

Protein kinase C 매개 인산화에 의한  
HMGB1 분비 조절 기전

연세대학교 대학원

의과학과

오 영 주

Protein kinase C 매개 인산화에 의한  
HMGB1 분비 조절 기전

지도 신 전 수 교수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2007년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

오 영 주

오영주의 석사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2007년 12월

## 감사의 글

지난 2년 동안 제가 과학을 공부할 수 있도록 기회를 주시고 한결같이 옹운 길로 지도해 주신 신전수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 그리고 저의 연구를 관심있게 지켜봐 주시고 지도해 주신 최인홍 교수님과 윤호근 교수님께도 감사를 드립니다. 또한 이원영 교수님, 김세종 교수님, 박전한 교수님, 조상래 교수님, 이봉기 교수님, 김종선 교수님, 이재면 교수님, 조성에 교수님께도 감사 드립니다.

서투른 제가 실험을 할 수 있도록 도와주신 윤주호 선생님과 따뜻한 격려와 조언을 해주신 은숙언니와 수인언니에게 감사드립니다. 실험실 생활이 낯설었던 저에게 격려해주고 조언해준 필성 선생님, 힘들어 할 때마다 존재만으로 힘이 되어준 선화언니, 실험실 생활하는데 산소 같은 존재였던 셋별이, 항상 옆에 있어준 상은이, 같이 논문 준비하던 미화언니, 늘 도와주던 아름언니, 처음 들어왔을 때부터 한결같이 챙겨주고 도와주신 형란언니와 은정언니에게도 감사를 드립니다. 늘 밝은 미소로 도와주신 고시환 선생님과 항상 친절하셨던 김주영 선생님, 장난을 다 받아주던 민경언니, 현주언니, 소영이, 정신 선생님, 주말에도 고생하는 진원선생님, 동위원소 실험할 때 자상하게 도와주셨던 이정화 선생님, 언제나 밝은 모습으로 대해주시는 김지수 선생님, 김영미 선생님, 볼 때 마다 친절하게 웃어주는 민경 언니에게도 감사 드립니다. 또 실험실 밖에서도 제가 공부하는데 늘 버팀목이 되어준 물리학도 조영이, 언제나 자기 일같이 생각하고 충고해주고 힘이 되어준 성필 선생님, 말이 필요 없는 최고의 선물 지혜와 서희, 공부한다는 핑계에 늘 연락이 없어도 항상 이해해주고 받아주는 혜영이, 화정이, 민정이, 민선이, 지혜, 격려해주던 영환, 재호, 종훈 선생님에게도 감사 드립니다. 마지막으로 저를 한결 같은 사랑으로 보듬어주시고 저의 부족함을 채워주신 사랑하고 존경하는 아버지와 어머니, 동원오빠에게 진심으로 감사를 드립니다.

과학에 대한 흥미와 열정으로 시작한 길이었습니다. 많은 교수님들과 선생님들의 가르침이 헛되지 않도록 앞으로도 지금의 가르침을 잊지 않고 발전해나가는 사람이 되겠습니다.

# 차례

국문요약 .....	1
I. 서론.....	4
II. 재료 및 방법	
1. 세포주 배양.....	8
2. 시료처리 및 샘플준비.....	9
3. Western blotting.....	10
4. MTT assay.....	11
5. DNA 플라스미드 준비.....	11
6. 공초점 현미경.....	12
7. 면역침강법.....	12
8. <i>In vitro</i> kinase assay.....	13
III. 결과	
1. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 LPS 자극 후 활성화 되는 MAPK, NF- $\kappa$ B, PI3K와 HMGB1 분비의 연관성.....	15
2. <i>In vitro</i> kinase assay에서 cPKC에 의한 HMGB1 인산화.....	21
3. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 Ca <sup>2+</sup> 의존적인 HMGB1 분비.....	23
4. cPKC에 의한 HMGB1의 인산화.....	23
5. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 higenamine 유도체에 의한 HMGB1의 인 산화 및 분비억제.....	26
IV. 고찰.....	29
V. 결론.....	33
참고문헌.....	35
영문요약.....	42

## 그림차례

그림 1. LPS에 의해 활성화 되는 신호전달경로.....	16
그림 2. RAW264.7 세포에서 LPS 자극 후 HMGB1의 분비 측정.....	16
그림 3. RAW264.7 세포에서 MAPK 신호전달경로 억제제 전처리 후 LPS 자극에 따른 HMGB1의 분비량 변화.....	17
그림 4. RAW264.7 세포에서 NF- $\kappa$ B 신호전달경로 억제제 전처리 후 LPS 자극에 따른 HMGB1의 분비량 변화.....	18
그림 5. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 PI3K, AKT, PKC 신호전달경로 억제제 전처리 후 LPS 자극에 따른 HMGB1의 분비량 변화.....	20
그림 6. <i>In vitro</i> kinase assay를 이용한 HMGB1의 인산화.....	22
그림 7. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 Ca <sup>2+</sup> 농도 변화에 따른 HMGB1의 분비량 변화.....	24
그림 8. PKC $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ 에 의한 HMGB1의 인산화.....	25
그림 9. Higenamine 유도체(CKD-712)의 세포 독성.....	27
그림 10. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 CKD-712에 의한 HMGB1의 분비 및 인산화 억제.....	28
그림 11. 본 실험을 통해 제시하는 HMGB1의 인산화 기전 및 CKD-712의 작용 기전.....	32

국문요약

## Protein kinase C 매개 인산화에 의한 HMGB1 분비 조절 기전

HMGB1 은 진핵세포에 존재하여 핵 안에서 DNA 의 전사를 조절하는 핵단백으로 알려졌으나 lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$  의 자극에 의해 세포 밖으로 분비된다. 분비된 HMGB1 은 전염증성 cytokine 의 성질을 가지며 이는 동맥경화, 패혈증, 관절염, 출혈성 쇼크 등의 systemic inflammation 에 주요한 매개 물질이다. HMGB1 은 인산화, 아세틸화 등의 post-translational modification 을 거치게 되면 DNA 와 결합력이 약해지면서 secretory lysosome 을 거쳐 세포 밖으로 분비된다. 본 실험실에서는 선행연구를 통해 HMGB1 의 인산화가 분비를 일으키는 주요한 기전임을 보고하였다. 그러나 HMGB1 분비와 관련되는 신호전달과정은 아직 잘 알려지지 않았다. HMGB1 의 분비기전을 규명하는 것은 패혈증을 포함한 다양한 염증 질환의 치료제를 개발하기 위해 필수적이다.

본 실험은 LPS 에 의해 활성화되는 mitogen-activated protein kinase (MAPK), nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) 억제제를 사용하여 실험한 결과, HMGB1 의 분비는 PI3K 와 연관성이 있음을 밝혔다. 또한 PI3K 의 downstream 에 있는 protein kinase B (Akt), mammalian target of rapamycin (mTOR), conventional protein kinase C (cPKC) 억제제를 사용하여 HMGB1 의 분비에 영향을

관찰한 결과 cPKC inhibitor 가 HMGB1 분비를 감소시켰다.  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]를 사용한 *in vitro* kinase assay 상에서 cPKC 가 HMGB1 을 인산화 시킨 것을 확인 할 수 있었다. cPKC 는 HMGB1 의 nuclear localization sequence (NLS)에 있는 serine 을 alanine 으로 치환시킨 mutant HMGB1 을 인산화 시키지 못했다. 이 결과들을 토대로 cPKC 는 HMGB1 NLS 의 serine 을 인산화 시키는 kinase 로 HMGB1 의 분비를 조절하는 kinase 임을 알 수 있었다. 세포 내에서  $Ca^{2+}$ 이 증가되면 HMGB1 의 분비가 일어나고  $Ca^{2+}$ 이 억제되었을 경우 LPS 자극 후에도 HMGB1 의 분비가 감소하는 것으로 보아 HMGB1 의 분비는  $Ca^{2+}$ 에 의해 조절 받으며, cPKC 는  $Ca^{2+}$ 에 의해 활성화 되므로 이를 통해 HMGB1 의 분비는  $Ca^{2+}$  의존적인 cPKC 의 활성화와 관련성이 있을 것으로 생각된다.

이와 함께 항염증적 특성이 보고된 부자 유래의 higenamine 유도체를 사용하여 HMGB1 분비에 미치는 영향을 규명하고자 하였다. Higenamine 유도체를 사람 단구와 RAW264.7 세포에 처리하였을 때, LPS 자극에 의해 야기되는 핵에서 세포질로의 HMGB1 이동이 억제되었으며, 결과적으로 HMGB1 의 분비가 감소하였다. 또한  $\gamma$ -[ $^{32}$ P]를 사용한 *in vitro* kinase assay 상에서도 higenamine 유도체가 cPKC 억제제와 유사하게 HMGB1 의 인산화를 감소시켰다. 이를 통해 higenamine 유도체가 HMGB1 의 인산화를 일으키는 cPKC 의 작용을 직접적으로 억제하여 HMGB1 의 분비를 감소시키는 것으로 생각된다.

본 연구를 통해 HMGB1의 분비를 야기시키는 인산화 과정을 규명하여 HMGB1 매개 염증반응의 조절가능성을 제시하였다. 그리고 higenamine

유도체는 HMGB1의 인산화를 억제하여 그 분비를 감소시키는 것을 확인하여 HMGB1 매개 패혈증 치료제로써의 가능성을 제시하였다.

---

핵심 되는 말 : HMGB1, 패혈증, 인산화, 분비, higenamine, PKC

# Protein kinase C 매개 인산화에 의한 HMGB1 분비 조절 기전

<지도교수 신 전 수>

연세대학교 대학원 의과학과

오 영 주

## I. 서론

패혈증 (sepsis)은 치사율이 30~70 %에 이르며 미국에서 매년 75 만 명이 사망하는 염증질환으로 이를 치료하기 위해 드는 비용은 매년 170억에 달한다.<sup>1</sup> 패혈증은 주로 그람 음성 박테리아에 의한 감염으로 일어나며, 대식세포 (macrophage), 상피세포 (epithelial cell), 단핵세포 (monocyte), 림프구 (lymphocyte)가 과도하게 분비하는 tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 등 전염증성 (pro-inflammatory) cytokine에 의해 유발된다. 이를 통해 체내의 방어 기작 중에 지나치게 염증 시스템이 활성화 되는 현상을 동반한다.<sup>1</sup> 현재 미국 FDA의 승인을 받은 유일한 패혈증의 치료제는 activated protein C (Xigris)가 있으나 이는 응혈과정이 개입하여 심각한 출혈이나 뇌졸중을 일으키는 부작용이 있다.<sup>2</sup> 초기에는 박테리아 등의 감염 후 이른 시간에 분비되는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등 전염증성 cytokine의 형성을 억제하거나

중화시키는 치료제를 개발했으나 이는 임상시험에서 치사율을 크게 개선시키지 못했다.

