



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

세포 스트레스로 유발되는
마이토파지(mitophagy)에서
HMGB1의 역할



연세대학교 대학원
의과학과
정 장 빈

세포 스트레스로 유발되는
마이토파지(mitophagy)에서
HMGB1의 역할

지도교수 신전수

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2015년 6월

연세대학교 대학원

의과학과

정 장 빈

정장빈의 석사 학위논문을 인준함

지도교수 _____ 신전수 _____ 인

심사위원 _____ 유지환 _____ 인

심사위원 _____ 박성하 _____ 인



연세대학교 대학원

2015 년 6 월

감사의 글

우선 건강과 여러 가지 여건들을 충족시켜주시고 석사 학위 과정을 잘 마칠 수 있게 인도해 주신 하나님께 감사 드립니다.

석사 과정을 마감하며 학위 기간 과정 동안 도움을 주신 많은 분들께 짧은 글로나마 감사의 마음을 표합니다.

석사 학위 과정 동안 세심한 관심과 아낌없는 격려, 항상 변함없는 가르침으로 과학이라는 학문에 한 걸음 더 나아갈 수 있도록 도움을 주신 신전수 교수님께 무한한 감사 드립니다. 또한 바쁘신 가운데도 저의 연구에 관심을 가져 주시고 많은 도움을 주신 유지환 교수님과 박성하 교수님께도 깊은 감사 드립니다. 그리고 항상 많은 가르침과 조언을 해주신 미생물학교실 조상래, 박전한, 최인홍, 김종선, 이재면, 윤상선, 신성재, 유제욱 교수님께 감사를 드립니다.

실험에 관한 아낌없는 가르침으로 도와주시고 삶에 대한 고민도 함께 나누며 항상 든든한 버팀목이 되어주신 곽만섭 박사님, 실험뿐만 아니라 배울점이 참 많은 김술 박사님, 열정적인 가르침과 배려로 도와주신 유종만 박사님, 기초부터 저를 잘 가르쳐주었고 늘 친절함으로 도움주신 나의 첫 사수 고은애 언니, 따스한 마음으로 늘 성심껏 도와주신 김숙영 선생님, 따끔한 충고와 올바른 방향성을 제시해 주신 조성규 박사님, 착한 마음씨로 실험실원들을 배려해준 이용준 선생님, 꼼꼼하게 챙겨주고 신경 써준 김영훈 선생님, 유쾌한 에너지를 전해주는 Khulan, 성실함을 높게 사는 김희수, 많은 시간 함께하진 못했지만 항상 모범을 보여주신 민현진, 박인호, 조희연 박사님, 즐거운 마음으로 실험하며 함께한 고마운 언니들 임아람, 박수정, 가장 가까이에서 나의 기쁨과 힘들음을 함께 나눠준 하나뿐인 내 동기 이현숙에게 진심으로 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 밤낮으로 기도해주시고 격려해주시며 저를 믿어주신 최철영 목사님, 김현숙 사모님, 언제나 저의 절대적인 지지자가 되어 학위를 마칠 수 있는 큰 힘이 되어 주신 아버지 정찬원, 항상 기도와 사랑으로 저를 지켜봐 주시고 용기를 북돋아 주신 어머니 장은자, 보이지 않는 곳에서 늘 나를 위해 도움을 준 내 동생 정나래 그리고 이하늘 사랑하고 존경합니다.

저의 방패 되시고 인도자 되시며 제 삶의 주인이신 하나님께 영광 돌려드립니다.

정 장 빈 씬

차례

국문요약.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법	
1. 세포배양 및 자가포식(autophagy) 유도.....	8
2. Western blot 분석.....	8
3. 면역침강법(immunoprecipitation).....	9
4. 형질주입(transfection).....	9
5. 면역세포형광염색.....	10
6. CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 HMGB1 ^{ΔVVK_A} HEK293T 변이 세포 주 구축.....	11
III. 결과	
1. 스트레스에 의한 HMGB1 ^{WT} 의 미토콘드리아로 이동 확인	15
2. CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 HMGB1 ^{ΔVVK_A} HEK293T 변이 세포 주 구축.....	17
3. HEK293T 및 HMGB1 ^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에서 자가포식 및 마	

이토파지 유도 차이.....	22
4. 마이토파지 연관 단백질과 HMGB1 ^{WT} 의 결합.....	28
5. HMGB1 ^{ΔVVK_A} HEK293T 변이 세포에 HMGB1 과발현에 따른 자가포식 및 마이토파지 저해효과의 회복.....	30
IV. 고찰.....	39
V. 결론.....	43
참고문헌.....	44
Abstract.....	50



그림 차례

그림 1. 스트레스에 의한 HMGB1 ^{WT} 의 마이토콘드리아로 이동 확인.....	16
그림 2. CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 HMGB1 ^{ΔVVKa} HEK293T 변이 세포주 구축.....	19
그림 3. HEK293T 및 HMGB1 ^{ΔVVKa} HEK293T 세포에서 자가포식 및 마이토파지 유도 차이.....	24
그림 4. 마이토파지 연관 단백질과 HMGB1 ^{WT} 의 결합 확인.....	29
그림 5. HMGB1 ^{ΔVVKa} HEK293T 변이 세포에 HMGB1 과발현에 따른 자가포식 및 마이토파지 저해효과의 회복.....	33
그림 6. HMGB1에 의한 자가포식 및 마이토파지의 조절 모델.....	37

국문요약

세포 스트레스로 유발되는 마이토파지(mitophagy)에서 HMGB1의 역할

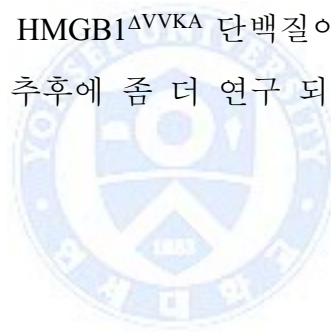
HMGB1은 대부분의 진핵세포에 존재하는 핵 단백질이며 DNA의 minor groove에 결합하여 유전자 전사를 조절한다. 핵 안에 존재하는 HMGB1은 다양한 면역적 자극에 의해 활성화된 대식세포 (macrophage) 등에서 능동적으로 분비되거나, 세포 괴사(necrosis) 등에 의해 수동적으로 세포 밖으로 분비된다. 분비된 HMGB1은 만성 (chronic) 혹은 급성(acute) 염증반응에 관여하는 손상 관련 분자 패턴(damage-associated molecular patterns, DAMP)으로 작용한다.

자가포식이란 악조건 속에서 세포가 살아남으려는 반응 중 하나로 다양한 스트레스에 의해 유발되는 세포손상에 대한 방어 기작이라고 할 수 있는데, 크게 샤페론매개자가포식(chaperone-mediated autophagy), 미세자가포식(microautophagy), 거대자가포식 (macroautophagy) 세 가지로 나눌 수 있다. 이 중 마이토파지는 거대자가포식에 해당하며 마이토콘드리아가 손상을 받았을 때 세포 내 항상성 유지를 위해 손상된 마이토콘드리아를 제거하는 역할을 수행한다.

HMGB1이 이러한 자가포식과 관련이 있다는 내용이 보고되고 있으며 핵, 세포질 그리고 세포 밖으로 분비된 HMGB1이 자가포식을 조절한다고 보고되고 있다.

본 연구는 스트레스에 의해 마이토파지가 유발 될 때 HMGB1의 역할을 규명한 연구로서, HMGB1^{WT}이 핵에서 세포질로 이동 한 후

일부가 미토콘드리아로 위치하고, 스트레스 상황에서 자가포식의 한 종류인 마이토파지의 진행에 필수적인 연관 단백질 Parkin, p62와 HMGB1^{WT}이 각각 결합함을 확인하였다. 또한 HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포(HMGB1 아미노산 No. 175-178 부위의 유전자를 결손한 세포)에서 자가포식 및 마이토파지의 유도 정도가 증가함을 확인 하였으며, HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 HMGB1을 재발현 시켰을 때 HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 마찬가지로 자가포식 및 마이토파지의 유도 정도가 감소함을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과들을 토대로 본 연구에서는 HMGB1의 과발현이 자가포식 및 마이토파지를 감소시키며 HMGB1^{ΔVVK^A}에 의하여 자가포식 및 마이토파지가 증가함을 알 수 있었다. 그러나 HMGB1^{ΔVVK^A} 단백질이 관여하는 자가포식에 대한 분자적인 기전은 추후에 좀 더 연구 되어야 할 부분이다.



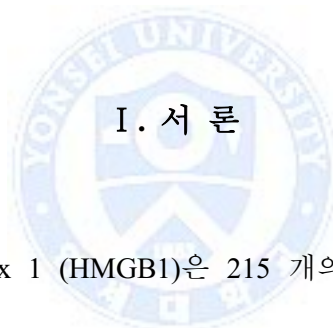
핵심되는 말: HMGB1, mitochondria, mitophagy, cellular stress

세포 스트레스로 유발되는
마이토파지(mitophagy)에서 HMGB1의 역할

<지도교수 신 전 수>

연세대학교 대학원 의과학과

정 장 빈



I. 서론

High mobility group box 1 (HMGB1)은 215 개의 아미노산으로 이루어진 단백질로 대부분의 진핵세포에 존재하는 핵 단백질이며, 포유동물에서는 99%의 상동성을 갖고 있다.¹ HMGB1 은 크게 세 부위로 나뉘어지며, DNA 에 결합하는 도메인인 A box 와 B box, 그리고 산성을 띄고 있는 C-말단 도메인으로 구성되어진다. HMGB1 은 non-histone DNA 결합 단백질로, 뉴클레오솜(nucleosome)을 안정화 시키고 DNA 의 minor groove 에 결합하여 핵 내에서 다양한 유전자 발현에 영향을 끼치는 전사조절인자로 작용한다.^{2,4} HMGB1 결핍 생쥐의 경우 glucocorticoid receptor-responsive gene 의 활성화가 결여되어 출생 후에 죽게 된다.⁵ 핵 내에 존재하는

HMGB1 은 lipopolysaccharide (LPS), tumor necrosis factor- α (TNF- α), reactive oxygen species (ROS), interferon- γ (IFN- γ) 등 다양한 면역적 자극에 의해 활성화된 대식세포에서 아세틸화, 인산화, 메틸화와 같은 전사 후 번역 과정을 거쳐 DNA 에서 분리 된 후 능동적 과정을 통해 세포 밖으로 분비되거나,⁶⁻¹⁰ 괴사(necrosis)를 일으키는 세포에 의해 수동적으로 분비된다. 분비된 HMGB1 은 세포 외 공간에서 감염 없이 나타나는 염증 반응인 멸균면역(sterile inflammation)에 관여하는 손상 관련 분자 패턴(damage-associated molecular pattern, DAMP)으로 작용한다. 손상 관련 분자 패턴에는 HMGB1, heat shock proteins (HSPs), S100 단백질, IL-1 α 등이 있으며, 병원균 관련 분자 패턴(pathogen-associated molecular pattern, PAMP)과 유사하게 염증반응을 촉진시킨다.¹¹⁻¹⁴

