비슷한 분포를 보였지만, 9A 유전자는 정상군에서 3.6%인 반면 루푸스 환자군에서 18%로 유의하게 많이 사용되었다($P=0.016$). 생산적 재배합 레파토리에서

는 3L는 정상군에서 0.7%인 반면 루푸스 환자군에서 8.9%로 빈번히 사용되었고($P=0.001$), 1E 유전자는 정상군에서 4.1%, 루푸스 환자군에서 10.1%로 루푸스 환자군에서 더 많이 사용되었다($P=0.043$)(Fig. 1).

선택적 영향: 선택적 영향을 살펴보기 위해 생산적 재배합과 비생산적 재배합을 비교 분석하였다. Vλ 유전자 9A는 루푸스 환자에서 비생산적 재배합 레파토리에서 18% 사용되었으나 생산적 재배합 레파토리에서 1.3%로 사용되어 음성 선택됨을 보였다($P=0.000$). 정상군의 4C 유전자는 비생산적 재배합 레파토리에서 5.5% 사용되었으나 생산적 재배합 레파토리에서 전혀 사용되지 않아 음성 선택됨을 보였다($P=0.004$)(Fig. 1).

Jλ 유전자의 사용. 루푸스 환자군과 정상군 사이에 Jλ 유전자의 사용은 생산적 재배합과 비생산적 재배합의 레파토리에서 통계적으로 차이는 없었으나 루푸스 환자에서 생산적 및 비생산적 재배합의 레파토리 모두에서 루푸스 환자군에서는 Jλ2/3가 가장 많이 사용되었고 정상군에서는 Jλ7이 가장 많이 사용

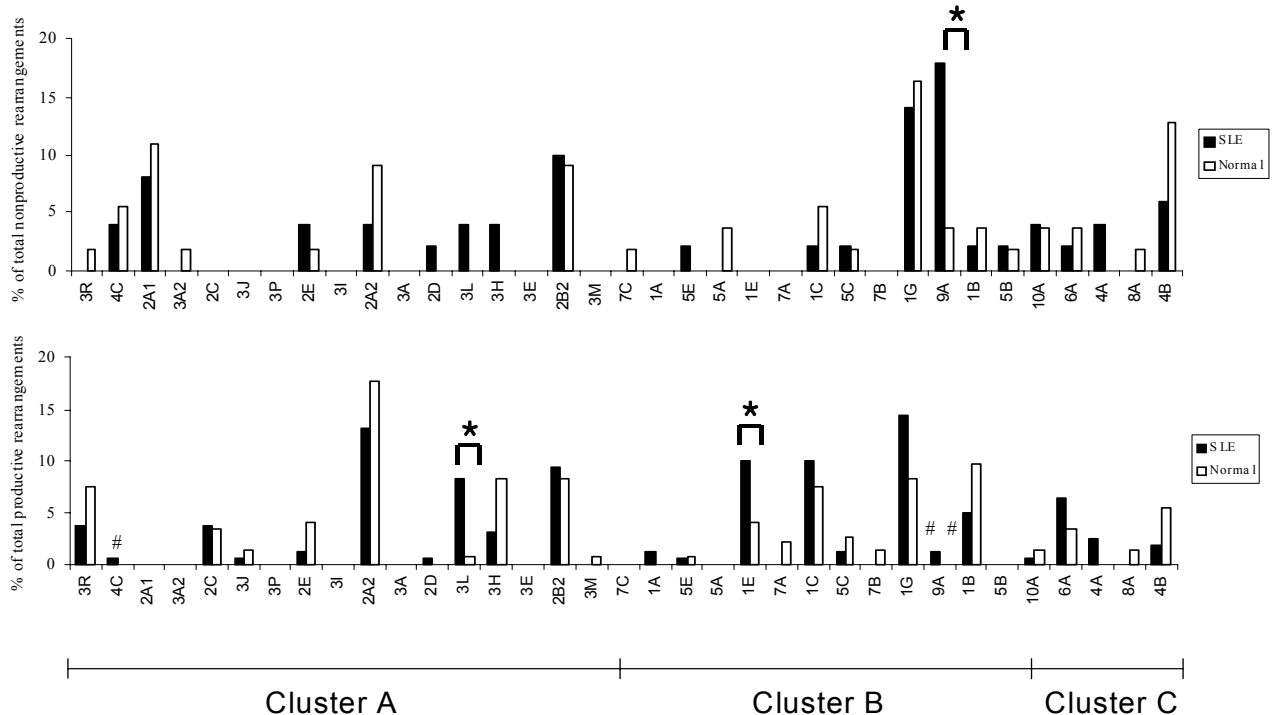


Figure 1. Distribution of individual Vλ gene usage in the SLE patients and normal subjects. *: significant difference between the frequencies in the SLE and normal repertoires ($P < 0.05$); #: negative selection in normals, $P < 0.005$; ##: negative selection in SLE, $P < 0.005$.