HMGB1은 모든 진핵 세포의 핵에 존재하는 단백질으로써 포유동물에서 99 %의 상동성을 갖고 있다. 215 개의 아미노산으로 구성된 HMGB1은 2 개의 DNA결합 모티프 (A, B box)와 acidic tail로 구성되어 있으며 DNA의 minor groove에 결합한다.<sup>3</sup> HMGB1이 결핍된 마우스의 경우 glucocorticoid receptor-responsive gene의 활성화가 결여되어 출생 후에 사망하며,<sup>4</sup> 이를 통해 HMGB1이 DNA에 결합하여 전사활성 및 DNA 구조 유지에 있어서 그 중요성이 입증되었다.

DNA에 결합하고 있던 HMGB1은 세포 사멸사 (apoptosis)의 경우와는 달리 세포괴사 (necrosis)의 경우 세포 밖으로 수동적 분비가 일어난다. 또한 lipopolysaccharide (LPS),<sup>5</sup> TNF- $\alpha$ ,<sup>6</sup> interferon (IFN)- $\gamma$ ,<sup>7</sup> H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>8</sup> 등의 자극이 올 경우 인산화 (phosphorylation),<sup>9</sup> 아세틸화 (acetylation),<sup>10</sup> 메틸화 (methylation)<sup>11</sup> 등의 post-translational modification에 의해 DNA와의 결합력을 잃게 되어 능동적 분비가 일어나게 된다. HMGB1은 2 개의 nuclear localization sequence (NLS)가 있으며 또한 nuclear export sequence (NES)를 갖고 있어 핵과 세포질 사이의 이동이 엄격히 조절되고 있다. DNA와 떨어진 HMGB1은 NES를 통한 CRM1 (exportin 1)과 결합하여 세포질 내 secretory lysosome으로 이동하여 exocytosis에 의해 세포 밖으로 분비되며<sup>10</sup> 이는 IL-1 $\beta$ 의 분비과정과 유사하다.<sup>12</sup> HMGB1의 분비는 다른 전염증성 cytokine과는 다르게 내독소 등의 자극에 의해 8 시간 이후부터 혈청에서 검출되며 72 시간까지 그

분비가 지속되는 late mediator이다. 분비된 HMGB1은 autocrine, paracrine하게 receptor for advanced glycation endproducts (RAGE),<sup>13</sup> Toll-like receptor (TLR) 2 및 4와 결합<sup>14</sup> 하여 nuclear factor (NF)- $\kappa$ B, mitogen activated protein kinase (MAPK)를 활성화 시킨다. 세포 밖 HMGB1은 TNF- $\alpha$  같은 전염증성 cytokine의 성질을 갖고 있어 패혈증 뿐 만 아니라 동맥경화,<sup>15</sup> 관절염<sup>16</sup> 등의 질환에 관여하고 신경세포의 neurite outgrowth<sup>14</sup>, 암세포의 전이,<sup>17</sup> 수지상 세포의 성숙<sup>18</sup>에도 관여한다.

HMGB1의 분비에 영향을 미치는 신호전달경로는 아직 정확히 밝혀지지 않았다. LPS 자극 후에 분비되는 HMGB1의 post-translational modification에 영향을 주는 신호전달경로는 아직 분명하지 않다. 식물, 곤충, 양 (lamb)의 HMGB1의 경우 casein kinase II (CK II),<sup>19</sup> cyclic AMP-dependent protein kinase 2 (cdc2)<sup>20</sup>에 의해서 인산화 되어 DNA와의 결합력이 감소한다. Rat의 protein kinase C (PKC)의 경우 calf thymus HMG family인 HMG14,17을 인산화 시켜 DNA와의 결합력을 감소시킨다.<sup>21</sup> 이들은 HMGB1의 인산화에 대한 기전은 분명하지 않으며 HMGB1의 분비기전과 관련한 신호전달경로는 밝혀지지 않았다.

염증반응에 있어 중요한 신호전달경로로는 MAPK, NF- $\kappa$ B, phosphatidylinositide 3-kinase (PI3K) 등이 있다. 특히 PI3K는 p85 regulatory subunit과 p110 catalytic subunit으로 구성되며 세포의 생존과 관련하여 주요한 신호전달경로로 알려져 있었으나 최근에 면역세포의 활성화에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다.<sup>22</sup> PI3K는 세포막이나 핵막의 phosphoinositide (PtdIns)를 인산화 시키는 lipid

kinase이다. 염증반응에 주요하게 알려진 downstream kinase 에는 protein kinase B (Akt)-mammalian target of rapamycin (mTOR), PKC등이 있다 (그림 1).<sup>23</sup> HMGB1의 분비에 영향을 미치는 신호전달경로를 규명하는 것은 패혈증 등 HMGB1이 관여하는 여러 질병의 치료제 개발을 위해 필요하다. 본 실험에서는 HMGB1의 분비와 관련이 있는 신호전달경로를 알아보고, LPS 자극 후에 어떤 kinase에 의해 HMGB1이 인산화 되는지 알아보려고 하였다.

최근 부자의 뿌리 성분인 higenamine은 항염증적 효과가 있다는 것이 보고되었다. Higenamine은 LPS에 의해 유도되는 inducible nitric oxygen synthesis (iNOS)의 발현을 감소시키며 마우스 endotoxemia 모델에서 생존율을 증가시켰다.<sup>24</sup> Ischemia-reperfusion rabbit 모델에서도  $Ca^{2+}$ 의 농도를 감소시켜 심장 수축을 증가 시키고 관상 동맥의 순환을 개선하며 심근의 국소빈혈(myocardial ischemia)을 감소시키는 효과가 있다.<sup>25</sup> Systemic inflammation에서 이런 항염증적 효과가 있지만 higenamine이 HMGB1의 분비와 어떠한 연관이 있는지는 아직 보고되지 않았다. 분비된 HMGB1이 systemic inflammation과 관련된 여러 질병에서 주요한 mediator로 주목되기 때문에 higenamine이 HMGB1의 분비 억제 효과가 있는지 알아보고, 또한 HMGB1 인산화에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

본 연구를 통해 HMGB1의 인산화에 의한 분비기전을 밝히고, 이에 있어서 패혈증 치료후보물질인 higenamine 유도체가 미치는 영향을 제시하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포주 배양

마우스의 대식세포주인 RAW264.7 세포는 한국 세포주 은행에서 분양 받았다. 세포배양은 10% 우태아혈청 (fetal bovine serum, FBS, Gibco BRL, Rockville, MD)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)를 사용하였고 5% CO<sub>2</sub>, 37 °C에서 배양하였고 사람 단구는 10% FBS-RPMI1640 배지를 사용하였다. RAW264.7 세포는 5 X 10<sup>5</sup> 세포/well을 6 well에 하룻밤 동안 배양한 후, 다시 새 OPTI-MEM (Gibco BRL, Rockville, MD) 배지로 교환한 후 LPS 1 µg/ml을 18 시간 동안 처리한 배양액을 회수하여 1,000 rpm, 5 분 동안 원심분리 한 다음 상층액을 회수하여 centricon (Millipore, Billerica, MA)으로 3,500 rpm, 4°C, 90 분 동안 농축하였다. 그 농축액을 Western blotting 방법으로 정량하였다. 필요에 따라 RAW264.7 세포를 10% FBS-DMEM에서 배양하여 실험에 사용하였다. 사람 단구의 경우 4 X 10<sup>5</sup> 세포/well을 96 well에 10% FBS-RPMI1640에 넣어서 24 시간 동안 LPS로 자극하였다.

사람 단구는 건강한 사람의 말초 혈액에서 얻은 peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)에서 순수 분리하였다. 우선 PBMC 분리는 혈액과 동량의 RPMI1640을 넣고, Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham biosciences, Piscataway, NJ)에 얹은 후 2,000 rpm, 4°C 에서 20 분 동안 원심분리하였다. 이후 세포를 RPMI1640으로 2 회 세척하여 액체 질소 탱크에 보관한 후 사용하였다. 사람 단구는 RPMI1640를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>,

37°C에서 1 시간 배양 후에 붙지 않은 세포를 따뜻한 RPMI1640으로 제거하고 0.02%의 EDTA를 포함한 생리식염수를 넣고 10 분 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. Rubber scrapper를 이용하여 조심스럽게 세포를 떼어낸 후, 10% FBS-RPMI1640에서 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 하룻밤 이상 배양한 후 시료를 처리하였다.

## 2. 시료처리 및 샘플 준비

세포에서 HMGB1 분비와 관련된 신호전달체계를 알아보기 위해 다음과 같은 다양한 억제제를 사용하였다. NF- $\kappa$ B 억제제인 SN-50 및 Bay-11 (Calbiochem, Darmstadt, Germany), MAPK 억제제인 PD098059 (ERK inhibitor, Calbiochem), SB203580 (p38 inhibitor, Calbiochem), SP600125 (JNK inhibitor, Calbiochem), PI3K 억제제인 wortmannin (Calbiochem) 및 LY294002 (A.G. Scientific, Inc. San Diego, CA)를 사용하였다. 그리고 PI3K downstream 신호경로 억제제인 Akt inhibitor IV (Akt inhibitor, Calbiochem), rapamycin (mTOR inhibitor, Cell signaling, Danvers, MA), Gö6983 및 Ro-31-7549 (cPKC inhibitors, Calbiochem)을 사용하였다. 또한 Ca<sup>2+</sup> 연관성 시약으로 세포내 Ca<sup>2+</sup> chelator인 BAPTA-AM (Calbiochem), Ca<sup>2+</sup> specific ionophore인 A23187 (Sigma)를 사용하였다. 억제제는 DMSO에 녹여서 -20°C에서 보관하였고 처리하는 양은 DMSO의 부피가 전체 배지의 0.1% 미만이 되도록 하였다. Higenamine 유도체는 3차 멸균 증류수에 녹여서 -70°C에서 보관하였다. 억제제의 경우 MTT assay를 통해 세포 독성을 알아본 후, 세포 독성이

없는 농도에서 시료처리를 하였다.

