

High mobility group box 1 (HMGB1)의
oligomerization이 DNA chaperone과
DAMP로서 미치는 역할 규명

연세대학교 대학원

의과학과

이 용 준

High mobility group box 1 (HMGB1)의
oligomerization이 DNA chaperone과
DAMP로서 미치는 역할 규명

지도교수 신 전 수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014년 12월

연세대학교 대학원

의과학과

이 용 준

이용준의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 신 전 수 인

심사위원 최 인 홍 인

심사위원 서 준 영 인

연세대학교 대학원

2014년 12월

감사의 글

석사 학위의 과정동안 은혜와 평안으로 인도하여 주신 하나님께 감사드립니다.

과학이라는 학문을 공부함에 있어서 폭넓은 안목과 사고력을 길러 주시고 언제나 아낌없는 격려와 지도로 이끌어 주신 신전수 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 와중에도 저의 연구에 관심과 격려로 응원해 주신 최인홍 교수님, 서준영 교수님께도 깊은 감사를 드립니다.

우리 실험실의 분위기를 항상 훈훈하게 만들어주시고 실험실 내에서의 생활 뿐만 아니라 인생에 있어서도 많은 조언을 주신 나의 사수 광만섭 박사님께 감사드립니다. 실험실 생활에 기쁨과 슬픔을 함께해준 유종만, 김숙영, 임아람, 이현숙, 정장빈, 박수정, 김영훈, Khulan, 희수, 민현진 선생님에게도 진심으로 감사의 말씀을 전합니다.

못난 아들을 언제나 뒤에서 밀어주시고 앞에서 손잡고 이끌어주시며 위로와 격려로 학위를 마칠수 있도록 지켜주신 나의 영웅 아버지 이세희, 항상 나를 믿어주시고 기도로 나를 응원해주시는 정 많고 따뜻한 엄마 정선옥, 나를 언제나 걱정해주는 하나뿐인 누나 이계현 사랑합니다. 그리고 존경합니다.

나의 삶에 인도자가 되시며 창과 방패가 되시는 하나님께 모든 영광을 돌립니다.

이 용 준 씬

차례

| | |
|---|----|
| 국문요약 | 1 |
| I. 서론 | 4 |
| II. 재료 및 방법 | |
| 1. 재료 | 10 |
| 2. 실험 방법 | 11 |
| 가. 세포배양 | 11 |
| 나. HMGB1 oligomerization | 11 |
| 다. Western blot | 12 |
| 라. EMSA | 12 |
| 마. Transfection | 13 |
| 바. IL-6 assay | 13 |
| 사. TNF- α assay | 14 |
| III. 결과 | |
| 1. HMGB1 monomer 와 oligomer 의 DNA binding affinity | 16 |
| 2. HMGB1 monomer 와 oligomer 의 DNA protecting | |

| | |
|---|----|
| ability | 18 |
| 3. Fe ²⁺ 와 Cu ²⁺ 그리고 H ₂ O ₂ 에 의해 유발되는 DNA fragmentation에 대한 HMGB1의 DNA protecting ability | 21 |
| 4. 다양한 리간드에 의한 HMGB1의 oligomerization | 23 |
| 5. Lipopolysaccharide (LPS)에 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1의 synergistic effect | 25 |
| 6. Lipoteichoic acid (LTA)에 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1의 synergistic effect | 27 |
| IV. 고찰 | 31 |
| V. 결론 | 34 |
| 참고문헌 | 35 |
| Abstract | 42 |
| 계제 LIST | 44 |

그림 차례

| | |
|---|----|
| 그림 1. HMGB1 monomer와 oligomer의 DNA binding affinity | 17 |
| 그림 2. HMGB1 monomer와 oligomer의 DNA protecting ability | 20 |
| 그림 3. Fe ²⁺ 와 Cu ²⁺ 그리고 H ₂ O ₂ 에 의해 유발되는 DNA Fragmentation에 대한 HMGB1의 DNA protecting ability | 22 |
| 그림 4. 다양한 리간드에 의한 HMGB1의 oligomerization | 24 |
| 그림 5. Lipopolysaccharide (LPS)에 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1 oligomer의 synergistic effect | 26 |
| 그림 6. <i>Staphylococcus aureus</i> 유래 LTA 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1 oligomer의 synergistic effect | 29 |
| 그림 7. <i>Bacillus subtilis</i> 유래 LTA에 의한 신호 전달에 있 | |

어서 HMGB1의 synergistic effect30

국문요약

High mobility group box 1 (HMGB1)의 oligomerization이

DNA chaperone과 DAMP로서 미치는 역할 규명

세포핵 단백질 high mobility group box 1 (HMGB1)은 대부분의 세포에서 발현하고 있으며 핵에서 HMGB1은 DNA chaperone으로서의 역할을 수행하지만 분비된 HMGB1은 염증 반응을 유발하는 염증 신호의 매개자로서의 역할을 수행한다. HMGB1은 다양한 자극에 의해서 oligomerization 되는 가능성을 바탕으로 DNA chaperone 혹은 DAMP로서의 역할을 수행할 때 oligomer를 이루어서 작용 하는지 조사하였다. 먼저 HMGB1의 DNA chaperone으로서의 역할을 oligomerization 형태로 수행하는지를 살펴 보았다. Oligomer HMGB1의 DNA에 결합 능력이 monomer 보다 강한지 EMSA를 통해 측정 한 결과 HMGB1의 oligomer가 monomer에 비해 DNA에 강하게 결합 하고 있음을 확인하였다. 다음으로 oligomerization된 HMGB1이 monomer에 비해 DNA 손상을 더 효과적으로 막을 수 있는지 조사

하였다. 이를 위해 HMGB1 monomer와 oligomer가 transfection된 HMGB1이 knock out 된 mouse embryonic fibroblast (MEF) 세포로부터 얻은 whole cell lysates를 DNase, 구리, 철 이온 등과 반응시켜 chromosomal DNA 손상을 유도하였다. DNA fragmentation에 대해 HMGB1의 DNA protective effect를 측정한 결과 HMGB1 oligomer 형태가 monomer에 비해 DNA를 더 잘 protection 함을 확인할 수 있었다. 다음으로 HMGB1 oligomerization의 danger-associated molecular pattern (DAMP)로서의 가능성을 알아보았다. 먼저, 면역반응을 유발하는 다양한 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)에 의해 HMGB1이 oligomerization 되는지를 확인하였고, 그 결과 HMGB1의 oligomerization이 다양한 PAMP의 농도에 의존적으로 증가됨을 확인할 수 있었다. 다음으로 oligomerization된 HMGB1의 DAMP로서의 역할을 조사해 보았다. LPS와 HMGB1을 pre-incubation하여 oligomerization 시킨 실험군과 pre-incubation하지 않은 각각의 HMGB1과 LPS 실험군을 마우스 대식세포주인 J774와 RAW264.7에 처리한 후 생성된 TNF- α 와 IL-6 양을 측정해 보았다. 그 결과 pre-incubation 되지 않은 HMGB1에 비해 LPS와 pre-incubation 하여

oligomerization 시킨 HMGB1에 의해 TNF- α 와 IL-6의 양이 매우 높게 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 그람양성 PAMP 분자인 LTA를 이용하여서 실험을 수행해 본 결과 LTA 역시 pre-incubation 하지 않은 HMGB1에 비해 LTA와 pre-incubation하여 oligomerization 시킨 HMGB1과의 결합체가 TNF- α 와 IL-6의 생산량을 증가시킴을 확인할 수 있었다. 이러한 연구를 통해 HMGB1의 oligomerization은 핵내 HMGB1의 DNA chaperone으로서의 기능과 세포 밖으로 분비된 HMGB1의 DAMP로서의 기능을 더욱 촉진 시킴을 확인할 수 있었다.

핵심 되는 말: HMGB1, LPS, LTA, oligomerization, TNF- α , IL-6

High mobility group box 1 (HMGB1)의 oligomerization이

DNA chaperone과 DAMP로서 미치는 역할 규명

<지도교수 신 전 수>

연세대학교 대학원 의과학과

이 용 준

I. 서 론

High mobility group (HMG) 단백질은 세포 내 핵에 풍부하게 존재하는 단백질로 구조적으로나 화학적으로 유사한 superfamily를 이루며 DNA에 의존하는 여러 과정에 있어서 구조적인 구성성분 (architeturual element)으로써 작용한다. HMG proteins은 ‘AT-hooks’ 를 가지는 HMGA와 ‘nucleosome binding domain’ 를 가지는 HMGN, 두 개의 fuctional motif인 ‘A box와 B box’ 를 가지는 high mobility group box (HMGB) 이렇게 세 개의 family로 구성되어 있다. HMG proteins는 DNA와 뉴클레오솜 (nucleosome)에 결합하여 염색질섬유 (chromatin fiber)의 구조적 변화를 유발하여 DNA의 전사, 번역,

재조합, 손상회복 등의 다양한 과정에 관여한다. HMG 단백질의 기능은 특정 조절인자와의 상호작용이나 염색질의 subset에 특이적으로 작용할 수 있는 능력에 따라 결정된다¹⁻⁷. 그 중에서도 HMGB1은 DNA의 bending activity를 조절하거나 DNA repair process에 관여하거나 transcription factor와의 상호작용을 통해서 transcription을 조절하는 작용을 한다⁸.

