

**HMGB1이 보체의 고전 경로
활성화에 미치는 영향**

연세대학교 대학원

의과학과

이 상 은

HMGB1이 보체의 고전 경로 활성화에 미치는 영향

지도교수 신 전 수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2008년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

이 상 은

이상은의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 신 전 수 인

심사위원 최 인 홍 인

심사위원 박 용 범 인

연세대학교 대학원

2008년 12월

감사의 글

지난 2 년은 제게 용기와 끊임 없는 도전을 요구하는 과정이었습니다. 부족한 저를 이끌어주시고 세심한 관심과 지도로 저를 한 걸음 더 나아가게 해주신 신전수 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 저의 연구를 관심있게 지켜봐 주시고 조언을 아끼지 않으신 최인홍 교수님과 박용범 교수님께도 감사를 드립니다. 김세종 교수님, 박전한 교수님, 조상래 교수님, 이봉기 교수님, 김종선 교수님, 이재면 교수님 등이 계셨기에 많은 가르침을 얻을 수 있었습니다.

실험의 기초부터 차근차근 가르쳐 주시며 실험의 흥미를 이끌어 주신 윤주호 선생님과 힘들 때 격려와 위로, 그리고 관심과 조언으로 많은 도움을 주신 김은숙, 연수인 선생님께 감사 드립니다. 또한 실험실 생활의 첫 걸음을 함께하며 가르침을 주신 김아름 선생님과, 고민을 함께하며 힘을 준 영주, 따뜻한 말 한마디와 격려를 아끼지 않은 미화 언니, 그리고 항상 옆에서 따뜻한 베풀어 주어진 연정언니에게 감사를 드립니다. 감사와 사랑을 전해주는 고마운 존재인 이선화 선생님과 새롭게 우리와 함께 실험을 시작하며 열심인 WUJIE에게도 감사의 말을 전합니다. 항상 밝은 얼굴로 인사하며 안부를 챙기는 셋별이와 민경언니, 학위 과정을 함께 한 현주 언니, 소영이 그리고 친절한 미소로 대해주시는 김형란, 양은정 선생님께도 감사 드립니다. 부탁할 때마다 흔쾌히 들어주시는 서진원 선생님, 실험실에서 항상 함께하며 도움을 주시는 많은 교실원 선생님들께도 감사의 마음을 전합니다.

연락 못하고 챙기지도 못하는 친구를 이해해주고 응원하는 대학 친구들과 오랜 시간 함께하며 존재 만으로도 힘이 되는 병진이, 성현이, 지영이, 주미에게도 감사 드립니다.

묵묵히 힘든 시간 함께하며 다시 일어날 수 있도록 힘을 주는 든든한 버팀목 명진 오빠에게 감사드리며, 마지막으로 밤낮으로 기도하며 막내 딸을 응원하시는 사랑하고 존경하는 아버지, 어머니 그리고 좋은, 주은 언니에게 감사하다는 말을 전하고 싶습니다.

저자 씀

차례

국문요약.....	1
I. 서론.....	3
II. . 재료 및 방법	
1. 클로닝.....	7
2. 재조합 단백질의 발현과 용해성 여부 확인 및 대량 배양을 통한 단백질 확보	
가. 재조합 단백질의 발현과 용해성 여부 확인.....	8
나. 대량 배양을 통한 단백질 확보.....	9
다. Western blot analysis.....	11
3. 효소면역항체법 (ELISA)	
가. Direct binding assay.....	12
나. Complement activation assay.....	13
4. 표면 플라즈몬 공명법 (surface plasmon resonance assay).....	14
5. Affinity 결합 여부.....	15
III. 결과	
1. GST-His ₆ -Gly ₃ -HMGB1 단백질 발현을 위한 클로닝.....	17

2. <i>E. coli</i> 내 HMGB1 재조합 단백질의 발현 및 정제.....	19
3. ELISA를 통한 HMGB1과 C1q의 상호 결합 여부.....	21
4. Biacore를 통한 HMGB1과 C1q의 상호 결합 여부.....	22
5. Affinity를 통한 HMGB1과 C1q의 상호 결합 여부.....	24
6. HMGB1 및 C1q 결합에 따른 C4의 활성화.....	26
7. 막공격복합체 (membrane attack complex, MAC)의 형성.....	27
IV. 고찰.....	29
V. 결론.....	33
참고문헌.....	34
영문요약.....	39

그림 차례

그림 1. 박테리아 내 HMGB1 발현을 위한 plasmid construct 제작.....	18
그림 2. HMGB1 재조합 단백질의 <i>E. coli</i> 내 발현 및 정제.....	20
그림 3. HMGB1과 C1q간의 결합.....	21
그림 4. HMGB1과 HMGB1의 A, B box의 C1q와의 실시 간 결합.....	23
그림 5. HMGB1과 혈청 내 C1q 간의 결합.....	25
그림 6. 보체의 고전적 경로의 활성화에 의한 C4b deposition.....	26
그림 7. 보체의 고전적 경로의 활성화에 의한 MAC deposition.....	27
그림 8. HMGB1에 의한 보체의 고전적 경로의 활성화	28

약자

C5aR	C5a receptor
CRP	C-reactive protein
EDC	1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
GST	glutathione S-transferase
GVB	gelatin veronal buffer
HMGB1	High mobility group box 1 protein
IL	Interleukin
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyrano-side
LPS	lipopolysaccharide
MAC	membrane attack complex
NHS	<i>N</i> -hydroxysulfosuccinimide
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	phenylmethanesulphonylfluoride
SAP	serum amyloid P
SPR	surface plasmon resonance
TNF- α	tumor necrosis factor- α

국문요약

HMGB1이 보체의 고전 경로 활성화에 미치는 영향

보체의 작용은 미생물 감염에 대한 숙주의 저항성을 제공하는 중요한 선천성 면역 기전 중의 하나이다. 패혈증에서 보체는 과도하게 활성화된 형태로 나타난다. 이러한 보체의 활성화에 의해 생산되는 C5a와 같은 anaphylatoxin는 강한 주화성을 나타내는 보체 단백질로서 면역 세포를 모집하고 자극하여 감염 부위의 염증 반응을 증가시키는 역할을 한다.

High mobility group box 1 (HMGB1)은 미생물 감염에 의해 lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극이 왔을 때, 면역 세포가 능동적으로 분비하거나 세포 괴사가 일어나는 세포에 의해 수동적으로 분비되는 핵 단백질이다. 이는 세포 밖에서 사이토카인 (cytokine)과 같은 역할을 함으로써 질병에서 염증 반응을 증가시키는 매개체 역할을 한다. 이러한 HMGB1은 패혈증뿐 아니라 다양한 질병에서 혈청 내 높은 농도로 관찰된다.

미생물 감염에 의한 질병에서 비정상적으로 활성화된 보체 단백질의 역할과 HMGB1의 작용은 각기 그 중요성과 이들을

통한 질병 치료를 위한 연구 들이 진행되었으나, 이들 둘 간의 상관 관계와 작용은 아직 연구된 바가 없다. 따라서 여기서 보체 단백질 C1q와 HMGB1의 결합 여부와 보체 활성화 실험을 통하여 그 여부를 알아보고자 하였다.

보체의 고전적 경로 (classical complement pathway)의 활성화를 이끄는 첫 분자인 C1q와 HMGB1과의 결합 여부는 효소면역항체법 (ELISA), 표면 플라즈몬 공명법 (BIACORE) 그리고 두 단백질 간의 affinity 결합을 통하여 확인하였다. C1q 또는 HMGB1을 부착한 후 각 상대되는 단백질을 농도 별로 반응시켰을 때, 이들 간의 결합이 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 또한, 이들 간의 결합이 실질적으로 보체의 고전적 경로를 활성화시키고 있음을 보체 활성화 실험을 통해 표면에 보체의 C4b와 막공격복합체 (membrane attack complex, MAC)가 혈청 농도 별 반응에 따라 축적되는 양상을 통하여 알 수 있었다.

이로써 본 연구는 혈청 내 증가된 HMGB1이 C1q와의 결합이 보체의 고전적 경로의 활성화를 통해 질병에서 염증 반응을 증가시키는 매개 물질로서 작용할 수 있다는 가능성을 새롭게 제시하였다.