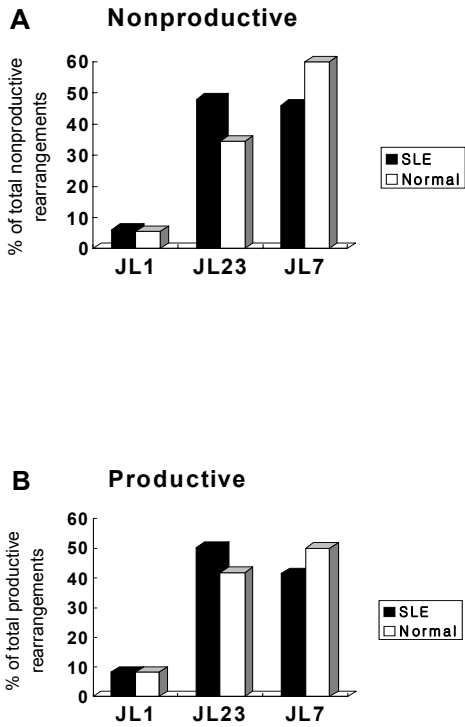


Figure 2. Jλ gene usage in the SLE patients and normals. (A) Jλ gene usage in nonproductive repertoire. (B) Jλ gene usage in productive repertoire.

되었다(Fig. 2).

루푸스 B 세포에서 클론성 팽창. 루푸스 환자의 생산적 재배합의 Vλ 레파토리에서 전체 염기 서열의 9.4%에서 동일한 제 3 상보성 결정 부위를 가지고 있는 클론성 팽창을 발견하였다(Fig 3A). 이러한 클론성 팽창은 정상인에서도 13.0% 발견되는데, 그중 8.9%는 CD5+ B cell에서 발견되고 4.1%만이 CD5- B cell에서 발견되었다. 루푸스 클론을 정밀 분석한 결과 전체 염기 서열의 40%에서 접합부위에서 H-joining을 사용하고 있었고 정상인에서는 10.5%에서만 H-joining을 사용하고 있어 루푸스 환자에서 통계적으로 의미있게 H-joining을 많이 사용하고 있음을 알 수 있었다 ($P=0.044$)(Fig. 3B). 또한 1명의 루푸스 환자의 1G-Jλ 2/3Vλ 재배열에서 7개의 동일한 염기 서열을 발견하였고 다른 환자에서도 같은 염기서열 3개를 발견하였다. 이들 염기서열은 결합부위에서 H-joining을 사용함을 볼 수 있었다(Fig. 4).

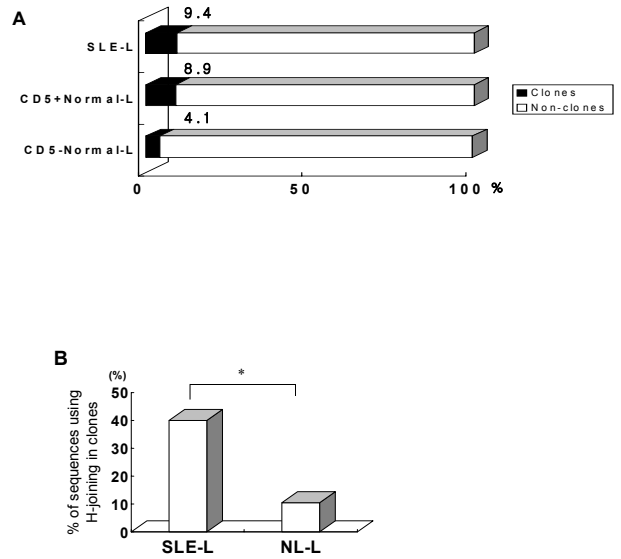


Figure 3. Clonal expansion of B cells with Vλ rearrangements. A. Frequencies of B cells expression identical λ light chain. B. Utilization of H-joining in clonally expanded Vλ rearrangements. *: $P<0.05$.