HMGB1은 거의 모든 진핵세포에 존재하는 핵단백질로 215개의 아미노산으로 이루어져 있다. HMGB1은 DNA와 상호작용하는 HMG box 부위에 속하는 A box와 B box, 그리고 산성을 띠는 C tail 부위로 이루어져 있다⁹. 이러한 HMGB1의 A box와 B box부위는 염기성의 lysine과 arginine 잔기들이 존재하며, C tail 부위는 산성을 띠는 aspartic acid과 glutamic acid 잔기들을 다수 가지는 강한 양 극성을 띠는 특성의 단백질이다. HMGB1은 핵에서 DNA의 minor groove에 결합하여 유전자의 전사, 번역 그리고 재조합 등을 조절하는 역할을 수행한다¹⁰⁻¹². HMGB1은 염색질의 구조를 조절함으로써 DNA의 손상회복을 조절하는 것으로도 알려져 있다. HMGB1은 단일 가닥이나 이중나선 또는 코일형태의 DNA에는 작은 결합력으로 결합하고 교차된 형태나 변형된 형태의 DNA에는 높은 결합력으로 결합한다. 이렇게 결합한 형태의 HMGB1은 선형구조의 DNA를 구부리거나 고리의 형태로 변형 시킨다고 알려져 있다. 또한 HMGB1은 UV 손상에 의해 유발되는 histone의 아세틸화에서 중요한 역할을 수행한다.

핵 내에 존재하는 HMGB1은 LPS와 같은 내독소 (endotoxin)에 의해서 활성화된 대식세포 혹은 세포자멸사 (apoptosis)에 의해 능동적으로 분비되거나, 세포괴사 (necrosis)를 일으키는 세포에서 수동적으로 분비되어 damage-associated molecular patterns (DAMPs) 신호 분자로 작용한다¹³. 분비된 HMGB1은 단핵구 (monocyte)를 자극하여 TNF- α , IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-8과 같은 전 염증성 사이토카인의 합성을 자극하여 염증반응을 유도하며¹⁴¹⁵, 면역반응에 관여하는 면역 세포들을 모이게하는 화학주성 (chemotaxis)의 역할도 수행한다¹⁵⁻¹⁷. 그 외에도 분비된 HMGB1은 인간 상피 세포 (human epithelial cell)로부터 adhesion molecule의 발현을 증가시킨다¹⁸⁻¹⁹. 이렇게 세포 밖으로 분비된 HMGB1은 Toll-like receptors (TLRs), receptor for advanced glycation end products (RAGE)등의 receptor에 결합하여 NF- κ B 활성화를 유도하고 핵 내로 전좌 (translocation) 시켜서 염증성 사이토카인 발현을 증가시킨다²⁰. 또한 HMGB1이 LPS와 상호작용하여 시너지효과를 일으킨다²¹⁻²⁴. 세포 자극 시 분비되어 염증반응을 촉진하는 HMGB1은 최근 여러 가지 질환의 치료용 표적물질로서 인식되고 있다. 즉, 새로운 패혈증 치료제 개발에 있어 주요 표적물질로 HMGB1이 제시되고 있으며, 균혈증 이외에 류마티즘의 염증 질환 치료에도 HMGB1의 중요성이 강조 되고 있다. 세포핵 단백 HMGB1은 정상적인 상태에서는 핵에 존재하여 뉴클레오솜을 안정화 시키고, 전사, 번역, 재조합, 손상회복 등에 관여하는 단백질

이지만 자극에 의해서 밖으로 분비된 HMGB1은 그람 음성 세균 혹은 양성 세균에 의한 감염 시 균혈증의 중개인자로 작용하여 심한 염증반응을 유발하여 사망에 이르게 한다.

세포 내에 존재하는 단백질들은 기능을 더 효율적으로 수행하기 위해서 60% 정도의 단백질들이 세포 내에서 oligomer의 형태로 존재하며, homo- 혹은 hetero-oligomer의 형태로 기능을 수행한다²⁵. HMGB1 유사단백질로 알려진 사이토카인 S100B calcium binding protein의 경우 주로 뇌 정상세포에서 합성되는 단백질로 세포 밖으로 분비 시 사이토카인과 같은 역할을 하여 뇌 염증반응에 관여하는 단백질로, RAGE 수용체를 통한 신호전달을 할 때 tetramer의 형태로 RAGE와 결합하여 기능을 수행 하며, 세포에서도 테트라머화 된 S100B 단백질은 세포 성장이나 사멸 유지에 매우 중요하게 관여한다²⁶. 활성화되는 대식세포와 비만세포에서 분비되며, 박테리아에 의해 야기되는 면역질환에 중요한 역할을 하는 galectin-3 역시 HMGB1 처럼 LPS와 상호작용을 하며, LPS에 의해 oligomerization 되고, LPS를 해체 시켜서 galectin-3 oligomer와 LPS의 복합체가 CD14를 모집하여 호중성 백혈구를 활성화시킨다²⁷. 많은 수용성 단백질과 막 단백질들은 homo-oligomeric complex를 형성하여 다양한 경로에서 다양성과 특이성을 유도 하며, 유전자의 발현을 유도하거나 조절하며, 효소나 이온 채널, 그리고 수용체 활성화에 관여하거나 세포의 부착에도 중요한 영향을 미친다²⁸. 또한

다른 oligomer 상태로의 구조적 변화는 단백질의 활성을 조절하거나 서로 다른 경로 사이에서 스위치 역할을 수행한다.

LPS는 지질과 공유결합으로 이루어진 다당류 (polysaccharide)로 구성되어 있다. 이러한 LPS는 내독소를 가지며 동물모델에서 강한 면역반응을 유발한다. LPS는 그람음성박테리아의 대표적인 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)으로써 감염이나 염증성 질병에서 강한 면역반응 유발자로 작용한다²⁹. LPS는 TLR4를 통하여 신호를 전달하여 강한 염증 반응을 유발한다³⁰. LPS는 lipopolysaccharide binding protein (LBP)에 의해서 CD14으로 전달되고 다시 TLR4로 전달되는 일련의 과정들은 잘 알려진 LPS-TLR4의 경로이다³¹. 이렇게 전달된 신호가 p65와 p50을 핵내로 이동시키고 이 subunit들이 타겟 전사인자에 결합하고 이로 인해 TNF- α 나 iNOS, IL-6등의 염증을 유발하는 염증성 사이토카인을 발현하여 강한 염증반응이 일어나게 한다³²⁻³⁴. LTA는 그람 양성 세균의 대표적인 PAMP로써 두꺼운 펩티도글리칸 층을 가지고 있고 세포벽에는 teichoic acid이라고 하는 산성 다당이 존재한다. Teichoic acid는 glycerophosphoric acid 또는 ribitol phosphoric acid를 가지는 모든 세포벽, 세포막, 캡슐 중합체에 포함되어 있다³⁵⁻³⁷. Teichoic acid는 음전하를 띠기 때문에 세포 표면 전체가 음전하를 갖는데 일정부분 기여하며, 세포벽을 통한 이온의 통과에 효과적인 역할을 수행한다. glycerol을 함유하는 산들은 그람 양성세균의 막 지질과 결합

하는데 teichoic acid이 지질과 치밀하게 결합되어 있기 때문에 이들을 LTA라고 한다³⁸. LTA는 숙주세포의 표면 물질인 섬유 결합소 (fibronectin), 알부민, 지방산 (fatty acid) 또는 막인지질 (membrane phospholipid) 또는 CD14나 TLR 등의 분자를 통하여 숙주세포에 결합하는데 중요한 역할을 담당한다³⁹⁻⁴¹. 이러한 결합을 통해서 조직 손상을 활성화 시키고 패혈성 쇼크를 더욱 증가시켜 그람 양성박테리아의 감염에 중요한 역할을 한다⁴². 또한 그람 음성박테리아의 LPS를 CD14에 전달하는 LBP는 LPS 뿐만 아니라 LTA에도 결합하여 CD14에 전달하여 TLR2 매개 염증반응을 일으킨다⁴³⁻⁴⁴.