핵심 되는 말: HMGB1, 패혈증, 보체, 고전적 경로

HMGB1이 보체의 고전 경로 활성화에 미치는 영향

<지도교수 신 전 수>

연세대학교 대학원 의과학과

이 상 은

I. 서론

패혈증 (sepsis)과 전신성 염증 반응 증후군 (systemic inflammatory response syndrome)은 적절한 염증 반응 조절 기능의 저하를 수반함으로써 그 치사율이 30-70%에 이르는 것으로 보인다.¹ 패혈증은 혈액 내에 박테리아가 감염이 되었을 때, 과도한 면역 반응의 유발에 의해 발생된다. 이에 관여하는 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 면역 매개물질을 특이적으로 억제함으로써 패혈증을 치료하기 위한 임상적 시도를 하였으나 실패하였다.^{1,2}

보체계 (complement system)는 미생물 감염에 대한 숙주 방어 기전으로서 알려진 대표적인 선천성 면역 기전 중의 하나이다. 패혈증은 보체를 과도하게 활성화 시키며, 이로 인해 전염증성

펩타이드 (pro-inflammatory peptide)인 C5a 등의 보체계 물질 들을 과다 생산해 낸다. 패혈증에서 증가된 C5a는 대식세포로부터 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 분비를 상당히 증가시키며,² 상피 세포로부터 응고 인자들을 분비해 내거나³⁻⁷ 호중구에 의한 탐식 작용을 방해하는 등⁸ 의 작용을 한다. 이로써 과도히 증가된 보체의 활성화는 오히려 미생물 감염에 대한 민감성을 증가시키게 된다. 패혈증에서 이른 시간 내에 분비되는 전염증성 사이토카인 중 하나인 IL (interleukin)-6는 C5aR (C5a receptor)의 발현을 증가시켜 C5a에 의한 다양한 기관들의 상해 위험성을 증가시킨다. 또한 IL-6는 C-reactive protein (CRP) 매개한 보체를 활성화 시킴으로써⁹ 패혈증에서 또 다른 기능을 하는 것으로 보인다. 보체계 물질들과 패혈증에 관여되는 전염증성 사이토카인과의 이러한 관련성은 패혈증 환자 내에서 높은 수준으로 검출되는 핵 단백질인 HMGB1과의 상관성 여부를 시사해주기도 한다.

HMGB1은 거의 모든 진핵 세포 내에 존재하는 핵 단백질이며, DNA의 minor groove에 결합¹⁰ 하여 전사를 조절하는 단백질로 알려져 있다.¹¹⁻¹⁶ HMGB1은 214 아미노산으로 이루어져 있으며 DNA와 상호작용하는 A box, B box 그리고 산성을 띠는 C-terminal tail로 구성되어 있다. 핵 내에 존재하는 HMGB1은 LPS (lipopolysaccharide)와 같은 내독소 (endotoxin)에 의해 활성화된 대식세포에 의해서 능동적으로 분비되거나 세포괴사 (necrosis)가 일어나는 세포에 의해서

수동적으로 분비된다. TNF- α 와 같이 자극 후에 빠른 시간 내에 분비되는 다른 사이토카인과는 달리 HMGB1은 자극 후 약 6~12 시간 이후에 대식 세포로부터 분비되는 late mediator이다. 분비된 HMGB1은 사람 단구 세포 (monocyte)로부터 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8과 같은 전염증성 사이토카인의 합성을 자극하며¹⁷ 사람 상피 세포 (epithelial cell)로부터 세포 부착분자 (adhesion molecule)의 발현을 증가시킨다.¹⁸ ¹⁹ 또한 HMGB1은 주화성 (chemotaxis)의 역할을 하여 면역반응에 관여하는 면역 세포들을 모집하는 역할을 한다.^{17, 20, 21}

보체의 고전적 경로 (classical complement pathway)는 항원을 인식한 항체 복합체 (antigen-antibody complex)를 인식하거나 항체 비의존적으로 CRP와 같은 단백질을 인식하는 시작 분자인, C1q에 의해서 활성화 된다. C1 복합체의 활성화에 의해 C4는 C4b와 anaphylatoxin인 C4a로 분해되며, C4b는 목표물에 결합함으로써 다른 보체 들의 활성화를 이끈다. 이어 보체 활성 경로에 관여하는 C2,3,5,6,7,8,9의 순차적 작용에 의해서 표적세포 표면에 막공격복합체 (membrane attack complex, MAC)를 형성하여 결국 죽임으로써 숙주의 저항성을 나타낸다. 하지만 이러한 보체의 활성화는 양면성을 지니고 있어, 미생물 감염에 의한 적절한 반응은 숙주에게 이롭게 작용하지만 지속적인 자극에 의한 과도한 활성화는 오히려 면역 반응을 증가시켜 질병을 악화 시키는 원인 요인으로 작용하기도 한다.

HMGB1은 패혈증에서 감염 물질에 의해 자극을 받은 면역 세포에 의해 늦은 시간대에 다량으로 분비되며 염증 반응을 유발시키는 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있지만, 그 질병 모델에서 과도하게 활성화되어 나타나는 보체계와 상관성 여부는 아직 연구된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 보체의 고전적 경로의 활성화의 시작 분자인 C1q와 HMGB1과의 결합 여부와 결합에 의한 보체 활성화 연구를 통하여 패혈증에서 이들 간의 관계와 역할을 규명하고자 하였다.

II. 재료 및 실험 방법

1. 클로닝

사람 HMGB1은 N-말단에 여섯 개의 histidine과 이어 세 개의 glycine을 coding하는 유전자를 얻기 위기 위하여 PCR primer를 제작하였다. Primer 유전자 서열은 다음과 같다: 5'-CG GAATTC
EcoRI
CATCATCATCATCATCAT GGTGGTGGT ATGGGCAAAGGAGATCCTA
His₆ Gly₃
AG-3' (앞), 5'-CCG CTCGAG TTATTCATCATCATCATCTTCTTCTTC-3'
XhoI
(뒤). 중합효소 연쇄 반응은 500 ng의 HMGB1의 염기가 pRSETB 발현 벡터에 클로닝되어 있는 플라스미드 DNA,²² 10 mM dNTP (Takara, Shiga, Japan), 1 U의 Phusion DNA polymerase (Finnzymes OY, Espoo, Finland), primer를 20 pmol씩 넣어 thermal cycler에서 반응시켰으며, 반응 시 조건은 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 1분을 한 cycle로 하여 이를 30 번 반복하였다. 반응을 마친 PCR 산물은 1% agarose gel에서 전기영동 하여 확인하였고, 이를 gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 순수한 PCR 산물을 얻었다. 제한효소 처리는 4 µg의 PCR 산물과 5 µg의 pGEX-4T-1 발현 벡터 (Pharmacia, Uppsala, Sweden)를 20 U의 *EcoRI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA)과 *XhoI* (NEB)과 섞은 후 37°C에서 하루 밤 반응시켜 절단하였으며, 반응 산물은 PCR purification kit (Qiagen)을 사용하여 순수한 DNA 만을 얻었다. 정제된

DNA는 발현 벡터 : PCR 산물의 몰 비율 (molar ratio)이 1 : 1, 1 : 3, 1 : 5가 되도록 하여 10 U의 T4 DNA ligase (NEB)를 사용하여 16°C에서 하루 밤 반응시켜 ligation을 하였다. 20 μ l의 ligation 반응 산물 중 10 μ l 만큼 취하여 *E. coli* DH5 α (Real Biotech Corp., Taipei, Taiwan)에 형질전환 (transformation) 하였다. 단일 colony는 100 μ g/ml ampicillin이 첨가되어 있는 LB 배지 3 ml에 접종하여 37°C에서 하루 밤 배양한 후 mini prep kit (Qiagen)을 사용하여 플라스미드를 추출하였다. 클로닝이 되었는지 여부는 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단하여 원하는 유전자의 크기가 나오는지 DNA 전기영동을 통하여 확인하였고, 클로닝 한 유전자의 염기서열을 분석하였다. 이로써 GST-His₆-Gly₃-HMGB1의 단백질의 생성을 위한 DNA construct를 제작하였다.

2. 재조합 단백질의 발현과 용해성 여부 확인 및 대량 배양을 통한 단백질 확보

가. 재조합 단백질의 발현과 용해성 여부 확인

클로닝된 DNA는 *E. coli* BL21(DE3) pLysE (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)와 얼음 위에서 30 분간 반응시킨 후, 42°C에서 90 초 동안 heat shock을 주었다. Heat shock 이후 얼음 위에서 1 분간 반응시킨 후 300 μ l의 LB를 넣고 37°C에서 45 분간 흔들어 배양하였다. 이를 100

$\mu\text{g/ml}$ ampicillin과 34 $\mu\text{g/ml}$ chloramphenicol이 첨가되어 있는 LB plate에 도달한 후 37°C에서 하루 밤 배양하였다.

