

MRL-*lpr/lpr* 마우스로부터 항-DNA 항체생성 하이브리도마세포의 합성과 항-DNA 항체의 특성 분석

*아주대학교 의과대학 미생물학교실 및 *아주대학교 의과학연구소 면역학연구실

강재승* · 김형일* · 김영태** · 윤정구*

Production of Anti-DNA Antibody Producing Hybridoma Cells and Characterization of Anti-DNA Antibodies

Jae Seung Kang*, Hyung Il Kim*, Young Tai Kim** and Jung Koo Youn*

*Department of Microbiology, Ajou University School of Medicine, Suwon, Korea

**Laboratory of Immunology, Ajou University Institute for Medical Science, Suwon, Korea

The pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE) an autoimmune disease, is unknown, but it is certain that anti-DNA antibodies are closely related to pathogenesis.

The character and combination of the isotype, antigen specificity and charge are thought to be main factors in pathogenesis; in effect, they determine the toxicity of anti-DNA antibodies.

In this study, the spleen cells of MRL-*lpr/lpr* mouse were fused with P3X63Ag8.653 myeloma cells, to obtain hybridoma cells which secrete various anti-DNA antibodies. From these cells, anti-DNA antibodies were separated, purified and analysed. The findings are summarised as follows:

- 1) 14 hybridoma clones produced monoclonal anti-DNA antibodies.
- 2) 14 clones showed highly positive reaction to single-stranded DNA, and 4 clones out of the 14 clones showed cross-reaction between single-stranded DNA and double-stranded DNA. No clone reacted with left-handed Z DNA.
- 3) 13 clones out of the 14 clones had the isotype IgG2a, κ ; the remaining clone had the isotype IgM, κ . None of the clones had a λ chain.
- 4) 6 clones showed positive reaction to poly[dA-dT] · poly[dA-dT] and poly[dA] · poly[dT], 7 clones to poly[dA-dC] · poly[dG-dT], 8 clones to poly[dG-dC] and 2 clones had a positive reaction to poly[dG-dC] · poly[dG-dC].
- 5) 3 clones showed negative charge of pI3.6~7.2, 10 clones showed positive charge of pI8.0~9.2 and the remaining clone had neutral charge of pI 7.0~7.4.

Our findings suggest that 4 antibodies, which react with double-stranded DNA and have IgG2a isotype and cationic charge, may have pathogenic activity. This finding needs to be further tested by evaluating the effects of these antibodies when injected into normal young autoimmune disease-prone mice.

Key Words: Systemic lupus erythematosus, Hybridoma cell, Anti-DNA antibody

서 론

*본 연구는 1995년도 교육부 학술연구조성비(유전공학) 및 아주대학교 연구비 지원에 의해서 수행된 것임.
저자연락처: 강재승, (442-749) 경기도 수원시 팔달구 원천동 산 5, 아주대학교병원 미생물학교실, Tel (0331) 219-5078

자가면역질환이란 면역조절의 이상으로 정상면역계의 중요한 기능인 면역관용이 파괴됨으로써 B 림프구 또는 T 림프구가 자가항체에 반응하게 되고, 그 결과

조직이 파괴되면서 발생하는 질환을 말한다¹². 자가면역질환과 깊은 관련이 있는 자가항체로는 항-DNA 항체, 항-snRNP 항체, 항-Sm 항체등이 있다. 이중 항-DNA 항체는 전신성홍반성낭창의 진단과 발병후 질환의 진행정도를 가늠하는 중요한 병인자로 생각되고 있다^{3,4}. 그러나 지난 수 년간의 노력에도 불구하고 대표적인 자가면역질환인 전신성홍반성낭창의 정확한 병인기전은 아직까지 규명되지 않고 있으며, 병인자로 생각되는 항-DNA 항체의 생성에 있어서 몇 가지 가능성만이 제시되고 있을 뿐이다⁵⁻⁸.

정상인도 혈청내에 항-DNA 항체를 가지고 있으며, 노쇠해짐에 따라 그 역가가 차츰 증가되기는 하나, 질환과 관련된 증상은 나타나지 않는 것으로 알려져 있다⁹. 약물에 의해서 유도된 낭창의 경우 역시 높은 역가의 항-DNA 항체가 혈청내에 존재하기는 하지만, 질환의 유발과는 관계가 없는 것으로 알려져 있다¹⁰. 따라서 항-DNA 항체가 전신성홍반성낭창에 있어서 주된 병인자로 작용하리라는 생각이 지배적이기는 하나, 모든 항-DNA 항체가 병독성을 가지고 있지는 않은 것으로 생각된다¹¹.

항-DNA 항체와 자가면역질환의 유발과의 연관성을 설명하기 위해서는 다음과 같은 항-DNA 항체의 특성들을 고려해야만 할 것이다.

첫째는, 항-DNA 항체의 이종이인자형(isotype)이다. Jerrie등¹²은 자연발생적으로 자가면역질환이 유도되기는 하지만, 발생시기가 다소 늦고 질환의 정도 또한 다소 미미한 NZB 마우스와 자가면역질환의 동물모델인 SNF1 마우스의 혈청내 항-DNA 항체의 분석을 통하여, NZB 마우스에서는 항-DNA 항체의 23%만이 IgG2a의 이종이인자형을 보였으며, SNF1 마우스에서는 항-DNA 항체의 65%가 IgG2a의 이종이인자형을 보였다고 보고하여, 질환의 유발에 특정 클래스의 이종이인자형이 관련되어 있음을 시사한 바 있다.

둘째는, 항-DNA 항체의 항원에 대한 특이성이다. 항-DNA 항체는 이중가닥 DNA, 단일가닥 DNA, Z형 DNA, poly[I], poly[dT]등과 같은 여러종류의 핵산에 반응을 보이는데, 이중 이중가닥 DNA, Z형 DNA, poly[dT]등에 반응을 보이는 항-DNA 항체가 질환의 유발과 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다^{13,14}. 그러나, 합성폴리뉴클레오타이드의 경우 poly[dA-dC]·poly[dG-dT]의 염기서열을 가지는 합성폴리뉴클레오타이드에 반응을 보이는 항-DNA 항체가 질환의 유발과 밀접한 관계가 있다는 보고도 있다¹⁵.