본 연구에서는 oligomerization을 이룬 HMGB1이 핵 내에서 DNA 손상에 관여하여 DNA를 보호하는 구조적인 DNA chaperone으로서 monomer 형태의 HMGB1보다 효과적인 역할을 수행할 수 있는지의 여부와 세포 밖에서 TLRs의 리간드와 결합하여 oligomer를 형성함으로써 TLRs의 신호전달을 보다 효과적으로 증폭 시킬 수 있는지의 여부를 통해 HMGB1 oligomerization의 역할을 살펴보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

HMGB1 단백질은 pRSET-B (BD Clontech, Palo Alto, USA) 플라스미드 (plasmid)에 사람 HMGB1 전체 염기서열을 클로닝 (cloning)하여 *Escherichia coli* pLysE (Novagen, Darmstadt, Germany)에서 발현시킨 뒤 Ni²⁺-NTA column으로 정제하여 사용하였다. 순수 정제된 재조합 단백질은 Triton X-114를 이용하여 내독소를 제거하였다⁴⁵. 항체는 anti-HMGB1 antibody (Abcam, Cambridge, UK), anti-His tag antibody (Abcam, Cambridge, UK), anti-Myc tag antibody (Cell signaling technology, Danvers, MA, USA)를 사용하였다. HMGB1-myc 플라스미드는 pCMV-myc (BD Clontech, Palo Alto, USA) 플라스미드에 HMGB1 전체 염기서열을 클로닝하여 제작하였다. HMGB1 C106A-myc은 HMGB1-myc을 주형 (template)으로 프라이머 (primer) 5'-GCC TCC TTC CTC TTC GCC TCT GAG TAT CGC CC-3' (forward) 및 5'-GGG CGA TAC TCA GAG GCG AAG AGG AAG AAG GC-3' (reverse)를 이용하여 QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA)의 manufacture's protocol에 따라 106 번째 cysteine을 alanine으로 치환하여 제작하였다. HMGB1 dimer인 HMGB1-HMGB1-myc은 플라스미드는 HMGB1-myc을 주형으로 HMGB1 primer를 이어 붙여서 제작하였다. TNF- α ELISA

kit은 Ebioscience (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. IL-6 ELISA kit은 Biolegend (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. LTA와 HMGB1과의 관계 실험에 사용된 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)와 *Bacillus subtilis* (*B.subtilis*)(내독소 양, 0.01 EU/ μ g)은 InvivoGen (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다.

2. 실험 방법

가. 세포배양

대식세포주인 RAW264.7 세포나 J774 세포를 T75 flask에서 10% FBS가 포함된 RPMI 1640를 배양액으로 하여 37 °C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. RAW264.7 세포나 J774 세포를 계대배양 할 때 버퍼를 사용하여 떼어 주지 않고 scraper를 사용하였다. MEF 세포는 T75 flask에서 10 % FBS DMEM으로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

나. HMGB1 oligomerization

DNA와의 결합력을 확인하기 위하여 HMGB1 WT을 oligomerization 할 때 Cu²⁺ 10 μ M, H₂O₂ 10 μ M을 HMGB1과 함께 37°C에서 24시간 incubation 한 후 dialysis tubing bag을 이용하여 1 x PBS로 buffer를 교환하였다. 리간드 의한 HMGB1의 oligomerization 여부를 확인하기 위하여 HMGB1을 리간드

와 함께 17시간 pre-incubation한 후 western blot을 수행하였다. Western blot을 수행하기 위해 1 µg의 HMGB1을 LPS, CpG, poly(I:C)는 1 ng, 10 ng, 100 ng, 1 µg의 농도로 실험을 수행하였다.

다. Western blot

단백질의 구조가 깨지지 않도록 non-denature용 sample buffer를 사용하였다. 1차 항체로 HMGB1에 반응하는 항체를 1:3000의 비율로 사용하며 2~3시간 정도 반응시킨 후 TBST (Tween 0.1%)로 5분씩 3-4회 세척 하였다. 2차 항체로는 1차 항체에 반응하는 마우스나 토끼 또는 염소에서 유래된 항체를 사용하며 1:3000으로 1시간 정도 반응시키고 난 후 TBST로 5분씩 3-4회 세척 하였다. 이후 ECL 용액을 사용하여 발광시킨 후 film을 현상 하였다.

라. EMSA

HMGB1과 DNA의 결합력을 확인하기 위하여 genomic DNA는 HMGB1이 결손된 MEF 세포 혹은 MEF WT을 RIFA buffer로 용해시켜서 whole cell lysate를 이용하였다. DNA와 HMGB1의 결합력을 확인하기 위해서는 1.8% agarose gel을 사용하였다. 외부의 스트레스나 DNase에 의한 DNA의 절단으로부터 보호하는 HMGB1의 역할을 알아보기 위해서는 HMGB1이 결손

된 MEF 세포 whole cell lysate에 HMGB1을 transfection 시킨 후 DNase 나 Fe^{2+} , Cu^{2+} , H_2O_2 처리 후 10분간 반응시켰다. Protease를 처리하여 50°C에서 3시간 반응시켰다. 다시 RNase를 처리한 후 50°C에서 1시간 반응시키고 DNA dye로 염색한 후 전기영동을 수행하였다.

마. Transfection

HMGB1이 결손된 MEF 세포 (HMGB1^{-/-} MEF)에 HMGB1 monomer 및 HMGB1:HMGB1 플라스미드를 electroporator를 이용하여 transfection을 수행하였다. 1×10^6 HMGB1^{-/-} MEF 세포를 100 µg의 suspension buffer에 풀어준 후 2 µg의 DNA를 10 분간 반응시킨 후 1350 V에 30 ms로 전기충격을 주었다. Transfection이 끝난 세포는 6-well plate에 배양하였다.

바. IL-6 assay

HMGB1에 의한 synergy effect를 분명히 하기 위해 LPS 0.7 ng, LTA 600 ng을 HMGB1 1 µg과 함께 혹은 단독 처리하여 각각 17시간 pre-incubation하거나 1시간 pre-incubation 한 후 RAW264.7 세포나 J774 세포에 처리하고 20시간 후에 상층액을 분리하여 IL-6 생성을 측정하였다. RAW264.7 세포나 J774 세포를 24-well plate에 옮긴 후 preincubation된 HMGB1-LPS mixture나 HMGB1-LTA mixture를 처리하였다. IL-6를 측정하기 위하여 20시간 후 세포

배양 상층액을 회수하여 ELISA를 수행하였다. IL-6의 포획 항체 (capture antibody)를 96 well plate에 1:250으로 희석시켜서 코팅 한 후 4℃에서 17시간 반응시켰다. 반응 후 PBST (0.1 % Tween 20)로 3회 세척했다. 3 % BSA로 blocking 한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. RAW264.7 세포나 J774 세포의 상층액을 처리한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 한 후 검출 항체 (detection antibody)를 처리하고 상온에서 한시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후에 avidin-HRP를 처리하고 상온에서 30분 반응시켰다. TMB 용액으로 10분간 반응시킨 후 2.5 N H₂SO₄ 50 µl로 반응을 정지시킨 후 450 nm에서 O.D를 측정하였다.

사. TNF- α assay

HMGB1에 의한 synergy effect를 분명히 하기 위해 LPS 0.7 ng, LTA 600 ng을 HMGB1 1 µg과 함께 혹은 단독 처리하여 각각 17시간 pre-incubation하거나 1시간 pre-incubation 한 후 RAW264.7 세포나 J774 세포에 처리하고 20시간 후에 상층액을 분리하여 TNF- α 생성을 측정하였다. RAW264.7 세포나 J774 세포를 24-well plate에 옮긴 후 preincubation된 HMGB1-LPS mixture나 HMGB1-LTA mixture를 처리하였다. TNF- α 를 측정하기 위하여 20시간 후 세포배양 상층액을 회수하여 ELISA를 수행하였다. TNF- α 의 포획 항체를 96 well plate에 1:250으로 희석시켜서 코팅 한 후 4℃에서 17시간 반응시켰다.

반응 후 PBST로 3회 세척했다. 3 % BSA로 blocking 한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. RAW264.7 세포나 J774 세포의 상층액을 처리한 후 상온에서 2시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 한 후 검출 항체를 처리하고 상온에서 한시간 반응시켰다. PBST로 3회 세척 후에 avidin-HRP를 처리하고 상온에서 30분 반응시켰다. TMB 용액으로 10분간 반응시킨 후 2.5 N H₂SO₄ 50 μ l로 반응을 정지시킨 후 450 nm에서 O.D를 측정하였다.

III. 결 과

1. HMGB1 monomer와 oligomer의 DNA binding affinity

HMGB1의 monomer form 과 oligomer form의 DNA 결합력을 확인한 결과 HMGB1 monomer 와 HMGB1 oligomer form 둘 다 농도에 의존적으로 DNA와의 결합이 증가함을 확인하였다. 그리고 HMGB1의 monomer form 보다 oligomer form이 더 강하게 DNA와 결합함도 확인하였다 (그림 1A). HMGB1은 106번째 cysteine을 매개로 하여 disulfide를 이루고 이를 통해서 oligomer form을 이루기 때문에 disulfide bond를 이루는 것을 막기 위해서 106번째 cystein을 alanine으로 치환 시킨 후 HMGB1 C106A 단백질을 HMGB1 wild type과 비교하여 binding affinity를 확인하였다. 그 결과 HMGB1 C106A form과 wild type 둘 다 농도에 의존적으로 결합이 증가함 확인 하였고 HMGB1 C106A보다 wild type의 HMGB1이 더 강하게 DNA와 결합함을 확인하였다 (그림 1B). 이러한 결과로 HMGB1의 oligomerization 은 106번째 cystein을 통해서 이루어지며 oligomerization된 HMGB1이 더 강한 affinity로 DNA에 결합하고 그로 인해 더 효과적인 DNA chaperone으로써 역할을 수행할 것을 예측할 수 있었다.