Ca<sup>2+</sup> 연관성 시약을 제외한 다른 억제제들과 higenamine 유도체는 LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, Sigma) 1 µg/ml을 처리하기 1 시간 전에 전처리 하였다. BAPTA-AM의 경우 1 mM EDTA (USB, Cleveland, Ohio)와 함께 LPS 처리하기 30 분 전 처리하였다. A23187의 경우 tyroid buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.1 mM MgCl<sub>2</sub>, 11.9 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.4 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, pH 7.2)와 30 분 동안 세포에 처리한 후 10% FBS-DMEM에 배양하였다.

### 3. Western blotting

각각의 상층액을 회수한 후 5X sample buffer [60 mM Tris-HCl pH 6.8, 50% Glycerol, 2% Sodium dodecyl sulfate (SDS), 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue]를 전체 부피의 20%가 되도록 넣었다. 5 분 동안 끓인 후 Western blotting을 하였다. 12% SDS-PAGE gel을 사용하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)에 80 V에서 2 시간 동안 transfer 하였다. Ponceau S (Sigma) 염색을 하여 transfer가 제대로 되었는지 확인한 후, PBS에 0.1% Tween 20 (USB)이 포함된 PBST로 세척하였다. 실온에서 1 시간 동안 5% skim milk를 사용하여 blocking을 한 후 1:2,500으로 희석한 1차 항체 anti-HMGB1 항체 (Abcam) 혹은 anti-PKC 항체 (BD bioscience, Franklin Lakes, NJ)를 실온에서 2 시간 혹은 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. PBST로 10 분씩 3 회 세척한 후

1:10,000으로 희석한 HRP-conjugated anti-rabbit Ig GAM 혹은 1:5,000으로 희석한 HRP-conjugated anti-mouse Ig GAM (Sigma)을 1 시간 동안 실온에서 반응 시켰다. PBST로 10 분씩 3 번 세척 한 후 ECL (Lab Frontier, Seoul, Korea)를 사용하여 발광정도를 측정하였다.

#### 4. MTT assay

RAW264.7은  $2 \times 10^4$  세포/well로 96 well에 분주하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양하였다. 10% FBS-DMEM 배지에서 20 시간 동안 처리한 후 5 mg/ml MTT (Sigma)를 well 당 50  $\mu$ l씩 넣어서 최종 1 mg/ml이 되게 하였다. 4 시간 동안 5% CO<sub>2</sub>, 37°C에서 배양한 후에 상층액을 제거하고 DMSO를 50  $\mu$ l씩 넣어 녹인 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5. DNA 플라스미드 준비

HMGB1의 이동양상을 관찰하기 위하여 HMGB1-EGFP 플라스미드를 이용하였다.<sup>9</sup> HMGB1-EGFP 플라스미드는 XL-1 blue *E. coli* (Stratagene, San Diego, CA)에 4°C, 30 분 동안 배양한 후 다시 90 초 동안 42°C에서 heat shock을 주었다. Ampicillin과 kanamycin (USB)이 포함된 LB broth 500  $\mu$ l를 넣고 37°C에서 45 분 동안 흔들어 배양하였다. Ampicillin과 kanamycin이 포함된 LB plate에 도말 하였다. 37°C에서 하룻밤 동안 배양 후 다시 colony 하나를 ampicillin과 kanamycin이 포함된 LB broth 100 ml에 넣고 하룻밤 동안 배양하였다. 플라스미드는 midi prep kit (Qiagen, Santa Claris, CA)를 사용하여 추출하였다.

## 6. 공초점 현미경

RAW264.7을  $4 \times 10^5$  세포/well로 멸균한 cover glass를 넣은 6 well에 넣고 하룻밤 동안 배양한 후,  $1 \mu\text{g}$ 의 HMGB1-EGFP 플라스미드와  $4 \mu\text{l}$ 의 FuGENE™ 6 (Roche, Indianapolis, IN)를 사용하여 transient transfection을 수행하였다. Serum free media에 FuGENE™ 6와 HMGB1-EGFP 플라스미드를 넣어 상온에서 30 분 동안 먼저 반응시킨 후 RAW264.7이 있는 6 well에 첨가하였다. 3 시간 후에 10% FBS가 포함된 배지를 첨가하여 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$  incubator하에 24 시간 동안 배양하였다. Higenamine 유도체는 LPS  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리 전후에 각각 처리하였다. 이 때 양성대조군은 HMGB1의 핵에서 세포질로의 이동을 억제하는 것으로 알려진 ethyl pyruvate (Sigma)를 이용하였다. LPS 처리시간을 기준으로 18 시간 후에 차가운 PBS로 2 회 세척하고 3.7% formaldehyde (Sigma)로 실온에서 15 분 동안 처리하여 세포를 고정시킨 후, 다시 차가운 PBS로 2 회 세척한 후 암실에서 DAPI (Vector, Burlingame, CA) 염색을 하였다. 공초점 현미경을 이용하여 세포 내 HMGB1의 이동을 관찰하였다.

## 7. 면역침강법

RAW264.7을  $5 \times 10^6$  세포를 100 mm dish에 넣고 5%  $\text{CO}_2$ ,  $37^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 배양하였다. NP-40 buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.6, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.5 mM DTT, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 5 mM NaF, 150 mM NaCl, NP-40 1%, aprotinin  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , leupeptin  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ , pepstatin A  $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ )로 세포를 용해시켰다.  $4^\circ\text{C}$ 에서 30분 동안 흔들어 준 후 13,000 rpm,  $4^\circ\text{C}$ , 20

분 동안 원심분리 하였다. Bradford assay를 통해 whole cell lysate를 정량하였다. PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  isoform에 대한 항체 (BD bioscience) 1  $\mu\text{g}$ 과 whole cell lysate 3 mg을 4°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. Protein G agarose (Amersham biosciences) 40  $\mu\text{l}$  (50% slurry)를 NP-40 buffer로 3 회 세척하였다. 항체와 whole cell lysate를 반응시킨 tube를 세척한 protein G agarose 와 4°C에서 90 분 동안 반응시켰다. Protein G agarose와 반응하지 않은 상층액을 제거한 후, NP-40 buffer로 1 회, kinase buffer (20 mM MOPS-NaOH pH 7.2, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.5 mM DTT, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 5 mM NaF, aprotinin 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , leupeptin 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , pepstatin A 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )로 3 회 세척하였다. 면역침강법을 통해 얻은 PKC는 *in vitro* kinase assay에 사용되었다.

## 8. *In vitro* kinase assay

Recombinant HMGB1 단백질의 인산화 정도를 측정하기 위하여 recombinant active cPKC (Upstate), casein kinase II (CKII) (New England Biolab), cdc2 (New England Biolab), recombinant PKC isoform sampler kit (Calbiochem), 면역침강법을 통해 얻은 protein G agarose-PKC Abs coupled cell lysate를 이용하였다. cPKC는 20 mM MOPS (pH 7.2), 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM DTT, 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , lipid activator (Upstate), 50  $\mu\text{M}$  ATP, 5  $\mu\text{Ci}$   $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ 에서 반응 시켰고, CKII는 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 50 mM KCl, 50  $\mu\text{M}$  ATP, 5  $\mu\text{Ci}$   $\gamma$ -[ $^{32}\text{P}$ ]ATP, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ 에서 반응시켰고, cdc2는 20

mM Tris-HCl (pH7.5), 50 mM KCl, 50  $\mu$ M ATP, 5  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EGTA, 2 mM DTT에서 30°C, 40 분 동안 반응시켰다. 사용된 HMGB1은 *E. coli*에서 생산하여 순수분리 후 2  $\mu$ g을 사용하였다.<sup>9</sup> HMGB1의 인산화 정도는 autoradiography로 측정하였다.

PKC isoform ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) 반응시에는 assay dilution buffer II (ADB II) (Upstate), lipid activator, PKA/CaMK inhibitor (Upstate), 75  $\mu$ M ATP, 5  $\mu$ Ci  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP, 10 mM MgCl<sub>2</sub>를 넣고 30°C에서 30 분 혹은 1 시간 동안 배양하였다. P81 phosphocellulose paper (Upstate)에 반응물을 떨어뜨린 후 30 분 말린 후 0.75% phosphoric acid로 2 회, acetone으로 1 회 세척 한 후  $\beta$ -scintillation counter로 cpm 값을 측정하였다.

### III. 결과

#### 1. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 LPS 자극 후 활성화 되는 MAPK, NF- $\kappa$ B, PI3K 와 HMGB1 분비의 연관성

그람음성세균의 감염 후 유리된 LPS는 염증반응 및 패혈증 유발의 주요 원인이다. 단구, 대식세포에서 LPS 자극에 의해 활성화 된다고 보고된 신호전달체계를 요약하면 아래 그림과 같다 (그림 1). LPS 자극 후 HMGB1 분비가 어느 신호전달경로와 연관이 있는 경로를 조사하기 위해 염증반응에 주요하게 관련된 MAPK, NF- $\kappa$ B, PI3K 억제제를 사용하여 HMGB1 분비 변화를 관찰하였다

HMGB1은 LPS 자극 6 시간 이후부터 분비되기 시작하여 48 시간 이상 지속적으로 분비된다.<sup>43</sup> 본 실험에서 RAW264.7 세포에 1  $\mu$ g/ml의 LPS 자극 후 HMGB1 분비를 시간에 따라 Western blotting으로 확인한 결과 HMGB1의 분비가 12 시간에 증가하여 24 시간에 높은 분비가 관찰되었다 (그림 2). 이에 따라 앞으로의 실험은 18-24 시간 자극을 기준으로 하였다.

