

항원결합에서 항-Z-DNA 단클론항체 Z44의 재조합 중쇄 및 경쇄 가변영역의 역할

아주대학교 의과대학 미생물학교실

권명희 · 주민경 · 서정규 · 김형일

=Abstract=

Role of Recombinant V_H and V_L Domains of Anti-Z-DNA mAb Z44 in Antigen Binding

Myung-Hee Kwon, Min-Kyung Chu, Jeong Kyu Seoh and Hyung-Il Kim

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

It has long been known that both heavy(V_H) and light chain variable region(V_L) of antibody are involved in antigen binding. Recently, reports for anti-DNA Abs such as Z22 and Hed-10 have revealed that V_H chain is more important than V_L in recognizing antigen. However, it is not certain yet whether the V_H chain alone of these specific anti-DNA antibodies has dominant role or such dominance of V_H chain can be applicable to other anti-DNA Abs. To investigate this possibility in connection with the role and contribution of V_L chain, experiments were performed using mAb Z44 which binds to Z-DNA but recognizes different epitopes from Z22 which share 95% sequence homology. The recombinant proteins including Z44V_H and Z44V_L were produced by *E.coli*. After purification of the these antibodies, the affinity and specificity of recombinant Ab proteins to DNA antigens were tested. The results were as follows; Z44V_H bound most strongly to Z-DNA and bound also to ssDNA, whereas Z44V_L did not bind to B-DNA, ssDNA, and Z-DNA. *In vitro* association of Z44V_H with Z44V_L has increased the affinity to Z-DNA synergistically compared with Z44V_H alone. In the case of association of Z22V_H with Z22V_L affinity to Z-DNA has showed synergistic increment compared with Z22V_H alone. However, the associations of Z44V_H with Z22V_L or Z22V_H with Z44V_L did not show any significant increments of affinity. From our findings that Z44V_H alone could bind to Z-DNA or to ssDNA and that Z44V_L could not, it could be concluded that Z44V_H has dominant role in recognizing the antigen. In addition, it may be suggested that Z44V_L can increase the affinity of Z44V_H and play some role in changing the specificity of Z44V_H.

Key Words: Z-DNA, Z44V_H, Z44V_L.

서 론

핵산에 대한 항체중 특히 DNA에 대한 항체 (항-DNA 항체)는 항체마다 B-DNA, ssDNA, Z-

DNA에 대하여 다른 결합특이성(binding specificity)을 가지고 있다¹. 항-DNA 항체가 인지하는 DNA 구조내의 epitope은 매우 다양하며, 자가면역질환의 대표적 동물모델 중 하나인 MRL-*lpr/lpr* 마우스로부터 얻은 단클론항체들 중 2C10은

ssDNA보다 dsDNA에, 특히 poly(dA-dT)나 poly(dA)·(dT)의 염기서열에 강한 결합특이성을 나타내며 단클론항체 H241은 dsDNA의 poly(dA-dT)보다는 poly(dG-dC)나 poly(dG)·(dC)에 강한 결합특이성을 나타낸다²³.

유전자 발현조절 및 재조합에 관여하는 것으로 알려진 왼쪽꼬임(left-handed)나선구조의 Z-DNA는 B-DNA 혹은 ssDNA에 비하여 면역원성(immunogenicity)이 강하므로, 마우스를 Z-DNA의 한 형태인 brominated(Br)-d(G-C)n같은 합성중합체(synthetic polymer)로 면역시킴으로써 Z-DNA에 대한 항체를 실험적으로 유도생산할 수 있다⁴. Moller등⁵은 C57BL/6마우스를 Br-d(G-C)n으로 면역시켜 Z-DNA와 반응하는 단클론 항체들을 생산하였으며 이 중 Z22(IgG2b)는 phosphodiester backbone에 작용하여 다양한 Z-DNA sequence와 결합할 수 있는 반면 Z44(IgG2a)는 Z-DNA의 d(G-C)n의 뉴클레오티드 염기(nucleotide base)의 노출 부위와만 결합한다고 보고하였다. 이들 단클론항체 가변영역의 중쇄(V_H)와 경쇄(V_L)는 모두 항-핵산 항체에 빈번하게 나타나는 V_H10 및 V_K10 gene family member로부터 유래되며 이들 V_H와 V_L(k) segment간에는 95%의 유전자 염기서열 상동성을 가지고 있다⁶.

이제까지 항원-항체 결합에 있어서 항체 가변영역의 두쇄(V_H와 V_L)가 모두 관여한다는 많은 증거들이 있으나⁷⁻¹⁰, 최근 여러 항-DNA자가항체의 연구에서는 V_H가 항원결합에 지배적인 역할을 한다는 것이 보고되고 있다. Radic등¹¹은 lupus를 가진 마우스에서 ssDNA 및 dsDNA와 결합하는 자가항체(3H9)의 V_H를 클로닝하여 3H9의 V_H gene segment를 RNA 또는 cardiolipin에 대한 V_L만을 생산하는 수종의 세포주에 transfection시켰다. 이때 모든 transfectant가 ssDNA와 결합하는 항체를 생산하였으므로 V_H가 DNA결합에 있어서 결정적인 역할을 하며, V_H와 조합을 이루었던 다양한 V_L들은 항체의 친화성(affinity)과 특이성(specificity)에 관여하여 ssDNA와 dsDNA에 대한 상대적인 결합력에 영향을 미쳤음을 보고하였다. 또한 Barry와 Lee도 NZB/NZW 마우스로부터 얻은 자가항체인 HED-10이 V_H만으로도 ssDNA와 강하게 결합한다고 하였다¹². 이러한 현상은 Z22의 경우에도 유사하여 Polymenis와 Stollar¹³는 단클론항체 Z22의 V_H만으로 scFv(single chain fragment of variable region)나 Fab 만큼 강하게, 선

택적으로 Z-DNA와 결합하였으며 V_H가 항원과 결합시 적절하지 못한 V_L이 존재 할 경우 이 V_L은 오히려 V_H와 항원과의 결합을 억제한다고 하였다.