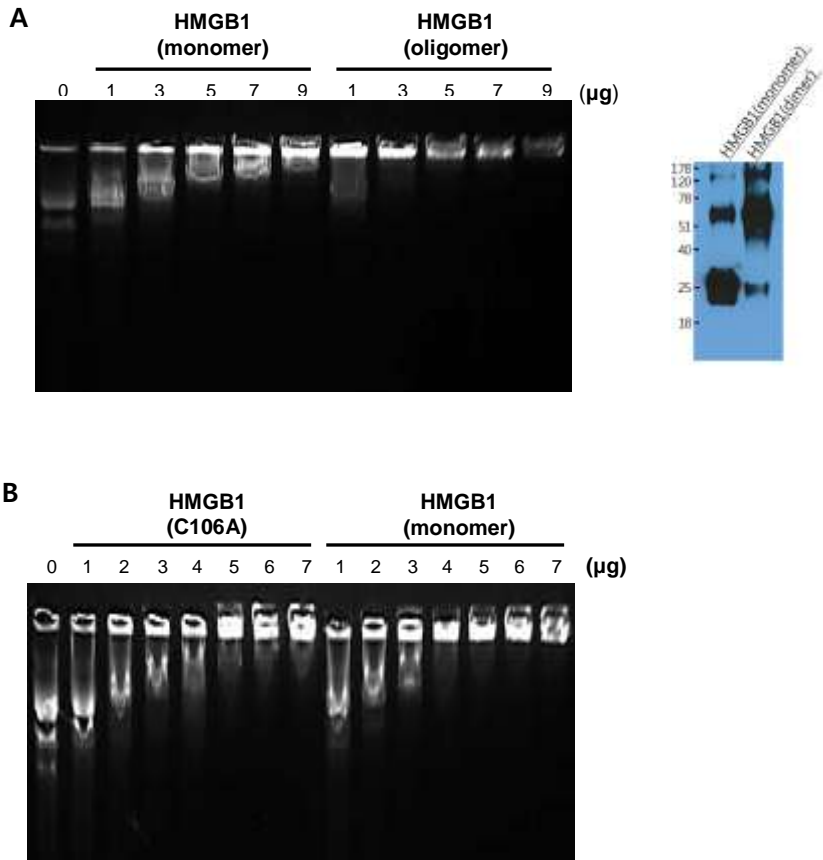


그림 1. HMGB1 monomer와 oligomer의 DNA binding affinity. A. DNA 2 μg 과 0, 1, 3, 5, 7, 9 μg 의 HMGB1 monomer form과 HMGB1 oligomer form을 2시간 pre-incubation 한 후 1.8% agarose gel에 loading하여 DNA와의 결합력을 확인하였다. B. DNA 2 μg 과 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 μg 의 HMGB1 C106A form과 HMGB1 monomer를 2시간 pre-incubation 한 후 1.8% agarose gel에 loading하여 DNA와의 결합력을 확인하였다.

2. HMGB1 monomer와 oligomer의 DNA protecting ability

HMGB1 monomer 와 oligomer의 DNA 손상 방지 능력을 확인하기 위하여 wild type (WT) MEF 세포와 HMGB1^{-/-} MEF 세포를 lysis한 whole cell lysate를 사용하였다. DNase를 처리하여 HMGB1의 DNA 손상 방지 능력을 확인한 결과 HMGB1^{-/-} MEF 세포에서 얻은 whole cell lysate에서는 DNase 0.1 unit 부터 DNA가 손상을 입어 fragmentation 되는 데 반해 WT MEF 세포에서는 DNase 0.1 unit 까지 DNA fragmentation이 억제 되다가 DNase 1 unit에서야 비로소 DNA가 fragmentation 됨을 확인하였다 (그림 2A). 세포 주에 의한 차이를 배제하고 HMGB1의 monomer와 oligomer를 비교하기 위해 HMGB1^{-/-} MEF 세포에 empty vector와 myc-HMGB1 vector 그리고 myc-HMGB1-HMGB1 vector를 transfection 한 후 각각의 whole cell lysate에 DNase를 처리하고 전기영동을 시행하였다. 그 결과 empty vector가 transfection된 whole cell lysate에서는 DNase 0.2 unit 부터 DNA 손상에 의한 fragmentation이 관찰되는데 반해 myc-HMGB1이 transfection된 whole cell lysate에서는 DNase 0.5 unit부터 DNA의 fragmentation이 관찰되었으며 myc-HMGB1-HMGB1이 transfection된 whole cell lysate에서는 DNase 1 unit부터 DNA의 fragmentation이 관찰되었다 (그림 2B). 이러한 결과는 HMGB1은 DNase에 의한 DNA의 손상으로부터 DNA를 보호하여 DNA가 fragmentation 되는 것을 막고 HMGB1의 monomer보다 oligomer가 보다 효

과적으로 DNA의 손상으로부터 DNA를 보호할 수 있다는 것을 제시한다.

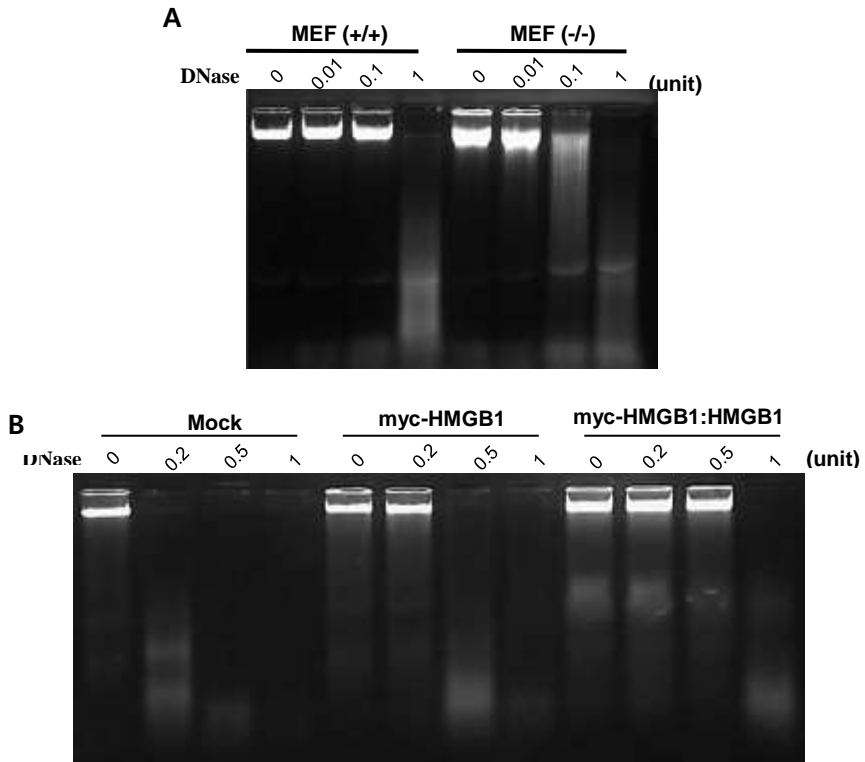


그림 2. HMGB1 monomer와 oligomer의 DNA protecting ability. A. WT MEF [MEF (+/+)] 와 HMGB1^{-/-} MEF [MEF (-/-)] 세포에서 얻은 whole cell lysate에 DNase를 0.01, 0.1, 1 unit으로 처리한 후 1.8 %의 agarose gel에 전기영동 한 후 HMGB1의 DNA 보호효과를 확인하였다. B. HMGB1^{-/-} MEF 세포에 empty, myc-HMGB1, myc-HMGB1-HMGB1 플라스미드를 transfection 한 후 각각의 whole cell lysate에 DNase를 0.2, 0.5, 1 unit으로 처리한 후 1.8 %의 agarose gel에 전기영동하여 DNA degradation을 확인하였다.

3. Fe^{2+} 와 Cu^{2+} 그리고 H_2O_2 에 의해 유발되는 DNA fragmentation에 대한 HMGB1의 DNA protecting ability

Oxidative 손상에 의한 DNA fragmentation에 HMGB1의 보호효과를 알아보기 위해 HMGB1^{-/-} MEF 세포에 empty, myc-HMGB1, myc-HMGB1-HMGB1 플라스미드를 transfection 한 후 Fe^{2+} 와 Cu^{2+} 로 oxidative 손상을 주고 DNA fragmentation 되는 정도를 확인하였다. 그 결과 Fe^{2+} 와 Cu^{2+} 를 H_2O_2 와 함께 처리하였을 때 유발된 DNA의 fragmentation을 oligomer가 효과적으로 보호하여 DNA fragmentation이 감소하였다 (그림 3A와 B). 이러한 결과를 통해 Fe^{2+} 와 Cu^{2+} 를 H_2O_2 와 함께 처리해 주었을 때 발생하는 hydroxy radical에 의해 일어나는 DNA oxidative 손상을 HMGB1이 막고 그 효과는 HMGB1 oligomer가 더 효과적으로 작용함을 확인하였다.