먼저 HMGB1 분비에 MAPK 경로인 ERK, p38, JNK의 3 가지 downstream 신호전달경로와의 연관성을 관찰하고자 LPS 처리 1 시간 전에 PD098059, SB203580, SP600125를 각각 전처리하고 20 시간 더 배양한 후에 HMGB1의 분비변화를 관찰하였다. 그 결과 HMGB1의 분비가 ERK, p38, JNK 억제제 처리에 영향을 거의 받지 않음을 확인하였다 (그림 3A, 3B 및 3C).

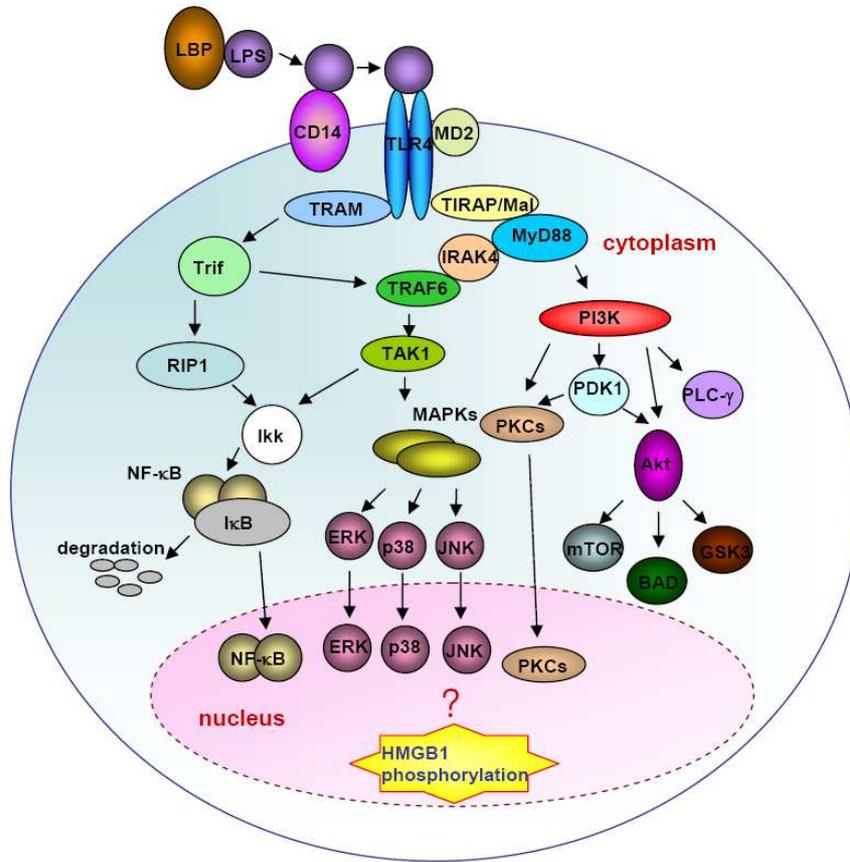


그림 1. LPS에 의해 활성화 되는 신호전달경로.

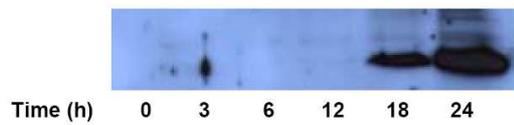


그림 2. RAW264.7 세포에 LPS 자극 후 HMGB1의 분비 측정. LPS 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 시간별로 처리한 후 상층액에서 HMGB1의 분비량을 Western blotting으로 관찰함.

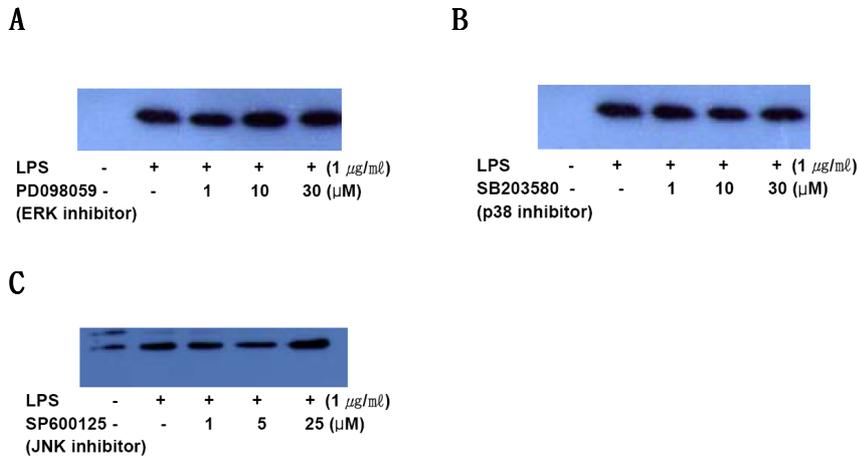


그림 3. RAW264.7 세포에서 MAPK 신호전달경로 억제제 전처리 후 LPS 자극에 따른 HMGB1의 분비량 변화. RAW264.7 세포에 PD098059, SB203580, SP600125를 각각 1 시간 전처리 후 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 LPS를 20 시간 동안 처리하여 상층액에서 HMGB1 양을 관찰함.

다음으로 NF- $\kappa$ B 활성화가 HMGB1의 분비에 미치는 영향을 관찰하고자 NF- $\kappa$ B 억제제를 전처리 후 HMGB1 분비를 관찰하였다. NF- $\kappa$ B는 자극이 없으면 세포질에 I $\kappa$ B와 결합하여 불활성화 된 상태로 세포질에 존재하다가 자극이 오면 I $\kappa$ B kinase (IKK)에 의해 I $\kappa$ B가 인산화되어 분해되고 분리된 NF- $\kappa$ B가 핵 안으로 이동하여 그 활성을 나타낸다. 본 실험에서는 NF- $\kappa$ B 신호전달경로의 억제제는 IKK를 억제하는 Bay-11과 NF- $\kappa$ B의 핵 내 이동을 억제하는 SN-50을 사용하였다. Bay-11을 10  $\mu\text{M}$  농도까지 처리하고 SN-50을 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 처리하였으나, LPS 자극에 의해 HMGB1의 분비가 감소되지 않았다 (그림 4A 및 4B). 이를 통해 LPS에 의해 유도된 HMGB1 분비는 NF- $\kappa$ B 신호전달경로와 무관함을 알 수 있었다.

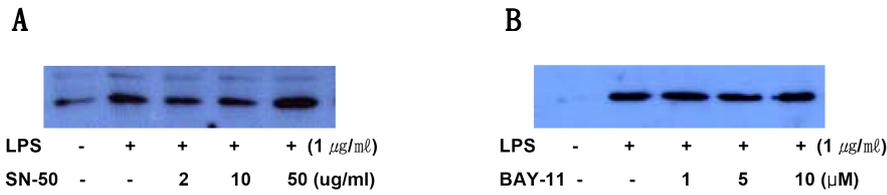
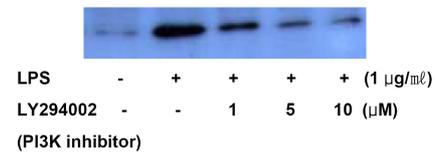
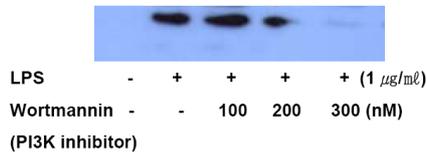


그림 4. RAW264.7 세포에서 NF- $\kappa$ B 신호전달경로 억제제 전처리 후 LPS 자극에 따른 HMGB1의 분비량 변화. RAW264.7 세포에 SN-50과 Bay-11을 1 시간 동안 전처리 한 후 LPS를 20 시간 동안 처리하여 상층액을 Western blotting을 통해 HMGB1의 분비량을 관찰함.

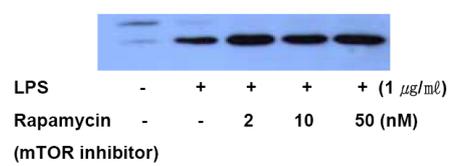
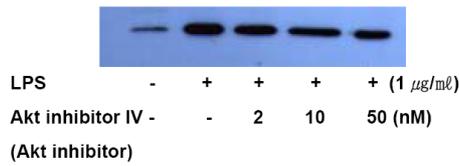
다음으로 HMGB1 분비에 PI3K 신호전달경로의 연관성을 조사하기 위하여 wortmannin과 LY294002를 사용하였다. RAW264.7 세포에 wortmannin과 LY294002를 다양한 농도로 전처리하고 LPS를 처리한 결과 wortmannin 농도 의존적으로 HMGB1의 분비량이 감소하였다 (그림 5A). 이와 관련된 PI3K downstream 신호전달경로를 조사하기 위하여 Akt inhibitor VI 및 rapamycin을 다양한 농도로 사용한 결과 LPS에 의한 HMGB1 분비에 영향이 없었다 (그림 5B). PI3K downstream의 다른 경로인 PKC 연관성을 조사하기 위하여 PKC 억제제인 Gö6983과 Ro-31-7549을 사용하여 HMGB1 분비의 변화를 관찰한 결과 HMGB1의 분비가 처리한 억제제의 농도증가에 따라 감소하였다 (그림 5C). Gö6983과 Ro-31-7549은 각각 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\zeta$  isoform과 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$  isoform을 억제하여 공통적으로 cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )를 억제한다. 사람 단구에서 PI3K 경로 연관성을 확인한 결과 PI3K 억제제인 wortmannin, LY294002과 PKC억제제인 Gö6983을 사용하였을 때, 농도 의존적으로 HMGB1의 분비가

감소하여 PI3K-PKC가 HMGB1의 분비에 영향이 있는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5D 및 5E). 따라서 LPS자극이 왔을 때 일어나는 HMGB1의 분비는 PI3K, PKC 신호전달경로와 연관성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

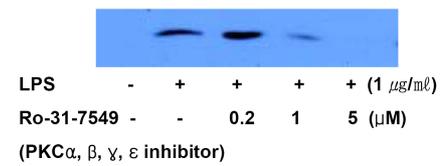
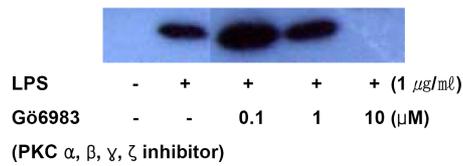
**A**



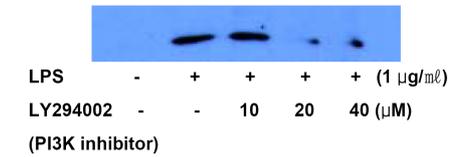
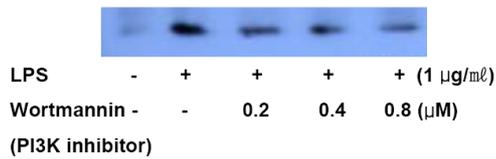
**B**



**C**



**D**



**E**

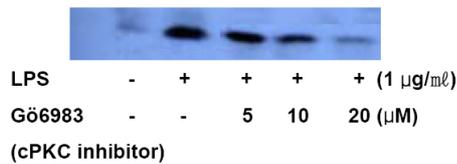


그림 5. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 PI3K, AKT, PKC 신호전달경로 억제에 따른 HMGB1 분비. RAW264.7 세포 (A-C) 및 사람 단구 (D, E)에 wortmannin, Akt inhibitor IV, rapamycin, Gö6983, Ro-31-7549를 1 시간 전처리 후 LPS를 처리하고 20 시간 후 상층액에서 HMGB1의 분비량을 관찰함.