본 연구에서는 항원과의 결합에서 V_H의 지배적인 역할이 항-dsDNA 항체나 항-ssDNA 항체에서 뿐만 아니라 항-Z-DNA항체인 Z44에서도 적용되는 현상인지, 동시에 Z44V_L의 역할은 무엇인지를 알아보고자 하였다. 이를 위하여 앞에서 언급한 단클론항체 Z22와 같이 Z-DNA와 결합하지만 인지하는 epitope이 상이한 단클론항체 Z44의 scFv가 클로닝된 유전자로부터 유전자 재조합법을 이용하여 Z44V_H 및 Z44V_L을 각각 독립적으로 subcloning하였고, 박테리아에서 발현, 정제한 후 이러한 재조합된 구조를 가진 항체의 DNA 항원에 대한 친화성 및 특이성을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시약

단백질 정제를 위한 IgG-Sepharose column(FF6)은 Pharmacia(LKB, Sweden), ELISA에 필요한 alkaline phosphatase가 결합된 항-rabbit IgG 항체는 Pierce(Rockford, IL)의 제품을, bromine water는 Fisher Scientific(Pittsburgh, PA)의 제품을 사용하였다. Poly(dG-dC)를 비롯하여 ELISA를 행할 때 항원으로 이용되는 calf thymus DNA와 그 밖의 시약들은 Sigma(ST. Louis, MO)의 제품을 사용하였다.

2. 벡터와 항체유전자

Vector pIg15, pIg17, pIg20¹⁴에 클로닝된 항체 가변영역의 유전자들, 즉 pIg15-Z44, pIg20H-Z22, pIg20L-Z22, pIg20-Z22, pIg17-Z44, pIg16L-18/2는 미국 Tufts 대학의 Dr. B.D. Stollar로부터 제공받았다.

pIg20은 박테리아의 alkaline phosphatase의 leader peptide, V_H, peptide linker(GGGGS), V_L, (His), thrombin 절단부위, *Staphylococcal* protein A의 B 영역과 번역정지부위(translational stop site)를 암호화하는 유전자들로 구성되어 있으며(Fig. 1.C). pIg20H와 pIg20L은 V_H와 V_L 유전자가 각각 subcloning된 expression vector이다. pIg15는 protein A 부위를 가지지 않으며 pIg17은 (His)와 protein

A사이에 thrombin 절단부위를 가지지 않는 것만이 pIg20과 다르다.

3. Z44V_H 및 Z44V_L의 subcloning

pIg15 vector에 삽입되어있는 Z44V_H와 Z44V_L 유전자를 pIg20vector에 옮기기 위한 첫 단계로 PCR를 행하였다. pIg15-Z44를 주형으로 Z44V_H 부위의 DNA증폭을 위하여 5' primer로서 *Xma I* 인식부위가 포함된 BO-3를, 3' primer로는 *Xba I* 인식부위가 포함된 D-2를 사용하여 94℃-1분/37℃-2분/72℃-2분의 프로그램을 20회 반복 시행하였다. Z44V_L 증폭을 위하여는 5' primer로 *Bgl II* 인식부위가 포함된 VL5Z2-4를, 3' primer로는 *Nco I* 인식부위가 포함된 VL3Z44를 사용하여 Z44V_H의 경우와 같은 조건하에서 Taq DNA polymerase를 이용한 PCR을 행하였다(Table 1).

PCR후 증폭된 DNA를 phenol/chloroform 추출법¹⁵으로 정제한 후, 정제된 V_H는 제한효소 *Sma I*과 *Xba I*으로, VL은 *Bgl II*와 *Nco I*으로 처리하였다. 동시에 pIg20H-Z22에 *Sma I*과 *Xba I*을, pIg20L-Z22에는 *Bgl II*와 *Nco I*을 처리하여 각각 Z22V_H유전자 또는 Z22V_L유전자가 제거된 벡터 pIg20H와 pIg20L을 agarose gel로 부터 추출하여 각각 Z44V_H 유전자가 Z44V_L 유전자를 subcloning하기 위한 vector로 사용하였다. Z44V_H와 Z44V_L 유전자가 삽입되어 있는 vector, 즉 pIg20H-Z44와 pIg20L-Z44를 얻기 위하여 준비된 벡터와 증폭된 V_H 또는 V_L 유전자에 T4 DNA ligase을 가하여 16℃에서 16시간 동안 반응을 진행시켰다. Electroporation(2.2kV, 25μFD, 200Ω)방법으로 반응혼합물을 competent SURE 세포에 transformation시킨 후 1ml LB broth에 옮겨 37℃에서 1시간 배양하고 Amp(100μg/ml)이 함유된 LB-agar에 spreading하였다. 자란 콜로니로부터 염기서열 분석을 행하여 pIg20H-Z44와 pIg20L-Z44임을 확인하였다.