고찰

특이 자가 항원에 대한 자가항체는 자가 면역 질환의 특징으로 이러한 자가 항체는 면역 조절 이상의 결과이다. 자가 항체 생성에 관한 기전은 잘 알려져 있지 않지만 여러 연구에서 면역 글로블린 생성과정에서의 편중성이 자가 면역성 획득과 연관이 있다고 보고하고 있다. 그러나 면역글로블린 레파토리의 사용이 루푸스 환자에서 정상인과 비교해 볼 때 차이가 있는지 여부는 아직 확실치 않다(22).

여러 연구에서 자가 면역성을 형성하는데 중심 또는 말초의 수용체 편집의 결핍 가능성에 대해 제시하고 있으나 이 가설에 대한 연구는 제한적이었다(23-26). 또한 면역글로블린 중쇄가 자가 항원과의 결합에 기여하지만(27), 경쇄의 영향력도 여러 연구에서 강조되어 왔다(11,27,28).

최근 정상 면역글로블린 레파토리에서 VλJλ 재배열의 분포에 대해 보고되었고(15) 루푸스 환자에서 Vλ와 VH 유전자에 대한 연구에서 Vλ 유전자의 증가된 수용체 편집과 중쇄의 VH3-11과 경쇄의 VMG의 클론성 확장을 발견하였고 이는 B세포의 과활동성으로 루푸스 초기에 말초 V 유전자 사용의 변화를 일으켜 자가면역성이 발현된다고 제시하였다(29). 정상적으로 자가 내성을 유지하는 기전으로 자가 면역의 B