두 개의 colony는 항생제가 첨가되어 있는 10 ml LB 배지에 각각 접종하여 OD₆₀₀가 0.4까지 배양한 후, 1 mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside)로 37°C에서 4 시간 또는 20°C에서 6 시간 흔들어 배양하여 *E. coli* 내 단백질 생성을 유도하였다. 유도된 각 조건의 배양액 중 100 μl 는 따로 취한 후 원심 분리하였고, cell pellet은 2X sample buffer [24 mM Tris-HCl pH 6.8, 20 % glycerol, 0.8% sodium dodecyl sulfate (SDS), 5.76 mM 2-mercaptoethanol, 0.04 % bromophenol blue]을 넣어 5 분간 끓인 후, western blotting에 사용하였다.

또한 각 조건의 배양액은 원심 분리하여 cell pellet으로 얻은 후, 상온에서 600 μl 의 용해 버퍼 [1X bugbuster (Novagen, Madison, WI, USA), 1 mM PMSF (phenylmethanesulphonylfluoride), 0.1% triton X-100, 1X benzonase nuclease (Novagen) in PBS, pH 8.0]를 넣고 용해 시키는 freezing-thawing 방법을 사용하였다. 이렇게 얻은 세포 용해물은 원심 분리를 통해 상층액과 가라앉은 cell pellet으로 분리하여 각각을 western blotting을 위한 시료 처리하였다.

나. 대량 배양을 통한 단백질 확보

제조합 단백질의 발현과 용해성 여부 확인 후 대량 배양을

위해서는 5 L 배지에 배양한 후 수확 (harvest)하였으며 이를 용해시켜 세포 용해물을 얻었다. 이는 원심 분리를 통해 상층액만을 취하여 GST column (Bioprogen, Seoul, Korea)에 결합시켰다. Column에 결합된 GST-His₆-Gly₃-HMGB1는 30 U의 thrombin을 상온에서 하루 밤 반응시켜 glutathione S-transferase (GST)를 제거한 His₆-Gly₃-HMGB1을 얻었다. 이는 Ni²⁺-NTA 결합 버퍼 (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 5 mM imidazole, pH 8.0)로 투석한 후, Ni²⁺-NTA resin (Novagen)과 4°C에서 2 시간 반응시켰다. 결합된 단백질은 150 mM imidazole이 첨가된 결합 버퍼로 용리(elution)하였고, 이렇게 정제된 단백질은 PBS로 투석한 후 사용하였다.

HMGB1의 A와 B box 단백질의 발현 및 정제는 HMGB1의 A와 B box의 염기가 pRSETB 발현 벡터에 클로닝되어 있는 플라스미드를 사용하였다.²² N-말단에 여섯 개의 histidine을 가지는 HMGB1의 A와 B box의 발현은 위의 HMGB1과 같은 방법으로 *E. coli* BL21(DE3) pLysE (Invitrogen)을 사용하여 대량 배양하여 0.5 mM의 IPTG로 20°C에서 하루 밤 동안 배양함으로써 *E. coli* 내 단백질 생성을 유도하였다. 박테리아 수확을 통하여 얻은 cell pellet은 freezing-thawing 방법을 이용하여 용해 및 Ni²⁺-NTA resin 결합 버퍼 [1 X bugbuster (Novagen), 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 1% triton X-100, 5% glycerol, 1 mM PMSF, 1X benzonase nuclease (Novagen), pH 8.0]에

용해시킨 후, 원심 분리기를 통하여 상층액 만을 취하였다. Ni²⁺-NTA resin (Novagen)을 박테리아 용해 후 분리한 상층액과 4℃에서 한 시간 동안 반응시켜 resin에 여섯 개의 histidine이 있는 HMGB1 A와 B box 단백질의 결합을 유도하였다. Resin에 결합된 단백질은 세척 버퍼 [50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 30 mM imidazole, 1% triton X-100, 5% glycerol, 1 mM PMSF, pH 8.0]로 반복 세척 후 300 mM imidazole이 첨가된 세척 버퍼로 용리 (elution)하였고, 이렇게 정제된 단백질은 PBS로 투석한 후 사용하였다.

다. Western blot analysis

재조합 단백질의 발현, 용해성 여부를 보는 20 μ l의 샘플에 5 μ l의 5X sample buffer를 넣은 후 5 분간 끓여 시료처리 하였다. 이는 12% SDS-PAGE gel을 이용하여 단백질 분리 후, nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)에 80 V 에서 2 시간 동안 transfer하였다. 이는 5% skim milk가 첨가되어 있는 PBST에 상온에서 한 시간 동안 blocking 하였다. PBST는 0.1% Tween 20 (USB, Cleveland, Ohio, USA)이 첨가된 PBS를 사용하였다. 이 후 anti-HMGB1 항체 (Abcam, Cambridge, UK)를 blocking 용액에 1:3000으로 희석하여 상온에서 한 시간 반응시켰다. 이는 PBST로 10 분간 3 번씩 세척 후 blocking 용액에 1:10,000으로 희석한 HRP-conjugated anti-rabbit IgGAM

(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) 을 상온에서 한 시간 반응시켰다. 이는 PBST로 세 번 세척 후 ECL (Lab frontier, Seoul, Korea)를 사용하여 발광 정도를 측정하였다.

3. 효소면역항체법 (ELISA)

가. Direct binding assay

ELISA plate (Corning costar, Corning, NY, USA)에 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 C1q (Sigma) 또는 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 HMGB1을 PBS (90 mM Na_2HPO_4 , 21.8 mM NaH_2PO_4 , 10 mM NaCl, pH 7.4)에 희석하여 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 4°C 에서 하루 밤 반응시켜 부착시켰다. Plate를 PBS로 세 번 세척한 후, 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma)이 있는 PBS를 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 상온에서 2 시간 동안 반응시켜 blocking하였다. 이후, HMGB1 또는 C1q를 결합 용액 (1% BSA와 0.15 mM CaCl_2 가 포함되어 있는 PBS)에 순차적으로 희석하여 상온에서 2 시간 혹은 4°C 에서 하루 밤 반응시켰다. Anti-human HMGB1 (Abcam)은 1:1500, 또는 anti-human C1q (Dako, Glostrup, Denmark)는 1:1000으로 blocking 용액에 희석하여 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 넣고, 상온에서 1 시간 반응시킨 후 0.05%의 Tween 20 (USB)이 첨가되어 있는 PBS (PBST)로 세척하고 HRP-conjugated anti-rabbit IgGAM (Sigma)을 상온에서 1 시간 반응시켰다. 이는 PBST로 세척 후 TMB (KPL, Gaithersburg, MD, USA)로 15 분 동안 반응시키고 OD 450 nm

과장에서 흡광도를 측정하였다.

나. Complement activation assay

Microtiter plates (Polysorb; Nunc, Roskilde, Denmark)에 65°C 20 분 동안 반응시켜 얻은 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aggregated IgG (Sigma), 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HMGB1 (R&D systems Inc., Minneapolis, MN, USA) 혹은 *E. coli* 에서 얻은 재조합 HMGB1 단백질을 75 mM carbonate-bicarbonate 버퍼 (pH 9.6)에 희석하여 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 4°C 하루 밤 반응시켜 부착하였다. 이는 PBS (137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.76 mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 세 번 세척하였다. Blocking은 1% BSA (Sigma)가 첨가된 PBS를 200 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 실온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 건강한 사람 혈액에서 얻은 혈청은 칼슘과 마그네슘이 첨가되어 있는 gelatin veronal buffered saline (GVB²⁺ 버퍼; Sigma)로 순차적으로 희석하여 C4b deposition을 보기 위해 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 37°C에 20 분 또는 C5b-9 deposition을 보기 위해 45 분 동안 반응시킨 후, 차가운 세척 용액 (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.5)로 세척함으로써 혈청의 반응을 종료시켰다. 이는 anti-C4c (Dako)를 1:1000 또는 anti-C5b-9 (Quidel, San Diego, CA, USA)을 1:1000으로 blocking 용액에 희석하여 100 $\mu\text{l}/\text{well}$ 로 첨가한 후 37°C에 1 시간 동안 반응시켰다. 이어 세척 후, anti-C4c에 대한 이차 항체인 HRP-conjugated anti-rabbit Ig

GAM (Sigma) 또는 anti-C5b-9에 대한 이차 항체인 HRP-conjugated anti-mouse IgGAM (Sigma)을 상온에서 1 시간 반응시켰다. 이는 TMB로 15 분 동안 반응시킨 후 OD₄₅₀에서 그 흡광도를 측정하였다.