셋째는, 항-DNA 항체가 가지는 전하이다. 일정한 시

기가 되면 자가면역질환이 자연발생되는 SNF1 마우스와 자가면역질환이 자연발생되지 않는 NZB 마우스에서의 항-DNA 항체를 비교해 본 결과, SNF1 마우스의 항-DNA 항체는 등전위점이 주로 pI 8.2~8.8에 형성되어 양전하를 띠는 특징을 보였으며, NZB 마우스의 항-DNA 항체는 등전위점이 주로 pI 3.2~6.0에 형성되어 음전하를 띠는 특징을 보였다는 보고가 있다¹⁶. 이는 자가항체인 항-DNA 항체중에서도 양이온성 항-DNA 항체가 주된 병인자로 작용할 것이라는 설명의 근거가 될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 항-DNA 항체의 병독성 유무를 규명하는데 사용할 수 있는, 여러가지 다양한 종류의 항-DNA 항체를 생산하는 하이브리도마세포의 확보를 그 목적으로 하였다. 이를 위하여 자가면역질환의 동물모델인 MRL-*lpr/lpr* 마우스의 비장세포와 마우스 골수종세포인 P3X63Ag8.653을 융합하여 항-DNA 항체를 분비하는 하이브리도마세포를 만들었다. 또한, 이로부터 항-DNA 항체를 분리, 정제하여, 이들 항-DNA 항체의 이종이인자형, DNA의 형태에 따른 반응도, 항-DNA 항체의 항원반응기(epitope) 및 전하를 측정하여 봄으로써 병인기전을 밝히는데 기초가 되고자 하였다.

실험재료 및 방법

1. 실험동물

10~12주령의 MRL-*lpr/lpr* 마우스를 Jackson laboratory (Bar Harbor, Maine)으로부터 구입하여, 본 교실에서 사육한 20~24주령의 것을 사용하였다.

2. 골수종세포

마우스 골수종세포는 그 자신의 항체를 생산하지 않는 P3X63Ag8.653(ATCC CRL 1580)을 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI 1640배지(GibcoBRL, Grand Island, NY)에서 $10^5/ml$ 을 유지하도록 하였고, 세포융합 전달 배지를 교환하여 사용하였다.

3. 세포융합

20~24주령된 MRL-*lpr/lpr* 마우스의 혈액으로부터 혈청을 분리하여 우태아의 흉선으로부터 얻은 이중가닥 DNA에 대한 효소결합면역흡착법을 시행하여, 혈청내 항-DNA 항체의 역가가 높은 마우스를 선택한 후, Gelfer¹⁷의 방법을 이용하여 세포융합을 실시하였다. 선택한 마우스의 비장을 무균적으로 꺼내어 RPMI 배지로 3회 세척을 한후, 작은 가위로 세편으로 잘라 슬라

이드 글래스의 사이에 넣어 잘게 부수고, 상청액을 모아서 1,500 rpm에서 5분간 원침하고, 상청액을 제거하였다. 적혈구를 제거하기 위해 증류수를 1 ml 넣고 30초간 방치한 후 1,500 rpm에서 5분간 원침하였다. RPMI로 2회 더 세척하여 2.3×10^8 /ml의 세포를 얻었다. 전날 배지를 갈아준 최적 발육기의 P3X63Ag8.653을 RPMI배지로 2회 세척하여 5×10^7 /ml로 맞춘 다음 비장세포와 P3X63Ag8.653을 혼합하여 1,500 rpm에서 5분간 원침하였다. 상청액을 제거하고 2종류의 세포가 잘 섞이도록 한 다음, 분자량이 1,300~1,600인 폴리에틸렌 글리콜(Sigma, St. Louis, MO)과 RPMI 배지를 1:1로 혼합하여 만든 후, 37°C 항온수조에 정치하여 놓았던 50%(w/v)의 폴리에틸렌글리콜 용액 1 ml을 1분간에 걸쳐서 한방울씩 가하고, RPMI배지 9 ml을 천천히 첨가해준 다음 1,500 rpm에서 5분간 원침하였다. 침사를 우태아 혈청이 10% 첨가된 RPMI배지로 부유시켜 4개의 96 well plate에 분주하고 37°C, 5% CO₂와 습기가 있는 상태에서 24시간동안 배양하였다. 융합된 세포의 선택은 hypoxanthine(Sigma, St. Louis, MO)이 13.6 mg/ml, aminopterin(Sigma, St. Louis, MO)이 0.174 mg/ml, thymidine(Sigma, St. Louis, MO)이 3.87 mg/ml 그리고 우태아 혈청이 10% 첨가된 RPMI배지(이하 HAT배지라 칭함)를 사용하여 선택하였다. HAT배지는 융합을 실시한 다음날 각 well 당 100 μ l씩 첨가하였고, 2일, 4일째에는 배지 100 μ l씩을 새 배지로 교환해 주었으며, 이후 삼일마다 100 μ l씩 새배지로 교환하며 12~14일 동안 배양하였다.

4. 항체역가측정

융합된 세포들로부터 항-DNA 항체의 생산을 검정하기 위해서 세포융합 12~14일 후 세포가 집락을 형성한 well에서 상청액 100 μ l씩을 채취하여 효소결합면역흡착법을 시행하였다. 항원은 우태아의 흉선으로부터 얻은 단일가닥 DNA와 이중가닥 DNA를 5 μ g/ml의 농도로 인산염완충용액(PBS, pH7.4)에 희석하여 각 well당 100 μ l씩 96 well plate(Dynatech, Chantilly, VI)에 가하여 실온에서 1시간 동안 정치한 후, 0.1%(w/v)PBS-Tween20 (pH7.4)으로 3회 세척하였다. 항원이 부착되지 않은 표면을 차단하기 위하여 BSA(Sigma, St. Louis, MO)가 1%, Tween20(Sigma, St. Louis, MO)이 0.1%(w/v)함유된 인산염완충용액(1% BSA-0.1%(w/v)PBS-Tween20)을 각 well당 100 μ l씩 넣어주고 실온에서 1시간 동안 정치한 후, 세포융합 상청액을 넣어 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이때 DNA가 입혀진 well에 Tufts 대학(Boston,

MA)으로부터 분주받은 항-DNA 항체를 생산하는 하이브리도마 세포인 H241 배양액을 넣어준 것을 양성대조군으로, DNA가 입혀지지 않은 well에 H241 배양액을 넣어준 것을 음성대조군으로 하였다. 반응후 0.1%(w/v) PBS-Tween20으로 3회 이상 세척한 후 alkaline phosphatase가 부착된 토끼 항-마우스(rabbit anti-mouse)IgG, IgM 그리고 IgA(Sigma, St. Louis, MO)를 1%BSA-0.1%(w/v) PBS-Tween20에 1:250으로 희석하여 넣어주고 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 0.1%(w/v) PBS-Tween20으로 2회 세척하고, Tris염완충액(TBS, pH 7.4)에 Tween20을 0.1%(w/v)되게 넣어서 만든 0.1%(w/v) TBS-Tween20으로 1회 더 세척한 후 *p*-nitrophenylphosphate 20 mg과 MgCl₂를 최종농도가 50 mM되도록 sodium carbonate buffer 20 ml에 첨가하여 만든 기질용액 100 μ l를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 정치한 후 ELISA reader(Molecular Device, Menlopark, CA)로 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 세포 클로닝

융합된 세포에서 항-DNA 항체를 생산하는 well이 발견되면, McKeam등¹⁸의 제한희석법을 이용하여 well당 3×10^1 /ml의 세포가 들어가도록 희석하고 세포집락이 well의 반 정도를 차지한 12~14일 후에 다시 효소결합면역흡착법을 이용하여 높은 항체가를 나타내는 well을 선택하였다. 위와 같은 과정을 2회 더 실시하여 단세포로부터 기원한 세포임을 확실히 하였다.