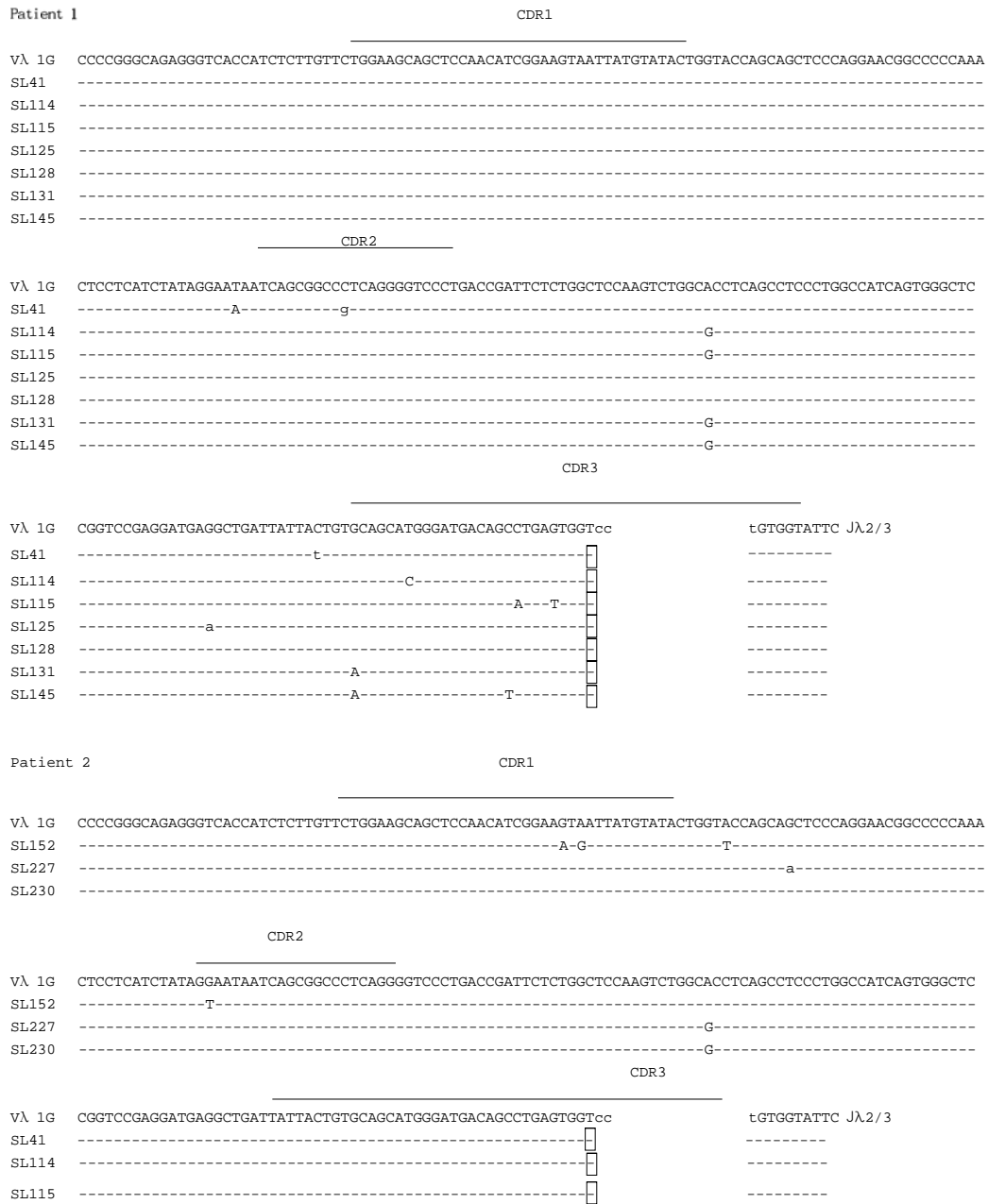


Figure 4. Nucleotide sequences of clonally expanded VλJλ rearrangements employing 1G-Jλ2/3. Seven identical sequences were detected from one patient and three of the sequences were detected from an another patient. Boxed sequence: H-nucleotide.

세포의 클론 결손, 클론 무반응과 수용체 편집 등이 제시되고 있다(26). 클론 결손은 자가면역의 림프구의 세포 사멸을 의미하며 또한 수용체 편집을 포함하는데 이러한 비정상적인 수용체 편집도 자가 내성의 결함을 일으키는 기전이 될 수 있다. 이러한 수용체 편집은 Vκ와 Vλ 사이에 차이를 보이는데 Vκ의 경우 체세포 돌연변이가 시작된 후 말초에서 일어나며 Vλ의 경우 중심에서 일어난다고 하였다(27,29).

본 연구에서 루푸스 환자와 정상군 사이의 말초 B

세포의 Vλ와 Jλ레파토리를 비교 분석하였다. Vλ 유전자계의 분포를 비교 시 두 군 간에 차이를 보였다. Vλ 유전자는 염기서열의 유사성에 따라 10개의 계로 분리를 한다(21). 본 연구에서 비생산적 재배합 레파토리에서는 Vλ9계가 루푸스군에서 정상군보다 빈번히 사용되었고 생산적 재배합 레파토리에서는 Vλ1계가 루푸스 환자군에서 정상군보다 빈번히 사용되어 Vλ 유전자계의 사용이 정상인과 루푸스 환자에서 차이가 있음을 알 수 있었다. 각각의 유전자를 살펴보

면 비생산적 재배합 레파토리에서 9A 유전자는 정상군에 비해 루푸스 환자군에서 유의하게 많이 사용되었다. 이는 루푸스 환자에서 $V\lambda\lambda$ 재배합 과정에서 9A 유전자가 특이적으로 많이 재배합됨을 의미한다. 하지만 9A 유전자는 선택 과정에서 음성 선택됨으로써 자가 면역성 획득을 위해 9A 유전자가 많이 재배합되나 내성을 유지할 수 있는 기전이 루푸스 환자에서 정상적으로 작용하여 자가면역성의 발현을 어느 정도 억제하고 있음을 반영한다. 4C 유전자는 정상군에서 음성 선택되었는데 이는 4C 유전자가 자가면역성을 가질 수 있는 가능성이 있어 발현된 생산적 재배합으로부터 삭제된 것으로 해석할 수 있다. 루푸스 환자군의 생산적 재배합 레파토리에서는 3L과 1E 유전자가 정상군에 비해 루푸스 환자군에서 더 많이 사용되었다. $J\lambda$ 분포에서는 생산적 재배합과 비생산적 재배합의 레파토리에서 통계적 차이는 보이지 않았으나 루푸스 환자에서 생산적과 비생산적 재배합의 레파토리 모두에서 $J\lambda 2/3$ 가 가장 많이 사용되었고 정상군에서는 $J\lambda 7$ 이 가장 많이 사용되었다. 루푸스 환자군과 정상군 사이에 재배합 형성 과정에 빈번하게 사용되는 유전자가 서로 다르고 선택적 영향이 서로 다르게 작용하는 사실은 재배합 과정과 그에 따르는 선택적 과정의 변화가 자가 면역성 획득에 기여함을 시사한다.