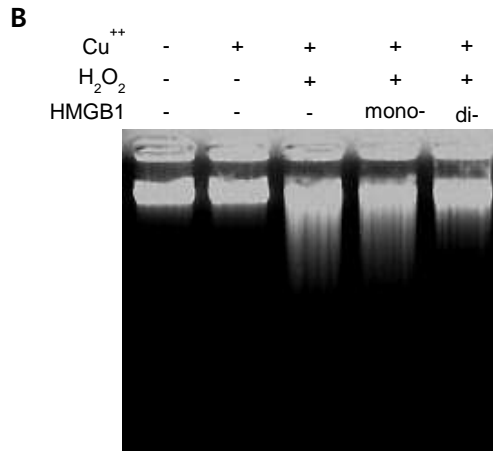
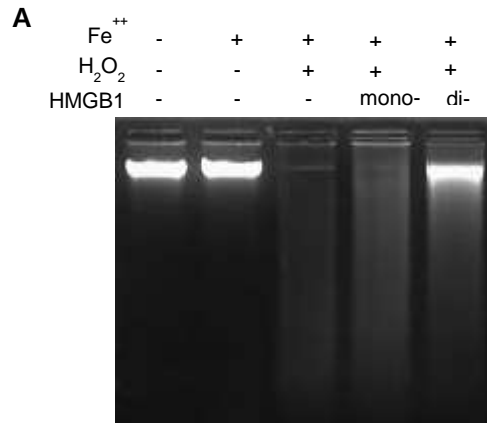


그림 3. Fe²⁺와 Cu²⁺ 그리고 H₂O₂에 의해 유발되는 DNA fragmentation에 대한 HMGB1의 DNA protecting ability. A and B. HMGB1^{-/-} MEF 세포에 empty, myc-HMGB1, myc-HMGB1-HMGB1 플라스미드를 transfection 한 후 Fe²⁺와 Cu²⁺ 를 H₂O₂와 함께 각각 37 °C에서 10 mM로 한 시간 처리한 후 1.8 % agarose gel에서 DNA가 fragmentation 되는 정도를 확인하였다.

4. 다양한 리간드에 의한 HMGB1의 oligomerization

세포 밖의 HMGB1은 TLRs의 리간드와 결합하여 complex를 이루고 oligomerization을 형성함으로써 보다 synergistic한 역할을 할 것으로 예상된다. 이를 확인하기 위해 먼저 각각의 HMGB1과 결합하는 TLR 리간드에 대하여 HMGB1이 oligomerization 되어 결합하는지를 확인하였다. LPS, CpG, poly(I:C)를 각각 HMGB1과 반응시킨 후 HMGB1의 oligomerization 여부를 관찰하였다. 그 결과 37°C 혹은 상온에서 HMGB1과 리간드들을 incubation 시켰을 때 리간드의 농도에 의존적으로 HMGB1의 oligomer가 증가하였다 (그림 4A 및 B). 이러한 결과들을 통해 HMGB1은 TLRs의 리간드에 의해서 리간드의 농도에 의존적으로 oligomerization이 됨을 확인하였다.

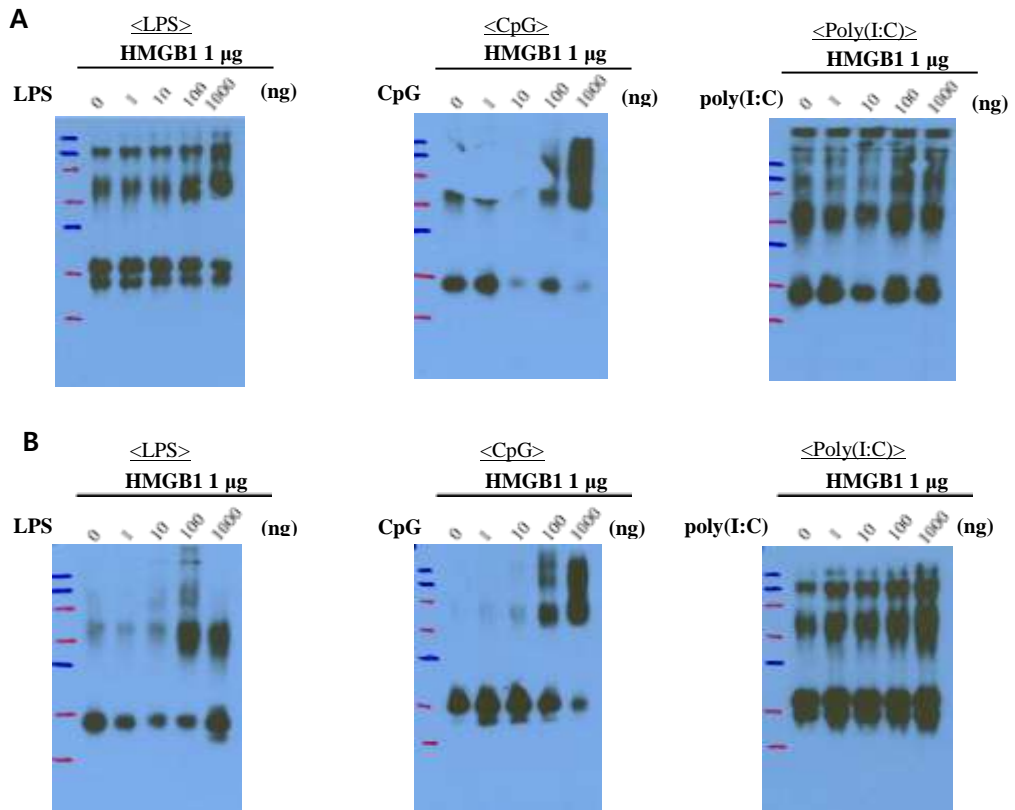


그림 4. 다양한 리간드에 의한 HMGB1의 oligomerization. A 및 B. LPS, CpG, poly(I:C) 0, 1, 10, 100 ng, 1 μ g을 각각 HMGB1 1 μ g과 섞어 37 $^{\circ}$ C (A) 혹은 상온 (B)에서 밤새 반응시키고 HMGB1이 oligomerization 되는 정도를 확인하였다.

5. LPS에 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1의 synergistic effect

LPS와의 pre-incubation에 의해 oligomerization을 이룬 HMGB1이 LPS의 신호전달에 있어서 보다 효과적으로 작용할 수 있도록 LPS의 신호 증폭자로서 작용할 것으로 예상되므로 이를 확인하기 위해 HMGB1을 LPS와 상온에서 pre-incubation 시킨 후 면역세포에 처리하고 이때 분비되는 TNF- α 와 IL-6의 양을 비교해 보았다.

그 결과 소량의 HMGB1 단독으로 혹은 LPS 단독 처리는 TNF- α 의 분비가 적었으나, LPS를 HMGB1과 상온에서 17시간 pre-incubation 한 후 J774 세포에 처리하였을 때 분비되는 TNF- α 의 양은 LPS 단독에 비해 급격하게 증가함을 확인할 수 있었다. LPS와 17시간 pre-incubation한 것이 1시간 pre-incubation것에 비해 훨씬 효과적으로 TNF- α 및 IL-6의 생성을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다 (그림 5A 및 B). 이와같은 현상은 다른 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포에서도 유사한 결과를 나타내었다 (그림 5C 및 D). 이러한 결과는 TLR4의 리간드인 LPS에 의해 발생하는 신호전달을 HMGB1이 증폭하여 신호 증폭자로서 역할을 하며 이는 HMGB1이 LPS와 결합하여 complex를 이루는 과정에서 oligomer를 이룸으로써 보다 효과적인 염증반응을 나타냄을 보여준다.