6. 단세포군 항체의 이종이인자형결정

단세포군 항체의 이종이인자형을 결정하기 위해서 마우스 단클론 이종이인자형결정 kit(Pierce, Rockford, IL)를 사용하여 효소결합면역흡착법을 시행하였다. 방법을 간단히 기술하면, 먼저 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA를 5 μ g/ml의 농도로 인산염완충용액(pH7.4)에 희석하여 각 well당 100 μ l씩 96 well plate에 가하여 실온에서 1시간 동안 정치한 후, 0.1%(w/v)PBS-Tween20 (pH7.4)으로 3회 세척하였다. 항원이 부착되지 않은 표면을 차단하기 위하여 1%BSA-0.1%(w/v)PBS-Tween20용액을 각 well당 100 μ l씩 넣어주고 실온에서 1시간 동안 정치한 후, Plate에 세포배양액을 넣어서 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 5종류의 항-마우스 토끼 면역글로불린(IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b 및 IgG3)을 넣어주고 다시 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. Alkaline phosphate용액을 Tris염완충액(pH7.4) 2.5 ml당 한 방울의 비율로 희석하여 각 well에 50 μ l씩 넣어 주고 37°C

에서 1시간 동안 반응시키고 0.1%(w/v)PBS-Tween20으로 2회, 0.1%(w/v) TBS-Tween20으로 1회 세척한 후 p-nitrophenylphosphate 20 mg과 MgCl₂를 최종농도가 50 mM되도록 sodium carbonate buffer 20 ml에 첨가하여 만든 기질용액 100 μ l를 첨가하여 실온에서 2시간 동안 정치한 후 ELISA reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 항-DNA 항체의 정제

항-DNA 항체를 정제하기 위하여 단일가닥 DNA-agarose(GibcoBRL, Grand Island, NY)를 matrix로 사용한 친화크로마토그래피법을 실시하였다. 단일가닥 DNA-agarose matrix를 직경 1 cm인 유리 컬럼에 채워 높이가 8 cm되게 한 유리 컬럼 부피의 10배 정도의 인산염완충액(pH 7.4)을 통과시켜 평형을 이루게 하였다. 하이브리도마 세포 배양액을 컬럼에 통과시킨 후 인산염완충액(pH 7.4)을 통과시켜 세척하고, 700 mM NaCl용액을 통과시켜 유출액이 260 nm에서 흡광도가 0이 될 때까지 시험관당 2 ml씩 받아 모은 후 동결건조시켰다. 컬럼은 인산염완충액(pH 7.4)과 2M의 NaCl용액을 차례로 통과시켜서 세척한 후, 다시 사용하였다. 정제된 항-DNA 항체는 3차 증류수에 24시간 동안 투석한 후 동결건조시키고 100 ng/ μ l의 농도가 되도록 증류수로 농축하였다.

8. SDS-폴리아크릴아마이드젤 전기영동

합성 단클론세포의 상청액으로부터 단일가닥 DNA-agarose를 matrix로 사용한 친화크로마토그래피법에 의해서 분리, 정제된 항-DNA 항체들로 Phast System(Pharmacia LKB, Sweden)으로 SDS 농도구배가 10~15인 pre-cast젤(Pharmacia LKB, Sweden)상에서 250 V, 10 mA, 3 W에서 Vh(voltours)가 65 Vh가 될때까지 전기영동을 실시한 후, PhastGel Silver Kit(Pharmacia LKB, Sweden)로 은염색을 실시하여 띠의 형성을 확인하였다.

9. 항-DNA 항체의 항원반응기 결정

각 항-DNA 항체들이 우선적으로 결합하는 염기서열을 알아보기 위하여 poly[dA-dC]·poly[dG-dT], poly[dG-dC]·poly[dG-dC], poly[dA]·poly[dT], 그리고 poly[dA-dT]·poly[dA-dT]의 5종 합성폴리뉴클레오타이드(Sigma, St. Louis, MO)를 항원으로 사용하여 방법 4와 동일하게 효소결합면역흡착법을 시행함으로써 항-DNA 항체의 항원에 대한 반응기를 결정하였다.

10. 등전위점전기영동(Isoelectric focusing)의 시행

Phast System으로 pH 농도구배가 3~9인 pre-cast젤상에서 등전위점전기영동을 실시한 후 은염색을 실시하여 띠의 형성을 확인하였다. 방법을 간단히 기술하면, 2,000V, 2.5 mA, 3.5 W로 Vh(volthours)가 75 Vh될때까지 prefocusing을 한 후, 다시 200 V, 2.5 mA, 3.5 W로 90 Vh가 될때까지 시료를 점적하였다. 그 후 2,000 V, 2.5 mA, 3.5 W로 500 Vh까지 focusing하였다. 띠의 형성은 SDS-폴리아크릴아마이드젤 전기영동에서와 마찬가지로 PhastGel Silver Kit로 은염색을 실시하여 확인하였다.

결 과

1. 세포융합결과

세포융합 조작 4~5일 후 융합세포의 증식 양상을 도립현미경을 이용하여 관찰할 수 있었다. HAT 배지에서는 융합되지 않은 세포는 증식 분열을 할 수 없게 되고 림프구는 HAT배지에 의하여 생존자체가 억제되지만 시간이 지남에 따라 세포수가 감소되었다. 이에 반해 융합된 세포는 7~8일이 되면서 세포집락이 보이고 12~14일에는 well의 반 이상을 채울 수 있을 정도로 증식하였다. 이같은 세포융합은 6회에 걸쳐서 시행하였고 융합효율은 30~50% 정도였다.

2. 항-DNA 항체의 항원특이성 및 항원에 대한 반응도 측정

항-DNA 항체의 항원특이성 및 항원에 대한 반응도를 측정하고자 단일가닥, 이중가닥 그리고 Z형 DNA에 대해서 각각 효소결합면역흡착법을 시행하였다. 먼저 Z형 DNA를 항원으로 시행한 경우, 모든 클론들이 반응을 보이지 않았다. 이중가닥의 DNA에 대하여 시행한 경우에는 9개의 클론이 반응을 보였으며, 단일가닥 DNA에 대하여 시행한 경우에는 141클론이 반응을 보였다. 이중가닥 DNA에 대해서 반응을 보였던 9개의 클론은 단일가닥 DNA에 대해서도 교차반응을 보였다(Table 1). 141개의 클론중 405 nm에서 흡광도 1.0 이상을 보인 고친화도의 27클론과 흡광도는 1.0 이하이나 이중가닥 DNA에 반응을 보였던 5개의 클론은 제한효소법으로 클로닝하였다.