본 연구에서 특이할만한 사항을 발견하였는데 루푸스 환자의 $V\lambda$ 레파토리에서 클론성 팽창을 한다는 것이다. 루푸스 환자군의 생산적 재배합 $V\lambda$ 레파토리에서 전체 염기서열의 9.4%에서 클론을 발견하였다. 그러나 정상군에서도 13%에서 클론을 발견하여 λ 경쇄를 포함하는 B 림프구의 팽창이 루푸스 환자의 특이 현상이 아닌 것으로 볼 수 있다. 그러나 정밀 분석 결과 정상군의 클론성 팽창을 보이는 염기 서열은 대부분 CD5+ B 림프구 내에서 발견되어 정상인에서는 특정 B 림프구에서만 클론성 팽창을 하는 것을 알 수 있었다. CD5+ B 림프구는 정상 말초 혈액에서는 소수를 차지하는 세포군으로 낮은 정도의 자가 면역성을 띄는 저친화성, 다반응성 면역글로블린을 생산하는 세포군이며 자연 항체의 생성의 주 공급원으로 알려져 있다(30).

또한 루푸스 환자에서는 1환자의 1G- $J\lambda 2/3V\lambda\lambda$ 재배열에서 7개의 동일한 염기 서열을 발견하였고 다른 환자에서도 같은 염기서열 3개를 발견하여 B 림프구의 과활동성을 반영하고 있다. 반면 정상인에서 클론성 팽창은 2개 이상 동일한 염기 서열을 발견하지 못하였다. 이상으로 루푸스 환자에서는 클론성 팽창은 특이 항원에 반응하여 B 림프구가 특이적으로 자극 받은 것을 알 수 있으며 이런 현상은 자가 항체

형성에 중요한 과정으로 알려져 있다(6,29). Portanova 등은 자가면역화(NZB \times SWR) F1 쥐에서 히스톤 특이 클론성 팽창을 보고하였고(31), Ash-Lerner 등도 NZB/NZW F1 쥐에서 VHBW-16의 클론성 팽창을 보고하였다(32). Drner 등은 루푸스 환자에서 VH3-11와 $V\lambda 1G$ 로 구성된 B 세포 수용체를 갖는 6개의 클론을 발견하였고(29), Odendahl 등도 VH4-61을 표현하는 B 세포의 클론성 팽창을 발견하였다(33).

결론적으로 본 연구에서 루푸스 환자군에서 경쇄의 발현은 특정 $V\lambda$ 유전자의 선택에 의해 영향을 받으며, 또한 각각의 $V\lambda$ 재배열의 편중된 선택과 클론성 팽창이 자가면역성 획득에 기여함을 알 수 있다. 이러한 결과는 B 세포의 과활동성이 루푸스 초기에 일어나 말초 $V\lambda$ 유전자의 사용에 변화를 일으키며 자가 면역성을 제거하려는 내성 기전에도 불구하고 자가면역성을 출현하도록 한다는 것을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Tan EM: Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* 44;93-151, 1989
2. Kotzin BL: Systemic lupus erythematosus. *Cell* 85;303-306, 1996
3. Tonegawa S: Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302;575-581, 1983
4. Rolink A, Melchers F: Generation and regeneration of cells of the B lymphocyte lineage. *Curr Opin Immunol* 5;207-217, 1993
5. Brezinschek HP, Foster SJ, Drner T, Brezinschek RI, Lipsky PE: Pairing of variable heavy and variable kappa chains in individual naive and memory B cells. *J Immunol* 160;4762-4767, 1998
6. Drner T, Lipsky PE: Immunoglobulin variable-region gene usage in systemic autoimmune diseases. *Arthritis Rheum* 44;2715-2727, 2001
7. Davidson A, Manheimer-Lory A, Aranow C, Peterson R, Hannigan N, Diamond B: Molecular characterization of a somatically mutated anti-DNA antibody bearing two systemic lupus erythematosus-related idiotypes. *J Clin Invest* 85;1401-1409, 1990
8. Manheimer-Lory A, Katz JB, Pillinger M, Ghossein C, Smith A, Diamond B: Molecular characteristics of antibodies bearing an anti-DNA-associated idiope. *J Exp Med* 174;1639-1652, 1991
9. Silverman GJ: Unconventional B-cell antigens and human immune repertoires. *Ann NY Acad Sci* 764;342-355, 1995
10. Paul E, Iliev AA, Livneh A, Diamond B: The anti-DNA-associated idiope 8.12 is encoded by the V lambda II gene family and maps to the vicinity of L chain CDR1. *J Immunol* 149;3588-3595, 1992
11. Ibrahim SM, Weigert M, Basu C, Erikson J, Radic MZ: Light chain contribution to specificity in anti-DNA antibodies. *J Immunol* 155;3223-3233, 1995
12. Yang YJ, Sanford D, Chung HY, Back SY, Stollar BD: The structural basis for DNA binding by an anti-DNA auto-antibody. *Mol Immunol* 35;1207-1217, 1998
13. Pewzner-Jung, Simon T, Eilat D: Structural elements controlling anti-DNA antibody affinity and their relationship to anti-phosphorylcholine activity. *J Immunol* 156;3065-3073,