4. 표면 플라즈몬 공명법 (surface plasmon resonance assay)

HMGB1과 HMGB1의 각 도메인(domain) A 및 B box 단백질과 C1q의 결합 정도는 BIACore 2000 (BIACORE, Uppsala, Sweden)을 사용하여 측정하였다. CM5 chip 내의 3 개의 flow-cells는 0.2 M 1-ethyl-3-(3 dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)와 0.05 M N-hydroxysulfosuccinimide (NHS)로 활성화시켰고, 활성화된 각 cell에 재조합 human HMGB1 (R&D systems), HMGB1의 A box와 B box를 pH가 4.0인 10 mM sodium acetate buffer (BIACORE)에 10 µg/ml로 희석하여 흘려보내 줌으로써 각 cell 표면에 단백질들의 결합을 유도하였다. 단백질이 결합되지 않은 cell 표면은 pH가 8.5인 1 M ethanolamine를 흘려보내 줌으로써 그 표면을 불활성화시켰다. 이로써 HMGB1은 3000 response units (RU), A와 B box는 1000 RU로 chip에 고정 시켰다.

C1q는 순차적으로 HBS-EP buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), 0.05 % Tween 20, pH 7.4)에 희석하였고, 이를 20 µl/min의 속도로 3 분간 흘려 보내어 반응시켰다. Chip 내 각 flow-cell의 표면은 50 mM NaOH로 30 µl/min의 속도로 10

초간 흘려 보내 cell 내의 결합된 단백질을 제거하고 재생시켰다. 음성 대조군 (negative control)은 활성화시킨 flow-cell 자체를 단백질을 고정시키지 않고 바로 불활성화시켜, BIAevaluation 3.0 software (BIAcore)를 사용하여 각 반응 값에서 음성 대조군의 값을 제거하여 결합 정도를 그래프화 하였다.

5. Affinity 결합 여부

HMGB1과 C1q의 결합 여부는 HMGB1을 EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin Reagents (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)로 biotin을 부착하여 사용하였다. Biotinylation은 2 μg 의 HMGB1을 100 μM 의 biotin용액 21.5 μl 를 넣어 얼음에서 2 시간 반응시켰다. Biotin이 부착된 단백질은 20 μl 의 streptavidin-microsphere (Bangs Laboratories Inc., Fishers, IN, USA)를 각각 첨가하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 이는 GVB²⁺ 버퍼 (Complement technologies, San Diego, CA, USA)로 세 번간 세척 후 streptavidin-microsphere로 preclearing을 마친 사람 혈청을 20%가 되도록 첨가하여 4°C에서 하루 밤 반응시켰다. 반응을 마친 microsphere는 세척 후 환원 조건 (reducing condition)인 2X sample buffer를 첨가하여 5 분간 끓였다. 이는 13000 rpm에 15 분 동안 원심 분리 후 상층액 만을 취해 western blotting을 위한 시료 처리 하였다. 양성 대조군은 20 μg 의 자연적 상태의 IgG (Sigma)와 65°C 20 분 동안

반응시켜 결집시킨 IgG를 100 μ M의 biotin용액 15.4 μ l을 넣고 반응시킨 것, 그리고 음성 대조군은 반응시키는 단백질 없이 biotin 만 첨가하여 반응시킨 것을 사용하였다.

각 샘플은 12% SDS-PAGE gel로 전기 영동하고 nitrocellulose membrane (Amersham Biosciences)으로 90 V에서 90 분간 단백질을 이동시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 하루 밤 blocking하였다. Anti-C1q (Dako) 항체를 1:1000으로 희석하여 1 시간 동안 상온에서 반응시켰으며, 이어 HRP-conjugated anti-rabbit IgGAM (Sigma)을 상온에서 한 시간 반응 시킨 후 ECL (Lab frontier)를 사용하여 발광 정도를 측정하였다.

III. 결과

1. GST-His₆-Gly₃-HMGB1 단백질 발현을 위한 클로닝

HMGB1은 *E. coli* 내 발현 정도와 단백질의 용해성을 높여주는 GST (Glutathione S-transferase)를 N-말단에 coding하는 플라스미드를 사용하여 클로닝 하였다. HMGB1을 위한 primer는 단백질 정제 과정에서 HMGB1의 N-말단에 있는 GST 제거 후 HMGB1을 분리해 낼 수 있는 꼬리인 여섯 개의 histidine을 coding하는 유전자를 첨가하여 제작하였다. 또한 histidine₆과 HMGB1 유전자 사이에 세 개의 glycine을 첨가하여 HMGB1 단백질과 근접해 있는 histidine₆ 꼬리가 외부로 잘 노출 되도록 하였다. GST-His₆-Gly₃-HMGB1 단백질 발현을 위한 DNA construct의 구조는 다음과 같다 (그림 1A). 또한 thrombin이 인식하여 절단하는 아미노산 배열이 HMGB1 내에 존재하지 않음을 확인하였다. 클로닝한 DNA construct는 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단하여 삽입된 유전자인 크기가 나오는지 DNA 전기 영동을 통하여 확인하였다 (그림 1B). 그 결과, 675 bp의 삽입된 유전자 His₆-Gly₃-HMGB1이 분리되어 나오는 것을 확인 할 수 있었다.

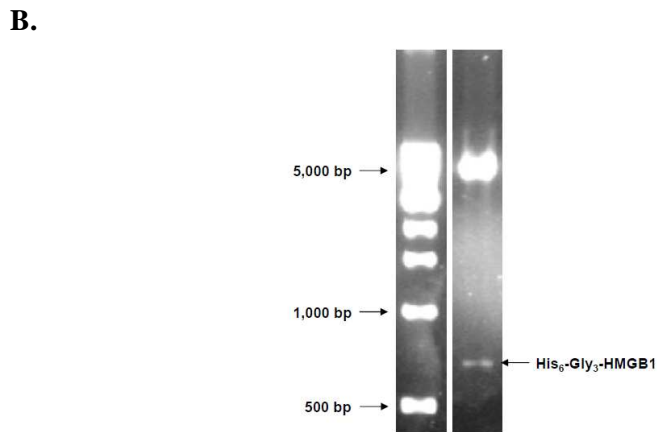
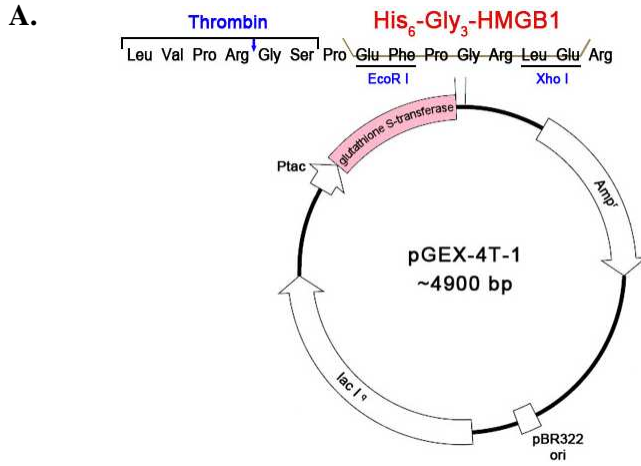


그림 1. 박테리아 내 HMGB1 발현을 위한 plasmid construct 제작.