3. 항-DNA 항체의 이종이인자형결정

2회에 걸쳐 제한효소법을 시행하는 과정에서, 15클론

은 항-DNA 항체의 역가가 차츰 낮아져 결국은 이중가닥 DNA와 단일가닥 DNA에 모두 반응을 보이지 않게 되었다. 이들을 제외한 나머지 단클론세포에서 생산된 항-DNA 항체의 이종이인자형을 결정하기 위하여 각 클론의 배양액으로 이종이인자형결정법을 시행한 결과, IgM이 1클론 IgG2a가 15클론 그리고 IgG3가 1클론이었는데, 이중가닥 DNA와 단일가닥 DNA에 교차반응을 보였던 클론들 중 IgM이 1클론 IgG2a가 2클론이었다 (Table 2).

4. SDS-폴리아크릴아마이드젤 전기영동(SDS -PAGE)

합성 단클론세포의 상청액으로 부터 단일가닥 DNA-agarose를 matrix로 사용한 친화크로마토그래피법에 의해서 분리, 정제된 항-DNA 항체들로 Phast System으로 SDS 농도구배가 10~15인 pre-cast젤상에서 전기영동을 실시하여 항-DNA 항체의 순도를 알아본 결과, 경쇄와

중쇄에 대한 띠를 모두 형성한 1E1과 3D8, 경쇄와 중쇄에 대한 띠를 모두 형성하였으나 순수분리, 정제되지 않은 것으로 생각되는 3F10, 그리고 경쇄와 중쇄에 대한 띠를 모두 형성하지도 않았고 제대로 분리 정제되지 않은 2F6를 제외한 나머지의 항-DNA 항체들은 중쇄가 이동하는 위치로 생각되는 곳에 하나의 띠만을 형성하였다(Fig. 1). 이종이인자형이 IgM인 2F6의 경우, 친화크로마토그래피법을 수차례 더 실시하여 순수하게 분리, 정제하고자 하는 노력에도 불구하고, 순수분리, 정제할 수 없었으므로, 본 연구에서는 더 이상 사용할 수 없었다.

5. 항-DNA 항체의 항원반응기 결정

항-DNA 항체의 항원반응기 결정하기 위해서 5종류의 합성폴리뉴클레오타이드를 항원으로 사용하여 시행한 효소결합면역흡착법 시행한 결과, 대부분의 항-DNA

Table 1. Antigen specificity of anti-DNA antibodies

	Z-DNA	dsDNA	ssDNA
O.D. > 1.0	0	4 ^a	27
O.D. < 1.0	0	5 ^a	114

^aThey also reacted with single-stranded DNA.

Table 2. Isotype of anti-DNA antibodies

	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
dsDNA	1 ^a	0	4 ^a	0	0
ssDNA	1	0	15	0	1

^aThey also reacted with single-stranded DNA.

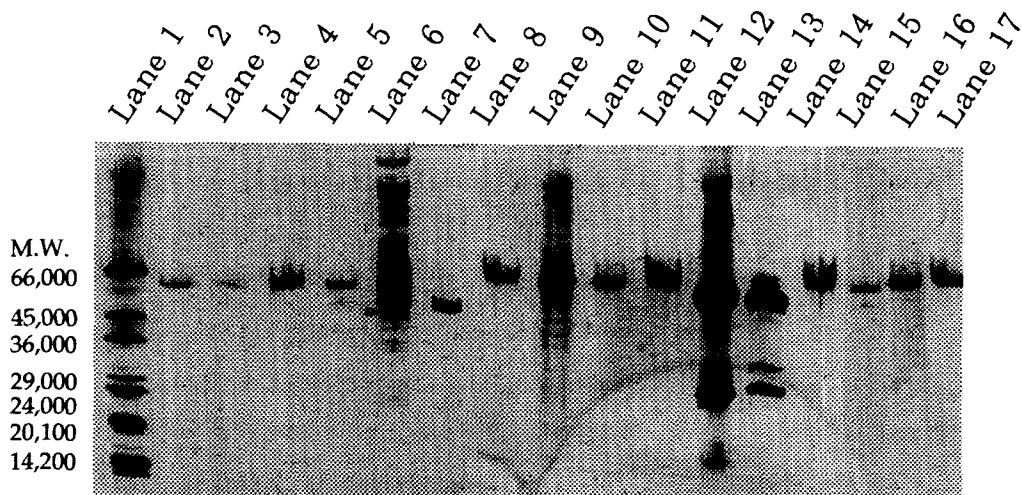


Fig. 1. SDS-PAGE of purified anti-DNA antibodies. Lane 1: Size marker, Lane 2: 4A11, Lane3: 2F7, Lane4: 1B5, Lane 5: 1G10, Lane6: 2F6, Lane7: 1C3, Lane 8:1B7, Lane 9: 3F10, Lane 10: 2C7, Lane 11: 2C10, Lane 12: 1E1, Lane 13: 3D8, Lane 14: 4A4, Lane 15: 4H11, Lane 16: 4D7, Lane 17: 1B2.

Lane 1~Lane 8 and Lane 9~Lane 17 were separated on each gels. Each antibodies were applied 100 ng/μl to 10~15 gradient gel and separated by Phast system. The band was confirmed by silver staining.

Table 3. Epitope mapping of anti-DNA antibodies

	poly[dA-dT] · poly[dA-dT]	poly[dG-dC]	poly[dA-dC] · poly[dG-dT]	poly[dA] · poly[dT]	poly[dG-dC] · poly[dG-dC]
1B7	-	-	-	-	-
2F7	-	+ ^a	-	-	-
1E1	++	+	+	+++++	-
1G10	-	+	+	-	-
1B5	-	-	-	-	-
1C3	+	-	-	-	-
4D7	+	+	+	+	-
4A11	-	++	+	-	-
2C10	-	-	-	+	-
2C7	-	-	-	-	+
1B2	+	+	+	+++++	-
4H11	-	-	-	-	-
4A4	+	++	+	++	-
3D8	+++++	+++++	+++++	+++++	-

- : no reaction, + : positive reaction

^aThe O.D was calculated by $A_{405nm(Sample)} - (2 \times A_{405nm(Blank)})$. Each + represents 0.5 of O.D.

Each synthetic polynucleotide was coated on 96 well plate at 5 µg/ml. After washing and blocking, 1 µg/ml of purified anti-DNA antibodies and alkaline phosphatase conjugated IgM, IgA and IgG mixture were added into each well at 1hr interval. Development was carried by using p-nitrophenylphosphate. After placing plate at room temperature for 2 hrs, optical density was measured at 405 nm.