- 1996
14. Tsao BP, Chow A, Cheroutre H, Song YW, McGrath ME, Kronenberg M: B cells are anergic in transgenic mice that express IgM anti-DNA antibodies. *Eur J Immunol* 23;2332-2339, 1993
 15. Farner NL, Drner T, Lipsky PE: Molecular Mechanisms and selection influence the generation of the human V λ J λ repertoire. *J Immunol* 162;2137-2145, 1999
 16. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ: The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25;1271-1277, 1982
 17. Boyum A: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 97;77-89, 1968
 18. Brezinschek HP, Brezinschek RI, Lipsky PE: Analysis of the heavy chain repertoire of human peripheral B cells using single-cell polymerase chain reaction. *J Immunol* 155;190-202, 1995
 19. Bolea MD, Briones P, Farres J, Tyfield L, Pi R: Experimental design: a useful tool for PCR optimization. *Biotechniques* 21;134-140, 1996
 20. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74;5463-5467, 1977
 21. Tomlinson IM, Williams SC, Corbett SJ, Cox JBL, Winter G: V BASE Sequence Directory. MRC Centre for protein engineering, Cambridge. 1996
 22. Hansen A, Drner T, Lipsky PE: Use of immunoglobulin variable region genes by normal subjects and patients with systemic lupus erythematosus. *Int Arch Allergy Immunol* 123;36-45, 2000
 23. Prak EL, Trounstein M, Huszar D, Weigert M: Light chain editing in κ deficient animals: a potential mechanism of B cell tolerance. *J Exp Med* 180;1805-1815, 1995
 24. Prak EL, Weigert M: Light chain replacement: a new model for antibody gene rearrangement. *J Exp Med* 182;541-548, 1995
 25. Radic MZ, Zouali M: Receptor editing, immune diversification and self tolerance. *Immunity* 5;505-511, 1996
 26. Suzuki N, Harada T, Mihara S, Sakane T: Characterization of a germline V κ gene encoding cationic anti-DNA antibody and role of receptor editing for development of the autoantibody in patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 98;1843-1850, 1996
 27. Drner T, Foster SJ, Farner NL, Lipsky PE: Immunoglobulin kappa chain receptor editing in systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 102;688-694, 1998
 28. Manheimer-Lory AJ, Monhian R, Splaver A, Gaynor B, Diamond B: Analysis of the V kappa I family: germline genes from an SLE patient and expressed autoantibodies. *Autoimmunity* 20;259-265, 1995
 29. Drner T, Farner NL, Lipsky PE: Ig λ and heavy chain gene usage in early untreated systemic lupus erythematosus suggests intensive B cell stimulation. *J Immunol* 163;1027-1036, 1999
 30. Kipps TJ: The CD5 B cell. *Adv Immunol* 47;117-185, 1989
 31. Portanova JP, Creadon G, Zhang X, Smith DS, Kotzin BL, Wysocki LJ: An early post-mutational selection event directs expansion of autoreactive B cells in murine lupus. *Mol Immunol* 32;117-135, 1995
 32. Ash-Lerner A, Ginsberg-Strauss M, Pewzner-Jung Y, Desai DD, Marion TN, Eilat D: Expression of an anti-DNA-associated VH gene in immunized and autoimmune mice. *J Immunol* 159;1508-1519, 1997
 33. Odendahl M, Jacobi A, Hansen A, Feist E, Hiepe F, Burmester GR, Lipsky PE, Radbruch A, Drner T: Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 165;5970-5979, 2000
-