자가포식이란 영양 결핍, 열 충격, 노화, 산화 스트레스, 외부 독소 등에 의해 손상 받은 세포 소기관 또는 단백질 등을 세포 내 구성성분인 라이소좀(lysosome)을 매개로 분해하여 세포의 항상성을 유지하는 기전이다. 이러한 자가포식은 크게 세 가지로 나뉠 수 있는데 손상된 단백질과 샤페론에 의해 유도되는 샤페론매개자가포식, 자가포식체(autophagosome)를 형성하지 않고 라이소좀과의 직접적인 결합을 통해 진행되는 미세자가포식, 세포 소기관 등과 같이 비교적 큰 물질을 분해하는 거대자가포식 세 가지로 나뉘며,¹⁵ 널리 알려져 있는 자가포식의 개념은 거대자가포식에 해당한다고 할 수 있다.^{16,17}

자가포식 과정을 살펴보면, 먼저 일반적인 상황에서는 자가포식을 억제하는 분자들에 의해 자가포식이 저해 되어 있다. 외부 자극에 의해 세포가 손상을 입게 되면 손상 받은 세포 소기관, 응집된 단백질 등에 유비퀴틴(ubiquitin)이 결합하게 되고, light chain 3-I (LC3-I)이 phosphatidylethanolamine (PE)에 의해 lipidation 되어 light chain 3-II (LC3-II) 형태로 바뀌게 되는데, 이때 p62의 LC3-interacting region (LIR)을 통해 LC3와 결합하고 ubiquitin-associated binding domain (UBA)을 통해 유비퀴틴과 결합할 수 있는 가교역할에 의해 연결되어 자가포식이 진행되게 된다.¹⁸⁻²⁰

제 기능을 하지 못하는 미토콘드리아가 적절히 제거 되어야만 세포가 정상적인 기능을 수행 할 수 있는데, 미토콘드리아는 동물세포에서 산화적 인산화와 에너지 생산의 중요한 역할을 수행하고 있으며 reactive oxygen species (ROS)의 생산에도 중요한 역할을 하는 기관이다. ROS는 정상적인 신호전달의 중간 생성물 이지만 과도한 ROS의 생성은 세포 기능에 악영향을 미친다. 미토콘드리아의 기능 이상은 노화 및 질병에 연관되어 있는데 그 중에서도 제 기능을 하지 못하는 미토콘드리아가 적절히 제거되지 못하고 남아 있을 때 여러 가지 질병을 유발하게 되며 특히 신경 질환 중 하나인 파킨슨병(Parkinson's disease)의 발병에 연관되어 있다.^{21,22} 거대자가포식 중 미토콘드리아 특이적인 자가포식을 미토파지(mitophagy)라 한다.²³

정상적인 미토콘드리아의 경우 미토콘드리아 내막 내에 존재하는 PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1)은 mitochondrial processing peptidase (MPP), presenilin-associated rhomboid-like protease (PARL), m-AAA 그리고 ClpXP 등 네 가지 프로테아제(protase)에 의해 지속적으로 분해되고 있지만, 미토콘드리아가 스트레스 상황에 처하게 되면 분해가 중단되고 미토콘드리아 표면에 존재하며 카이네이즈(kinase)로 작용하게 된다.²⁴ PINK1 단백질이 미토콘드리아 바깥쪽 막에 축적되게 되고, 이 PINK1 단백질은 E3 유비퀴틴 ligase 인 Parkin 을 미토콘드리아로 모여들게 하고 (PINK1 과 Parkin 의 직접적인 상호작용 또는 PINK1 에 의한 Parkin 의 linker 부위 중 175 번 Thr, T 의 직접적인 인산화로 Parkin 의 이동이 매개 ²⁵⁻²⁷) 인산화시킨다. 활성화 된 Parkin 이 미토콘드리아에 존재하는 VDAC (voltage-dependent anion channel), MFN (mitofusin), NF-κB essential modulator (NEMO) 등의 단백질들을 유비퀴틴화(ubiquitination) 시키면 자가포식 수용체로 불리는 p62 단백질은 UBA 도메인을 이용해 다유비퀴틴화(polyubiquitination)된 단백질을 인식해 결합하고, p62 의 LIR 도메인을 통해 LC3-II와 결합하여 막(phagopore)을 형성하면서 미토파지를 개시한다.^{28,29}

최근에는 HMGB1 이 이러한 자가포식과 관련이 있다는 내용의 연구가 많이 진행되고 있는데, 크게 세 가지 기작을 통해 자가포식에 관여한다고 알려져 있다. 첫 번째로 핵 내에서 HMGB1 은 자가포식을 유도할

수 있는 heat shock protein beta-1 (HSPB1)의 발현을 증가시킨다.³⁰ 두 번째로 산화 스트레스, 영양 결핍 등의 자극에 의해 산화환원반응(redox) 기전을 통하여 세포질로 이동한 HMGB1 은 자가포식의 진행 초기에 관여하는 단백질인 Beclin-1 과 결합하여 Beclin-1 억제 단백질인 Bcl-2 를 Beclin-1 으로부터 분리되게 함으로써 자가포식 조절에 중요한 역할을 한다.³¹⁻³³ 마지막으로 세포 밖으로 분비된 HMGB1 은 이것의 수용체인 receptor for advanced glycation end products (RAGE)와 결합하여 자가포식을 저해하고 있는 mammalian target of rapamycin (mTOR)를 억제함으로써 자가포식을 유도하게 된다.³⁰

본 연구에서는 세포의 열 충격 등의 스트레스에 의해 HMGB1^{WT} 이 핵에서 세포질로 분비되어 미토콘드리아로 이동하는 것을 확인하여 미토파지에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 이를 위하여 HMGB1^{WT} 과 미토파지 연관 단백질과의 결합을 관찰하였고, HMGB1^{WT} HEK293T 세포 및 CRISPR-Cas9 시스템으로 구축한 HMGB1^{ΔVKA} HEK293T 변이 세포를 이용하여 HMGB1 이 미토파지에 미치는 영향을 확인하였다.

II. 재료 및 방법

1. 세포배양 및 자가포식(autophagy) 유도

인간 배아 신장 세포(human embryonic kidney, HEK293T)와 HMGB1^{ΔVVKΔ} HEK293T 세포를 사용하였다. 이는 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)(Gibco, Rockville, MD, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)에 5% CO₂를 공급하며, 37°C에서 배양하였다.

자가포식을 유도하기 위하여 위 세포를 하룻밤 동안 배양한 후 confluency가 70-80% 의 배양 상태에서 열 충격(43°C, 30분) 또는 carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP)(20 μM, 6시간)를 처리하였다.

2. Western blot 분석

스트레스에 의해 마이토파지가 유도되는지 확인하기 위하여, HEK293T 세포에 열 충격, CCCP를 처리한 후 마이토크콘드리아와 세포질을 분리하여 SDS-PAGE를 시행하였다. 이후 nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)에 transfer한 후 자가포식 유도 확인을 위해 rabbit anti-LC3 의 항체(Sigma, USA)로 검출하였다.

스트레스에 의해 HMGB1이 마이토크콘드리아로 이동하는지 확인하기 위하여, HEK293T 세포에 열 충격, CCCP를 처리한 후 마이토크콘드리아와 세포질을 분리하여 SDS-PAGE를 시행하였다. 이후 nitrocellulose membrane에

transfer한 후 rabbit anti-HMGB1 항체(Abcam, Cambridge, UK)로 검출하였다.

3. 면역침강법(immunoprecipitation)

Protein G가 결합된 Dyna-bead에 HMGB1 항체(Abcam)를 25°C에서 1시간 반응시킨 후 스트레스를 주지 않은 세포와 스트레스를 준 세포에서 분리한 미토콘드리아 용해물과 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 이 후 bead를 침전하여 미토파지 연관 단백질인 Parkin, p62와의 결합 여부를 각각의 항체(rabbit anti-Parkin, Millipore, Massachusetts, USA)(mouse anti-p62, Abnova, Taoyuan City, Taiwan)를 사용하여 western-blotting을 통해 확인하였다.

4. 형질주입(transfection)

자가포식이 진행 될 때 LC3의 lipidation에 의한 puncta의 확인을 통해 자가포식의 표지로 사용하여 공초점현미경 이미지를 얻기 위해 GFP-LC3 플라스미드와 polyexpress(Excellgen, Rockville Maryland, USA)를 1:3 비율로 혼합하여 HMGB1^{WT} HEK293T 세포 및 HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 일시적으로 16시간 동안 과발현(transient transfection) 시켰다.

HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에서 과발현된 HMGB1에 의해 미토파지가 HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 같은 수준으로 회복되는지 확인하기 위해 Myc-HMGB1 플라스미드와 polyexpress(Excellgen)를 1:3 비율로 혼합하여 HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 일시적으로 16시간 동안 과발현시켰다.

또한 면역침강법을 이용하여 Parkin과 HMGB1^{WT}의 결합 여부를 확인하기 위해 Flag-parkin과 Myc-HMGB1 플라스미드를 각각 polyexpress(Excellgen)와 1:3 비율로 혼합하여 HMGB1^{WT} HEK293T 세포 및 HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 세포에 일시적으로 16시간 동안 과발현시켰다.

5. 면역세포형광염색

다양한 스트레스 상황에서 핵에서 세포질로 이동한 HMGB1^{WT}이 미토콘드리아로 이동하는지 확인하기 위하여 면역세포형광염색법을 실시하였다. 미토파지를 유도하기 위해 열 충격은 43°C에서 30분 처리하였을 때 HMGB1^{WT}의 세포 내 혹은 미토콘드리아로의 위치를 확인하였다.

이를 위해 HEK293T 세포를 LabTek2 4-wells chambers (Nunc, Roskilde, Denmark)에 1.5×10^5 세포/chamber로 배양한 뒤 스트레스 처리 후 배지를 제거하고 PBS로 한 차례 세척하였다. 4% paraformaldehyde(Biosesang, Seongnam, Korea)로 상온에서 30분간 고정한 후 0.2% Triton X-100으로 10분 동안 permeabilization 수행 하였고 PBS로 세척하였다. 항체의 비 특이적인 결합을 방지하기 위하여 1% BSA로 1시간 blocking 한 뒤, 1% BSA에 희석한 뒤 미토콘드리아를 염색하기 위해 mouse anti-COX IV 항체 (Abcam, Cambridge, UK), rabbit anti-HMGB1 항체(Abcam)를 넣어주고 4°C cold room chamber에서 하룻밤 반응시켜 주었다. 1% BSA에 rabbit Alexa 488이 conjugate된 2차 항체(Life Technologise, Carlsbad, CA, USA)를 희석하

여 넣어준 뒤, 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 핵을 염색하기 위하여 DAPI가 포함된 마운팅 용액(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 이용하여 슬라이드를 만들어준 뒤, 공초점현미경(Olympus Optical, Tokyo, Japan)을 이용하여 관찰하였다.