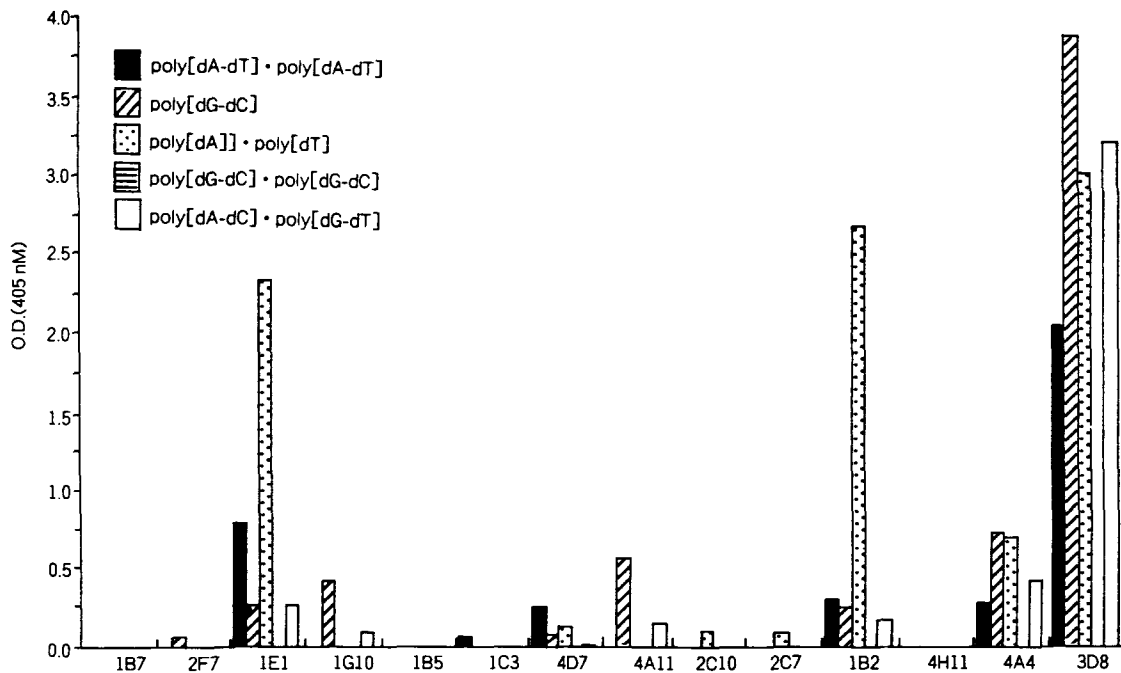


Fig. 2. Epitope mapping of anti-DNA antibodies.

항체들이 poly[dA-dT] · poly[dA-dT], poly[dG-dC], poly[dA] · poly[dT], 그리고 poly[dA-dC] · poly[dG-dT] 등과 반응을 보였으나, poly[dG-dC] · poly[dG-dC]와는 2클론만이 반응을 보였다(Table 3, Fig. 2).

Table 4. Isotype and isoelectric point of purified anti-DNA antibodies

Clone	Binding to dsDNA	Isotype	pI range
1B7	-	IgG2a	8.2~9.1
2F7	-	IgG2a	8.6~9.2
1E1	+ ^a	IgG2a	8.4~9.1
1G10	-	IgG2a	4.6~5.9
1B5	-	IgG2a	6.0~6.8
1C3	-	IgG2a	5.9
4D7	-	IgG2a	9.0
4A11	-	IgG2a	8.8~9.0
2C10	-	IgG2a	8.2~9.1
2C7	-	IgG2a	9.1~9.2
1B2	+	IgG2a	9.0~9.2
4H11	-	IgG2a	9.1~9.3
4A4	++	IgG2a	8.8~9.2
3D8	+++++	IgG2a	8.8~9.1

-: negative reaction to dsDNA but positive reaction to ssDNA

+: positive reaction to both dsDNA and ssDNA

^aO.D. was calculated by $A_{405nm}(\text{Sample}) - (2 \times A_{405nm}(\text{Blank}))$.

Each + represents 0.5 of O.D.

6. 등전위점전기영동법에 의한 항-DNA 항체의 전하측정

단일가닥 DNA-agarose 컬럼상에서 정제되지 않은 IgM 클론과 오염이 된 IgG3 클론을 제외한 15개의 IgG2a 클론으로 SDS-PAGE상에서 면역글로불린임을 확인한 후, pH농도구배범위가 3~9인 아크릴아마이드젤 상에서 등전위점 전기영동을 실시한 결과, 음전위영역에 위치한 것이 3클론, 양전위영역에 위치한 것이 11클론이었다(Table 4, Fig. 3).

고찰

자가면역질환 중의 하나인 전신성홍반성낭창의 명확한 병인기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않다. 그러나, 전신성홍반성낭창환자의 혈청에 높은 역가의 항-DNA 항체가 존재한다는 사실은 항-DNA 항체가 질환의 유발에 있어서 중요인자로 작용하리라는 것을 의미한다¹⁹~²¹. 질환의 유발과 관련이 있는 항-DNA 항체에 있어서 이종이인자형, 항원에 대한 특이성 및 항체의 전하가 중요한 특성으로 고려되고 있는데, 이들 특성들 중 어느 한 가지만에 의해서 질환이 유발되는 것이 아니라, 이 세가지가 서로 연관성을 가지고서 질환을 유발하는 것으로 생각된다.

합성된 14클론의 단클론세포들이 분비한 항-DNA 항체들은 모두 단일가닥 DNA와 반응을 보였으며, 이 중

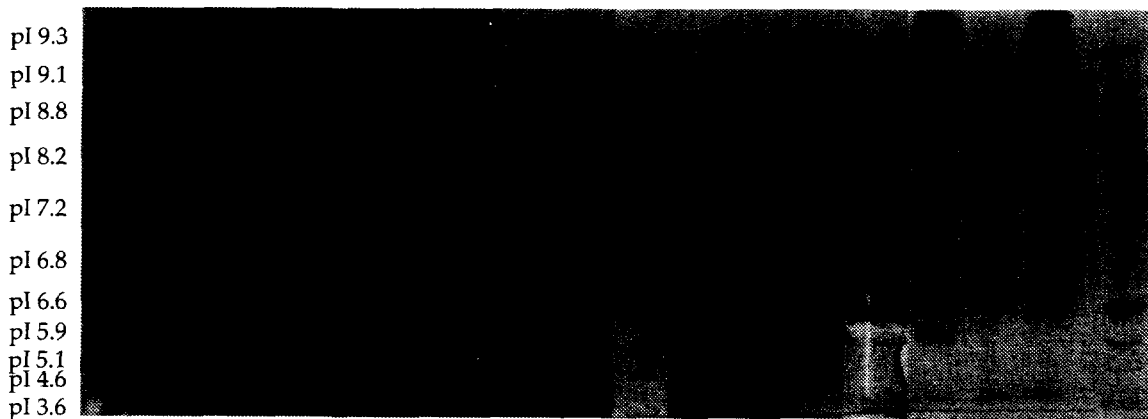


Fig. 3. Isoelectric focusing of purified anti-DNA antibodies.

Lane 1: pI marker, Lane 2: 2F7, Lane 3: 4D7, Lane 4: 2C7, Lane 5: 1E1, Lane 6: 2C10, Lane 7: 4A11, Lane 8: 1B7, Lane 9: pI marker, Lane 10: pI marker, Lane 11: 1G10, Lane 12: 1B5, Lane 13: 3D8, Lane 14: 1C3, Lane 15: 1B2, Lane 16: 4H11, Lane 17: 4A4, Lane 18: pI marker

Lane 1~Lane 7, Lane 8~Lane 9, Lane 10~Lane 14, and Lane 15~Lane 18 were separated on each other gels. Each antibodies were applied 100 ng/μl to 3~9 pH gradient gel and separated by Phast System. The band was confirmed by silver staining.