4. 재조합 scFv, V_H 및 V_L 단백질발현 및 정제

항체 유전자가 삽입되어 있는 발현 vector를 *E. coli* BL21(pLysE)에 transformation시킨 후 Amp (100μg/ml)과 CM(20μg/ml)이 함유된 배지에서 transformation된 콜로니를 취하였다. 이 콜로니를 LB broth(1L)에 접종하여 37℃ 진탕배양기에서 A₆₀₀ 값이 0.5가 될때 까지 배양한 후 최종농도 1mM가 되도록 IPTG를 가하여 다시 25℃에서

4~8시간 배양하였다. 배양액을 4,000g로 30분간 원심분리하여 발현, 분리된 V_H 혹은 V_L 단백질이 존재하는 상청액을 얻은 후 0.45μm filter로 여과시킨 후 여과액 1L에 0.5M EDTA(pH8.0) 10ml과 Tween 20 1ml를 가하였다. 여과액을 IgG-Sepharose 컬럼(bed vol.:2ml)에 30ml/hr의 속도로 loading하고 TBST(Tris-buffered saline with 0.05% Tween 20)로 A₂₈₀이 0이 될 때까지 컬럼을 세척하였다. 이에 5mM ammonium acetate(pH 5.0) 4ml로 다시 세척하고 0.1M acetic acid(pH3.4 4ml)로 scFv-protein A, V_H-protein A 혹은 V_L-protein A fusion protein을 분획당 2ml로 elution시킨 후 각 분획에 1M Tris(pH9.0) 0.2ml을 가하여 중화시켰다. IgG-Sepharose컬럼을 통하여 정제된 항체 단백질의 분자량과 순도는 10-15% gradient acrylamide gel상에서 SDS-PAGE를 행한 후 은염색(silver staining)하여 확인하였다.

5. Z-DNA 제조

Moller등¹⁶의 방법을 따라서 Z-DNA를 제조하였다. 즉 10 Units의 poly(dGd-C)를 100ml의 50mM NaCl에 녹인 후 5M NaCl 400ml를 첨가하고 안정한 Z form으로 완전히 전환시키기 위하여 37℃에 30분간 실온에 방치하였다. 방치 후 4M NaCl 500μl에 녹아있는 poly(dG-dC)를 450μl의 NaCl과 220mM sodium citrate (pH 7.2)를 100μl 가하여 잘 섞고 1:10으로 희석된 bromine water를 A₂₆₀/A₂₈₀ 비율이 약 0.35에 가깝게될 때까지 소량씩 첨가하여 브롬화반응을 수행하였다. 반응 종료 후 PBS(pH 7.4)에서 투석시키고 정량하여 항-DNA항체에 대한 항원으로 사용하였다.

6. ELISA

Polystyrene재질의 96 well microtiterplate의 각 well에 PBS(pH7.4)에 녹인 0.1ml의 DNA(1mg/ml)를 도포하고 1시간 동안 실온에 두었다. 이때 항원으로서의 ssDNA는 dsDNA를 100℃에서 10분간 가열함으로써 변성시키고 즉시 얼음에서 식힌 후 사용하였다. 이 plate를 PBST(0.1% Tween 20/PBS)로 3회 세척한 후 blocking buffer(0.1% BSA, 0.1% Tween 20, 0.02% sodium azide)를 넣어 다시 한 시간동안 두었다. 한 시간 후 정제한 항-DNA 항체(scFv, V_H 혹은 V_L) 0.1ml을 넣고 실온에서 1시간 방치하였으며 다시 각 well을 PBST로 3회 세척하였다. 이에 0.1m의 토끼 IgG(20mg/

ml)를 넣고 1시간 동안 실온에 방치하였고 alkaline phosphatase가 결합된 토끼 IgG에 대한 항체를 0.1ml씩 각 well에 가하였다. 한 시간후 각 well를 PBST로 3회 세척하고 기질 buffer(50mM sodium carbonate, 2mM MgCl₂, 0.02% sodium azide)에 녹인 p-PNPP(2mg/ml) 0.1ml을 넣고 405nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한 B-DNA, ssDNA 및 Z-DNA에 대한 항체 결합부위 특이성을 알아보기 위하여 competitive ELISA를 수행하였다. 항원으로서 Z-DNA 또는 ssDNA(1µg/ml) well에 도포하였고, 항체의 농도는 62.6nM 이었으며, 7.5µg/ml의 competitor들(Z-DNA, B-DNA, ssDNA)을 1:3씩 희석하여 0.01µg/ml의 농도까지 준비하여 항체를 차단하도록 항체용액과 혼합하여 30분간 실온에 방치한 후 well에 가하여 EL-

ISA를 수행하였다.

7. 항체의 in vitro association

각각 정제된 항체의 V_H와 V_L을 blocking buffer (0.1% BSA, 0.1% Tween 20, 0.02% sodium azide)에서 동일한 몰농도로 혼합한 후 4℃에 8시간 두어 두 단백질이 서로 folding하여 항체의 항원결합부위가 재형성되도록 하였다¹⁷.