또한 GFP가 표지 된 LC3를 HMGB1^{WT} HEK293T 세포 내로 transfection 시킨 후 여러가지 스트레스 상황에서 HMGB1^{WT}이 미토콘드리아로 이동하여 미토과지와 공존하는지 확인하기 위하여 같은 방법을 통하여 실시하였다.

6. CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 HMGB1^{ΔVKA} HEK293T 변이 세포주 구축

HMGB1^{WT}의 기능을 조사하기 위하여, HMGB1이 변이된 세포주를 구축하고자 하였다. HMGB1을 선택적으로 돌연변이 시키기 위해서 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 유전자 편집을 하였다.³⁴ CRISPR-Cas9 시스템은 Cas9을 발현하는 벡터에 대상 유전자 염기서열과 상보적으로 일치하는 sgRNA insert를 삽입한 후 세포에 형질주입 시켜주고, 형질주입 된 세포만을 선택하여 유전자 돌연변이 세포만을 얻을 수 있는 방법이다.³⁵

Cas9을 원하는 대상 유전자 부위로 이동시키기 위해서는 대상 유전자의 염기서열과 상보적으로 일치하는 guide RNA의 도움이 필요하다. 이를 위해서 online CRISPR Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>)을 이용하

여 HMGB1 3번째 exon부위(5'- CCGTTACCCTGATTTGCCCCGGGAAGGAA GCAGCAGGCAATGTTACCATTCACTGGGTGTACTC-3')를 표적으로 top (5'- CACCGAGCAAAAAAGGGAGTTGTCA-3', 25 bp), bottom (5'- AAAGTACAA CTCCCTTTTTTGCTC-3', 25 bp) guide RNA를 제작하였다. 이 부위는 HMGB1 아미노산 No. 175-178 (Val-Val-Lys-Ala, VVKA)에 해당하는 부위이다. Guide RNA를 제작 할 때에는 genomic DNA 상에서 한 exon내에서 연속된 20염기를 기준으로 PAM 염기서열(5'-NGG)을 포함 시켰고, online 프로그램 상에서 계산 된 off-target이 가장 적은 염기서열을 선택 함으로서 off-target을 최소화하였다.

제작한 top과 bottom guide RNA를 100 μ M 농도로 녹여 각각 1 μ l씩, T4 ligase 1 μ l, T4 PNK 1 μ l, 3차 증류수 6 μ l를 섞은 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분, 95 $^{\circ}$ C에서 5분 후 25 $^{\circ}$ C가 될 때까지 분당 5 $^{\circ}$ C씩 온도를 낮춰주어 sgRNA oligo insert를 만들어 준 후 3차 증류수에 1:200으로 희석하였다. Oligo 제작이 완료 되면, pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) (Addgene, Cambridge, MA. U.S.A) 벡터 0.77 μ l(100 ng), 희석된 oligo 2 μ l, NEB 2.1 buffer(10X)(New England Biolabs, Ipswich, United Kingdom) 2 μ l, DTT(10 mM) 1 μ l, ATP(10 mM) 1 μ l, Fast Digest *Bbs* I (New England Biolabs) 1 μ l, T4 ligase 0.5 μ l, 3차 증류수 11.73 μ l를 섞은 후 37 $^{\circ}$ C에서 5분, 21 $^{\circ}$ C에서 5분을 한 cycle로 6 cycle 총 1 시간 동안 반응시키어 벡터의 절단과 oligo insert의 삽입하였다. 이후 *E. Coli* DH5 α 에 transformation시키어 mini-prep (Qiaprep spin miniprep kit)하였고

insert가 삽입되면 사라지게 되는 *Bbs* I 효소의 특성을 활용하여 *Bbs* I 과 *Age* I (New England Biolabs, Ipswich)을 사용해 37°C에서 2시간 동안 절단시킨 후 2% agarose gel에 electroporation시켜 DNA 크기를 확인하였다. 최종적으로 U6-Fwd primer를 사용하여 염기서열 결정법을 시행하여 construct의 제작을 확인하였다.

12well에 seeding 된 HEK293T 세포에 제작 완료된 construct(1.2 µg) 1.7 µl, polyexpress(Excellgen) 1.2 µl를 1:1 비율로 섞은 후 형질주입 시켰다. 사용한 pSpCas9(BB)-2A-Puro 벡터는 puromycin 저항성 유전자를 포함하고 있기 때문에 2 µg/ml 농도의 puromycin을 72시간 동안 처리하여 형질주입된 세포만을 선택적으로 분리하였다.

선택된 세포는 genomic DNA prep (QIAamp DNA Mini Kit No.51304)하여 forward, reverse primer [Fwd 5'-AAAGGAGTGAGTTGTGTACAGGG-3', Rev 5'-CCTCCCTTTGCTTTGGAAGGATA-3' (Primer set 1) 또는 [Fwd 5'-CAGGACAGGGCTATCTAAAGACACA-3', Rev 5'-TCCCTACTGTTTTATCCTCCTTT-3' (Primer set 2)]를 각 1 µl, Ex Taq polymerase 10 µl, DNA template(2 ug/µl) 1 µl, 3차 증류수 7 µl를 섞은 후 95°C에서 2분, 95°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 30초를 한 cycle로 40 cycle, 72°C에서 3분 polymerase chain reaction (PCR)반응을 진행하였다. PCR 결과물에 loading star를 섞어 2% agarose gel에 electroporation시키어 원하는 크기의 DNA만을 추출한 후 얻어진 DNA를 95°C에서 2분, 85°C까지 초당 2°C씩 온도를 낮추어 준 후 25°C

까지 초당 0.1℃씩 온도를 낮추어 주어 heteroduplex를 형성하였다. 형질주입 된 세포에서 Cas9이 제대로 기능하는지 확인하기 위함이며 Cas9이 기능을 하였다면 돌연변이가 생성되었을 것이고 heteroduplex를 형성 할 때 unmatched DNA가닥이 생겼는지 확인하기 위하여 heteroduplex 10 µl, T7E1 0.5 µl, NEB 2.1 buffer 2 µl, 3차 증류수 7.5 µl를 섞어 준 후 37℃에서 20분간 반응시켜 2% agarose gel에 electroporation하여 확인하였다.

추가적으로 SDS-PAGE 방법을 사용하여 HMGB1^{ΔVVK} HEKJ293T 세포에서 HMGB1^{WT} 보다 작은 크기의 HMGB1이 탐지 됨을 확인한 후, genomic DNA prep (QIAamp DNA Mini Kit No.51304)하여 2% agarose gel에 electroporation하여 원하는 DNA만을 추출해 낸 후 TA (pGEM-T easy) 벡터에 클로닝하였다. 클로닝된 플라스미드는 DH5α에 transformation시킨 후 Mini prep하여 *EcoR* I (New England Biolabs)으로 절단하여 insert를 확인하였고 T7 primer로 염기서열 결정법을 시행하여 최종적으로 HMGB1^{ΔVVK}를 확인하였다.

단일 클론을 얻기 위해서는 puromycin에 의해 선택된 세포를 96well에 순차적으로 희석하여 seeding한 후 단일 세포에서 유래한 colony를 6well, 100mm dish, 75T flask로 점차 증식시켰다.

III. 결 과

1. 스트레스에 의한 HMGB1^{WT}의 미토콘드리아로 이동 확인

스트레스로 사용한 열 충격은 산화적 스트레스와 유사하게 ROS를 유발하고 미토콘드리아 손상을 유도하며,³⁶ CCCP는 미토콘드리아 선택적인 손상을 유도한다. 자가포식에 관여하는 HMGB1^{WT}이 자가포식의 한 종류인 미토파지에 관여하는지 확인하기 위하여 우선적으로 열 충격 또는 CCCP 처리 시 HMGB1^{WT}이 미토콘드리아로 이동하는지 관찰하였다.

HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 43°C, 30분의 열 충격과 20 μM, 6시간의 CCCP 처리 후 미토콘드리아와 세포질을 분리하여 HMGB1 항체를 사용하여 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다. 그 결과 대조군에서는 HMGB1^{WT}이 미토콘드리아로 이동하지 않는 것을 확인하였으나, 스트레스군에서는 미토콘드리아로 HMGB1^{WT}이 이동함을 확인할 수 있었다 (그림 1A).

대조군과 스트레스군에서 미토콘드리아로 HMGB1^{WT}의 이동 부위 면적을 Image J 프로그램을 이용하여 수치화하였을 때에도 HMGB1^{WT}의 이동이 유의하게 증가되어있음을 확인할 수 있었다 (그림 1B).

다음으로 미토콘드리아와 HMGB1^{WT}의 공존을 확인하고자 열 충격을 처리한 후 미토콘드리아를 염색하기 위해 COX IV 항체와 HMGB1 항체를 이용하여 면역형광염색법을 실시하였다. 그 결과 대조군과 비교하여 열 충격 처리군에서 HMGB1^{WT}이 미토콘드리아로 이동함을 확인할 수

있었다 (그림 1C).

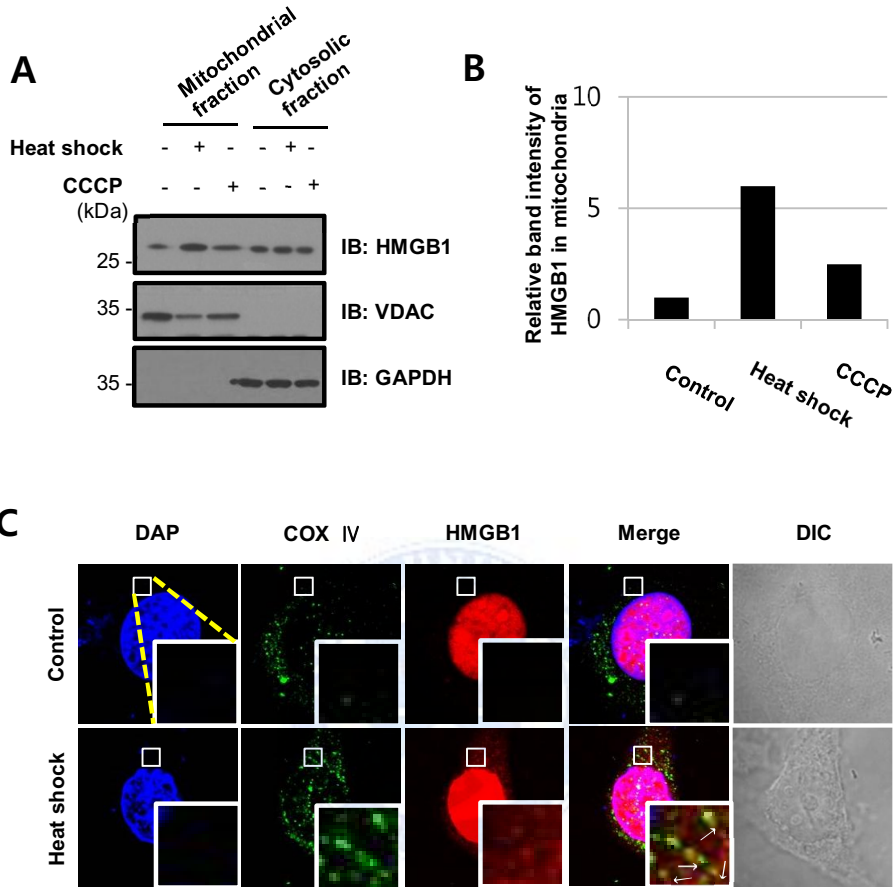


그림 1. 스트레스에 의한 HMGB1^{WT}의 미토콘드리아로 이동 확인. (A) HEK293T 세포를 43°C에서 30분간 열 충격 처리하거나 CCCP를 20 μM 농도로 6시간 처리한 후 HMGB1 항체를 사용하여 SDS-PAGE 방법을 수행함. (B) Image J 프로그램을 이용하여 loading control인 VDAC에 상대적인 HMGB1^{WT}의 band intensity를 구함. (C) 4 chamber에 HEK293T 세포를 seeding하여 열 충격 처리 후 COX IV, HMGB1 항체를 이용하여 면역세포 형광염색법을 실시함.

2. CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 변이 세포주 구축

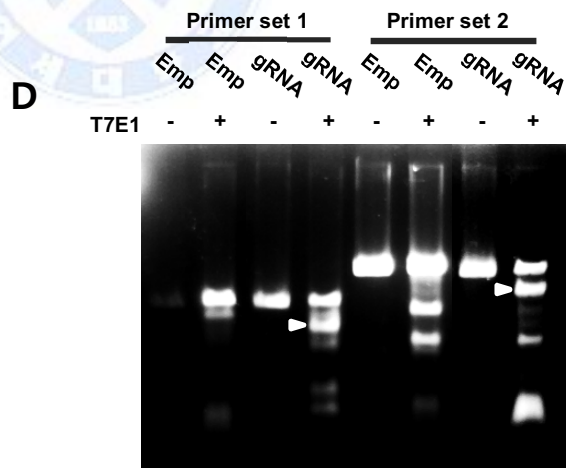
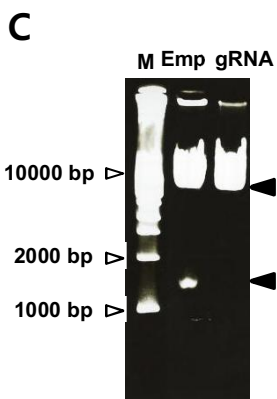
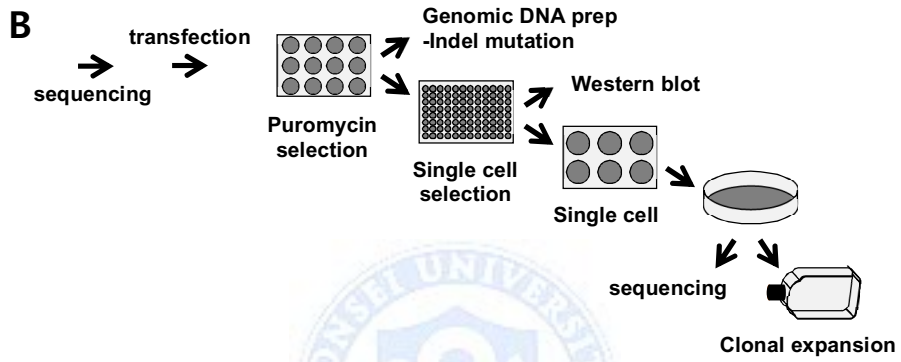
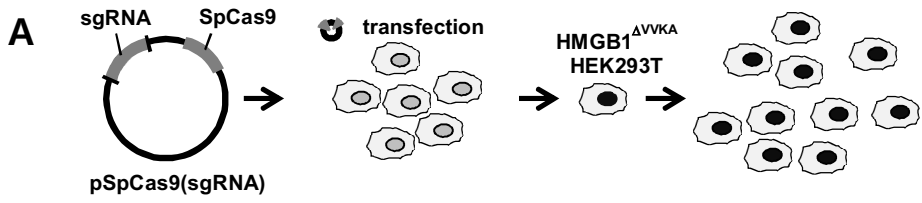
HMGB1^{WT}의 기능을 조사하기 위하여, CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포주를 구축하였다 (그림 2A).

온라인 디자인 도구를 사용하여 HMGB1 세 번째 exon부위(HMGB1 아미노산 No. 175-178에 해당하는 유전자 부위)를 표적으로 하는 sgRNA를 제작 한 후 구입한 pSpCas9(BB)-2A-Puro 벡터에 삽입시켰다. 제작된 construct를 HEK293T세포에 형질주입 시킨 후 형질주입 된 세포만을 선택 하여 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포를 구축하였다 (그림 2B).

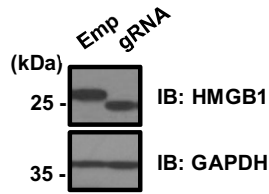
sgRNA를 삽입할 때 사용하는 *Bbs* I 효소 위치는 insert가 삽입 되었을 때 사라진다는 점을 이용하여 construct 제작 확인을 위해 *Bbs* I 과 *Age* I 을 사용하여 DNA 절단 후 agarose gel상에서 크기를 확인하였을 때, insert를 삽입하지 않은 벡터의 경우 *Bbs* I 과 *Age* I 으로 절단되어 약 1.2 kb 크기의 밴드(화살표로 표시)가 관찰된 반면 sgRNA가 insert된 경우 *Bbs* I 효소 위치가 사라지게 되어 *Age* I 만으로 절단되어 약 9.2 kb의 단일 밴드(화살표로 표시)만 관찰됨을 확인할 수 있었다 (그림 2C). 형질주입 된 construct가 기능하는지 확인하기 위해 genomic DNA를 통해 heteroduplex를 생성하였고, construct가 작용하여 DNA의 결손이 일어났을 때 정상 DNA 가닥과 결손이 일어난 DNA 가닥의 unmatch되는 부위를 절단하는 T7E1을

처리한 후 agarose gel상에서 크기를 확인한 결과 gRNA를 형질주입 한 후 2.5 units의 T7E1을 37°C에서 20 분간 처리한 샘플에서 잘린 DNA 밴드를 관찰하여 Cas9이 기능하고 있음을 확인하였다. 알 수 없는 이유로 때때로 gRNA가 없는 공백터 샘플에서 잘린 DNA 밴드가 관찰되기도 하지만 표적 밴드와 크기가 다를 시 문제되지 않는다 (그림 2D).

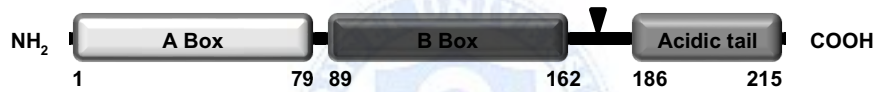
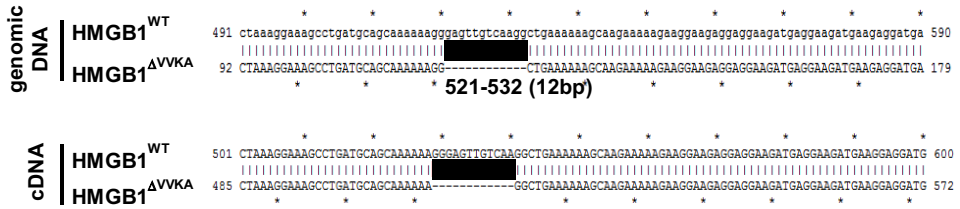
HMGB1^{ΔVVK_A} 를 확인하기 위해서 세포 용해물을 이용하여 SDS-PAGE 방법을 수행하여 Cas9 공백터가 형질주입된 세포에서 HMGB1이 탐지됨을 확인하였고, Cas9 벡터에 HMGB1 sgRNA를 삽입한 construct를 형질주입한 세포에서는 Cas9 공백터를 삽입한 세포의 HMGB1보다 작은 크기의 HMGB1이 탐지 되는 것을 확인하였다 (그림 2E). 세포에서 최종적으로 genomic DNA를 TA 벡터에 클로닝 한 후 T7 primer를 사용하여 DNA 염기 서열 결정법을 수행 하였고 HMGB1^{WT}의 B box 도메인과 C-말단을 잇는 연결 부위의 521-523 bp 위치 즉, B box 도메인과 C-말단 도메인을 연결하는 linker 부위인 175-178번 아미노산(Val-Val-Lys-Ala)이 결손된 HMGB1 단 백질(HMGB1^{ΔVVK_A})을 확인하였다 (그림 2F).



E



F



1 MGKGDPPKPRGKMSSYAFFV

21 QTCREEHKKKHPDASVNFSE

41 FSKKCSERWKTMSAKEKGKF

61 EDMAKADKARYEREMKTYIP

81 PKGETKKKFKDPNAPKRPPS

101 AFFLFCSEYRPKIKGEHPGL

121 SIGDVAKKLGEMWNNTAADD

141 KQPYEKKAARKLKEKYEKDIA

161 AYRAKGPDAAKKGVVKAIEK

181 SKKKKEEEEEDEEDEEEEE

201 EDEEDEDEEEDDDDE

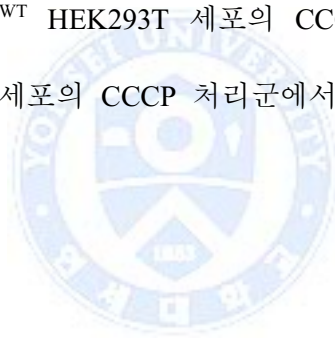
그림 2. CRISPR-Cas9 시스템을 이용한 HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 변이 세포 주 구축. (A) CRISPR-Cas9 시스템을 모식도로 나타냄. (B) CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 HMGB1 돌연변이를 만들기 위한 실험 진행 과정을 모식도로 나타냄. (C) Cas9을 발현하는 벡터에 HMGB1을 표적으로 하는 sgRNA를 삽입시킨 후 construct 제작 확인을 위해 *Bbs* I 과 *Age* I 효소를 사용하여 37°C에서 2시간 동안 절단 하여 삽입을 확인함. (D) HEK293T 세포에 (C)에서 제작한 construct를 형질주입 시킨 후 정상적으로 기능하는지 확인하기 위하여 genomic DNA를 PCR방법으로 증폭 시킨 후 heteroduplex를 형성하여 T7E1으로 unmatch된 DNA를 절단하여 돌연변이의 생성 여부를 확인함. (E) HMGB1의 돌연변이를 확인하기 위하여 세포 용해물을 사용해 SDS-PAGE 방법을 수행하여 HMGB1 항체를 사용하여 HMGB1을 탐지함. (F) TA 벡터와 genomic DNA를 1:3 비율로 클로닝 한 후 TA 벡터를 T7 primer를 사용하여 DNA 염기서열 결정법을 수행함. M, 1kb DNA marker; Emp, pSpCas9(BB)-2A-Puro empty vector; gRNA, pSpCas9(BB)-2A-Puro vector + HMGB1 guide RNA; Primer set 1, Fwd 5'-AAAGGAGTGAGTTGTGTACAGGG-3', Rev 5'-CCTCCCTTTGCTTTGGAAGGATA-3'; Primer set 2, Fwd 5'-CAGGACAGGGCTATCTAAAGACACA-3', Rev 5'-TCCCTACTGTTTTATCCTCCCTTT-3'.