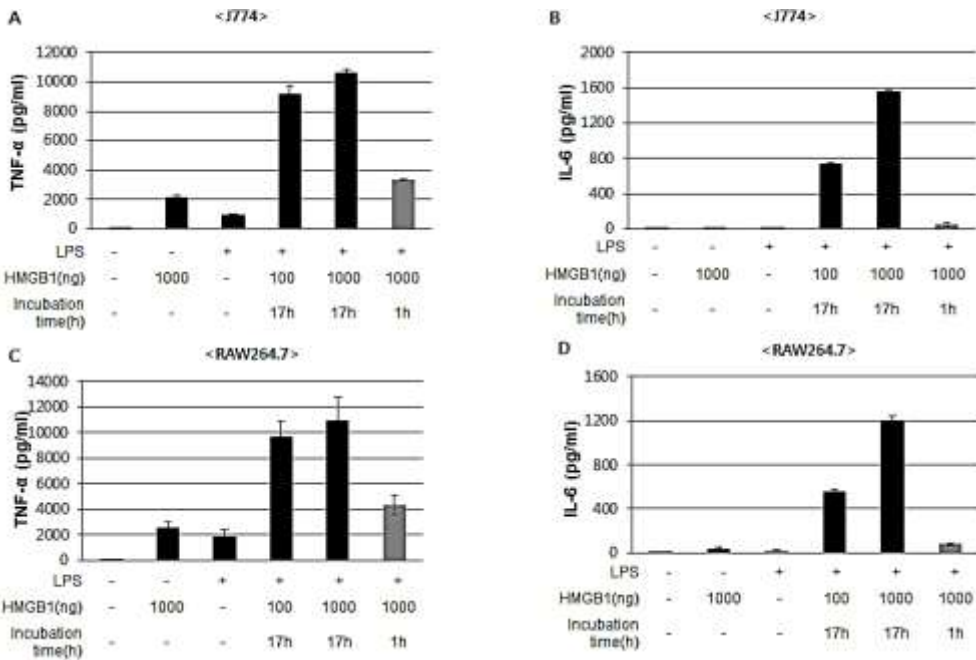
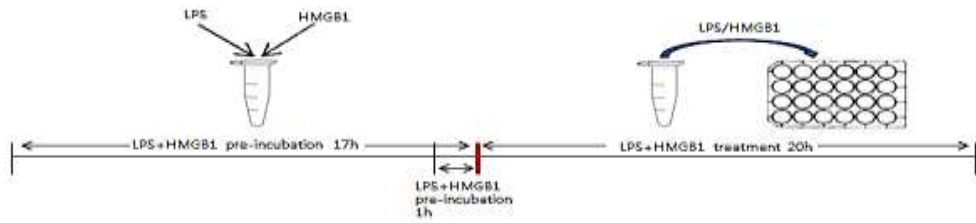


그림 5. LPS에 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1의 synergistic effect. A 및 B. J774 세포에 LPS 0.7 ng을 단독, HMGB1 1 μ g 단독, LPS 0.7 ng 및 HMGB1 1 μ g을 함께 섞은 후 17 시간 혹은 1 시간 pre-incubation 하여 처리하였다. 20시간 후에 상등액을 따서 TNF- α 및 IL-6 생성을 측정하였다. C 및 D. RAW264.7 세포에 위와 마찬가지로 조건으로 처리하고 TNF- α 및 IL-6의 생성을 측정하였다.

6. LTA에 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1 의 synergistic effect

앞에서 HMGB1이 TLR4의 리간드인 LPS와 결합하여 LPS에 의해 발생하는 신호전달을 HMGB1이 LPS와 결합하여 oligomer를 이루듯이 그람 양성균의 대표적인 PAMP 분자인 LTA에 대한 영향도 확인하였다. 이를 위하여 HMGB1을 LTA와 상온에서 pre-incubation 시킨 후 면역세포에 처리하고 이때 분비되는 TNF- α 와 IL-6의 양을 비교해 보았다.

그 결과 LPS 실험에서와 마찬가지로 HMGB1이 단독으로 J774 세포에 처리되었을 때 낮은 수준의 TNF- α 를 분비함을 확인하였고 *S. aureus* LTA (sLTA)를 HMGB1과 상온에서 17시간 pre-incubation 한 후 J774 세포에 처리하였을 때 분비되는 TNF- α 의 양은 sLTA 단독에 비해 급격하게 증가함을 확인하였다. 이는 TLR2의 리간드인 LTA에 의해 발생하는 신호전달을 HMGB1이 증폭하여 나타나는 것이라고 할 수 있겠다 (그림 6A). IL-6 생성에서도 sLTA를 HMGB1과 상온에서 17시간 pre-incubation 한 후 J774 세포에 처리하였을 때 sLTA 단독에 비해 급격하게 증가함을 확인할 수 있었다 (그림 6B). 이와 같은 현상은 다른 마우스 대식세포주인 RAW264.7 세포를 통해서도 유사한 결과를 나타내었다 (그림 6C 및 D). 다른 그람 양성균인 *B. subtilis* LTA (bLTA)의 경우에도 sLTA와 유사하게도 bLTA에 HMGB1 첨가 반응시 TNF- α 및 IL-6의 생성이 sLTA 처리 때와 유사하게 관찰되었다 (그림 7). 이상의 결과로 TLR2의 리간드인 LTA에 의해 발생

되는 신호전달은 HMGB1이 존재할 경우 LTA 분자와 complex를 형성하여 효율적으로 TLR2 수용체에 전달함으로 나타나는 것임을 예상 할 수 있었다.

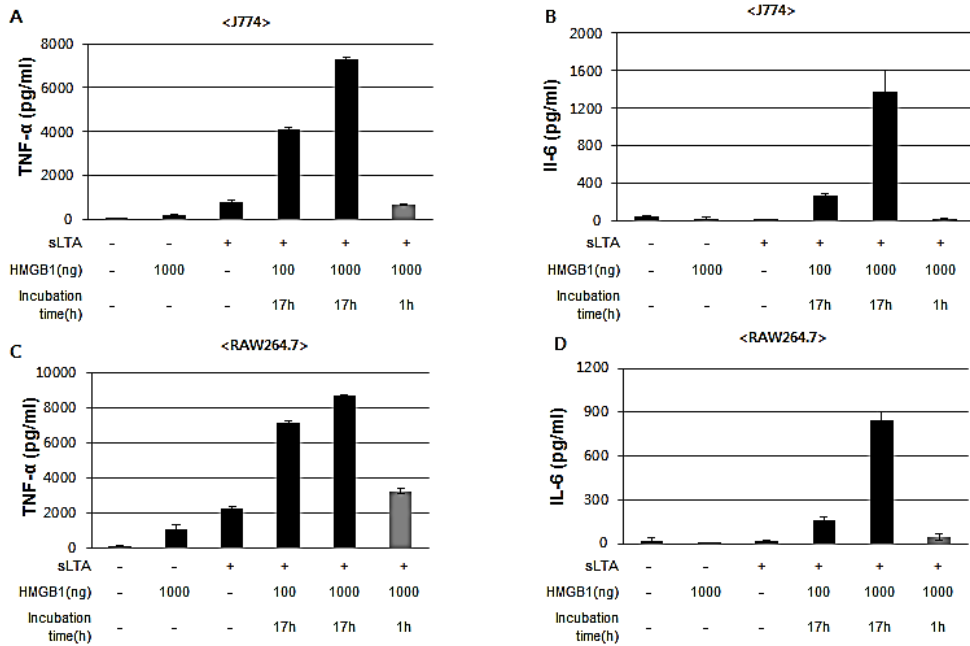
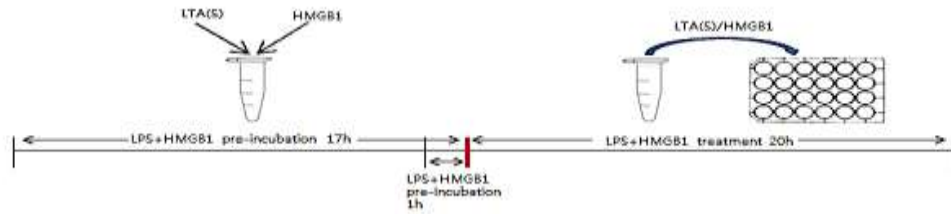


그림 6. *S. aureus* 유래 LTA에 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1의 synergistic effect. A-D. sLTA 단독 혹은 HMGB1 1 μ g 단독, sLTA와 HMGB1 1 μ g을 함께 17시간이나 1시간 pre-incubation 한 후 J774 세포 (A, B) 혹은 RAW264.7 세포 (C, D)에 20시간 처리한 후 상등액을 따서 TNF- α (A, C) 및 IL-6 (B, D)를 측정하였다.

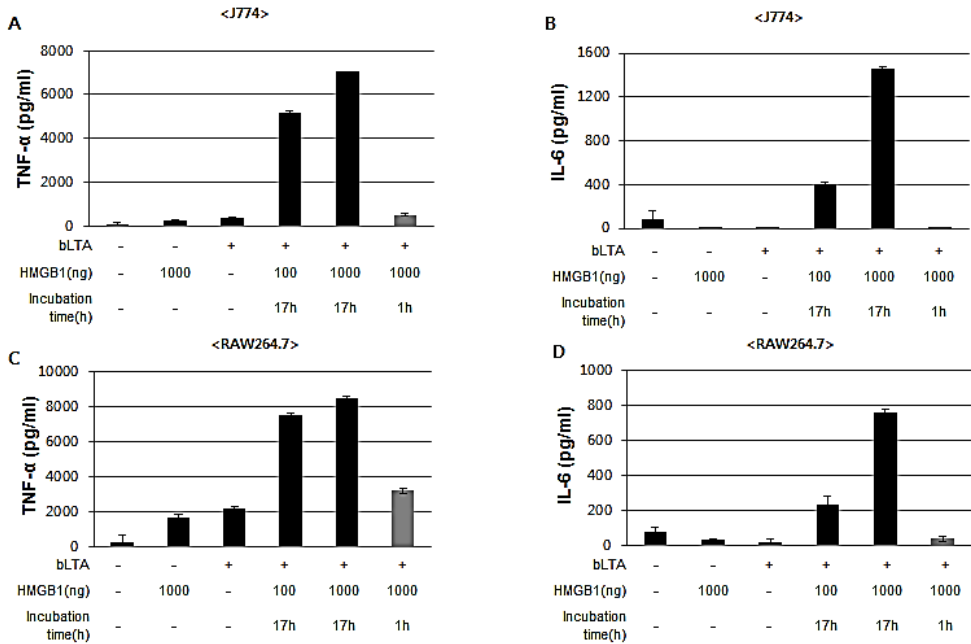
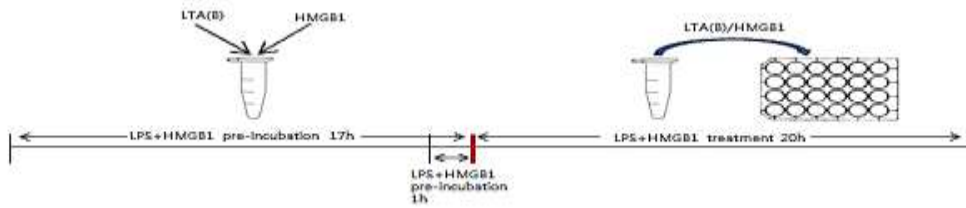