결 과

1. 재조합 scFv, V_H 및 V_L 단백질 정제

IgG-Sepharose컬럼으로 정제한 각 재조합 단백질양은 Table 2와 같았다. SDS-PAGE(Fig. 2)로 정제된 항체 단백질의 크기와 순도를 확인한 바,

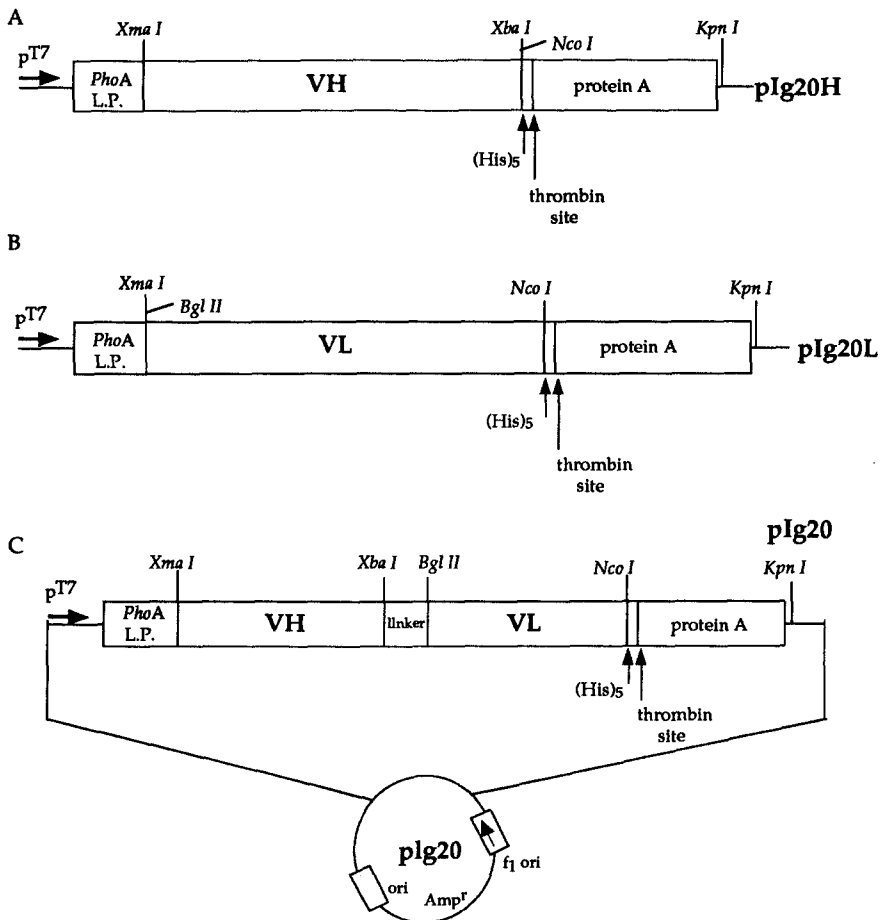


Fig. 1. The pIg20H, pIg20L and pIg20 expression vectors. Under control of T7 promoter the vectors encode a secretion signal peptide of bacterial alkaline phosphatase(PhoA L.P.), V_H(or V_L or both) of Ab, (His)₅, thrombin cleavage site, and B domain of *S. aureus* protein A. pIg20 is composed of V_H and V_L chains joined together by a flexible peptide linker which is(GGGGS)₃.

ANTIGEN BINDING OF RECOMBINANT ANTI-Z-DNA ANTIBODIES

Z44V_H, Z22V_H, Z22scFv, Z22V_L, 18/2V_L 항체 단백질은 단일물질로 확인되었으나 Z44scFv와 Z44V_L은 약 80% 정도, 부분적으로만 정제되었다. SDS-PAGE상에서 보여진 정제된 항체 단백질의 분자량은 Z44V_H, Z44V_L, Z22V_H, Z22V_L 및 18/2V_L은 예상대로 20~23kDa의 band를, Z22scFv나 Z44scFv는 약 43kDa의 band를 나타내었다.

2. 항원에 대한 항체의 친화성

각 항체의 DNA항원에 대한 친화성을 알아보기 위하여 1µg/ml의 B-DNA, ssDNA 및 Z-DNA 항원과

62.5nM의 재조합 항체를 사용하거나(Table. 3) 또는 2µg/ml의 항원과 다양한 농도의 재조합 항체를 사용하여 direct binding ELISA를 행하였을 때(Fig. 3), Z44scFv 및 Z22scFv는 B-DNA, ssDNA와는 결합하지 않았고 Z-DNA와 강한 결합을 보였다. Z22V_H도 Z22scFv보다 민감도는 약하지만 Z-DNA와는 결합하나 B-DNA, ssDNA와 결합하지 않았으며 이들 군간에 통계적으로 유의한 차이(p<0.05)를 보여 Z22V_H가 Z-DNA와 특이적으로 결합함을 알 수 있었다. Z44V_H는 Z22V_H와는 달리 ssDNA와도 강하게 결합하였다. 그러나 Z-DNA와의 결합보다는 약하여 Z-DNA의 약 80% 정도의 친화성을 보였으며 이는 통계적으로 유의하였다. Z44V_L과 Z22V_L은 어느 DNA 항원과의도 결합하지 않았다.

Z22V_H에 Z22V_L을 섞어 *in vitro* association시켰을 때 Z-DNA와의 친화성이 현저히 높게 나타나 Z22V_H 단독에 비하여 유의한(p<0.05) 증가(약 2.4배)를 보였다. Z44V_H에 Z44V_L을 섞은 경우에도 Z44V_H 단독에 비하여 Z-DNA에 대한 결합도가 증가 하기는 하였으나 증가정도가 미미하였다(Table. 3). 그러나 항원의 농도를 2µg/ml, 항체의 농도를 3.08nM, 9.25nM, 27.7nM, 83.5nM 및 250nM로 변화시켜 측정하였을 때에는 Z-DNA에 대하여 V_H 단독일 때보다 상승적인 결합력의 증가효과를 보였다(Fig. 3A). Z44V_H에 Z22V_L을 섞었을 때 Z44V_H 단독에 비하여 Z-DNA에 대한 친화성의 증가를 관찰할 수 없었다. Z22V_H에 Z44V_L을 섞은 경우에도 Z22V_H 단독일 때 보다 Z-

Fig. 2. SDS-PAGE analysis of antibodies purified on IgG-Sepharose. Lane 1; molecular weight marker, Lane2; Z22V_H, Lane3; Z22V_L, Lane4; 18/2V_L. Antibodies(100ng) were subjected to electrophoresis in a 10-15% poly acrylamide gel. Protein bands were visualized by staining with silver nitrate.