A. GST-HMGB1 클론의 구조. B. GST-HMGB1 클론을 *EcoRI*과 *XhoI*을 처리하여 삽입된 675 bp의 His₆-Gly₃-HMGB1과 4900 bp의 발현 벡터를 확인함.

2. *E. coli* 내 HMGB1 재조합 단백질의 발현 및 정제

HMGB1을 클로닝한 plasmid construct는 *E. coli*에 형질 전환하여 배양한 후, 1 mM IPTG를 통한 단백질 발현을 유도하였다. 발현을 유도시킨 박테리아는 수확하여 박테리아 내 HMGB1 발현 여부를 western blotting을 통하여 확인하였다 (그림 2B, L lane). IPTG를 통한 발현 조건은 20°C, 하루 밤 또는 37°C, 4 시간으로 온도와 시간의 조건을 달리하여 단백질 발현 정도의 차이와 용해성 여부를 비교하였다. 그 결과, 두 조건이 발현 정도에 큰 차이를 보이지 않았으며 (그림 2B, S와 P lane), 단백질은 대부분 용해 가능한 (soluble) 상태로 발현되고 있음을 확인할 수 있었다. 이로써 단백질의 3차 구조가 유지되는 native 조건으로 단백질 정제가 가능함을 확인하였다.

HMGB1 재조합 단백질의 발현을 위한 DNA construct 제작 및 단백질 발현과 정제 과정에 적절한 조건의 확립 후, 박테리아의 대량 배양을 통해 HMGB1 재조합 단백질을 얻었다. 박테리아로부터 발현 되어 나온 GST-His₆-Gly₃-HMGB1는 thrombin을 처리하여 GST 단백질을 제거하였다. GST가 제거된 His₆-Gly₃-HMGB1 재조합 단백질은 His₆을 이용하여 Ni²⁺ resin에 반응시켜 한번 더 정제하였으며, 이렇게 얻은 HMGB1 단백질은 coomassie blue 염색과 western blotting을 통하여 순도와 HMGB1 단백질 여부를 확인하였다 (그림 2C). 확인된 HMGB1은 이후 보체 실험에 사용하였다.

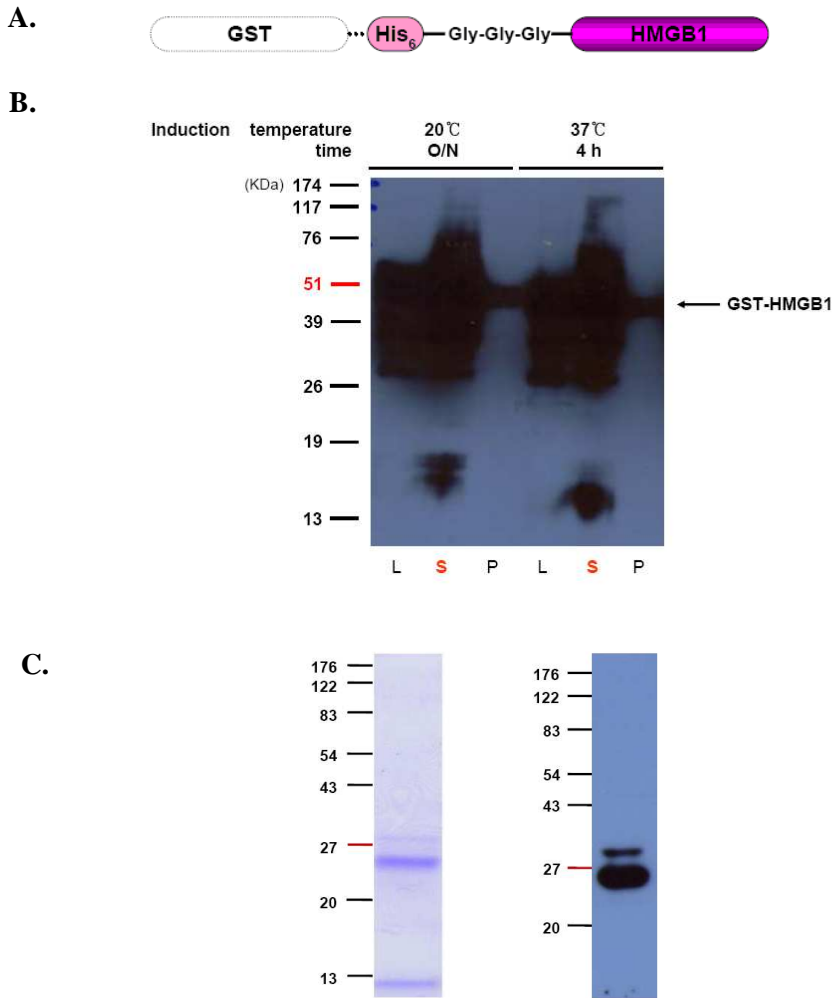


그림 2. HMGB1 재조합 단백질의 *E. coli* 내 발현 및 정제

A. *E. coli* 내 발현될 GST-HMGB1 융합 단백질의 구조. 그림 내 점선 (···)은 thrombin site를 의미함. B. GST-HMGB1 단백질을 *E. coli*에 형질 전환하여 배양, 1 mM의 IPTG로 20°C 에서 하루 밤 또는 37°C에서 4 시간 동안 단백질 발현을 유도하여 발현된 단백질의 용해성 여부를 anti-HMGB1 항체로

western blotting 하여 확인함. L: whole cell lysate, S: soluble, P: pellet (inclusion body)를 나타냄. C. Coomassie blue 염색을 통한 정제된 His₆-Gly₃-HMGB1의 확인과 anti-HMGB1 항체로 western blotting을 통해 HMGB1 단백질 탐지.

3. ELISA를 통한 HMGB1과 C1q의 상호 결합 여부

패혈증 내의 과도한 보체의 활성화와 이 질병에서 전염증성 사이토카인의 역할을 하는 HMGB1과의 상관성 여부를 알아보기 위하여, 보체의 고전적 경로의 활성을 이끄는 시작 분자인 C1q와 HMGB1 간의 결합 여부를 ELISA를 통하여 알아보았다. C1q(그림 3A) 또는 HMGB1(그림 3B)을 일정 농도로 표면에 부착한 이후에 HMGB1 또는 C1q를 농도를 증가시키며 반응시킨 결과, 농도 의존적으로 그 결합이 증가하는 것을 알 수 있었다.

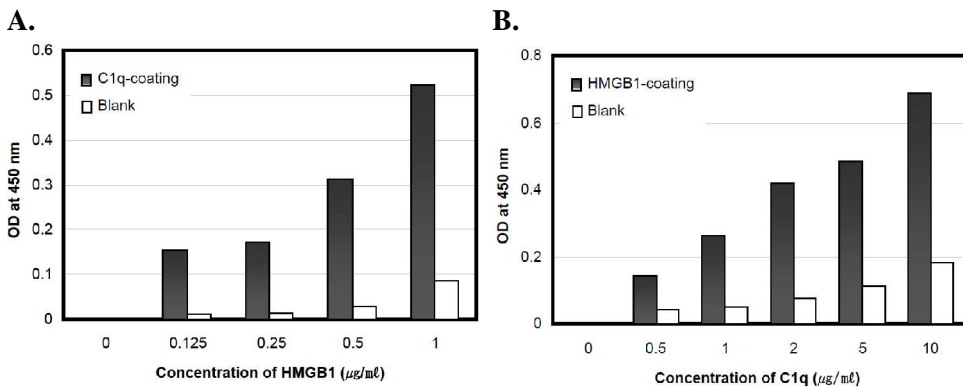


그림 3. HMGB1과 C1q 간의 결합. A. C1q 10 µg/ml을 microtiter plate에 부착시킨 후 HMGB1 농도를 2 배씩 증가시켜 넣고 그 결합 여부를 확인함.

B. HMGB1 3 $\mu\text{g/ml}$ 을 각 well에 부착시킨 후 용액 상의 C1q의 농도를 다양하게 넣고 그 결합 여부를 확인함. 각 단백질 부착 후 결합 버퍼만을 반응시켜 얻은 음성 대조군 값을 제거하고 그래프화 함. 이는 각각 3 번 반복 실험한 것 중 대표적인 결과를 보여줌.

4. Biacore를 통한 HMGB1과 C1q의 상호 결합 여부

HMGB1을 이루는 도메인은 A box, B box 그리고 강한 음성 전하를 띠는 C tail로 구분할 수 있다. C1q가 HMGB1의 어느 도메인에 의존적으로 결합하는지 여부를 확인하기 위하여 각 도메인을 CM5 chip에 부착한 이후 실시간 별 C1q 결합 정도를 확인하였다. 그 결과 C1q의 농도를 증가시키며 흘려줌에 따라 반응 단위가 증가함을 알 수 있었다. 또한 역으로, C1q를 부착한 이후에 HMGB1의 각 도메인 별로 농도를 증가시켜 결합하였을 때에도 같은 현상을 보이는 것을 알 수 있었다 (그림 4).