## 2. *In vitro* kinase assay에서 cPKC에 의한 HMGB1 인산화

HMGB1은 인산화가 일어나면 DNA와의 결합력을 잃고 세포 밖으로 분비된다.<sup>9</sup> 따라서 recombinant cPKC ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )가 HMGB1 인산화에 직접적으로 관련이 있는지를 알아보기 위해  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]ATP를 이용한 *in vitro* kinase assay를 수행하였다. 식물과 곤충에서 HMGB1 계열 단백질의 인산화와 관련있는 효소로 알려진 casein kinase (CK) II, cdc2를 함께 사용하였으며, HMGB1은 wild type과 HMGB1 NLS의 serine을 alanine으로 치환한 mutant HMGB1을 사용하였다 (그림 6A). 그 결과 사람 HMGB1은 cPKC에 의해 인산화 되며, CKII와 cdc2는 관련이 없는 것을 알 수 있었다 (그림 6B). 인산화가 예상되는 serine 부위를 모두 alanine으로 치환한 mutant HMGB1 (NLS1/2A)<sup>9</sup>는 거의 인산화가 관찰되지 않았고 wild type HMGB1만을 인산화가 되는 것을 관찰하였다. 이를 통해 cPKC가 HMGB1 인산화에 중요하며 주로 NLS1, NLS2 부위의 serine 잔기를 인산화 시킴을 알 수 있었다. cPKC 효소의 특이성을 조사하기 위해 cPKC 억제제인 Gö6983을 다양한 농도로 넣고 HMGB1 인산화 억제 정도를  $\beta$ -scintillation counter로 측정하였다. 우선 HMGB1 없이 cPKC 단독 처리시보다 Gö6983을 넣을 때 cpm 수치가 감소하여 Gö6983이 PKC의 autophosphorylation을 효율적으로 억제함을 알 수 있었다.<sup>26-28</sup> 이후 처리한 HMGB1 농도 의존적으로 HMGB1 인산화가 일어났고 (그림 6C), 또한 Gö6983 농도 의존적으로 HMGB1 인산화가 억제되어 (그림 6D), HMGB1 인산화에 cPKC가 중요함을 알 수 있었다.



### 3. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 $Ca^{2+}$ 의존적인 HMGB1의 분비량 변화

PKC는 cPKC 외에  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  isoform를 포함하는 novel PKC (nPKC)와  $\zeta$ ,  $\iota$  isoform을 포함하는 atypical PKC (aPKC)가 있으며 cPKC는 nPKC, aPKC와 달리  $Ca^{2+}$ 에 의해 활성화 된다. 따라서  $Ca^{2+}$ 과 HMGB1 분비의 상관성을 조사하기 위해 RAW264.7 세포에  $Ca^{2+}$  specific ionophore인 A23187을 처리하였다. 그 결과 LPS 자극 없어도 처리 12 시간 후부터 급격하게 HMGB1이 분비되었다 (그림 7A). 반대로  $Ca^{2+}$  chelator인 BAPTA-AM과 EGTA를 LPS 전처리 하였을 때  $Ca^{2+}$  chelator 농도 의존적으로 HMGB1의 분비가 억제되어 HMGB1 분비에 세포 내  $Ca^{2+}$ 이 관여함을 알 수 있었다 (그림 7B). 이는 사람 단구를 이용한 실험에서도 유사한 결과를 나타내었으며  $Ca^{2+}$  ionophore에 의한 HMGB1 분비가 더욱 빠르게 시작되었다 (그림 7C 및 7D).

### 4. cPKC에 의한 HMGB1의 인산화

Gö6983에 의해 활성화가 억제되는 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  isoform을 대상으로 각각의 isoform이 HMGB1 인산화에 기여하는 정도를 알아보려고 하였다. Recombinant PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  isoform 동량을 사용하여 *in vitro* kinase assay를 시행한 결과 PKC  $\alpha$ 와  $\gamma$ 가 HMGB1의 인산화에 크게 관여하였다 (그림 8A). 실제로 세포 내에서 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 에 의한 HMGB1의 인산화를 관찰하기 위하여 RAW264.7 세포에서 각각의 특이 항체로 면역침강법을 실시하여 각 효소를 얻은 후 HMGB1의 인산화를 측정하였다. 우선 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 의 존재를 Western blotting으로 확인한 결과 예상되는 위치에서 각

효소가 존재함을 확인하였다 (그림 8B). 면역침강법으로 분리한 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 에 recombinant HMGB1을 넣고 *in vitro* kinase assay를 하여 cpm 값을 측정한 결과 (그림 8C), PKC  $\alpha$ 에 의한 HMGB1 인산화 PKC  $\beta$ 나  $\gamma$ 보다 높게 나타났다.

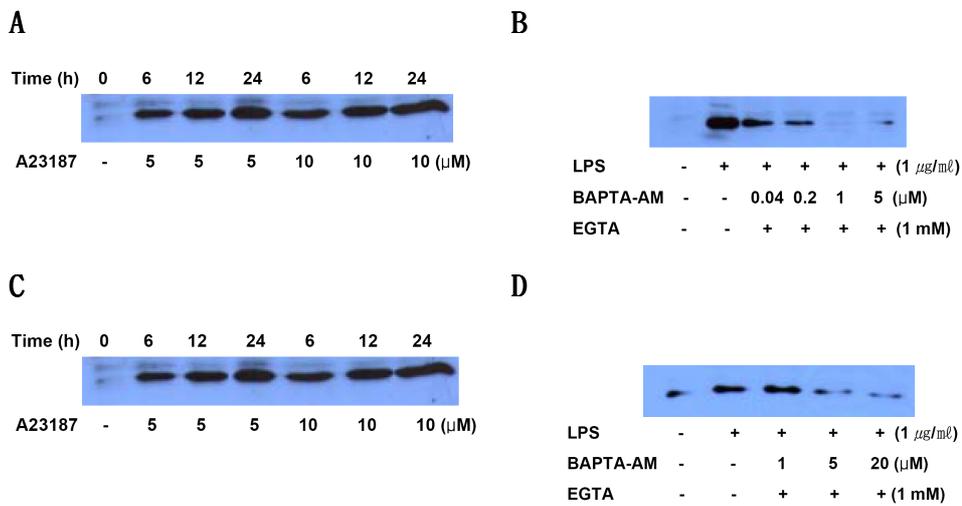
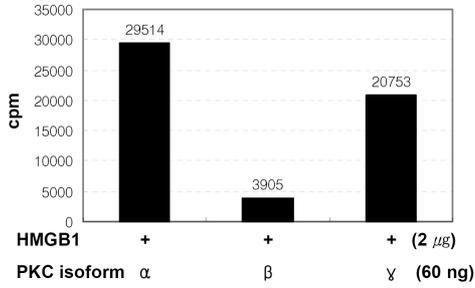
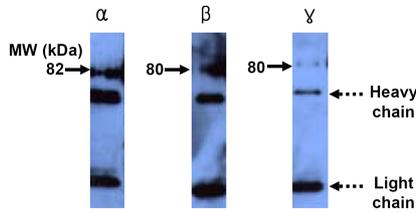


그림 7. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 세포내  $\text{Ca}^{2+}$  농도 변화에 따른 HMGB1의 분비량 변화. RAW264.7 세포 (A) 및 사람 단구 (C)에 A23187을 30 분 동안 처리하고 새 배지로 교환 후 6, 12, 18 시간 동안 배양하여 상층액에서 HMGB1의 분비량을 관찰함. RAW264.7 세포 (B) 및 사람 단구 (D)에 BAPTA-AM과 1 mM EGTA를 30 분 전처리 후, LPS를 20 시간 처리하여 상층액에서 HMGB1의 분비량을 관찰함.

**A**



**B**



**C**

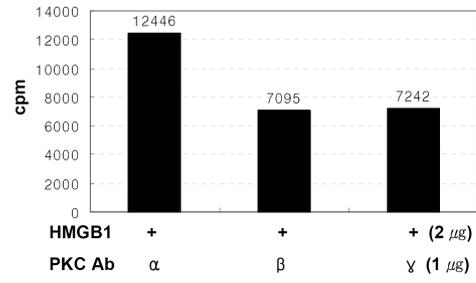


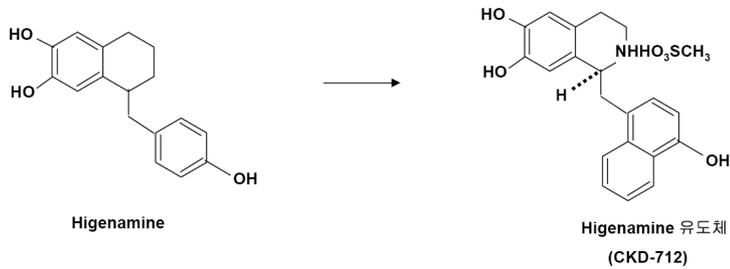
그림 8. PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 에 의한 HMGB1의 인산화. (A) PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 을 각각 60 ng과 HMGB1 2  $\mu$ g을 넣어 30°C, 30 분 동안 반응시킨 후  $\beta$ -scintillation counter를 이용하여 cpm 값을 측정함. (B) RAW264.7 세포의 whole cell lysate 3 mg을 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  각각의 항체로 면역침강 후 Western blotting을 시행함. (C) RAW264.7 세포의 whole cell lysate 동량에서 각 isoform의 PKC를 분리한 후 HMGB1 2  $\mu$ g을 넣어 반응시켜 cpm을 측정결과임. 각 cpm 값은 항체를 넣지 않고 bead만 넣어 반응시킨 cpm 값을 제외한 값임.