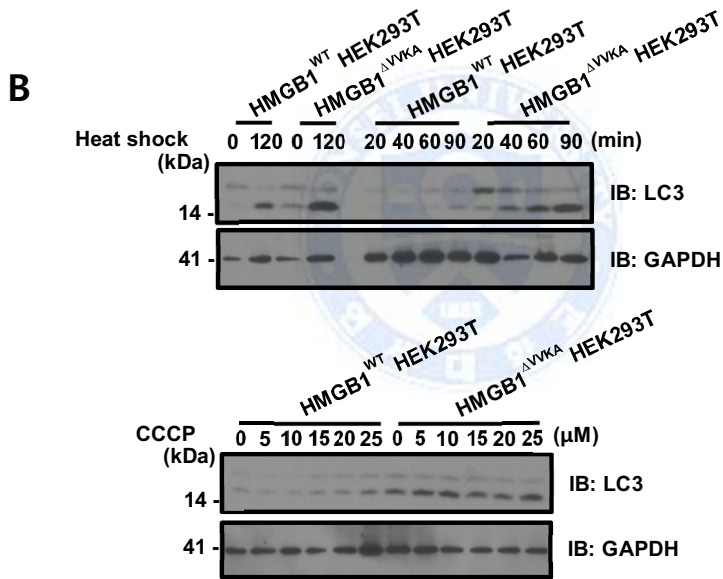
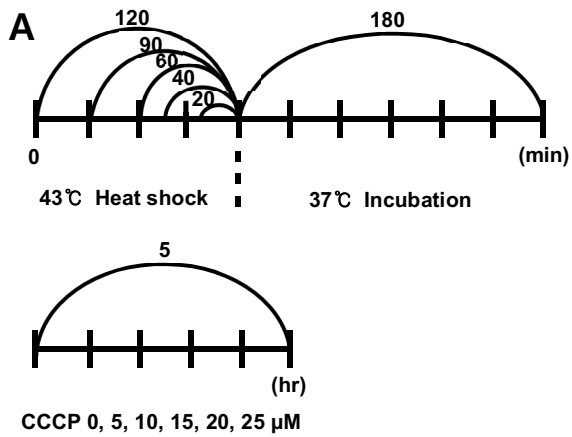
3. HEK293T 및 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에서 자가포식 및 미토파지 유도의 차이

HEK293T 및 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에서 자가포식 유도 정도를 확인하기 위하여 SDS-PAGE 방법을 사용하여 실험을 수행하였다. 열 충격은 43°C에서 20, 40, 60, 90, 120분 후 37°C에서 3시간 동안 회복하였고, CCCP는 0, 5, 10, 15, 20, 25 μM 농도로 5시간 동안 처리하였다 (그림 3A). 세포 용해물을 가지고 SDS-PAGE 을 수행한 결과 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 비해 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에서 상대적으로 많은 양의 LC3-II를 탐지할 수 있었다 (그림 3B).

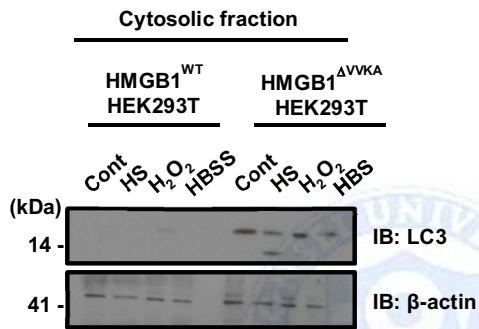
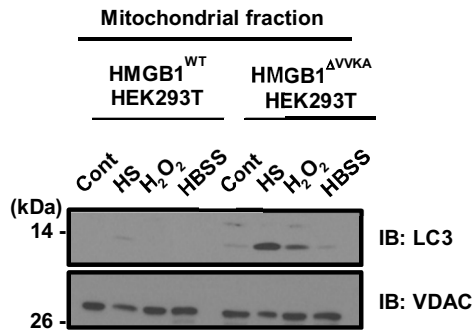
그 후 미토콘드리아와 세포질을 분리하여 SDS-PAGE 방법을 수행하였다. 미토콘드리아 부위를 확인했을 때, HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 비해 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에서 상대적으로 많은 양의 LC3-II가 탐지됨을 확인할 수 있었다 (그림 3C). GFP-LC3와 미토콘드리아를 표적으로 하는 pDsRed2-Mito(Clontech, Mountain View, CA, USA)를 형질주입하고 CCCP를 6시간 처리한 후 형광현미경을 통하여 관찰하였을 때, HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 비해 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에서 상대적으로 많은 양의 자가포식이 진행됨을 LC3 puncta로 확인할 수 있었으며, 미토콘드리아와 LC3 puncta의 co-localization을 관찰하여 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 비해 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에서 미토파지 역시 상대적으로 많이 진행 되고 있음을 확인할 수 있었다 (그림 3D).

CCCP를 처리하였을 때 HMGB1^{WT} HEK293T 세포, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에서 각각 LC3 puncta의 변화를 확인하기 위하여 공초점현미경을 사용하여 각 100개의 세포를 관찰한 후 puncta의 수를 집계하여 그래프로 나타낸 결과 HMGB1^{WT} HEK293T 세포의 control의 경우 단일 세포당 0.74±0.20개, CCCP 처리군의 경우 8.97±0.91개의 puncta를 확인할 수 있었으며 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포의 control의 경우 0.75±0.17개, CCCP 처리군의 경우 19.24±2.78개의 puncta를 확인할 수 있었다. HMGB1^{WT} HEK293T 세포의 control 그룹에서의 LC3 puncta 개수를 1로 기준 잡았을 때, 상대적으로 HMGB1^{WT} HEK293T 세포의 CCCP 처리군에서는 12.1배, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포의 CCCP 처리군에서는 26배의 puncta가 관찰되었다 (그림3E).





C



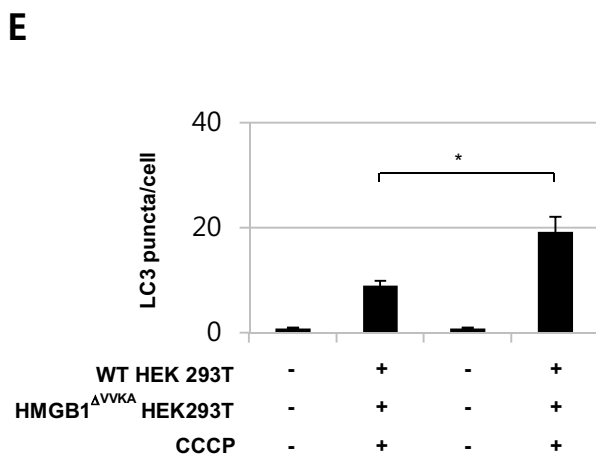
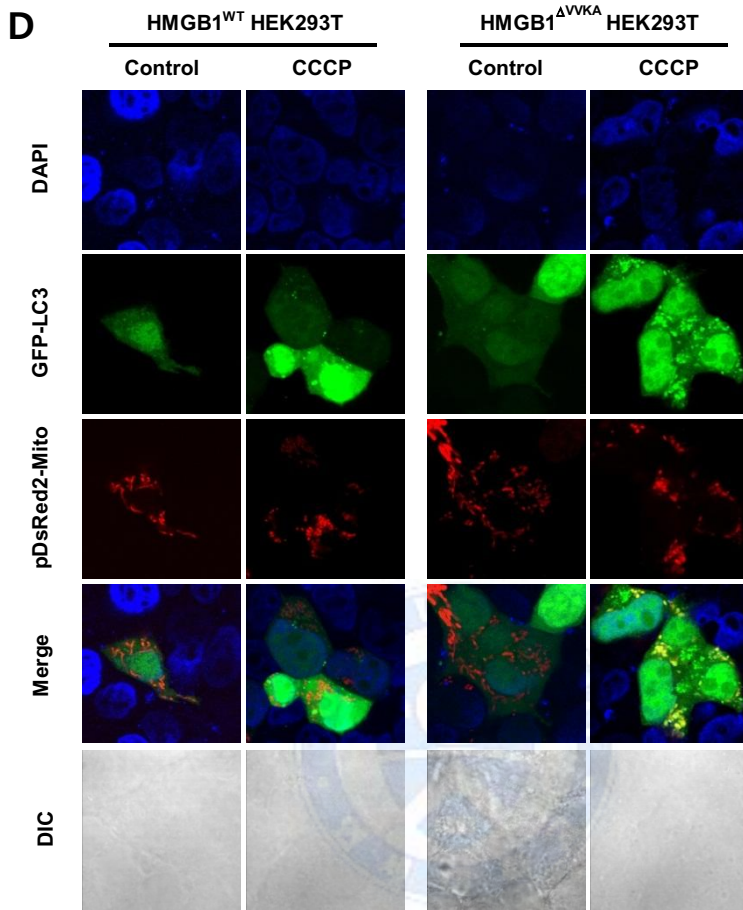


그림 3. HEK293T 및 HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 세포에서 자가포식 및 미토파지 유도의 차이. (A) 열 충격은 43°C에서 20, 40, 60, 90, 120분 후 37°C에서 3시간 동안 회복하였고 CCCP는 5, 10, 15, 20, 25 μM 농도로 5시간 동안 처리함. (B) 열 충격과 CCCP 처리 후 세포 용해질을 사용하여 SDS-PAGE 방법을 수행하여 LC3 항체를 사용하여 LC3-II의 정도를 확인하기 위해 SDS-PAGE 방법을 수행함. (C) 43°C에서 30분간 열 충격, CCCP 20 μM 농도로 6시간 처리 후 미토콘드리아와 세포질을 분리하여 SDS-PAGE 방법을 수행함. (D) HMGB1^{WT} HEK293T과 HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 세포에 CCCP 20 μM 을 6시간 동안 처리한 후 형광현미경을 사용하여 관찰함. (E) 각 100개의 세포의 LC3 puncta를 집계하여 단일 세포당 puncta의 수를 그래프로 나타냄. One-way ANOVA로 분석한 후, Bonferroni로 보정함 (*P<0.0001).