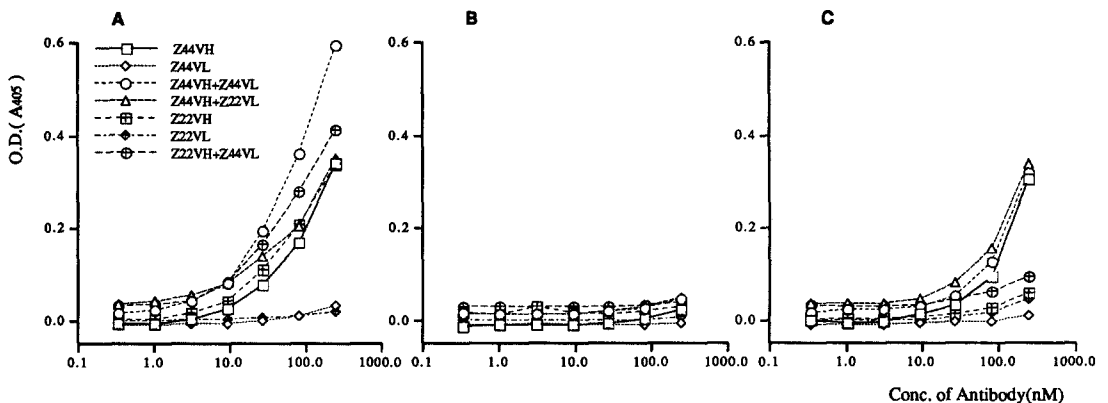


Fig. 3. Direct binding of various concentrations of recombinant anti-DNA antibodies to immobilized DNA antigens(A; Z-DNA, B; B-DNA, C; ssDNA), The wells of UV-treated polystyrene plates were coated with 100µl of Z-DNA, B-DNA and ssDNA(2µg/ml) and ELISA were performed as described in the material and method section. X axis was expressed in logarithmic value.

DNA에 대한 친화성이 증가하였으나 그 증가 정도가 두드러지지 않았다.

따라서 친화성이 증가하기 위해서는 동일한 항체로 부터 생성된 V_H 와 V_L (Z44V_H·Z444V_L 혹은 Z22V_H·Z22V_L)이 필요함을 알 수 있었다. V_H 와 V_L 을 섞어준 모든 경우에 V_H 단독으로 반응시켰을 때와 비교하여 B-DNA나 ssDNA에 친화성의 변화는 관찰할 수 없었다(Fig. 3B, 3C)

마우스가 아닌 사람에서 유래한 항-DNA 항체로 부터 얻은 18/2V_L은 Z22V_L 및 Z44V_L과 마찬가지로 어느 DNA항원과도 결합하지 않았으며, Z44V_H 및 Z22V_H와 각각 association시켰을 때에도 모든 DNA 항원과의 친화성에 변화를 주지 않았다.

3. Competitive ELISA

3. Competitive ELISA

V_L 첨가시 나타나는 Z-DNA에 친화성의 증가가 항원특이성이 있는지를 알아 보고자 competitive ELISA를 수행하였다(Fig. 4, 5). 항원으로 Z-DAN(1 μ g/ml)를 도포한 후 항체(62.5nM) 용액

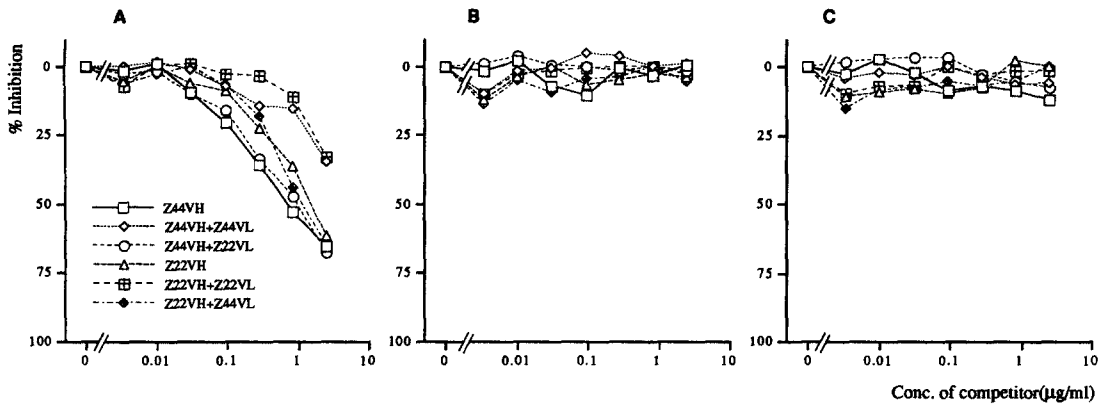


Fig. 4. Competitive ELISA in DNA binding affinity of anti-DNA antibodies using Z-DNA as an antigen. Various concentrations of competing Z-DNA(A), B-DNA(B), or ssDNA(C) were incubated with equimolar amounts(62.5nM) of antibody in solution for 30 min. and the mixture was added to wells of plates coated with 1 μ g/ml of Z-DNA