## 5. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 higenamine 유도체에 의한 HMGB1의 인산화 및 분비억제

Higenamine은 부자의 뿌리 성분으로 NF- $\kappa$ B등의 활성을 억제하여 항염증작용을 하는 것으로 보고된 바가 있으나<sup>24</sup> 아직 PKC와의 연관성에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있지 않아 HMGB1의 인산화에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에서 사용하는 higenamine 유도체 (CKD-712)는 테트라하이드로이소퀴놀린기를 가지며 키랄성이 있는 C-1의 위치에 나프틸 메틸기와 결합되어 있다 (그림 9A). 먼저 HMGB1의 분비에 대한 사용 적정 농도를 결정하기 위해 RAW264.7 세포를 이용하여 MTT assay를 수행한 결과 100  $\mu$ M 이상이 되면 CKD-712는 세포 독성을 갖는 것을 알 수 있었다 (그림 9B).

CKD-712가 LPS 자극에 대한 HMGB1의 분비에 영향을 끼치는지 알아보기 위해 CKD-712를 전처리 한 후 LPS를 처리한 결과 RAW264.7 세포와 사람 단구에서 HMGB1의 분비가 농도 의존적으로 감소되었다 (그림 10A). CKD-712가 핵 내 HMGB1이 LPS 자극에 의한 세포질로 이동에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 공초점 현미경을 사용하였다. 그 결과 LPS 자극에 의한 HMGB1의 세포질로 이동이 양성 대조군인 ethyl pyruvate와 유사하게 CKD-712에 의해 억제되는 것을 관찰하였다 (그림 10B 및 10C). CKD-712는 LPS 처리하기 1 시간 전처리 뿐만 아니라 1 시간 후처치에도 HMGB1의 이동을 억제하였으나, LPS 처리 4 시간 후에 처치했을 경우에는 HMGB1의 세포질로 이동을 억제하는 정도가 미약하였다 (그림 10C).

**A**



**B**

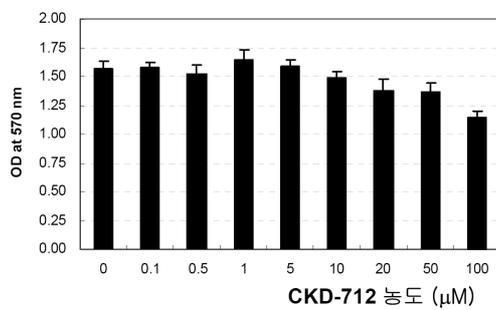
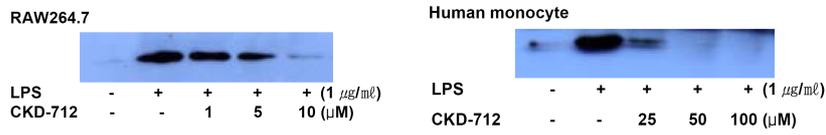


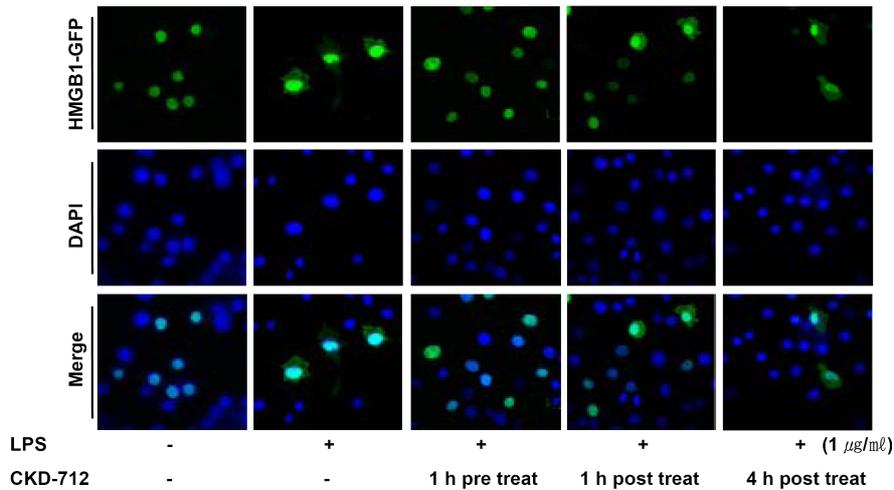
그림 9. Higenamine 유도체 (CKD-712)의 세포독성. (A) CKD-712의 구조. (S)-1-naphthalene-1-ylmethyl-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-6,7-diolmethanesulfonic acid ( $C_{20}H_{19}NO_2 \cdot HO_3SCH_3$ ). (B) RAW264.7 세포에 CKD-712를 처리한 후 20 시간 배양하여 MTT assay를 수행함.

CKD-712의 HMGB1 분비 억제 기전을 알아보기 위해 HMGB1의 인산화에 미치는 영향을 알아보고자 *in vitro* kinase assay를 수행하였다. cPKC와 HMGB1에 다양한 농도의 CKD-712를 넣어준 결과 농도 의존적으로 HMGB1 인산화가 억제됨을 확인하였다 (그림 10D). 따라서 CKD-712는 cPKC에 의해 HMGB1 인산화를 억제함으로써 LPS 자극에 의해 분비되는 HMGB1 양을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

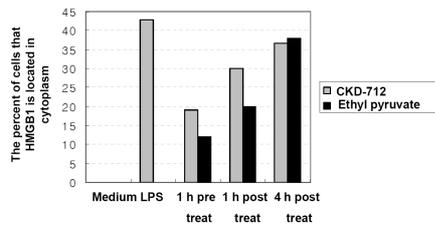
**A**



**B**



**C**



**D**

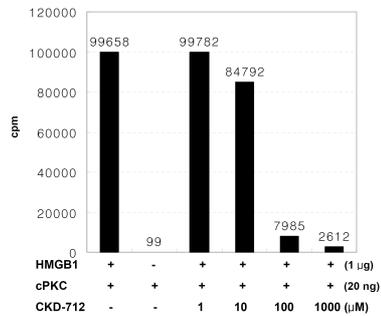


그림 10. RAW264.7 세포와 사람 단구에서 CKD-712에 의한 HMGB1의 분비 및 인산화 억제. (A) RAW264.7 및 사람 단구에 CKD-712를 1 시간 전처리하고 LPS 자극 18 시간 후에 HMGB1의 분비 관찰. (B, C) RAW264.7에서 HMGB1-EGFP를 transient transfection 한 후 CKD-712를 LPS 1 μg/ml 처리 1 시간 전처리, 1 시간 및 4 시간 후처리하여 공초점 현미경을 통해 관찰하고, 세포를 50 개 정도 세어 HMGB1이 세포질에 있는 세포의 수를 세어 백분율로 나타냄. (D) Recombinant HMGB1 5 μg, cPKC 20 ng, CKD-712를 넣어 37°C, 1 시간 동안 반응시킨 후 cpm 값을 측정함.

#### IV. 고찰

HMGB1은 진핵세포에서 ubiquitous 하게 존재하는 핵단백으로 사람의 HMGB1은 마우스와 99%의 상동성을 지니고 있다. HMGB1은 세포괴사가 일어날 때 세포 밖으로 유리되고 또한 내독소, 전염증성 cytokine의 자극에 의해 secretory lysosome을 통해 능동적으로 분비된다. 분비된 HMGB1은 전염증성 cytokine과 같은 활성을 보여 염증반응 및 패혈증 증상을 유발한다. HMGB1은 TLR2 및 TLR4와 RAGE와 결합하면 MAPK, NF- $\kappa$ B를 활성화시켜 다시 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6등의 전염증성 cytokine의 분비를 유도하므로 HMGB1의 분비의 차단은 질병의 진행을 억제하는데 중요하다.

HMGB1은 post-translational modification이 일어나면 DNA와의 결합이 떨어져서 세포질로 이동한다. 선행연구를 통해 HMGB1은 TNF- $\alpha$ , LPS 자극에 의해 인산화가 일어나며, HMGB1의 인산화는 세포 밖으로 분비를 일으키는 주요기전 중에 하나임을 밝혔다.<sup>9</sup> 식물 및 곤충 HMGB1은 CK II,<sup>19</sup> cdc2,<sup>20</sup> PKC<sup>29,30</sup>에 의해 인산화가 일어나 DNA와의 affinity가 감소된다. 본 실험에서 사람 HMGB1의 인산화를 일으키는 kinase를 관찰한 결과 CK II, cdc2와는 무관하며 cPKC에 의해서 HMGB1이 인산화 되는 것을 *in vitro* kinase assay를 통해 확인하였다. 실제로 RAW264.7 세포와 사람 단구에서 cPKC 억제제를 처리한 결과 HMGB1의 분비가 억제되어 HMGB1의 분비에 인산화가 중요함을 확인하였다. NLS의 serine 잔기를 alanine으로 치환한 형태의 HMGB1은 cPKC에 의해 인산화가 일어나지 않은 것을 통해 cPKC는