4. 마이토파지 연관 단백질과 HMGB1^{WT}의 결합

스트레스 상황에서 마이토크콘드리아로 이동한 HMGB1^{WT}이 스트레스 받은 마이토크콘드리아에서 일어나는 현상에 (마이토파지) 어떠한 방식을 통해 관여 하는지 확인하고자 HMGB1^{WT}과 마이토파지 연관 단백질과의 결합을 확인하는 실험을 수행하였다. HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 Flag-parkin과 Myc-HMGB1을 형질주입 한 후 열 충격을 주고, 마이토크콘드리아와 세포질을 분리하여 마이토크콘드리아에서 Flag를 사용하여 면역침강법을 수행하였다. 그 결과 대조군과 비교 하였을 때, 열 충격 상황에서 Parkin과 HMGB1^{WT}의 결합이 증가함을 확인할 수 있었다 (그림 4A).

HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 열 충격을 준 후 마이토크콘드리아와 세포질을 분리하고, 마이토크콘드리아에서 HMGB1^{WT} 단백질을 사용하여 면역침강법을 수행하였다. 그 결과 대조군과 비교 하였을 때, 열 충격 상황에서 p62와 HMGB1^{WT}의 결합이 증가함을 확인할 수 있었다 (그림 4B).

이를 바탕으로 HMGB1^{WT}이 마이토파지를 조절 할 때 Parkin과 결합 한 후 175-178번 아미노산 부위를 통해 Parkin의 E3 유비퀴틴 ligase 활동을 돕거나 p62와 결합하여 p62로 인해 매개되는 LC3-II와 유비퀴틴의 연결을 활발하게 하여 결과적으로 마이토파지를 조절 하는 역할을 할 가능성을 제시하는 바이다.

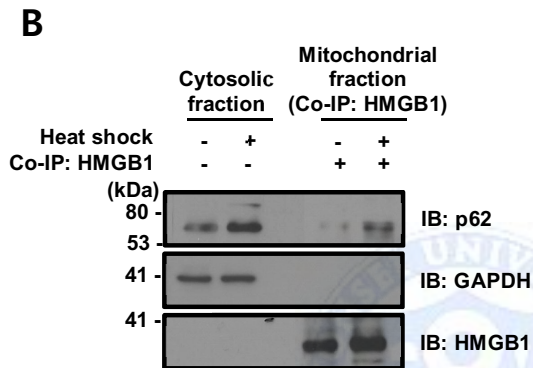
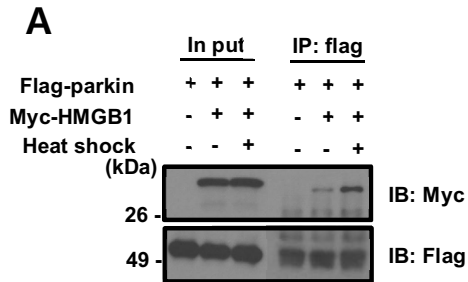


그림 4. 마이토파지 연관 단백질과 HMGB1^{WT}의 결합. (A) HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 Flag-parkin과 Myc-HMGB1을 2.5 μ g씩 형질주입 한 후, 43°C에서 30분간 열 충격을 준 후 마이토킨드리아와 세포질을 분리하여 면역침강법을 수행함. (B) HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 43°C에서 30분간 열 충격을 준 후 마이토킨드리아와 세포질을 분리하여 HMGB1^{WT} 단백질을 사용하여 면역침강법을 수행함.

5. HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 변이 세포에 HMGB1 과발현에 따른 자가포식 및 마이토파지 저해효과의 회복

HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에 HMGB1을 과발현시켜 주었을 때 자가포식 및 마이토파지 저해 정도가 HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 같은 정도로 회복되는지 확인하기 위하여 HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에는 pDsRed2-Mito(Clontech)와 GFP-LC3 플라스미드를 polyexpress (Excellgen)와 1:3비율로 혼합하여 형질주입하여 배양하였고, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에는 pDsRed2-Mito(Clontech), GFP-LC3, Myc-HMGB1 플라스미드를 polyexpress(Excellgen)와 1:3비율로 혼합 하여 형질주입 한 후 20 μ M농도의 CCCP를 6시간 동안 처리하였다. 이 후 HMGB1 항체를 사용하여 면역세포형광염색법을 실시 한 후 공초점현미경을 사용해 관찰하였다. HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T세포에서 HMGB1^{WT} HEK293T 세포 보다 많은 양의 자가포식 및 마이토파지가 진행됨이 확인되었으나, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에 HMGB1을 과발현한 결과 HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 유사한 정도로 자가포식 및 마이토파지 유도 정도가 감소되었다 (그림5A).

GFP-LC3를 형질 주입 한 후 CCCP를 처리하였을 때 HMGB1^{WT} HEK293T 세포, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1을 형질주입한 세포에서 각각 LC3 puncta의 변화를 확인하기 위하여 공초점현미경을 사용하여 각 100개의 세포를 관찰한 후 puncta

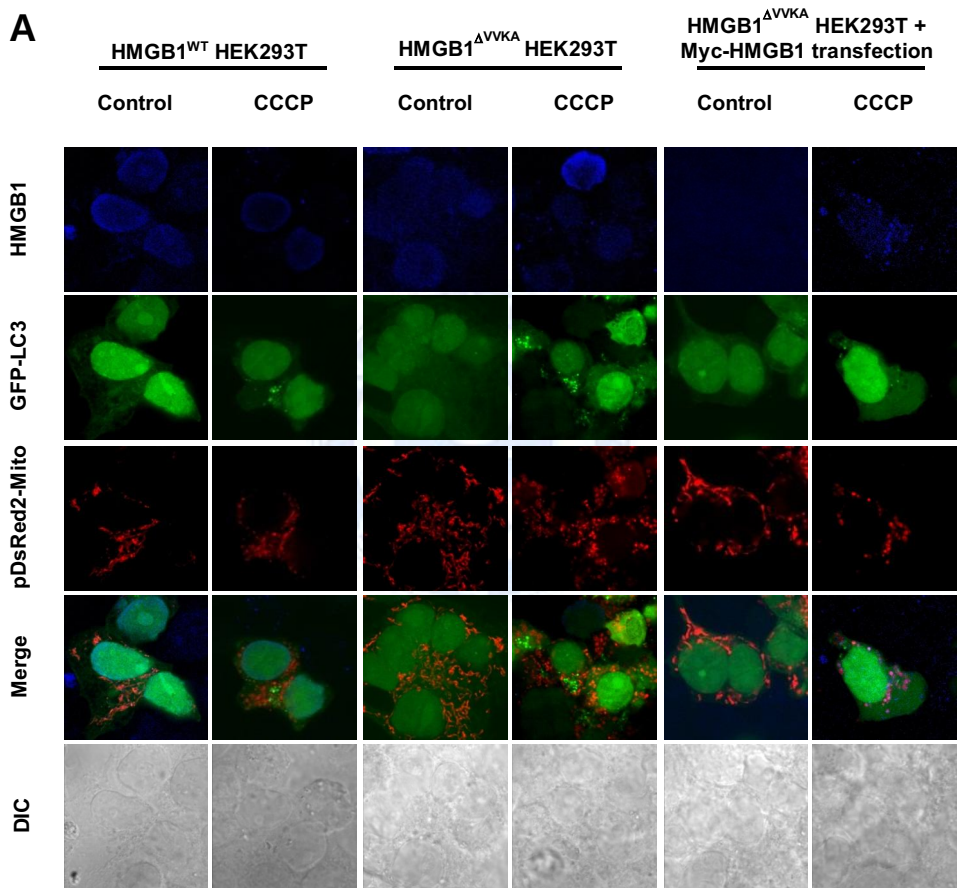
의 수를 집계하여 그래프로 나타낸 결과 HMGB1^{WT} HEK293T 세포의 control의 경우 단일 세포당 0.56±0.09개, CCCP 처리군의 경우 7.14±0.65개의 puncta를 확인할 수 있었으며 HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포의 control의 경우 0.46±0.05개, CCCP 처리군의 경우 19.62±1.79개의 puncta를 확인할 수 있었고 HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1을 형질주입한 세포의 control의 경우 0.47±0.1개, CCCP 처리군의 경우 8.37±0.78개의 puncta를 확인할 수 있었다. HMGB1^{WT} HEK293T 세포의 control 그룹에서의 LC3 puncta 개수를 1로 기준 잡았을 때, 상대적으로 HMGB1^{WT} HEK293T 세포의 CCCP 처리군에서는 12.8배, HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포의 CCCP 처리군에서는 35.0배, HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1을 형질주입한 세포의 CCCP 처리군에서는 14.9배의 puncta가 관찰됨을 확인하였다 (그림5B).

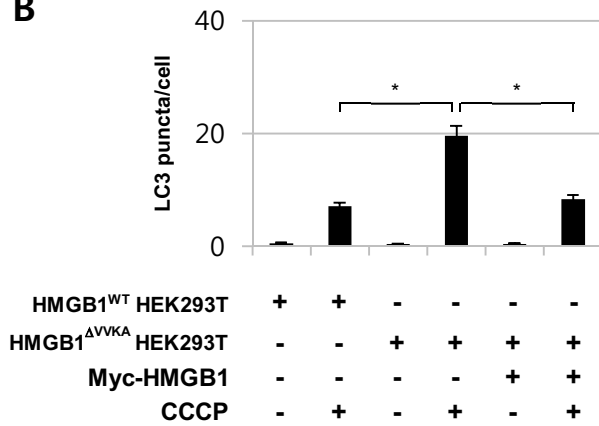
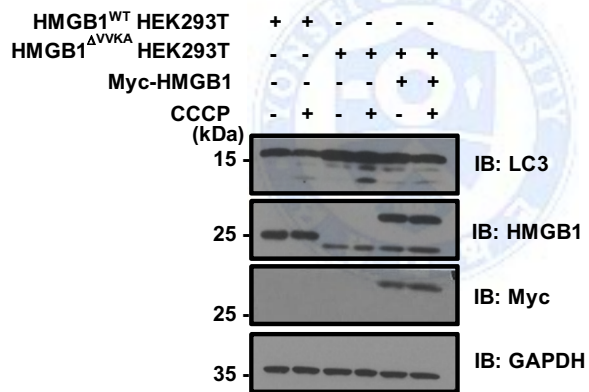
HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1 플라스미드를 polyexpress(Excellgen)와 1:3비율로 혼합 하여 형질주입 한 후 20 μM농도의 CCCP를 6시간 동안 처리하였다. 이 후 LC3 항체를 사용하여 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다. 그 결과 HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T세포에서 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에서 보다 많은 양의 자가포식이 유도됨을 확인하였으며, HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 HMGB1을 과발현시켜 주었을 때 HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 비해 상대적으로 자가포식이 감소됨을 확인하였다 (그림5C). HMGB1^{ΔVVK^A} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1 플라스미