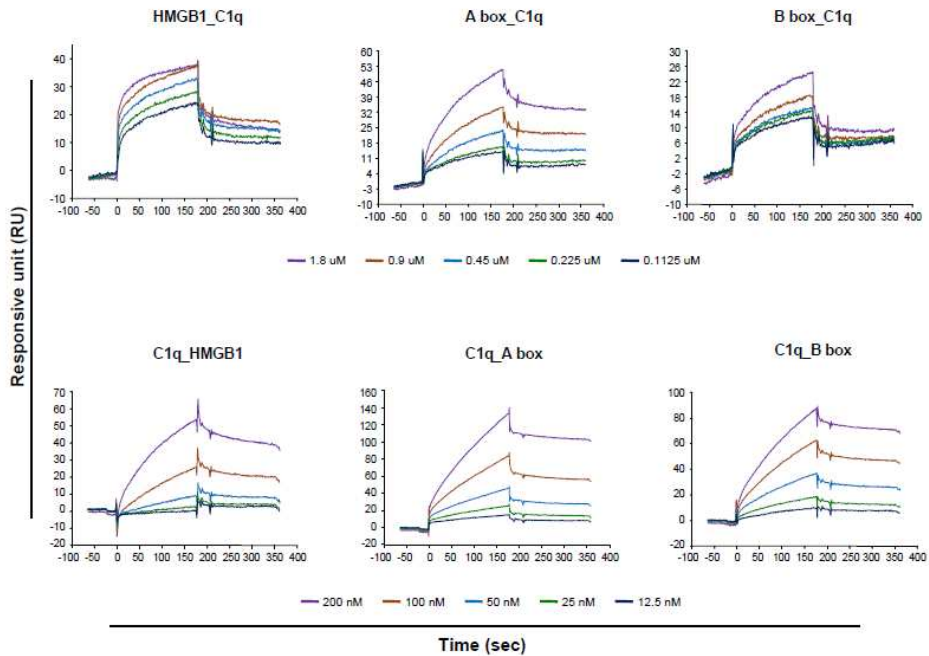


그림 4. HMGB1과 HMGB1의 A, B box의 C1q와의 실시간 결합. C1q 10000 RU를 CM5 chip에 고정시킨 후 HMGB1, A box 그리고 B box를 0.11, 0.23, 0.45, 0.9 및 1.8 μM 의 농도 별로 흘려 보내어 반응시킴 (위 panel). 역으로, 박테리아 내에서 발현시켜 정제한 HMGB1 단백질을 3000 RU, 그리고 A box, B box를 각각 1000 RU로 CM5 chip에 고정시킨 후, 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ 의 유속으로 C1q의 농도를 12.5, 25, 50, 100, 200 nM의 농도로 증가시켜 흘려 보내면서 결합을 유도함 (아래 panel). CM5에 단백질을 고정시키지 않고 불활성화 시킨 flow cell을 음성 대조군으로 사용하였으며 그 값을 제거하고 그래프화 함. 또한 흘려보내 주는 단백질 (Analyte)과 부착된 단백질 (Ligand)을 Analyte_Ligand형식으로 표시하였음.

5. Affinity를 통한 HMGB1과 C1q의 상호 결합 여부

효소 면역 항체법과 표면 플라즈몬 공명법을 통하여 HMGB1과 순수 정제된 C1q와의 직접적인 결합을 확인한 후, HMGB1이 실질적으로 사람 혈청 내에 존재하는 C1q와 결합하는지 확인하기 위하여 biotin-HMGB1을 streptavidin-microsphere와 반응시킨 후, 20% 사람 혈청을 첨가하여 그 여부를 확인하였다. C1q는 A, B 그리고 C chain을 구성하고 있는 복합체로서 환원적 조건에서 각각 27, 25, 23 KDa로 분리되어 나타난다. Western blotting 결과, 양성 대조군인 두 조건의 면역 글로블린 (IgG) 모두 음성 대조군과 비교하여 C1q 결합 정도가 증가하였으며, HMGB1 또한 농도 의존적으로 그 결합 정도가 증가 함을 확인할 수 있었다 (그림 5).

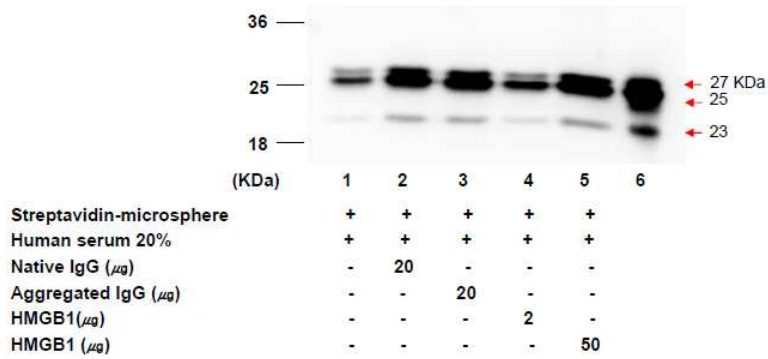


그림 5. HMGB1과 혈청 내 C1q 간의 결합. Biotin을 부착시킨 HMGB1 (2 그리고 50 μg)을 streptavidin-microsphere와 상온에서 한 시간 반응시켜 단백질이 microsphere에 결합하도록 함. 이를 GVB²⁺ 버퍼에 20% 사람 혈청 농도가 되도록 첨가한 후 4°C에서 하루 밤 반응시킴. Microsphere에 결합된 단백질을 환원 조건의 sample buffer로 용리하여 시료처리 후 anti-C1q 항체로 western blotting을 수행함. 양성 대조군은 자연적 상태의 IgG (20 μg), 열을 가하여 결집시킨 IgG (20 μg)에 biotin을 부착시킨 후 사용하였고 (lane 2와 3), 음성 대조군은 biotin을 부착하는 과정에서 반응시키는 단백질 없이 biotin만을 첨가하여 streptavidin-microsphere와 결합시킨 후 동일한 과정을 수행한 결과임 (lane 1). 또한, 6번째 lane은 loading control로 100 ng의 C1q 단백질을 나타냄. C1q의 A, B, 그리고 C chain은 환원적 조건에서 각각 27, 25 그리고 23 KDa을 나타냄.

6. HMGB1 및 C1q 결합에 따른 C4의 활성화

HMGB1과 C1q의 결합이 실질적으로 보체의 고전적 경로를 활성화 시키는지 여부를 알아보기 위하여 C4b deposition 여부를 확인하였다. 양성 대조군으로써 65°C에서 20 분간 열을 가하여 결집시킨 면역 글로블린 (aggregated IgG)을 사용하여 사람의 혈청을 농도 별로 증가시켰을 때 그 양상을 확인하였다. 그 결과 활성화에 의해 보체 고전적 경로의 중간 산물로서 생산되는 C4b가 혈청 농도 의존적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 동일하게 HMGB1을 부착시킨 후 보체 활성을 유도시켰을 때 양성 대조군과 같은 혈청 농도 별 C4b deposition 양상을 확인할 수 있었다. 이로서 HMGB1과 C1q의 결합이 보체의 고전적 경로의 활성을 이끌고 있음을 확인할 수 있었다 (그림 6).

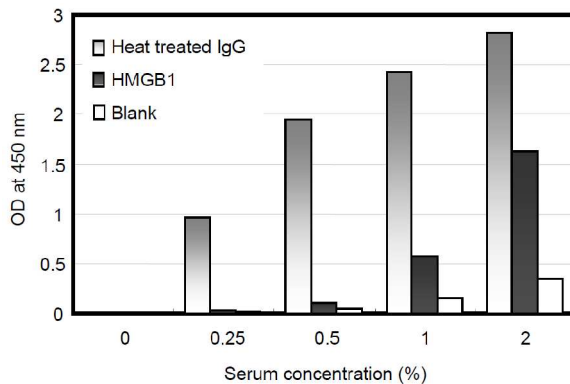


그림 6. 보체의 고전적 경로의 활성화에 의한 C4b deposition.

Microtiter plate에 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 HMGB1과 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 aggregated IgG (양성

대조군)를 부착한 후 0.25, 0.5, 1, 2% 사람 혈청을 넣어 20 분간 반응시킴. C4c 특이적 항체를 사용하여 축적된 C4b (deposited C4b) 정도를 측정함. 이는 3 번 반복 실험한 것 중 대표적인 결과를 보여줌.