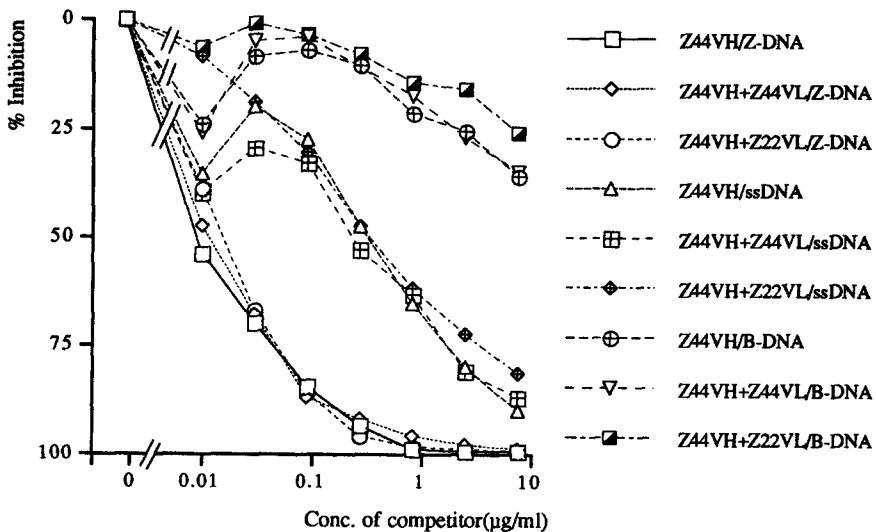


Fig. 5. Competitive ELISA in DNA binding affinity of anti-DNA antibodies using ssDNA as an antigen. Various concentrations of competing Z-DNA, B-DNA or ssDNA were incubated with equimolar amounts(62.5nM) of antibody in solution for 30min. and the mixtures were added to wells of plates coated with 1 μ g/ml of ssDNA.

ANTIGEN BINDING OF RECOMBINANT ANTI-Z-DNA ANTIBODIES

Table 1. Primers used for PCR amplification

| Primer | Nucleotide sequence | No. of bases |
|---------|---|--------------|
| BO-3 | 5'-GGC <u>CCG GGT</u> GCA ACT TGT TGA GTC TG-3' <i>Xma I</i> | 26 |
| D-2 | 5'-GCT CTA GAG GAG ACG GTG ACT GAG GTT C-3' <i>Xba I</i> | 28 |
| VL5Z2-4 | 5'-CGA GAT CTC CAG ATG ACG CAG AC-3' <i>Bgl II</i> | 23 |
| VL3Z44 | 5'-AAA CCA TGG AAC CGT TTT ATT TCC AGC-3' <i>Nco I</i> | 27 |

BO-3 and D-2 were used as primers for PCR amplification of Z44V_H. BO-3 is complementary to the V_H5'-end and D-2 is to the V_H3'-end. VL5Z2-4 and VL3Z44 were 5'- and 3'-end primers of Z44V_L.

과 다양한 농도의 competitor들(B-DNA, ssDNA 및 Z-DNA)을 혼합하여 ELISA를 수행한 바 ssDNA나 B-DNA를 competitor로 사용하였을 때에는 항원과의 결합억제 효과가 관찰되지 않았다. 그러나 Z-DNA를 competitor로 사용하였을 때에는 현저한 억제효과가 관찰되었다. 이러한 억제효과는 Z44V_H에 Z44V_L을, Z22V_H에 Z22V_L을 첨

가했을때 보다 Z44V_H 혹은 Z22V_H를 단독으로 반응시키거나 Z44V_H에 Z22V_L을, Z22V_H에 Z44V_L을 첨가했을때 더 높게 나타났다 (Fig. 4). Z44V_H는 ssDNA와도 결합하였으므로 ssDNA와의 결합에 Z-DNA 및 B-DNA도 영향을 미치는 요인으로 작용하는지 알기 위하여 ssDNA를 항원으로 하여 competitive ELISA를 수행한 결과, Z44V_H 단독 및 Z44V_L이나 Z22V_L을 첨가하였던 모든 경우에서 항원과의 결합억제효과가 ssDNA보다도 Z-DNA에 의해 더 크게 나타났다(Fig. 5).

Table 2. The amounts of recombinant antibody proteins purified on IgG-Sepharose column

| Antibody | protein amount(mg/L) |
|--------------------|----------------------|
| Z44scFv | 2 |
| Z44V _H | 5 |
| Z44V _L | 1.2 |
| Z22scFv | 0.6~1 |
| Z22V _H | 9 |
| Z22V _L | 5~10 |
| 18/2V _L | 5 |

고찰

Z-DNA에 결합하는 재조합 단클론항체 Z44와 Z22의 scFv, V_H 및 V_L을 박테리아 세포를 이용해 생산하여 항원결합에 있어서 V_H와 V_L 각각의 역할을 조사하였다. 항원결합에 있어서 Polymenis와 Stollar¹³는 BIAcore를 이용하여 친화성을 측정

Table 3. Antigen binding property of Z22 and Z44 antigodies

| Antibody | Antigen(1µg/ml) | | |
|--------------------------------------|-----------------|-------------|----------------|
| | B-DNA | ssDNA | Z-DNA |
| 62.5nM | | | |
| Z44scFv | 0.065±0.001 | 0.086±0.003 | 0.887±0.110 |
| Z44V _H | 0.107±0.006 | 0.377±0.016 | 0.466±0.035* |
| Z44V _L | 0.064±0.002 | 0.063±0.001 | 0.067±0.001 |
| Z44V _H +Z44V _L | 0.122±0.021 | 0.374±0.028 | 0.538±0.068 |
| Z22scFv | 0.068±0.002 | 0.100±0.006 | 0.595±0.077 |
| Z22V _H | 0.068±0.001 | 0.084±0.005 | 0.181±0.013** |
| Z22V _L | 0.063±0.001 | 0.064±0.001 | 0.074±0.003 |
| Z22V _H +Z22V _L | 0.060±0.002 | 0.068±0.003 | 0.460±0.059*** |