드를 polyexpress(Excellgen)와 1:3비율로 혼합 하여 형질주입 한 후 20 μ M농도의 CCCP를 6시간 동안 처리하였다. 이 후 미토콘드리아와 세포질을 분리하여 LC3 항체를 사용하여 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다. 그 결과 세포질에서와 마찬가지로 미토콘드리아에서 또한 HMGB1 ^{Δ VVKA} HEK293T세포에서 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에서 보다 많은 양의 미토파지가 유도됨을 확인하였으며, HMGB1 ^{Δ VVKA} HEK293T 세포에 HMGB1을 과발현시켜 주었을 때 HMGB1 ^{Δ VVKA} HEK293T 세포에 비해 상대적으로 미토파지가 감소됨을 확인하였다 (그림5D). HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1을 polyexpress (Excellgen)와 1:3비율로 혼합 하여 형질주입 한 후 20 μ M농도의 CCCP를 6시간 동안 처리하고 미토콘드리아와 세포질을 분리하여 LC3 항체를 사용하여 SDS-PAGE 방법으로 분석하였다. 그 결과 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1을 과발현시켜 주었을 때 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 비해 상대적으로 자가포식이 감소됨을 확인하였다 (그림5E). 결과적으로 HMGB1^{WT} HEK293T, HMGB1 ^{Δ VVKA} HEK293T 세포 모두 Myc-HMGB1을 과발현시켜 주었을 때 과발현시키지 않은 세포에 비해 자가포식 정도가 상대적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

HEK293T 세포에 열 충격 또는 CCCP를 처리하면 HMGB1^{WT}은 핵에서 세포질로 이동하게 되고, 이 중 일부는 미토콘드리아로 이동하여 Parkin, p62와 결합하게 되며 HMGB1^{WT}은 자가포식 및 미토파지를 저해한다 (그림 6A). 반면 No. 175-178 부위의 유전자를 결손한 HMGB1 ^{Δ VVKA} 단백질

은 자가포식 및 미토파지를 저해하고 있던 VVKA의 결손 효과 또는 구조변형의 효과로 인해 결과적으로 자가포식 및 미토파지를 유도한다 (그림 6B).



B**C**

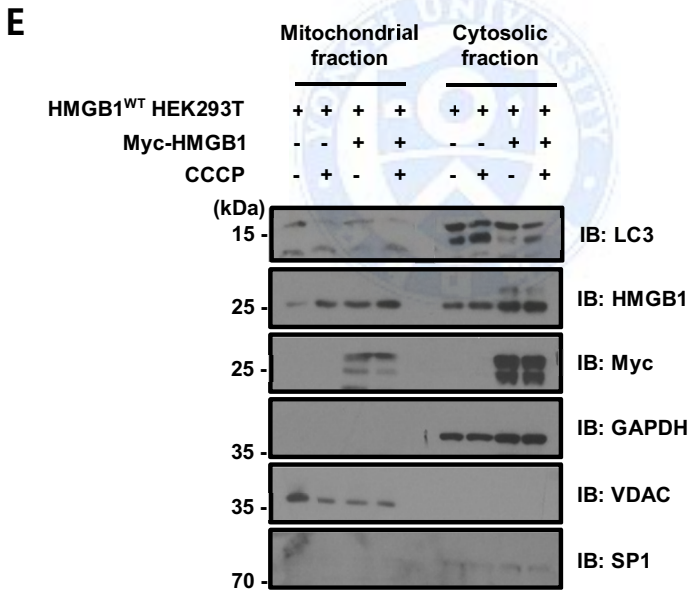
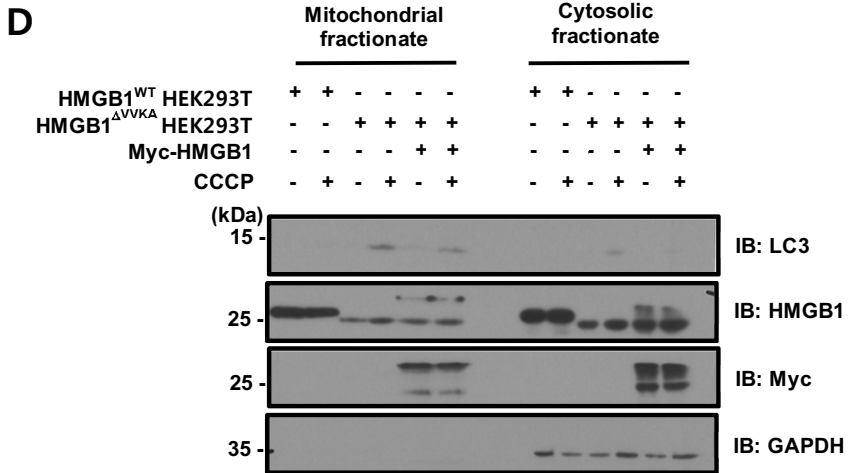


그림 5. HMGB1^{ΔVVKa} HEK293T 변이 세포에 HMGB1 과발현에 따른 자가포식 및 미토콘드리아 저해효과의 회복. (A) HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 HMGB1^{ΔVVKa} HEK293T 세포에 GFP-LC3, Mito-Red 플라스미드를 형질주입하였고, HMGB1^{ΔVVKa} HEK293T 세포에는 GFP-LC3, Mito-Red, Myc-HMGB1 플라스미드를 각 0.2 μg씩을 polyexpress를 이용하여 형질주입 함. 20 μM

농도의 CCCP를 6시간 동안 처리 후 HMGB1 항체를 사용하여 면역세포 형광염색하여 공초점현미경을 사용해 관찰함. (B) 각 100개의 세포의 LC3 puncta를 집계하여 단일 세포당 puncta의 수를 그래프로 나타냄. One-way ANOVA로 분석한 후, Bonferroni로 보정함 (*P<0.0001). (C) HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1을 형질주입한 세포에 20 μM 농도의 CCCP를 6시간 동안 처리한 후 LC3 항체를 사용하여 SDS-PAGE 방법을 수행함. (D) HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1을 형질주입한 세포에 20 μM 농도의 CCCP를 6시간 동안 처리 후 미토콘드리아와 세포질을 분리하여 LC3 항체를 사용하여 SDS-PAGE 방법을 수행함. (E) HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 Myc-HMGB1을 형질주입한 세포에 20 μM 농도의 CCCP를 6시간 동안 처리한 후 미토콘드리아와 세포질을 분리하여 LC3 항체를 사용하여 SDS-PAGE 방법을 수행함.



그림 6. HMGB1 에 의한 자가포식 및 미토콘드리아의 조절 모델. (A) HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 열 충격 또는 CCCP를 처리하면 핵 내에 존재 하던 HMGB1^{WT}은 세포질로 이동한 후, 일부는 미토콘드리아로 이동하여 Parkin, p62와 결합하게 됨. HMGB1^{WT} 단백질은 미토콘드리아를 저해함. (B) HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 세포에서는 HMGB1 단백질의 구조 변형 혹은 HMGB1의 VVKA 아미노산 부위 결손의 영향으로 결과적으로 미토콘드리아가 유도되기 때문에 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 비해 많은 LC3-II가 관찰 된다.



IV. 고찰

HMGB1은 대부분의 진핵세포에서 핵 내에 존재하고 있으며, 핵 내 DNA와 결합함으로써 뉴클레오솜을 안정화시키고 전사를 조절하는 인자로 작용을 한다.³⁷⁻³⁹ 하지만 여러 가지 자극에 의해 세포 외 공간으로 분비되게 되고, 분비된 HMGB1은 전염증성 사이토카인으로써 기능을 수행한다.³⁷ 이러한 HMGB1은 산화 환원 반응 상태에 따라 염증반응이나 자가면역 질환에 다양한 역할을 수행한다.⁴⁰ 이 뿐만 아니라 HMGB1은 핵에서 세포질로 이동하여 자가소화작용(autophagy)의 조절자로서의 역할도 수행한다.^{32,41}

자가포식이란 불필요하거나 제 기능을 하지 못하는 세포 구성성분들을 라이소솜 매개로 하여 분해시키는 과정인데,⁴² HMGB1이 자가포식 과정에 관여한다. HMGB1은 핵 내에서 자가포식에 관여하는 HSPB1의 전사를 조절하기도 하고, 세포질에서는 자가포식의 초기 단계에 관여하는 Beclin-1과 결합을 통해 조절하며, 세포질 밖으로 분비된 HMGB1은 RAGE와 결합하여 자가포식을 조절한다.³⁰ 즉 HMGB1은 다양한 곳에서 다양한 기전을 통해 불필요한 세포 구성성분을 분해시켜 세포 생존을 촉진시킨다.

스트레스를 받은 세포에서 HMGB1은 핵에서 세포질 혹은 세포 밖으로 분비된 후 위험 신호를 보낸다.⁴³ 본 연구에서는 HMGB1이 열 충격과 CCCP 처리에 의해 발생하는 미토콘드리아 손상에서 미토파지가 유

발 될 때 어떠한 역할을 수행하는지 확인해 보고자 하였다. HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 열 충격과 CCCP를 처리하였을 때 HMGB1^{WT}은 세포질로 분비된 후 미토콘드리아로 이동하게 됨을 확인하였다(그림 1).

본 연구에서는 자가포식 및 미토파지에서 HMGB1^{WT}의 역할을 규명하고자 유전자 편집 도구인 CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 인간 HMGB1 유전자를 표적으로 하여 HMGB1^{ΔVVK} 단백질을 발현하는 HEK293T 변이 세포를 구축하였으며(그림 2), HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 세포를 이용하여 자가포식 유도 정도를 관찰해본 결과, HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 세포의 경우 HMGB1^{WT} HEK293T에 비해 자가포식과 미토파지 모두 상대적으로 많이 유도하고 있음을 확인할 수 있었다(그림 3). HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 세포는 HMGB1^{WT} 대신 HMGB1^{ΔVVK} 단백질이 발현되어 있는데, 위와 같은 자가포식과 미토파지의 상대적 유도 증가가 HMGB1^{WT}의 경우 VVKA(175-178번 아미노산)부위를 통해 미토파지 연관 단백질들의 활동을 억제할 가능성, 즉 기존에 보고되고 있었던 자가포식 과정에서의 HMGB1^{WT}의 역할과 관련하여 HMGB1^{WT}이 미토콘드리아로 이동, 미토파지 연관 단백질과 결합함을 확인함으로써 HMGB1^{WT}의 VVKA(175-178번 아미노산)부위에 의해 미토파지 연관 단백질들의 활동을 억제하는 역할을 하여 스트레스를 받은 세포내의 미토파지 진행과정을 저해 할 수 있다는 가능성이 있다. 반면 VVKA(175-178번 아미노산)를 결손한 HMGB1^{ΔVVK}의 경우 HMGB1^{WT}에 비해 많은 양의

자가포식 및 마이토파지를 유도한다 (그림 6). HMGB1 단백질 서열에서 Val-Val-Lys-Ala(175-178번 아미노산)의 결손이 일어난 부위는 HMGB1^{WT}의 B Box 도메인과 C-말단을 잇는 loop 부위(163-185번 아미노산)에 위치하여 도메인과 도메인을 연결하는 부위이다. 이 부위는 굴곡성(flexibility)이 있으며, 소수성(hydrophobicity) 아미노산들의 공간상 거리에 영향을 받는다.^{44,45} 따라서 HMGB1^{WT}의 175-178번 아미노산 부위가 HMGB1^{WT}이 Parkin, p62와 결합할 때 이 단백질들의 자가포식 및 마이토파지 개시 기능을 억제하는 역할을 하는 부분이며 이 부위의 결손은 자가포식 및 마이토파지의 저해 기능이 변화하였을 가능성을 제시하며 소수성 아미노산인 V의 결손은 loop의 굴곡성 변화로 인한 단백질 구조의 변형을 초래하여 자가포식을 유도하는 단백질과의 결합력이 증가하여 높은 수준의 자가포식 및 마이토파지가 유도되었을 가능성이 또한 제시하는 바이다.