그림 7. *B. subtilis* 유래 LTA에 의한 신호 전달에 있어서 HMGB1의 synergistic effect. A-D. *B. subtilis* LTA (bLTA) 단독 혹은 HMGB1 1 μg 단독, bLTA와 HMGB1 1 μg을 함께 17시간이나 1시간 pre-incubation 한 후 J774 세포 (A, B) 혹은 RAW264.7세포 (C, D)에 20시간 처리한 후 상등액을 따서 TNF-α (A, C) 및 IL-6 (B, D)를 측정하였다.

IV. 고찰

HMGB1은 DNA repair 작용을 통해서 손상된 DNA를 복구시키는 기능을 한다는 것이 잘 알려져 있다¹¹. 이에 본 연구에서는 HMGB1이 손상된 DNA의 복구뿐만 아니라 직접적으로 DNA를 손상으로부터 보호하는 역할을 할 수 있는지 그 가능성을 알아보았다. HMGB1이 핵 내에서 역할을 수행하기 위해서는 DNA에 binding 함으로서 작용할 것으로 예상되기 때문에 HMGB1의 DNA와의 affinity를 확인하였다. 본 실험실의 선행연구자에 의해 HMGB1이 106번째 cysteine을 매개로 하여 disulfide bond를 이룸을 확인하였고 이러한 oligomer 형태의 HMGB1이 역할을 수행함에 있어서 더 효과적으로 작용할 것으로 예상되기 때문에 DNA와의 binding affinity를 확인하였다. 또한 이에 따른 DNA 손상 방지능력을 확인하기 위하여 DNase를 처리한 후 MEF 세포에서 HMGB1의 유무에 따른 DNA 손상 정도를 측정하였다. 그리고 HMGB1의 DNA 손상 방지능력을 다른 방법으로 확인하기 위하여 Fe^{2+} , Cu^{2+} , H_2O_2 를 사용하여 확인하였다. Fe^{2+} 와 Cu^{2+} 는 H_2O_2 와 함께 처리해 주었을 때 hydroxy radical을 형성 함으로서 DNA에 oxidative 손상을 주고 그로 인해서 DNA가 fragmentation 된다⁴⁶. 따라서 이러한 oxidative 손상에 의한 DNA fragmentation에 HMGB1의 보호효과를 알아보기 위해 HMGB1^{-/-} MEF 세포에 empty, myc-HMGB1, myc-HMGB1-

HMGB1 플라스미드를 transfection 한 후 Fe^{2+} 와 Cu^{2+} 로 oxidative 손상을 주고 DNA fragmentation 되는 정도를 확인하였다. 그 결과 HMGB1이 DNA와 잘 결합하며 HMGB1의 monomer form보다 oligomer form의 HMGB1이 더 효과적으로 결합하여 DNA를 보호하는 역할을 함을 확인 할 수 있었다.

폐혈증은 미국에서만 한해 75만명씩 사망자가 발생하며 치사율이 30-70 %에 이르는 질환으로 면역세포에 의해 과도하게 분비되는 염증성사이토카인에 의해 면역 방어체계가 과도하게 활성화 되어 생기는 질환이다^{47,48}. 폐혈증과 폐혈증쇼크는 주로 그람음성세균의 LPS와 그람양성세균의 LTA에 의해서 이루어진다⁴⁸. 이에 본 연구는 HMGB1이 리간드와 결합하여 oligomer를 이루며 HMGB1을 폐혈증 유발성의 LPS, LTA와 pre-incubation 시켜서 oligomer를 형성시켜 준 후 면역세포에 처리해 주었을 시에 저농도의 LPS와 LTA에서도 급격한 염증성 사이토카인의 분비가 유발됨을 확인하였으며 LPS와 LTA 단독에 비해서도 확연히 염증성사이토카인의 분비를 유발함으로써 HMGB1의 synergistic 역할을 확인할 수 있었다. 선행연구에서 HMGB1이 LPS와 결합을 하며 LPS-HMGB1의 복합체가 LPS를 CD14에 전달하여 사이토카인의 분비를 증가시키는 역할을 확인함으로써 HMGB1이 LPS의 신호전달을 유발하는 매개체 역할을 함을 확인한 바 이는 HMGB1이 LPS와 LTA의 신호전달에 관여하여 매개자로서 역할을 수행함을 제시한다⁵⁰. 또한 본 연구에서 HMGB1이 LPS와 LTA에 의해 oligomer

를 이룸으로서 더 상승된 효과로 LPS와 LTA의 신호전달에 관여함을 나타낸다. 이는 HMGB1이 비슷한 역할을 하는 단백질인 S100B나 galectin-3 처럼 oligomer를 이루어서 LPS에 의한 TLR4와 LTA에 의한 TLR2의 신호전달에 관여할 가능성을 제시해준다^{26,27}. 이는 LPS나 LTA를 인식하여 CD14에 전달하여 관련 수용체에 신호를 전달하는 LBP와 비슷한 역할을 수행하거나⁵¹⁻⁵³ 또는 LPS와 LTA의 endocytosis에 NF- κ B 활성화에 관여하여 염증성사이토카인의 분비를 촉진시킬 가능성도 배제할 수 없다⁵⁴.

결론적으로 본 연구는 핵 내에서 HMGB1이 DNA 손상으로부터 DNA를 구조적으로 보호할 수 있으며, 이는 HMGB1의 monomer 보다는 oligomer에서 더욱 효과적이었다. 또한 TLR4의 리간드인 LPS와 TLR2의 리간드인 LTA의 신호전달을 HMGB1이 증가시키며 이는 HMGB1이 리간드와 oligomer를 이루는 것과 관련있음을 확인하였다. 이 결과는 신호전달 매개자로서 HMGB1 oligomer의 가능성을 제시한 바를 할 수 있겠다. HMGB1은 다양한 역할을 수행하여 세포 내에서는 DNase로부터 DNA를 보호하지만 세포 밖에서는 LPS, LTA와 결합하여 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시키는 역할을 한다. 따라서 HMGB1의 세포내외에서의 작용기전에 대해서 더 많은 이해가 필요하나 본 연구를 통하여 HMGB1의 oligomerization 가능성을 통한 상승효과를 새롭게 제시하였다.

V. 결 론

세포의 핵 단백질인 HMGB1은 핵내에서는 DNA chaperone으로서 기능하며, 세포 밖으로 분비될 경우 여러 리간드와 결합하여 TLRs의 신호전달을 향진 시켜 염증반응을 촉진한다. 본 연구에서는 HMGB1이 oligomer를 이루어서 DNA chaperone 및 DNA를 다양한 손상으로부터 보호하는 DNA 보호효과를 나타냄을 관찰하였다. 또한 세포 밖에서는 TLR의 다양한 리간드들과 결합하여 oligomer를 이루어 TLRs의 신호전달에서 synergistic effect를 보임을 확인하였다. 즉, HMGB1이 DNA chaperone 및 TLRs의 신호전달에서 oligomerization되어 보다 효과적으로 작용할 수 있음을 제시하였다.

참고문헌

1. Fedele M, Battista S, Manfioletti G, Croce CM, Giancotti V, Fusco A. Role of the high mobility group A proteins in human lipomas. *Carcinogenesis* 2001;22:1583-91.
2. Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 2001;277:63-81.
3. Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* 1999;19:5237-46.
4. Sgarra R, Rustighi A, Tessari MA, Di Bernardo J, Altamura S, Fusco A, et al. Nuclear phosphoproteins HMGA and their relationship with chromatin structure and cancer. *FEBS Lett* 2004;574:1-8.
5. Bianchi ME, Agresti A. HMG proteins: dynamic players in gene regulation and differentiation. *Curr Opin Genet Dev* 2005;15:496-506.
6. Giavara S, Kosmidou E, Hande MP, Bianchi ME, Morgan A, d'Adda di Fagagna F, et al. Yeast Nhp6A/B and mammalian Hmgb1 facilitate the maintenance of genome stability. *Curr Biol* 2005;15:68-72.
7. Reeves R, Adair JE. Role of high mobility group (HMG) chromatin proteins in DNA repair. *DNA Repair (Amst)* 2005;4:926-38.
8. Hock R, Furusawa T, Ueda T, Bustin M. HMG chromosomal proteins in development and disease. *Trends Cell Biol* 2007;17:72-9.