The values are O.D. at 405nm, Values are mean±S.D., *: p<0.05 vs Z44V_H-ssDNA by Mann-Whitney U-test
: p<0.05 vs Z22V_H-ssDNA by Mann-Whitney U-test, *: p<0.05 vs Z22V_H-Z-DNA by Mann-Whitney U-test

한 결과 Z22V_H, Z22scFv, Z22Fab, Z22Fv(V_H-V_L dimer) 모두는 Z-DNA에 대한 친화성이 거의 같았으므로 Z22Fab와 scFv의 결합능력은 V_H 단독적인 작용으로 인해 나타나며 V_L 단독으로는 항원결합에 관여하지 않았다고 보고하였다. 본 연구결과도 Z44V_H만으로 항원과 결합하였으며 Z44V_L만으로는 결합력이 없어 Z22와 마찬가지로¹³ Z44의 경우에도 V_L이 아니라 V_H가 항원과의 결합에 중요함을 알 수 있었다. 이러한 V_H의 중요성은 항-ssDNA 항체인 Hed-10의 경우¹²나, lupus 마우스 항-dsDNA 항체인 2C10의 경우^{18,19}와도 일치하므로 적어도 관찰된 몇몇 항-DNA항체의 경우에는 항원과의 결합에 V_H가 주된 역할을 한다고 생각된다.

Z22scFv, Z22V_H 및 Z44scFv가 Z-DNA와 특이적으로 결합하는 반면 Z44V_H는 ssDNA에 대하여도 Z-DNA의 80%에 미치는 친화성을 가지고 있어 Z-DNA에 대한 특이성이 낮았다. Z44V_H에 Z44V_L을 섞었을 때 항원의 농도가 1µg/ml, 항체의 농도가 62.5nM이었을 때에는 Z44V_L에 의한 Z44V_H의 상승적 친화성 증가는 관찰되지 않았으나(Table. 3) 항원의 농도를 2µg/ml, 항체의 농도를 250nM로 증가시켰을 때에는 Z44V_H보다는 Z-DNA에 친화성이 상승적(synergistic)으로 증가하였으며(Fig. 4A) ssDNA에 대한 친화성은 변화가 없었다(Fig. 3C). Z22V_H에 Z22V_L을 섞었을 때에는 5배 이상 친화성이 증가하여 Z22scFv와 유사한 정도의 친화성을 보였다(Table. 3) 이러한 Z22와 Z44간의 V_L에 의한 친화성 증가효과가 차이를 보인 이유는 Z44V_L자체가 가지는 증가효과가 Z22V_L과는 다를 수도 있기 때문이라 생각된다^{20,21}. V_H 단독으로 ssDNA와도 결합하였던 Z44의 경우, Z44V_L을 섞었을 때에도 ssDNA와 결합하여 V_L 첨가에 따른 특이성의 변화가 관찰되지 않았다(Table. 3). 그러나 Z-DNA에 대한 친화성은 상승적으로 증가한 반면(Fig. 3A), ssDNA에 대하여는 V_H 단독일 때와 같은 친화성을 유지하였으므로(Fig. 3C) Z44V_L은 항원특이성도 증가시킬 것으로 추측된다. V_H와 V_L이 모두 존재하는 Z44scFv도 Z-DNA에만 특이성을 보이는 점으로 미루어, Z44V_H와 Z44V_L을 섞은 혼합액이 ssDNA와 반응을 보인 이유는 V_L이 특이성의 변화에 관여하지 않는다고보다는 *in vitro* association시킨 후 형성된 Z44V_H · Z44V_L dimer만을 따로 분리정제하지 않았으므로 association되지 않은 V_H가 작

용하였기 때문으로 생각된다. *In vitro* association 반응 후 형성된 dimer만을 gel filtration과 같은 방법으로 정제하여 결합 여부를 측정한다면 V_L이 특이성에 영향을 미치는지의 여부를 더욱 명확히 할 수 있을 것이다.

Z44V_H에 다른 항체로부터 유래된 Z22V_L을 첨가하였을 때에는 친화성이나 특이성의 변화가 관찰되지 않았으며 Z22V_H에 Z44V_L을 첨가하였을 때에도 친화성이 증가하기는 하였으나 그 정도가 미미하였고 별다른 특이성의 변화를 보이지 않았다. 또한 사람의 항-DNA 항체인 18/2의 V_L을 Z22V_H 또는 Z44V_H에 첨가하였을 때에도 B-DNA, ssDNA, 및 Z-DNA에 대하여 Z22V_H 또는 Z44V_H 또는 Z44V_H 단독일 때와 동일한 친화성 및 특이성을 유지하여 항원결합에 아무런 영향을 미치지 않았다. 이는 18/2가 사람에서 유래한 것이기 때문에 마우스 유래의 V_H와는 association하지 않았거나 association하였더라도 항원결합부위에는 영향을 주지않아 나타난 결과로 생각된다. 이러한 결과들로 미루어 보아 항체가 일정한 친화성과 특이성을 유지하기 위하여는 동일한 항체에도 유래된 V_H · V_L의 dimer (Z44V_H · Z44V_L, Z22V_H · Z22V_L)가 필요하다고 생각된다. Polymenis와 Stollar는¹³ 특정 V_H에 부적절한(nonpermissive) V_L(예: LZ1-2V_L)이 함께 3차 구조를 이룰 때는 친화성을 감소시킨다고 보고하였으나 본 연구에서는 서로 다른 항체에서 유래된 V_H와 V_L을 혼합하였을 때(Z44V_H · Z22V_L, Z22V_H · Z44V_L) 이러한 친화성 감소 현상은 관찰되지 않았다.