4클론만이 이중가닥 DNA와 교차반응을 보였고, Z형 DNA와는 반응을 보이지 않았다. 질환의 유발과 관련된 항-DNA 항체의 항원인 DNA형태에 따른 친화도에 대해서는 여러 견해들이 있다. 일반적으로 이중가닥의 DNA에만 반응을 보이는 것이 단일가닥의 DNA에만 반응을 보이는 것이 단일가닥의 DNA에만 반응을 하는 것 보다 질환의 유발과 훨씬 더 관련이 있다고 알려져 있다. 또한, 이중가닥 DNA와 단일가닥 DNA에 모두 반응을 보이면서, Z형 DNA 및 purine과 pyrimidine이 반복되는 염기서열로 구성된 폴리뉴클레오타이드등과 교차반응을 보이는 것이 질환의 유발과 더 깊은 관련이 있다는 보고들도 있다.^{13,15,22} 따라서, 이중가닥 DNA와 단일가닥 DNA에 모두 반응을 보인 4클론의 항-DNA 항체들은 병독성과 관련이 있을 가능성이 있다고 하겠다. 일반적으로 Z형 DNA에 대한 항체는 자가면역질환이 있는 개체의 혈청내에 상당량이 존재하는 것으로 알려져 있다.^{23,24} Z형 DNA와 B-DNA간에는 유사한 항원결정기가 존재하고 있어서, 이 두가지 형태의 DNA에 대한 항-DNA 항체는 서로 교차반응을 한다는 보고도 있다.²² 정상개체로부터 유도된 항-DNA 항체는 Z형 DNA에 대해 반응을 보이지 않으나, 자가면역질환이 있는 개체로부터 유도된 항-DNA 항체는 Z형 DNA에 대해 반응을 보인다는 보고²⁵는 정상개체와 자가면역질환이 있는 개체간의 혈청내 Z형 DNA의 존재유무를 간접적으로 설명하여 주는 것이며, 또한 질환의 유발에 Z형 DNA에 대한 항-DNA 항체가 연관이 있음을 시사해주는 것이라 하겠다. 비록 본 연구에서 얻어진 항-DNA 항체 중에는 Z형 DNA와 반응을 보이는 것이 없었지만, 병독성과 항-DNA 항체간의 연관성을 밝히는 연구를 위해서는 이중가닥 DNA와 단일가닥 DNA에 반응하면서 Z형 DNA에 반응을 보이는 클론의 확보도 필요하리라 생각된다.

Manny등²⁶은 발병시기가 늦고 질환의 정도도 미미한 NZB마우스와 정상 마우스인 SWR마우스를 교배하여 얻어진 F1과 NZB에서 항체의 repertoire를 비교한 실험에서, 두 마우스간의 혈청내 항-DNA 항체의 역가는 비슷하나, NZB의 경우 IgM의 발현빈도가 더 높게 나타나고 SWR의 경우는 IgG2a의 발현빈도가 더 높게 나타난다고 보고하였다. 경쇄의 경우, 정상항체와 자가항체들이 경쇄로 κ 체인을 지니고 있다고 알려져 있으나, 정상항체에서 보다는 자가항체에서 그 빈도가 더 높다고 알려져 있다.²⁷ 그러나, 수포성 피부질환이 있는 환자의 피부에서나 전신성홍반성낭창이 있는 환자의 항-DNA 항체와 항-Sm 항체에서 간혹 λ 체인이 발견되는 경우가 있기도 하다.^{28,29} MRL-*lpr/lpr* 마우스의 경우나

다른 자가면역질환 마우스들의 경우에 있어서 IgG 클래스 항-DNA 항체의 발현빈도가 높은 것은, 항원인 DNA에 의해서 IgG 항-DNA 항체를 생성하는 B 세포가 다른 클래스의 항-DNA 항체를 생성하는 B 세포보다 상대적으로 더 많이 생성되도록 유도되기 때문인 것으로 생각된다. IgG클래스의 항체들이 다른 클래스의 항체들보다 월등히 높은 보체고정능력을 가지고 있다는 사실과³⁰, 자가면역질환이 있는 개체에서 주로 관찰되는 항-DNA 항체들의 이중이인자형이 IgG2a이며 κ 체인의 경쇄를 갖는다는 사실들로 미루어^{12,31-33} 합성된 단클론세포들이 분비하는 항-DNA 항체들중 IgG클래스이면서 경쇄가 κ 인 항체들은 병독성을 지녔을 가능성이 있다.

합성된 단클론세포들이 분비하는 항-DNA 항체가 우선적으로 결합하는 염기서열부위를 알아보기 위해서 poly[dA-dT]·poly[dA-dT], poly[dG-dC], poly[dA]·poly[dT], poly[dA-dC]·poly[dG-dT], poly[dG-dC]·poly[dG-dC]의 5종 합성폴리뉴클레오타이드에 직접 반응시킨 후 나타나는 반응양상을 보았다. 각각의 단클론세포들이 분비하는 항-DNA 항체들이 각기 다른 반응양상을 나타내었는데, 이로보아 본 연구에서 합성된 단클론세포들이 분비하는 항-DNA 항체들은 동일 클론으로부터 생성된 것은 아니라고 생각된다. 그러나, 항-DNA 항체와의 결합에는 poly[I], poly[dT]도 관여하므로^{13,14}, 반응에 직접 관계하는 염기서열 부위를 알기 위해서는 5종류의 합성 폴리뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 이들을 포함하는 것이 바람직하리라 생각된다. 또한, 본 연구의 경우에서는 항원을 직접 well에 코팅시켜 이를 측정하였는데, 합성폴리뉴클레오타이드의 염기구조의 차이로 인해 코팅되는 양이 달라질 수 있으므로, 경쟁적 효소 결합면역흡착법을 시행하여 항-DNA 항체가 우선적으로 결합하는 염기서열부위를 좀 더 명확히 할 필요가 있을 것으로 생각된다.

질환의 유발에 있어서 항-DNA 항체가 가지는 전하가 중요한 작용을 하는 것으로 알려지고 있다. 왜냐하면, 항-DNA 항체가 표적장기인 신장의 사구체 기저막에 결합하거나, 항원인 DNA와 면역복합체를 형성하며 표적장기인 신장의 사구체에 침착한 후 질환을 유발할 때, 항-DNA 항체와 반응을 하는 사구체의 기저막과 DNA가 음전위를 띠고 있는 물질이기 때문이다. 실제로, 전신성홍반성낭창 환자의 혈액을 음성전하를 띠고 있는 황산덱스트란겔럼을 사용한 분리반출법을 시행하여 양전하를 띠고 있는 항-DNA 항체만을 제거하여 준 경우, 낭창신염의 완화가 관찰된다.³⁴ 본 연구에서 얻은 항-DNA 항체의 전하는 14클론중 10클론이 양전하를

떠고 있었다.