HMGB1 NLS에 위치한 serine 잔기를 인산화 시킨다는 것을 알 수 있었다. 이는 HMGB1의 DNA 결합 모티브에 있는 serine 잔기가 인산화 되어 DNA와의 이온결합력이 약해져서 해리된다는 이론을 뒷받침한다.<sup>21</sup> PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 에 의해 HMGB1을 인산화 시키는 정도를 *in vitro* 상에서 관찰한 결과 recombinant PKC와 면역침강법을 통해 얻은 PKC에서 PKC  $\alpha$ 가 다른 PKC isoform보다 HMGB1을 높게 인산화 시켰다. 하지만 HMGB1 인산화에 중요한 특정 PKC isoform을 밝히기 위해서는 추후 정확한 실험이 필요할 것으로 생각된다. 또한 면역침강법을 통해 얻은 PKC  $\beta$ ,  $\gamma$ 에 의한 HMGB1의 인산화 양상이 recombinant PKC를 이용한 것과 다소 다른 것은 RAW264.7 세포에서 PKC isoform의 양적 차이에 의한 것으로 추측된다.<sup>45</sup> cPKC는 aPKC 및 nPKC와 달리  $Ca^{2+}$ 에 의해 활성화 되므로 세포질 내  $Ca^{2+}$ 농도를 증가시키면 LPS 자극이 없이도 HMGB1이 시간에 지남에 따라 분비되었다. 반대로 세포 내의  $Ca^{2+}$ 을 억제하였을 경우에는 LPS 자극이 와도 HMGB1의 분비가 감소하였다. HMGB1의 분비는  $Ca^{2+}$ 에 의존적으로 이루어짐을 알 수 있었다. 본 실험에서 세포내  $Ca^{2+}$  증가에 따라 활성화되는 많은 신호경로 중 cPKC가 HMGB1의 인산화에 주요한 영향을 끼친다는 것을 보였으며  $Ca^{2+}$ 의 증가를 억제하는 것이 HMGB1의 분비를 억제하는 기전이 될 수 있으나  $Ca^{2+}$  매개 다른 효소와의 관련성은 좀 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

LPS에 의해 활성화되는 MAPK, NF- $\kappa$ B, PI3K<sup>33</sup> 억제제를 이용하여 HMGB1의 분비 변화를 관찰한 결과 PI3K와 연관성이 있음을 밝혔다. PI3K에 의해 활성화 되는 다양한 세포에서 cPKC는 핵으로 이동한다.<sup>39-41</sup> 이러한

nuclear PKC는 세포의 증식이나 분화, 세포 사멸사, 심혈관 질병을 조절한다.<sup>36,37</sup> 본 실험에서도 핵 내로 이동된 cPKC가 HMGB1의 인산화에 관계됨을 밝혀 HMGB1을 매개로 하는 다양한 질병에서 HMGB1의 분비를 차단할 수 있는 근거를 제시하였다. MAPK, NF- $\kappa$ B를 억제하는 ethyl pyruvate는 TNF- $\alpha$ , HMGB1의 분비를 감소시켜 HMGB1의 분비에 MAPK, NF- $\kappa$ B의 연관 가능성을 제시하였지만<sup>42</sup> 본 실험에서 확인한 결과 MAPK (ERK, p38, JNK), NF- $\kappa$ B는 HMGB1의 분비와 무관함을 밝혔다. 이는 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  등 MAPK, NF- $\kappa$ B를 통해 전사단계에서 발현이 증가되어 이른 시간에 분비되는 전염증성 cytokine과는 다른 기전을 통해 post-translational modification을 거쳐 늦은 시간에 HMGB1의 분비가 이루어 짐을 짐작할 수 있으며 본 실험을 통해 HMGB1의 분비가 조절되는 기전중의 하나가 PI3K, cPKC 활성화를 통한 HMGB1의 인산화를 알 수 있었다.

부자의 뿌리 성분인 higenamine은 항염증적 성질이 보고되어 iNOS의 발현을 감소시키고 세포의 사멸사를 감소시키며 나아가 endotoxemia, ischemia-reperfusion injury에서 생존율을 높인다.<sup>24,25</sup> Higenamine 유도체 (CKD-712)는 패혈증 치료 후보제로 염증반응 억제의 연구되고 있으며 HMGB1 분비와의 연관성을 관찰한 결과, CKD-712는 독성을 보이지 않는 농도에서 LPS에 의해 유도된 HMGB1의 분비를 감소시켰다. CKD-712는 *in vitro* kinase assay를 통해 cPKC에 의한 HMGB1의 인산화를 감소시킨 것으로 보아 CKD-712의 HMGB1 분비 억제 기전을 이해할 수 있었다. CKD-712는 LPS 자극 후 4 시간 후에 그 억제 효과가 감소하는데 이것은 LPS 자극 후 1~2 시간 내에 HMGB1의 인산화가 일어나기 때문이라고 추측된다.<sup>9</sup>

CKD-712가 패혈증의 치료제로써의 가능성을 확인하기 위해서는 추후에 cecal ligation and puncture 모델을 통해 *in vivo* 상에서 CKD-712에 의한 HMGB1 분비가 감소 여부를 확인할 필요가 있다.

이상의 결과로 HMGB1의 인산화에 의한 분비 기전을 밝힘으로써 HMGB1의 분비를 차단시킬 수 있는 발판을 제시하였으며 CKD-712가 HMGB1의 인산화 및 분비를 차단 시키는 것을 통해 새로운 패혈증의 치료제가 될 가능성을 확인하였다 (그림 11).

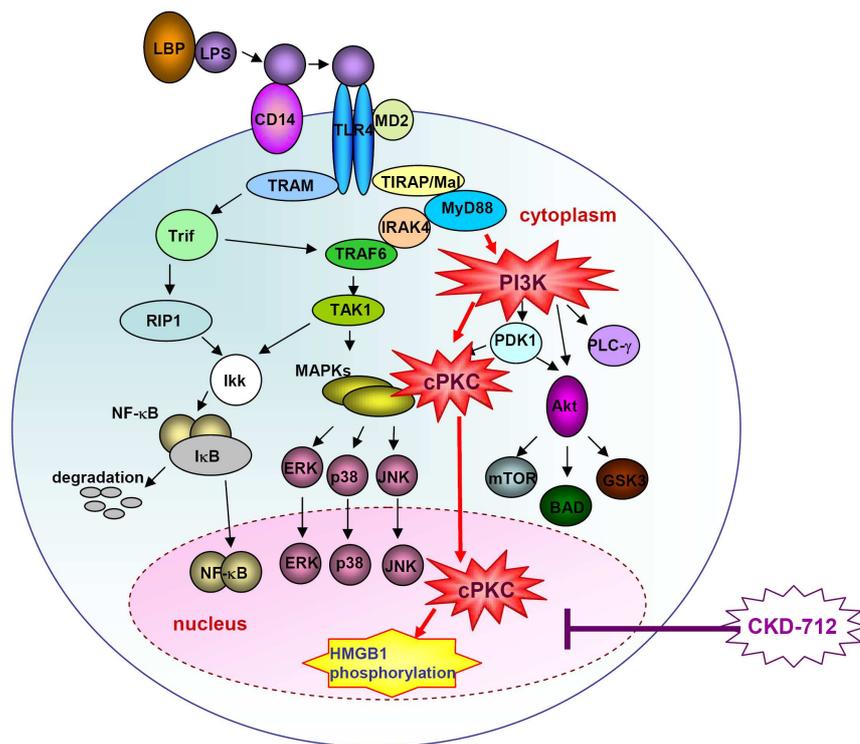


그림 11. 본 실험을 통해 제시하는 HMGB1의 인산화 기전 및 CKD-712의 작용 기전.

## V. 결론

1. 핵단백 HMGB1의 인산화를 일으키는 신호전달경로에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다. 따라서 본 실험은 LPS에 의해 유도되는 HMGB1의 인산화 및 분비에 영향을 미치는 신호전달경로를 실험하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

가. HMGB1의 분비는 MAPK, NF- $\kappa$ B 경로와는 무관하며, PI3K-PKC 경로에 의해 조절을 받는다.

나. HMGB1 인산화는 cPKC에 의해 되고 이는 CKII, cdc2에 의해서는 일어나지 않는다. cPKC는 HMGB1의 NLS에 위치한 serine 잔기를 alanine으로 치환한 mutant HMGB1을 인산화 시키지 못하고 wild type의 HMGB1을 시킨 것을 통해 cPKC는 HMGB1의 NLS에 있는 serine 잔기를 인산화를 시키는 것을 알 수 있었다.

다. HMGB1의 분비는  $Ca^{2+}$ 에 의존적인 것을 통해 HMGB1 분비에  $Ca^{2+}$ 에 의존적 cPKC의 활성화가 중요한 요소임을 간접적으로 확인하였다.

라. Recombinant PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 와 면역침강법을 통해 얻은 세포 내 PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ 를 이용한 *in vitro* kinase assay를 통해 cPKC 중 PKC  $\alpha$ 가 HMGB1 인산화에 더 많이 관여함을 확인 할 수 있었다.

본 실험을 통해 LPS에 의해 활성화 되는 PI3K, PKC에 의해 HMGB1의 분비가 조절되는 것을 알 수 있었다. 활성화된 cPKC에 의해 핵 안의 DNA와 결합하고 있는 HMGB1가 인산화 되어 분비되는 가능성을 확인할 수 있었다.

2. Higenamine 유도체 (CKD-712)는 항염증적 특성을 갖고 있으며 패혈증 치료 후보 물질로 HMGB1의 분비 및 PKC 신호전달경로에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

가. CKD-712는 LPS에 의해 유도된 HMGB1의 분비를 억제하였다.

나. CKD-712는 LPS에 의해 핵에 있던 HMGB1이 세포질로 이동을 억제하였다.

다. CKD-712는 HMGB1을 인산화 시키는 cPKC의 작용을 억제하였다.

이상으로 CKD-712는 HMGB1의 cPKC에 의한 인산화를 억제함으로써 HMGB1의 분비를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.