7. 막공격복합체 (membrane attack complex, MAC)의 형성

HMGB1에 의한 보체의 고전적 경로의 활성화가 보체의 마지막 단계인 MAC의 형성을 이끄는지를 알아보기 위하여 MAC deposition 여부를 확인하였다. 이는 MAC이 형성되었을 때 발견되는 신생 항원 (neoantigen)을 탐지할 수 있는 단일 클론 항체를 사용하였다. 그 결과 양성 대조군과 비슷한 양상으로 HMGB1에 의한 혈청 농도 별 MAC의 축적 현상을 확인할 수 있었고 (그림 7), C4b deposition과도 일관성을 보이는 것을 알 수 있었다.

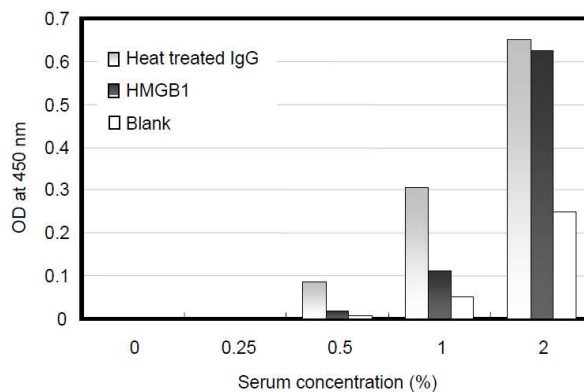


그림 7. 보체의 고전적 경로의 활성화에 의한 MAC deposition.

Microtiter plate에 10 $\mu\text{g/ml}$ HMGB1과 5 $\mu\text{g/ml}$ 의 aggregated IgG (양성 대조군)를

부착한 후 0.25, 0.5, 1, 2% 사람 혈청을 넣어 45 분간 반응시킴. C5b-9 특이적 항체를 사용하여 축적된 MAC (deposited MAC) 정도를 측정함.

이로써 보체의 고전적 경로의 활성화에 의해 생산되는 보체 중간 산물인 C4b와 최종 산물인 MAC의 형성을 통하여 HMGB1이 C1q의 직접적 인지를 통해 보체 고전적 경로의 활성을 이끌고 있음을 알 수 있었다 (그림 8).

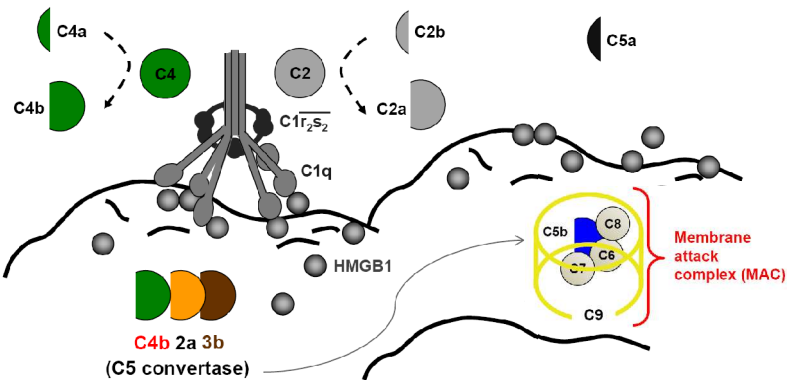


그림 8. HMGB1에 의한 보체의 고전적 경로 활성화.

IV. 고찰

HMGB1은 모든 진핵 세포의 핵 내에 존재하여 DNA에 결합함으로써 nucleosome을 안정화 시키며 전사를 조절하는 인자로서 알려져 왔지만,^{20, 23, 24} 최근에 핵 내에 존재하는 HMGB1이 질병과 관련하여 cytokine과 같은 역할을 함으로써 다양한 역할을 하는 중요 인자로서 연구되고 있다. 다른 cytokine과는 달리 감염 자극 이후 늦은 시간대에 분비되는 특징을 지닌^{25, 26} HMGB1은 면역 반응을 더 강화, 더 오랜 기간 지속시킬 수 있다는 점에서 주목할 만 하다. 미생물 감염에 대한 적극적인 숙주의 방어기전 중의 하나인 보체는 패혈증에서 과다 활성화 형태로 나타난다. 미생물 감염에서 LPS에 의해 활성화 되는 보체 대체경로 (alternative pathway), 박테리아 표면의 mannose에 의해 활성화되는 렉틴 경로 (mannose-binding lectin pathway), 그리고 항원-항체 복합체 (antigen-antibody complex) 에 의해 활성화되는 고전적 경로 (classical pathway)를 통한 보체의 작용과, 이러한 보체의 세 가지 경로에 의해 생산되는 anaphylatoxin인 C5a는 조절되지 않는 과다 면역 반응을 유도하여 이를 억제하기 위한 시도와 연구 결과들이 진행되어 왔다.

항체 비의존적으로 C1q와 결합하고 보체 고전적 경로의 활성을 이끄는 CRP, serum amyloid P (SAP), pentraxin과 같은 분자들은 낮은 PI

값을 가지고 산성을 띄는 성질이 있어 높은 PI 값을 가지는 C1q와의 상호작용이 용이하다는 보고가 있다.²⁷ HMGB1은 염기성 성질을 띄는 HMGB1의 A와 B box와 산성적 아미노산으로 대부분 구성되어 있어 낮은 PI 값을 지니도록 하는 HMGB1의 C tail로 구성되어 있다. 따라서 ELISA와 Biacore를 통하여 그들간의 상호 관계를 보기 위해, HMGB1을 microtiter plate 또는 CM5 chip에 부착하여 액체 상의 C1q의 결합을 유도하거나, C1q를 부착시킨 후 액체 상에 존재하는 HMGB1의 결합여부를 보았을 때 서로 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 이로서 두 물질이 결합한다는 것을 확인할 수 있었다. Biacore로 HMGB1 자체 단백질, HMGB1의 A box와 B box 단백질을 각각 부착한 후 C1q와의 결합을 확인하였을 때 각 도메인에서 모두 결합 정도를 나타내는 것을 볼 수 있었다. C1q는 서로 다른 A, B 그리고 C chain이 하나의 heterotrimeric structure를 이루고²⁸ 이러한 구조가 6개 모여있는 hexameric structure로서²⁹ 760 KDa의 거대 분자이다. 이러한 구조의 C1q는 N-말단의 collagen-like region과 C-말단의 globular (gC1q) domain을 가지고 있으며, C1q의 gC1q는 리간드 (ligand)와 주요하게 결합하는 부분으로 알려져 있다.²⁸ C1q는 리간드와 charge를 근본으로 한 상호작용을 하며 gC1q의 A, B, 그리고 C chain는 표면에 서로 다른 정전기적 성질을 지닌다.³⁰ C1q와 CRP, IgG, gC1q 수용체 등과 같은 리간드가 이러한 성질을 근본으로 한 상호작용을 하며 HMGB1이

amphoterin으로서 A, B box와 산성적 C tail을 가지고 양, 음성적 전하를 모두 띄는 특성을 고려하여 볼 때, HMGB1의 각 도메인과 C1q과의 상호작용이 charge를 근본으로 한 상호작용의 가능성이 있음을 예상할 수 있다.

HMGB1과 C1q와의 상호작용이 실질적으로 보체의 고전적 경로를 활성화 시키는지의 여부를 C4b와 MAC deposition으로 확인하였다. HMGB1에 의한 보체의 활성화가 양성 대조군과 비슷한 양상을 나타내는 것을 확인함으로써 이들의 상호작용이 보체의 고전적 경로의 활성화를 이끌고 있음을 확인할 수 있었다. 보체의 고전적 경로의 활성화는 C3a 또는 C5a와 같은 anaphylatoxin의 생산해 낼 뿐 아니라, 혈청 내의 다양한 보체 단백질들의 작용으로 마지막 단계로서 박테리아 세포 표면에 형성되는 MAC의 작용으로 박테리아에 대한 숙주의 저항성을 부여해 준다. C5a는 강력한 anaphylatoxin으로서 호중구 (neutrophil), 대식세포와 같은 면역 세포가 표현하고 있는 C5aR에 작용하여 전염증성 사이토카인으로서 작용한다.⁸ HMGB1 매개로 한 보체의 고전적 경로의 활성화가 이러한 강력한 염증 반응을 일으키는 물질을 생산해 냄으로써 질병에서 중요한 역할을 할 것이라고 생각된다.