Segawa³⁵는 자가면역질환을 가진 개체로부터 유도한 항-DNA 항체는 이종이인자형에 따라 항체가 가지는 전하가 다르며 이종이인자형이 동일하더라도 전하는 달라질 수 있다 하였다. 그의 실험에서 IgA 클래스와 IgM 클래스의 항-DNA 항체는 pI 3.2~6.0의 음전위영역에 등전위점을 형성하였으며, IgG 클래스의 항-DNA 항체는 pI 3.2~6.0의 산성부위와 pI 7.8~10.0의 염기성부위의 두 곳에 등전위점을 형성하였다. 항체의 전하는 중쇄의 가변부위에 의해서 많은 영향을 받으며^{12,36}, Wenisch³⁷은 glycosylation도 영향을 줄 수 있을 것으로 생각된다 하였다. 본 연구에서 사용된 항-DNA 항체들 모두가 2회에 걸친 제한효소법을 통하여 얻은 단클론세포들로부터 분리, 정제하여, SDS-폴리아크릴아마이드젤 전기영동상에서 이를 확인하였으며, 항원에 대한 특이성이 있음에도 불구하고, 등전위점전기영동결과 각각의 항-DNA 항체가 협소한 범위내에서 각각 여러개의 띠를 형성하였다. 각 클론간에 형성된 등전위점의 차이는 가변부위의 차이에 의한 것으로 생각되나, 하나의 클론으로부터 생산된 항-DNA 항체가 여러개의 띠를 보인 이유는, glycosylation이 영향을 미쳐 나타난 것으로 생각된다. 이는 분리, 정제한 항-DNA 항체를 다시 전위차에 따라 분리하여 glycosylation 양상을 분석함으로써 확인할 수 있을 것이다.

이상의 사실들을 토대로 하여볼 때, 본 연구에서 얻은 항-DNA 항체들 중 이종가닥 DNA에 반응을 보이면서, IgG2a클래스이고, 양전하를 띠고 있는 4개의 클론들이 병독성과 가장 관련이 높을 것으로 생각된다. 본 연구에서 합성된 단클론세포들이 분비하는 항-DNA 항체를, 증상이 나타나지 않은 상태의 어린 MRL-*lpr/lpr* 마우스에 주사하여 증상의 유발이 촉진되는지와 정상 마우스에다 주사하여 항체의 전하에 따른 자가면역질환의 유발유무를 관찰하는 등의 추구연구를 함으로써, 항-DNA 항체의 병독성 유무를 밝힐 수 있을 것이라 생각된다.

결 론

본 연구에서는 항-DNA 항체의 병독성 유무를 규명하는데 사용할 수 있는, 여러가지 다양한 종류의 항-DNA 항체를 생산하는 하이브리도마세포의 확보를 그 목적으로 하였다. 이를 위하여 자가면역질환의 동물모델인 MRL-*lpr/lpr* 마우스의 비장세포와 마우스 골수종세포인 P3X63Ag8.653을 융합하여 항-DNA 항체를 분리

하는 하이브리도마세포를 만들었다. 또한, 이로부터 항-DNA 항체를 분리, 정제하여, 이들 항-DNA 항체의 이종이인자형, DNA의 형태에 따른 반응도, 항-DNA 항체의 항원반응기 및 전하를 측정하여 봄으로써 병인기전을 밝히는데 기초가 되고자 하였으며, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) 모두 14개의 단클론세포를 얻었다.

2) 모든 항-DNA 항체는 단일가닥의 DNA와 반응을 보였으며, 그 중 4클론은 이중가닥의 DNA와 교차반응을 보였다. 그러나 Z형 DNA와 반응을 보이는 클론은 하나도 없었다.

3) 합성된 항-DNA 항체의 이종이인자형은 IgM, κ 인 것 하나만을 제외하고는 나머지 모두가 IgG2a, κ 였으며, 경쇄가 λ 인 것은 하나도 없었다.

4) 합성폴리뉴클레오타이드에 대한 반응에서 6클론의 항-DNA 항체가 poly[dA-dT]·poly[dA-dT]와 poly[dA]·poly[dT]에, 7클론이 poly[dA-dC]·poly[dG-dT]에, 8클론이 poly[dG-dC]에 반응을 보였고, poly[dG-dC]·poly[dG-dC]와는 단 2클론의 항-DNA 항체만이 반응을 보였다.

5) 합성된 항-DNA 항체의 전하는 전체 14클론 중 3클론은 pI 3.6~7.2의 범위내에서 음전하를 띠는 음이온성 항-DNA 항체였으며, 10 클론은 pI 8.0~9.2 범위의 양전하를 띠는 양이온성 항-DNA 항체였고 나머지 1클론은 pI 7.0~7.4의 범위내에서 중성전하를 띠는 항-DNA 항체였다.

이상의 사실들을 토대로 하여볼 때, 본 연구에서 얻은 항-DNA 항체들 중 이종가닥 DNA에 반응을 보이면서, IgG2a클래스이고, 양전하를 띠고 있는 4개의 클론들이 병독성과 가장 관련이 높을 것으로 생각된다. 본 연구에서 합성된 단클론세포들이 분비하는 항-DNA 항체를, 증상이 나타나지 않은 상태의 어린 MRL-*lpr/lpr* 마우스에 주사하여 증상의 유발이 촉진되는지와 정상 마우스에다 주사하여 항체의 전하에 따른 자가면역질환의 유발유무를 관찰하는 등의 추구연구를 함으로써, 항-DNA 항체의 병독성 유무를 밝힐 수 있을 것이라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Fessel WJ: Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. Arch Intern Med 134: 1027-1035, 1974
2. Nossal GJ and Pike BL: Functional clonal deletion in immunological tolerance to major histocompatibility complex