HMGB1^{ΔVVKKA} HEK293T 세포에 HMGB1을 형질주입 시켰을 때 HMGB1^{ΔVVKKA}에 의해 상대적으로 증가되었던 자가포식 및 마이토파지가 HMGB1^{WT} HEK293T와 유사한 정도로 감소함을 확인하였다(그림 5). 스트레스 상황에서 마이토크콘드리아로 이동한 HMGB1^{WT}이 마이토파지에 어떠한 방식으로 역할 하는지 확인해 보고자 마이토파지 연관 단백질과 결합을 확인한 결과(그림 4) Parkin 및 p62와 각각 결합함을 확인하여 HMGB1^{WT}이 이들 단백질의 역할에 어떤 영향을 주는지 여부에 대해서는 추후 연구가 더 필요하다.

또한 HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포(HMGB1 아미노산 No. 175-178 부위의 유전자를 결손한 세포)에서 자가포식 및 미토콘드리아의 유도가 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 비해 증가되어 있음을 확인 하였으며, HMGB1^{ΔVVK_A} HEK293T 세포에 HMGB1을 재발현 시켰을 때 HMGB1^{WT} HEK293T 세포와 마찬가지로 자가포식 및 미토콘드리아가 감소됨을 확인 할 수 있었다.

본 연구에서는 HMGB1과 자가포식에 대한 상호 관련성을 제시하였으나 HMGB1^{ΔVVK_A} 단백질에 의한 자가포식의 유도에 대한 분자적인 기전은 추 후에 좀 더 연구 되어야 할 부분이다.



V. 결 론

세포의 핵 내에 존재하는 HMGB1은 다양한 세포 스트레스에 노출되었을 때 세포질로 이동하며, 자가포식에 관여한다고 알려져 있다. 또한, 단백질의 구조 변형은 다른 단백질과의 결합이나 단백질 기능에 영향을 미친다. 따라서, 본 연구에서는 HMGB1의 Val-Val-Lys-Ala (aa 175-178) 부위를 유전적으로 결손시킨 HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 변이 세포주를 구축하여 HMGB1의 마이토파지 유도에 미치는 영향을 확인하고, 마이토파지 연관 단백질들과의 상관관계를 확인해 보았다. 그 결과 HMGB1^{WT}은 열 충격 및 CCCP 처리에 의해 핵에서 세포질내 마이토킨드리아로 이동하고, 마이토파지 연관 단백질인 Parkin 및 p62와 결합함을 관찰하였다. 또한 동일한 환경에서 HMGB1^{ΔVVK} HEK293T 세포에서 마이토파지가 HMGB1^{WT} HEK293T 세포에 비해서 저해되는 것을 확인하였다. HMGB1^{ΔVVK} 단백질에 의해 마이토파지가 증가 되는 이유에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

IV. 참고 문헌

1. Yotov WV, St-Arnaud R. Nucleotide sequence of a mouse cDNA encoding the nonhistone chromosomal high mobility group protein-1 (HMG1). *Nucleic Acids Res* 1992;20:3516.
2. 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.
3. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5:331-42.
4. 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.
5. Calogero S, Grassi F, Aguzzi A, Voigtlander T, Ferrier P, Ferrari S, et al. The lack of chromosomal protein Hmg1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice. *Nat Genet* 1999;22:276-80.
6. 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.
7. Youn JH, Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 2006;177:7889-97.
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. 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-dependent mechanism. *J Immunol* 2003;170:3890-7.
10. 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.
11. Chen CJ, Kono H, Golenbock D, Reed G, Akira S, Rock KL. Identification of a key pathway required for the sterile inflammatory response triggered by dying cells. *Nat Med* 2007;13:851-6.
12. Foell D, Wittkowski H, Vogl T, Roth J. S100 proteins expressed in phagocytes: a novel group of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol* 2007;81:28-37.
13. Quintana FJ, Cohen IR. Heat shock proteins as endogenous adjuvants in sterile and septic inflammation. *J Immunol* 2005;175:2777-82.
14. Yang D, Chen Q, Yang H, Tracey KJ, Bustin M, Oppenheim JJ. High mobility group box-1 protein induces the migration and activation of human dendritic cells and acts as an alarmin. *J Leukoc Biol* 2007;81:59-66.
15. Aki T, Funakoshi T, Unuma K, Uemura K. Impairment of autophagy: from hereditary disorder to drug intoxication. *Toxicology* 2013;311:205-15.
16. Zhang J. Autophagy and Mitophagy in Cellular Damage Control. *Redox Biol* 2013;1:19-23.
17. Ryter SW, Choi AM. Autophagy: An Integral Component of the Mammalian Stress Response. *J Biochem Pharmacol Res* 2013;1:176-88.

18. Kapuy O, Vinod PK, Banhegyi G. mTOR inhibition increases cell viability via autophagy induction during endoplasmic reticulum stress - An experimental and modeling study. *FEBS Open Bio* 2014;4:704-13.
19. Manley S, Williams JA, Ding WX. Role of p62/SQSTM1 in liver physiology and pathogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2013;238:525-38.
20. Lin X, Li S, Zhao Y, Ma X, Zhang K, He X, et al. Interaction domains of p62: a bridge between p62 and selective autophagy. *DNA Cell Biol* 2013;32:220-7.
21. Zanellati MC, Monti V, Barzaghi C, Reale C, Nardocci N, Albanese A, et al. Mitochondrial dysfunction in Parkinson disease: evidence in mutant PARK2 fibroblasts. *Front Genet* 2015;6:78.
22. Ney PA. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta* 2015.
23. Kubli DA, Gustafsson AB. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circ Res* 2012;111:1208-21.
24. Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep* 2012;13:378-85.
25. Sha D, Chin LS, Li L. Phosphorylation of parkin by Parkinson disease-linked kinase PINK1 activates parkin E3 ligase function and NF-kappaB signaling. *Hum Mol Genet* 2010;19:352-63.
26. Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, et al. Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest* 2009;119:650-60.

27. Kim Y, Park J, Kim S, Song S, Kwon SK, Lee SH, et al. PINK1 controls mitochondrial localization of Parkin through direct phosphorylation. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;377:975-80.
28. Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 2010;19:4861-70.
29. Muller-Rischart AK, Pilsl A, Beaudette P, Patra M, Hadian K, Funke M, et al. The E3 ligase parkin maintains mitochondrial integrity by increasing linear ubiquitination of NEMO. *Mol Cell* 2013;49:908-21.
30. Kang R, Livesey KM, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT, Tang D. Metabolic regulation by HMGB1-mediated autophagy and mitophagy. *Autophagy* 2011;7:1256-8.
31. Tang D, Kang R, Livesey KM, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT. High mobility group box 1 (HMGB1) activates an autophagic response to oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2011;15:2185-95.
32. Tang D, Kang R, Livesey KM, Cheh CW, Farkas A, Loughran P, et al. Endogenous HMGB1 regulates autophagy. *J Cell Biol* 2010;190:881-92.
33. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011;18:571-80.
34. Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc* 2013;8:2281-308.
35. Xiao-Jie L, Hui-Ying X, Zun-Ping K, Jin-Lian C, Li-Juan J. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet* 2015.

36. Slimen IB, Najar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia* 2014;30:513-23.
37. 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.
38. Zhang Y, Cheng Y, Ren X, Zhang L, Yap KL, Wu H, et al. NAC1 modulates sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin by altering the HMGB1-mediated autophagic response. *Oncogene* 2012;31:1055-64.
39. Guazzi S, Strangio A, Franzi AT, Bianchi ME. HMGB1, an architectural chromatin protein and extracellular signalling factor, has a spatially and temporally restricted expression pattern in mouse brain. *Gene Expr Patterns* 2003;3:29-33.
40. Magna M, Pisetsky DS. The role of HMGB1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases. *Mol Med* 2014;20:138-46.
41. Livesey KM, Kang R, Vernon P, Buchser W, Loughran P, Watkins SC, et al. p53/HMGB1 complexes regulate autophagy and apoptosis. *Cancer Res* 2012;72:1996-2005.
42. Zhang Q, Kang R, Zeh HJ, 3rd, Lotze MT, Tang D. DAMPs and autophagy: cellular adaptation to injury and unscheduled cell death. *Autophagy* 2013;9:451-8.
43. Frank MG, Weber MD, Watkins LR, Maier SF. Stress sounds the alarmin: The role of the danger-associated molecular pattern HMGB1 in stress-induced neuroinflammatory priming. *Brain Behav Immun* 2015.

44. Berezovsky IN, Kirzhner VM, Kirzhner A, Trifonov EN. Protein folding: looping from hydrophobic nuclei. *Proteins* 2001;45:346-50.
45. Berezovsky IN, Trifonov EN. Protein structure and folding: a new start. *J Biomol Struct Dyn* 2001;19:397-403.



Abstract

The roles of HMGB1 in mitophagy
as a targeted defense against cellular stress

Jang Bin Jeong

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeon-Soo Shin)

High mobility group box 1(HMGB1), an abundant non-histone nuclear protein is translocated to cytosol under cellular stresses like oxidative stimuli. Translocated HMGB1 has been reported as a kind of regulator of autophagy, which is a process where eukaryotes degrade various intracellular materials such as damaged mitochondria. In this study, we show that HMGB1^{WT} could translocate to cytoplasm and migrate to mitochondria in stress condition. And, we also found that HMGB1^{WT} interact with Parkin and p62 that are mitophagy related protein. To determine the roles of HMGB1 in mitophagy, we confirmed the difference in degree of mitophagy induction between wild type and HMGB1^{ΔVVK_A} cell line under stress condition. We demonstrated that HMGB1^{ΔVVK_A} cells showed higher rate of mitophagy induction than wild type cells did. And in case of HMGB1 overexpression to HMGB1^{ΔVVK_A} cell line the degree of autophagy and mitophagy induction is recovered as much as

wild type cell did. In summary, we suggest the possibility that the deleted amino acids of HMGB1 might be critical to negative regulate mitophagy induction or that of HMGB1's flexibility change caused by deletion of hydrophobic amino acids could increase the binding with proteins relating to mitophagy induction and as a result it could induce higher mitophagy in cells in response to stress.



Key words: HMGB1, mitochondria, mitophagy, cellular stress