## VI. 참고문헌

1. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003;9:517-24.
2. Barie PS, Hydo LJ, Shou J, Eachempati SR. Efficacy and safety of drotrecogin alfa (activated) for the therapy of surgical patients with severe sepsis. *Surg Infect (Larchmt)* 2006;7:S77-80.
3. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, Yang R, Ochani M, Qiang X, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box1. *Mol Med* 2003;9:37-45.
4. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtländer T, Ferrier P, Ferrari S, et al. The lack of chromosomal protein HMG1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycemia in newborn mice. *Nat Genet* 1999;22:276-80.
5. Lang CH, Silvis C, Deshpande N, Nystrom G, Frost RA, et al. Endotoxin stimulates in vivo expression of inflammatory cytokines tumor necrosis factor alpha, interleukin-1beta, -6, and high mobility group protein 1 in skeletal muscle. *Shock* 2003;19:538-46.
6. Chen G, Li J, Ochani M, Rendon-Mitchell B, Qiang X, Susarla S, et al. Bacterial endotoxin stimulates macrophages to release HMGB1 partly through CD14- and TNF-dependent mechanisms. *J Leukoc Biol* 2004;76:994-1001.
7. Rendon-Mitchell B, Ochani M, Li J, Han J, Wang H, Yang H, et al. IFN- $\gamma$  Induces high mobility group box 1 protein release partly through a TNF- $\alpha$  dependent

- mechanism. *J Immunol* 2003;170:3890-7.
8. Tang D, Shi Y, Kang R, Li T, Xiao W, Wang H, et al. Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1. *J Leukoc Biol* 2007;81:741-7.
  9. Youn JH, Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 2006;177:7889-97.
  10. Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, Ferrera D, Porto A, Bachi A, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. *EMBO J* 2003;22:5551-60.
  11. Ito I, Fukazawa J, Yoshida M. Post-translational methylation of high mobility group box1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem* 2007;282:16336-44.
  12. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, Lotti LV, Torrisi MR, Bianchi ME, et al. The nuclear protein HMGB1 is secretory by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO reports* 2002;3:995-1001.
  13. Kokkola R, Andersson A, Mullins G, Ostberg T, Treutiger CJ, Arnold B, et al. RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol* 2005;61:1-9.
  14. Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim JY, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;290:C917-24.
  15. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, et al.

High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003;48:971-6.

16. Porto A, Palumbo R, Pieroni M, Aprigliano G, Chiesa R, Sanvito F, et al. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box1 protein. *FASEB J* 2006;20:2565-6.

17. Taguchi A, Blood DC, del Toro G, Canet A, Lee DC, Qu W, et al. Blockade of rage-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature* 2000;405:354-60.

18. Messmer D, Yang H, Telusma G, Knoll F, Li J, Messmer B, et al. High mobility group box protein 1: an endogenous signal for dendritic cell maturation and Th1 polarization. *J Immunol* 2004;173:307-13.

19. Stemmer C, Schwander A, Bauw G, Fojan P, Grasser KD. Protein kinase CK2 differentially phosphorylates maize chromosomal high mobility group B (HMGB) proteins modulating their stability and DNA interactions. *J Biol Chem* 2002;277:1092-8.

20. Ramachandran C, Yau P, Bradbury EM, Shyamala G, Yasuda H, Walsh DA. Phosphorylation of high-mobility-group proteins by the calcium-phospholipid-dependent protein kinase and the cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 1984;259:13495-503.

21. Palvimo J, Mahonen A, Mäenpää PH. Phosphorylation of high-mobility-group chromatin proteins by protein kinase C from rat brain. *Biochim Biophys Acta* 1987;931:376-83.

22. Deane JA, Fruman DA. Phosphoinositide 3-kinase: diverse roles in immune cell activation. *Annu Rev Immunol* 2004;22:563-98.
23. Fruman DA, Cantley LC. Phosphoinositide 3-kinase in immunological systems. *Semin Immunol* 2002;14:7-18.
24. Park JE, Kang YJ, Park MK, Lee YS, Kim HJ, Seo HG, et al. Enantiomers of higenamine inhibit LPS-induced iNOS in a macrophage cell line and improve the survival of mice with experimental endotoxemia. *Int Immunopharmacol* 2006;6:226-33.
25. Cao J, Zheng CD, Zhang GX, Zhang YJ, Min S. Protective effect of Shenfu injection on myocardial mitochondria injured by ischemia-reperfusion in rabbits. *Chin Med J (Engl)* 2005;118:505-7.
26. Feng X, Becker KP, Stribling SD, Peters KG, Hannun YA. Regulation of receptor-mediated protein kinase C membrane trafficking by autophosphorylation. *J Biol Chem* 2000;275:17024-34.
27. Stewart JR, Christman KL, O'Brian CA. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. *Biochem Pharmacol* 2000;60:1355-9.
28. Liu Y, Liu YC, Meller N, Giampa L, Elly C, Doyle M, et al. Protein kinase C activation inhibits tyrosine phosphorylation of Cbl and its recruitment of Src homology 2 domain-containing proteins. *J Immunol* 1999;162:7095-101.
29. Xiao DM, Pak JH, Wang X, Sato T, Huang FL, Chen HC, et al. Phosphorylation

of HMG-I by protein kinase C attenuates its binding affinity to the promoter regions of protein kinase C  $\gamma$  and neurogranin/RC3 genes. *J Neurochem* 2000;74:392-9.

30. Banks GC, Li Y, Reeves R. Differential in vivo modification of the HMG1(Y) nonhistone chromatin proteins modulate nucleosome and DNA interaction. *Biochemistry* 2000;39:8333-46.

31. Taro Fukao, Shigeo Koyasu. PI3K and negative regulation of TLR signaling. *Trends Immunol* 2003;24:358-63.

32. Hazeki K, Nigorikawa K, Hazeki O. Role of phosphoinositide 3-kinase in innate immunity. *Biol Pharm Bull* 2007;30:1617-23.

33. Jones BW, Heldwein KA, Means TK, Saukkonen JJ, Fenton MJ. Differential roles of Toll-like receptors in the elicitation of proinflammatory responses by macrophages. *Ann Rheum Dis* 2001;3:iii6-12.

34. Neri LM, Martelli AM, Borgatti P, Colamussi ML, Marchisio M, Capitani S. Increase nuclear phosphatidylinositol 3-kinase activity and phosphatidylinositol (3,4,5) triphosphate synthesis precede PKC- $\zeta$  translocation to the nucleus of NGF-treated PC12 cells. *FASEB J* 1999;13:2299-310.

35. Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, Ando K, Mitsudo K, Nobuyoshi M. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc Pathol* 2007;16:136-43.

36. D.A. Salamanca, R.A. Khalil. Protein kinase C isoform as specific target for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension. *Biochem Pharmacol* 2005;70:1537-47.

37. Wolf SC, Brodbeck C, Sauter G, Risler T, Brehm BR. Endithelin-1 regulates protein kinase C isoform differently in smooth muscle cells and cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol* 2004;44:S301-3.
38. Spitaler M, Cantrell DA. Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol* 2004;5:785-90.
39. L.M. Neri, P. Borgatti, S. Capitani, A.M. Martelli. Nuclear diacylglycerol produced by phosphoinositide-specific phospholipase C is responsible for nuclear translocation of PKC- $\alpha$ . *J Biol Chem* 1998;273:29738-44.
40. B. Sun, N.R. Murray, A.P. fields. A role for nuclear phosphatidylinositol-specific phospholipase C in the G2/M phase transition. *J Biol Chem* 1997;272:26313-7.
41. Neri LM, Bortul R, Borgatti P, Tabellini G, Baldini G, Capitani S, et al. Proliferating or differentiating stimuli act on different lipid-dependent signaling pathways in nuclei of human leukemia cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:947-64.
42. Ulloa L, Ochani M, Yang H, Tanovic M, Halperin D, Yang R, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:12351-6.
43. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248-51.
44. Merenmies, J., Pihlaskari, R., Laitinen, J., Wartiovaara, J. & Rauvala, H. 30-kDa heparin-binding protein of brain (amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane. *J Biol Chem* 1991;266:16722-9.

45. Oh CD, Kang SS, Ha MJ, Chun JS. Analysis of protein kinase C isoforms involved in the activation of laminin receptor in Raw264.7 macrophages. *IUBMB Life* 1999;48:439-43.

## **Abstract**

### **HMGB1 is phosphorylated by protein kinase C that results in secretion**

**Young Joo Oh**

**Department of Medical Science**

**The Graduate School, Yonsei University**

**(Directed by Professor Jeon-Soo Shin)**

High mobility group box-1 protein (HMGB1), which is secreted from activated monocytes/macrophages, has been studied as a key late mediator of systemic inflammatory diseases including sepsis, ischemia/reperfusion. The regulation of secretion is important to control the systemic inflammation diseases. Phosphorylation of HMGB1 is one of the major secretion pathways in our previous report. To investigate the phosphorylation-related pathway of HMGB1, LPS-induced HMGB1 secretion was observed with various inhibitors in RAW264.7 cells and human monocytes. When RAW264.6 cells were pre-treated with SP600125 (JNK inhibitor), PD098059 (ERK inhibitor) and SB203580 (p38 inhibitor), LPS-induced HMGB1 secretion was not changed. SN-50 and Bay-11, the NF- $\kappa$ B inhibitors, also failed to inhibit HMGB1 secretion. However, wortmannin and LY294002 inhibited HMGB1

secretion, suggesting that phosphoinositide 3-kinase (PI3K) is involved in secretion of HMGB1. Akt inhibitor IV and rapamycin failed to inhibit HMGB1 secretion, suggesting no relevance of Akt-mTOR axis pathway. In contrast, protein kinase C (PKC) inhibitor Gö6983 and Ro-31-7549 could inhibit HMGB1 secretion. And it is confirmed by that HMGB1 was directly phosphorylated by conventional PKCs (cPKCs) but not by casein kinase II or cdc2 in *in vitro* kinase assay. A23187, a calcium ion specific ionophore, could induce HMGB1 secretion without LPS stimulation and BAPTA-AM, an intracellular calcium ion chelator, could block LPS-induced HMGB1 secretion, supporting that Ca<sup>2+</sup>-dependent cPKC activation is involved in the secretion of HMGB1. Also, we investigated an effect of higenamine derivative (CKD-712) on HMGB1 secretion, which has been studied as a candidate drug for sepsis. CKD-712 could inhibit LPS-induced HMGB1 secretion on RAW264.7 and human monocyte and inhibit HMGB1 translocation from nucleus to cytoplasm. *In vitro* kinase assay, HMGB1 phosphorylation by cPKCs was reduced by CKD-712 in a dose-dependent manner. Taken together, we propose that cPKCs is an effector kinase for HMGB1 phosphorylation, which is one of the secretion pathways, and PI3K may act in concert to control of HMGB1 secretion via independent manner of MAPK and NF-κB pathways. Also, we suggest that CKD-712 could be one of the novel drugs to inhibit HMGB1 secretion.