항원으로 Z-DNA를 사용하여 시행한 경쟁적인 ELISA결과(Fig. 5), Z-DNA에 의해서만 억제효과가 나타나 이들의 친화성 증가효과가 Z-DNA에 대해 특이적임을 확인 할 수 있었다. 또한 ssDNA를 항원으로 사용하였을 때에도 ssDNA보다 Z-DNA에 의하여 항원결합 억제효과가 더 크게 나타났(Fig. 5). ssDNA는 Z44V_H와 Z-DNA와의 결합을 억제하지 못하였던 반면, Z-DNA는 ssDNA와 결합을 ssDNA보다 더 강하게 억제하였으므로 Z44V_H가 인식하는 주된 항원은 Z-DNA임을 알 수 있었다. 이상의 결과로 미루어 항-DNA 항체의 항원결합에 있어서 V_H가 주된 역할을 하며 V_L은 V_H가 가지는 친화성을 증가시키고 특이성을 변화에 관여할 것으로 추측된다. 그러나 Z44V_H, Z22V_H, Z44V_H · Z22V_L 및 Z22V_H

ANTIGEN BINDING OF RECOMBINANT ANTI-Z-DNA ANTIBODIES

· Z44V_L보다 Z44V_H · Z44V_L과 Z22V_H · Z22V_L이 Z-DNA에 의한 억제 효과가 낮은 경향을 보여 특이성을 증가에 관여할 것으로 믿어지는 V_L의 역할에 대하여는 더 많은 추구 연구가 이루어져야 이를 명확히 할 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Bergen HR III, Losam MJ, O'Connor T, Zacharisa W, Larson JE, Accavitti MA, Wells RD and Koopman WJ: Specificity of monoclonal anti-Z antibodies from unimmunized MRL/MP-lpr/lpr mice. *J Immunol* 139: 743-748, 1987
2. Stollar BD: Immunological analyses of nucleic acids. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 42: 39-77, 1992
3. Stollar BD, Zon G and Pastor RW: A recognition site on synthetic helical oligonucleotides for monoclonal anti-native DNA autoantibody. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 4469-4473, 1986
4. 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
5. Moller A, Gabriels JE, Lafer EM, Nordheim A, Rich A and Stollar BD: Monoclonal antibodies recognize different parts of Z-DNA. *J Biol Chem* 257: 12091-12096, 1982
6. Brigido MM and Stollar BD: Two induced anti-Z-DNA monoclonal antibodies use VH gene segments related to those of anti-DNA autoantibodies. *J Immunol* 146: 2005-2009, 1991
7. Metzger H and Wofsy L: The participation of A and B polypeptide chains in the active sites of antibody molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 51: 367-381, 1964
8. Singer SJ and NO Thorpe: On the location and structure of the active sites of antibody molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 60: 1371-1378, 1968
9. Davies DR, Padlan EA and Sheriff S: Antibody-antigen complex. *Ann Rev Biochem* 59: 439-473, 1990
10. Rumbley CA, Denzin LK, Yantz L, Tetin SY and Voss EW Jr: Construction, characterization, and selected site-specific mutagenesis of an anti-single-stranded DNA single-chain autoantibody. *J Biol Chem* 268: 13667-13674, 1993
11. Radic MZ, Mascelli MA, Erikson J, Shan H and Weigert M: IgH and L chain contributions to autoimmune specificities. *J Immunol* 145: 176-182, 1991
12. Barry MM and Lee JS: Cloning and expression of an autoimmune DNA-binding single chain Fv: only the heavy chain is required for binding. *Mol Immunol* 30: 833-840, 1993
13. Polymenis M and Stollar BD: Domain Interactions and antigen binding of recombinant anti-Z-DNA antibody variable domains. *J Immunol* 154: 2198-2208, 1995
14. Brigido MM, Polymenis M and Stollar BD: Role of mouse VH10 and VL gene segments in the specific binding of antibody to Z-DNA, analyzed with recombinant single chain Fv molecules. *J Immunol* 150: 469-479, 1993
15. Sambrook JE, Fritsch EF and Maniatis T: *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor, 1989, pp1.25-1.28
16. Moller A, Nordheim A, Kozlowski SA, Patel DJ and Rich A: Bromination stabilizes poly(dG-dC) in the Z-DNA from under low-salt conditions. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 3546-3550, 1981
17. Horne C, Klein M, Polidoulis I and Dorrington KJ: Noncovalent association of heavy and light chains of human immunoglobulins III. Specific interactions between VH and VL. *J Immunol* 129: 660-664, 1982
18. Jang YJ and Stollar BD: Ultraviolet cross-linking of helical oligonucleotides to two monoclonal MRL-lpr/lpr anti-DNA autoantibodies: variations in H and L chain binding to DNA. *J Immunol* 145: 3353-3359, 1990
19. Jang YJ and Stollar BD: in press, in *Mol Immunol*, 1995
20. Wu TT and Kabat EA: An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity.

Korean J. Immunol. 18: 333~342, 1996

J Exp Med 132: 211-250, 1970

21. Polymenis M and Stollar BD: Critical binding

site amino acids of anti-Z-DNA single chain Fv
molecules. J Immunol 152: 5318-5329, 1994