9. Read CM, Cary PD, Crane-Robinson C, Driscoll PC, Norman DG. Solution structure of a DNA-binding domain from HMG1. *Nucleic Acids Res* 1993;21:3427-36.
10. Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins. *Trends Biochem Sci* 2001;26:167-74.
11. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5:331-42.
12. Ulloa L, Batliwalla FM, Andersson U, Gregersen PK, Tracey KJ. High mobility group box chromosomal protein 1 as a nuclear protein, cytokine, and potential therapeutic target in arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:876-81.
13. Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol cell Physiol* 2006;291:C1318-C1325.
14. Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191-5.
15. 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.
16. 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.

17. 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.
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;101:2652–2660.
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. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock* 2006; 26:174-9.
21. Tian J, Avalos AM, Mao SY, Chen B, Senthil K, Wu H, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nat Immunol* 2007;8:487-96.
22. Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood* 2007;15;110:1970-81.
23. Hreggvidsdottir HS, Ostberg T, Wähämaa H, Schierbeck H, Aveberger AC, Klevenvall L, et al. The alarmin HMGB1 acts in synergy with endogenous and exogenous danger signals to promote inflammation. *J Leukoc Biol* 2009;86:655-62.
24. Hreggvidsdóttir HS, Lundberg AM, Aveberger AC, Klevenvall L, Andersson U,

- Harris HE. High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor. *Mol Med* 2012;27;18:224-30.
25. Mayssam H. Ali and Barbara Imperiali. Protein oligomerization: How and why. *Bioorg Med Chem* 2005;13:5013–5020.
26. Ostendorp T, Leclerc E, Galichet A, Koch M, Demling N, Weigle B, et al. Structural and functional insights into RAGE activation by multimeric S100B. *EMBO J* 2007;26:3868–3878.
27. Fermino ML, Polli CD, Toledo KA, Liu FT, Hsu DK, Roque-Barreira MC, et al. LPS-Induced Galectin-3 Oligomerization Results in Enhancement of Neutrophil Activation. *PLoS One* 2011; 6: e26004.
28. Hashimoto K, Nishi H, Bryant S, Panchenko AR. Caught in self-interaction: evolutionary and functional mechanisms of protein homooligomerization. *Phys Biol* 2011; 8:035007
29. Ray A, Cot M, Puzo G, Gilleron M, Nigou J. Bacterial cell wall macroamphiphiles: pathogen-/microbe-associated molecular patterns detected by mammalian innate immune system. *Biochimie* 2013;95:33-42.
30. Peri F, Piazza M, Calabrese V, Damore G, Cighetti R. Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules. *Biochem Soc Trans* 2010; 38:1390-5
31. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 2008;42:145-51.

32. Rossol M, Heine H, Meusch U, Quandt D, Klein C, Sweet MJ, et al. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. *Crit Rev Immunol* 2011;31:379-446.
33. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16:3-9.
34. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1-14.
35. Morath S, von Aulock S, Hartung T. Structure/function relationships of lipoteichoic acids. *J Endotoxin Res* 2005;11:348-56.
36. Gründling A, Schneewind O. Genes required for glycolipid synthesis and lipoteichoic acid anchoring in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 2007;189:2521-30.
37. Bosshart H, Heinzelmann M. Targeting bacterial endotoxin: two sides of a coin. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1096:1-17.
38. Fischer W, Markwitz S, Labischinski H. Small-angle X-ray scattering analysis of pneumococcal lipoteichoic acid phase structure. *Eur J Biochem*. 1997;244:913-7.
39. Fischer W. Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv Microb Physiol* 1988;29:233-302.
40. Fischer W. Lipoteichoic acid and lipids in the membrane of *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol* 1994;183:61-76.
41. Kusunoki T, Hailman E, Juan TS, Lichenstein HS, Wright SD. Molecules from *Staphylococcus aureus* that bind CD14 and stimulate innate immune responses. *J Exp Med* 1995;182:1673-82.

42. Kengatharan KM, De Kimpe S, Robson C, Foster SJ, Thiemermann C. Mechanism of gram-positive shock: identification of peptidoglycan and lipoteichoic acid moieties essential in the induction of nitric oxide synthase, shock, and multiple organ failure. *J Exp Med* 1998;188:305-15.
43. Hailman E, Lichenstein HS, Wurfel MM, Miller DS, Johnson DA, Kelley M, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein accelerates the binding of LPS to CD14. *J Exp Med* 1994;179:269-77.
44. Fan X, Stelter F, Menzel R, Jack R, Spreitzer I, Hartung T, et al. Structures in *Bacillus subtilis* are recognized by CD14 in a lipopolysaccharide binding protein-dependent reaction. *Infect Immun* 1999;67:2964-8.
45. Cotten M, Baker A, Saltik M, Wagner E, Buschle M. Lipopolysaccharide is a frequent contaminant of plasmid DNA preparations and can be toxic to primary human cells in the presence of adenovirus. *Gene Ther* 1994 Jul;1:239-46.
46. Gao JL, Lu Y, Browne G, Yap BC, Trewhella J, Hunter N, et al. The role of heme binding by DNA-protective protein from starved cells (Dps) in the Tolerance of *Porphyromonas gingivalis* to heme toxicity. *J Biol Chem* 2012;287:42243-58.
47. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
48. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003;9:517-24.

49. Bhakdi S, Klonisch T, Nuber P, Fischer W. Stimulation of monokine production by lipoteichoic acids. *Infect Immun* 1991;59:4614-20.
50. Youn JH, Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 2006;177:7889-97.
51. Wurfel MM, Hailman E, Wright SD. Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med* 1995;181:1743-54.
52. Wurfel MM, Wright SD. Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid. *J Immunol* 1997;158:3925-34.
53. Lehner MD, Morath S, Michelsen KS, Schumann RR, Hartung T. Induction of cross-tolerance by lipopolysaccharide and highly purified lipoteichoic acid via different Toll-like receptors independent of paracrine mediators. *J Immunol* 2001;166:5161-7.
54. Brandt KJ, Fickentscher C, Kruithof EK, de Moerloose P. TLR2 ligands induce NF- κ B activation from endosomal compartments of human monocytes. *PLoS One* 2013;8:e80743.

ABSTRACT

The role of high mobility group box 1 (HMGB1) oligomerization as DNA chaperone and DAMP molecule

Yong-joon Lee

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeon-Soo Shin)

HMGB1, nuclear protein, abundantly exists in nucleated cells and plays different roles in intracellular and extracellular spaces; a DNA chaperone in nucleus and a mediator of signal transduction. HMGB1 could be oligomerized by diverse stimuli. To identify the effect of oligomerized HMGB1 as a DNA chaperone or a DAMP interacting molecule. I investigated whether HMGB1 oligomer has a higher binding affinity to DNA than that of monomer. HMGB1 oligomer bound to genomic or plasmid DNA more effectively than HMGB1 monomer. Further, I observed that

oligomerized HMGB1 could more effectively protect DNA from DNA damage by DNase and a mixture of Fe^{2+} , Cu^{2+} , and H_2O_2 . Next, I studied the effect of HMGB1 oligomerization on DAMP molecule-induced inflammation. When HMGB1 was incubated with LPS, poly(I:C), and CpG molecules, HMGB1 oligomer formation increased in a dose dependent manner of PAMPs. Further, when J774 and RAW264.7 cells treated with a mixture of HMGB1 and LPS, which were pre-incubated, TNF- α and IL-6 secretions were significantly increased compared with LPS or HMGB1 treatment alone. In conclusion, HMGB1 shows many functions in the intracellular and extracellular spaces effectively with forming HMGB1 oligomer.

Key Words: HMGB1, LPS, LTA, oligomerization, TNF- α , IL-6

게제 LIST

Man Sup Kwak, Miwha Lim, Yong Joon Lee, Hyun Sook Lee, Young Hun Kim, Ju Ho Youn, Ji Eun Choi, and Jeon-Soo Shin. HMGB1 Binds to Lipoteichoic Acid and Enhances TNF- α and IL-6 Production through HMGB1-mediated Transfer of Lipoteichoic Acid to CD14 and TLR2. Journal of Innate Immunity 2014 Accepted.

Pil-Sung Yang, Dae-Hoon Kim, Yong Joon Lee, Sang-Eun Lee, Won Jun Kang, Hyuk-Jae Chang and Jeon-Soo Shin. Glycyrrhizin, inhibitor of high mobility group box-1, attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and vascular remodeling in rats. Respiratory Research 2014 Accepted.