HMGB1은 패혈증뿐 아니라 다양한 질병에서 혈청 내 높은 수준으로 관찰됨에 따라 그 중요성이 부각되는 단백질 중 하나이다.

알츠하이머 병 (Alzheimer disease), 동맥경화증 (atherosclerosis)에서 HMGB1은 질병을 심화시키는 매개 물질로서 보고되고 있다. 이러한 질병에서 보체 또한 과도히 활성화된 형태로 나타난다. 보체 조절 단백질 (complement inhibitors)에 의해 적절히 조절되지 않은 보체의 활성화는 손상된 숙주 세포의 표면에 MAC을 형성하여 자가 공격에 의한 정상 세포의 손상을 가져오기도 한다.³¹ 이는 HMGB1에 의한 보체의 활성화가 MAC을 형성하게 함으로써 패혈증뿐 아니라 다른 질병 모델에서 HMGB1의 역할을 생각해 보게 한다.

본 연구는 생체 외에서의 HMGB1과 보체 활성화의 관계를 밝힌 바, 생체 내에서의 HMGB1에 의한 보체의 작용과 그것의 영향을 알아보기 위한 실험이 추가적으로 진행된다면 이를 적용한 치료적 접근도 가능할 것으로 예상된다. 결론적으로 본 연구는 HMGB1과 보체 단백질인 C1q의 상호작용이 보체의 고전적 경로의 활성을 이끌어 HMGB1이 패혈증, 그 외 질병에서 보체의 활성화를 통해 면역 반응을 증가시킨다는 새로운 기전을 제시하는 바이다.

V. 결론

패혈증 및 일부 질병에서 HMGB1은 혈청 내에 고 농도로 존재한다. 또한 이들 질병에서 보체는 과도히 활성화된 형태로 나타난다. 하지만 혈청 내 증가된 HMGB1 과 보체와의 상관성 여부는 아직 밝혀진 바가 없다. 따라서 본 실험은 HMGB1과 C1q의 결합과 이로 인한 보체의 고전적 경로의 활성화를 확인함으로써, 혈청 내 증가된 HMGB1이 보체 활성을 통해 질병에서 염증 반응을 증가시키는 매개 물질로서 작용할 수 있다는 가능성을 새롭게 제시하였다.

VI. 참고문헌

1. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003;9:517-24.
2. Vincent JL, Sun Q, Dubois MJ. Clinical trials of immunomodulatory therapies in severe sepsis and septic shock. *Clin Infect Dis* 2002;34:1084-93.
3. Ikeda K, Nagasawa K, Horiuchi T, Tsuru T, Nishizaka H, Niho Y. C5a induces tissue factor activity on endothelial cells. *Thromb Haemost* 1997;77:394-8.
4. Muhlfelder TW, Niemetz J, Kreutzer D, Beebe D, Ward PA, Rosenfeld SI. C5 chemotactic fragment induces leukocyte production of tissue factor activity: a link between complement and coagulation. *J Clin Invest* 1979;63:147-50.
5. Carson SD, Johnson DR. Consecutive enzyme cascades: complement activation at the cell surface triggers increased tissue factor activity. *Blood* 1990;76:361-7.
6. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003;101:3765-77.
7. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmieg RE, Jr., Hui JJ, Chang KC, et al. Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans. *J Immunol* 2001;166:6952-63.

8. Huber-Lang M, Sarma VJ, Lu KT, McGuire SR, Padgaonkar VA, Guo RF, et al. Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. *J Immunol* 2001;166:1193-9.
9. Banks RE, Forbes MA, Storr M, Higginson J, Thompson D, Raynes J, et al. The acute phase protein response in patients receiving subcutaneous IL-6. *Clin Exp Immunol* 1995;102:217-23.
10. 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 box 1. *Mol Med* 2003;9:37-45.
11. Paull TT, Carey M, Johnson RC. Yeast HMG proteins NHP6A/B potentiate promoter-specific transcriptional activation in vivo and assembly of preinitiation complexes in vitro. *Genes Dev* 1996;10:2769-81.
12. Bianchi ME, Beltrame M. Flexing DNA: HMG-box proteins and their partners. *Am J Hum Genet* 1998;63:1573-7.
13. Jayaraman L, Moorthy NC, Murthy KG, Manley JL, Bustin M, Prives C. High mobility group protein-1 (HMG-1) is a unique activator of p53. *Genes Dev* 1998;12:462-72.
14. Vijayanathan V, Thomas T, Shirahata A, Thomas TJ. DNA condensation by polyamines: a laser light scattering study of structural effects. *Biochemistry* 2001;40:13644-51.
15. Mitsouras K, Wong B, Arayata C, Johnson RC, Carey M. The DNA

architectural protein HMGB1 displays two distinct modes of action that promote enhanceosome assembly. *Mol Cell Biol* 2002;22:4390-401.

16. Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13:170-8.

17. Andersson U, Wang H, Palmblad K, Aveberger AC, Bloom O, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. *J Exp Med* 2000;192:565-70.

18. Fiuza C, Bustin M, Talwar S, Tropea M, Gerstenberger E, Shelhamer JH, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. *Blood* 2003;101:2652-60.

19. Treutiger CJ, Mullins GE, Johansson AS, Rouhiainen A, Rauvala HM, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group 1 B-box mediates activation of human endothelium. *J Intern Med* 2003;254:375-85.

20. Park JS, Svetkauskaite D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004;279:7370-7.

21. Li J, Wang H, Mason JM, Levine J, Yu M, Ulloa L, et al. Recombinant HMGB1 with cytokine-stimulating activity. *J Immunol Methods* 2004;289:211-23.

22. Youn JH, Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 2006;177:7889-97.
23. West KL, Castellini MA, Duncan MK, Bustin M. Chromosomal proteins HMGN3a and HMGN3b regulate the expression of glycine transporter 1. *Mol Cell Biol* 2004;24:3747-56.
24. Stros M, Ozaki T, Bacikova A, Kageyama H, Nakagawara A. HMGB1 and HMGB2 cell-specifically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter. *J Biol Chem* 2002;277:7157-64.
25. Yang H, Ochani M, Li J, Qiang X, Tanovic M, Harris HE, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:296-301.
26. Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. Lipid unites disparate syndromes of sepsis. *Nat Med* 2004;10:124-5.
27. Lu JH, Teh BK, Wang L, Wang YN, Tan YS, Lai MC, et al. The classical and regulatory functions of C1q in immunity and autoimmunity. *Cell Mol Immunol* 2008;5:9-21.
28. Kishore U, Reid KB. C1q: structure, function, and receptors. *Immunopharmacology* 2000;49:159-70.
29. Kishore U, Reid KB. Modular organization of proteins containing C1q-like

globular domain. *Immunopharmacology* 1999;42:15-21.

30. Ghai R, Waters P, Roumenina LT, Gadjeva M, Kojouharova MS, Reid KB, et al. C1q and its growing family. *Immunobiology* 2007;212:253-66.

31. McGeer PL, McGeer EG. The possible role of complement activation in Alzheimer disease. *Trends Mol Med* 2002;8:519-23.

Abstract

HMGB1 binds to C1q and activates classical pathway of complement

Sang Eun Lee

Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeon-Soo Shin)

Serum complement proteins play an important role in resistance to infection. Complement is strongly activated in sepsis, and the complement-activated products of anaphylatoxins have biological activities leading to inflammation and chemotaxis. High mobility group box 1 protein (HMGB1) is released and plays roles as a pro-inflammatory cytokine-like molecule in sepsis even though HMGB1 is a poor inducer of TNF- α production in vitro treatment. To investigate whether HMGB1 can induce complement activation, we have been investigated the relationship between HMGB1 and complement system

in this study. First, we studied the involvement of HMGB1 in binding to C1q, an initiator of classical pathway of complement activation, using ELISA. The immobilized C1q bound to HMGB1 in a dose-dependent manner, and the reciprocal experiment of C1q binding to the immobilized HMGB1 showed the similar result. Surface plasmon resonance (SPR) assay showed the real time binding of HMGB1 to C1q and reciprocal binding. In addition, affinity purification using human sera also proved that HMGB1 binds to C1q. Next C4b and the membrane attack complex (MAC) deposition could be observed after the interaction of HMGB1 with C1q. The study for classical pathway of complement activation via interactions of HMGB1 and C1q will show the novel role of HMGB1 in the pathogenesis of sepsis.

Key Words: HMGB1, Sepsis, Complement, Classical pathway