- antigens. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3844-3847, 1981
3. Jacob L, Viard JP, Allenet B, Anin MF, Slama FB, Vandekerckhove J, Primo J, Masrkovits J, Jacob F and Bach JF: A monoclonal anti-double-stranded DNA autoantibody binds to a 94-kDa surface protein on various cell type via nucleosomes or a DNA-histone complex. Proc Natl Acad Sci USA 86: 4669-4673, 1989
 4. Raz E, Brezis M, Rosenmann E and Eilat D: Anti-DNA antibodies bind directly to renal antigens and induce kidney dysfunction in the isolated perfused rat kidney. J Immunol 142: 3076-3082, 1989
 5. Dang H and Harbeck RJ: The in vivo and in vitro glomerular deposition of isolated anti-double-stranded DNA antibodies in NZB/W mice. Clin Immunol Immunopathol 30: 265-381, 1984
 6. Ebling F and Hahn BH: Restricted subpopulations of DNA antibodies in kidneys of mice with systemic lupus: comparison of antibodies in serum and renal eluates. Arthritis Rheum 23: 392-403, 1971
 7. Gallo GR, Caulin-Glaser T and Lamm ME: Charge of circulating immune complexes as a factor in glomerular basement membrane localization in mice. J Clin Invest 67: 1305-1313, 1981
 8. Kanwar YS and Farquhar MG: Anionic sites in the glomerular basement membrane. In vivo and in vitro localization to the laminae rarae by cationic probes. J Cell Biol 81: 137-153, 1976
 9. Rubin RL and Carr RI: Anti-DNA activity of IgG F(ab')₂ from normal human serum. J Immunol 122: 1604-1607, 1979
 10. Lahita R, Kluger J, Drayer DE, Koffler D and Reidenberg MM: Antibodies to nuclear antigens in patients treated with procainamide or acetylprocainamide. N Engl J Med 301: 1382-1385, 1979
 11. Avi L, Allan H, David P, Anne L, Roberta H and Betty D: A monoclonal antibody to a cross-reactive idio type on cationic human anti-DNA antibodies expressing λ light chains: A new reagent to identify a potentially differential pathogenic subset. J Immunol 138: 123-127, 1987
 12. Jerrie G, Nicklas JA, Eastcott JW, Madaio MP, Stollar BD, Schwartz RS and Datta SK: Lupus prone(SWR \times NZB)F₁ mice produce potentially nephritogenic autoantibodies inherited from the normal SWR parent. J Immunol 134: 885-894, 1985
 13. Isenberg DA, Dudeney C, Williams W, Todd PA and Stollar BD: Disease activity in systemic lupus erythematosus related to a range of antibodies binding DNA and synthetic polynucleotides. Ann Rheum Dis 47: 717-724, 1988
 14. Joyce KM, Austin HA 3rd and Balow JE: The patient with lupus nephritis: a nursing perspective. Heart Lung 14: 75-79, 1985
 15. Thomas TJ, Meryhew NL and Messner RP: DNA sequence and conformation specificity of lupus autoantibodies. Preferential binding to the left-handed Z DNA form of synthetic polynucleotide. Arthritis Rheum 31: 367-377, 1988
 16. Argyrios NT and Frank JD: Murine models of systemic lupus erythematosus Adv Immunol 37: 269-390, 1985
 17. Gelfer G, Howe GC, Milstein C, Butcher GW and Howard JC: Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature 266: 550-552, 1977
 18. Mckearn TJ: Cloning of hybridoma cells by limiting dilution in fluid phase 374. Monoclonal antibodies, hybridoma: A new dimension in biological analysis(ed. Kennet RH, Mckearn TJ and Bechtol KB). New York, Plenum Press, 1980, pp457-472
 19. Dixon FJ, Oldston MBA and Tonietti G: Pathogenesis of immune complex glomerulonephritis of New Zealand mice. J Exp Med 134: No. 3 Pt, 2, 65(5), 1971
 20. Koffler D, Carr RI, Agnello V, Thoburn R and Kunkel HG: Antibodies to polynucleotides in humn sera: antigenic specificity and relation to disease. J Exp Med 134: 294-312, 1971
 21. Martin H, Thomas HW, Hogler F and Joachim RK: Preferential recognition of specific DNA motifs by anti-double-stranded DNA autoantibodies. Eur J Immunol 25: 1897-1904, 1995
 22. Kanai Y, Akatsuka T, Kuboa T, Goto S and Stollar BD: MRL/MP-lpr/lpr mouse derived monoclonal antibodies that recognize determinant shared by poly(ADP-ribose), single stranded DNA and left handed Z-DNA. Clin Exp Immunol 59: 139-145, 1985
 23. Lafer EM, Moller A, Nordheim A, Stollar BD and Rich A: Antibodies specific for left-handed Z-DNA. Proc Natl Acad Sci USA 78: 3546-3550, 1981
 24. Thomas TJ, Meryhew NL and Messner RP: Enhanced binding of lupus sera to the polyamine-induced left-handed Z-DNA form of polynucleotides. Arthritis Rheum 33: 335-365, 1990
 25. Rauch J, Massisotte H and Tannenbaum H: Hybridoma anti-DNA antibodies from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus demonstrate similar nucleic acid binding characteristics. J Immunol 134: 180-186, 1985
 26. Manny N, Datta SK and Schwartz RS: Synthesis of IgM by cells of NZB and SWR mice and their crosses. J Immunol 122: 1220-1227, 1979
 27. Capra JD, Kehoe JM, Winchester RJ and Kunkel HG: Structure function relationship among anti-gammaglobulin antibodies. Ann NY Acad Sci 190: 371-381, 1971
 28. Eisenberg RA, Dyer K, Craven SY, Fuller CR and Yount WJ: Subclass restriction and polyclonality of the systemic lupus erythematosus marker antibody anti-Sm. J Clin Invest 75: 1270-1277, 1985
 29. Flotte TJ and Baird LG: Immunoglobulin light and heavy chain isotypes in skin disease: restricted distribution in bullous pemphigoid and linear IgA bullous dermatosis. J Immunol 136: 491-491, 1986

30. Oi VT, Vuong TM, Hardy R, Reidler J, Dangle J, Herzenberg LA and Stryer L: Correction between segmental flexibility and effector function of antibodies. *Nature* 307: 136-140, 1984
 31. Tillman DM, Jou NT, Hill RJ and Marion TN: Both IgM and IgG anti-DNA antibodies are the products of clonally selective B cell stimulation in(NZB×NZE)F1 mice. *J Exp Med* 176: 761-779, 1992
 32. Jerrie G, Robert AS and Datta SK: The NZB×SWR model of lupus nephritis. *J Immunol* 138: 128-137, 1987
 33. Jianguo W, Tong Z, Jinju Z, Jin H, William CG and John DM: Correction of accelerated autoimmune disease by early replacement of the mutated *lpr* gene with the normal Fas apoptosis gene in the T cells of transgenic MRL-*lpr/lpr* mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2344-2348, 1994
 34. Tastuhiro H, Suzuki N, Mizushima Y and Sakane T: Usage of a novel class of germ-line Ig variable region gene for cationic anti-DNA autoantibodies in human lupus nephritis and its role for the development of the disease. *J Immunol* 153: 4806-4815, 1994
 35. Segawa A: Analysis of anti-DNA antibody in sera from patients with systemic lupus erythematosus by isoelectric focusing with respect to autoantibody isotype and immune complex. *Hokkaido Igaku Zasshi* 67: 67-80, 1992
 36. Matsuuchi L, Sharon J and Morrison SL: An analysis of heavy chain glycoproteins hybridoma antibodies: correction between antibody specificity and sialic acid content. *J Immunol* 127: 2188-2190, 1981
 37. Wenisch E, Reiter S, Hinger S, Steindl F, Taued C, Jungbauer A and Katinger H: Shifts of isoelectric points between cellular and secreted antibodies as revealed by isoelectric focusing and immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 11: 966-969, 1990
-