

인플라마솜 매개
peroxiredoxin2의 분비와
보체 고전경로 활성화

연세대학교 대학원
의과학과
이 현 숙

인플라마솜 매개
peroxiredoxin2의 분비와
보체 고전경로 활성화

지도교수 신 전 수

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014 년 12 월

연세대학교 대학원

의과학과

이 현 숙

이현숙의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 신 전 수 인

심사위원 박 채 규 인

심사위원 배 수 한 인

연세대학교 대학원

2014 년 12 월

감사의 글

석사 학위과정을 마치며, 많은 분들께 글로나마 감사의 마음을 전하려 합니다.

우선 이 논문을 완성하기까지 많은 가르침을 주신 신전수 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 바쁘신 가운데도 많은 조언으로 부족한 저의 결과물이 좀 더 다듬어지도록 도움 주신 박채규 교수님, 배수한 교수님께도 감사의 마음을 전합니다.

가족과도 같았던 실험실 식구들. 힘든 일이 생길 때마다 힘이 되는 말과 격려를 아끼지 않고 해주신 곽만섭 박사님, 실험실 생활을 잘 해나갈 수 있도록 여러 가지 도움을 주신 김숙영 선생님, 실험에 대한 많은 조언을 해주신 김솔 박사님, 언제나 모범적인 유종만 박사님, 긍정적인 용준 선생님, 실험이나 개인적인 고민도 함께 고민해준 아람 언니, 가장 가까이에서 나의 기쁜 일과 힘든 일을 함께 해준 하나뿐인 동기 장빈 언니, 밝은 분위기로 항상 웃음을 준 수정 언니, 실험실 굿은 일도 하며 조언도 많이 해준 영훈 선생님, 언제나 친절하고 정도 많은 라나. 깊은 감사의 마음을 전합니다.

끝까지 응원해주고 가장 큰 힘이 된 가족들. 묵묵히 믿어 주시고 아낌없이 지원해주신 아빠, 투정을 부려도 사랑으로 보듬어주신 엄마, 언제나 내 편이 되어준 언니. 항상 감사하고 사랑합니다.

이현숙 씬

차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 재료	7
2. 세포배양	8
3. Inflammasome 유도 및 Western blot 분석	9
4. 효소면역항체법 (ELISA)	10
5. Complement activation assay	11
6. 용혈 보체 검정 (Hemolytic complement 50, CH ₅₀ assay)	12
7. 면역세포형광염색	13
III. 결과	15
1. LPS 및 ATP 처리에 따른 peroxiredoxins의 분비	15
2. LPS 및 ATP, nigericin, alum 처리에 따른 peroxiredoxin2의 분비	17
3. Caspase-1 의존적인 peroxiredoxin2의 분비	21
4. NLRP3 의존적인 peroxiredoxin2의 분비	23

5. Peroxiredoxin1 과 peroxiredoxin2 단백질 제조	25
6. Peroxiredoxin1, peroxiredoxin2와 C1q의 결합	27
7. Peroxiredoxin1, peroxiredoxin2와 C1q의 결합에 따른 보체의 활성화	29
8. 용혈 보체 검정	32
9. Peroxiredoxin2에 의해 증가된 C3c의 형성	34
10. Peroxiredoxin2에 의해 증가된 C5b-9의 형성	36
IV. 고찰	39
V. 결론	44
참고문헌	45
Abstract	52

그림 차례

그림 1. 면역세포에서 LPS와 ATP 자극 후 peroxiredoxins의 분비 측정	16
그림 2. 면역세포에서 LPS와 ATP, nigericin, alum 자극 후 peroxiredoxin2의 분비 측정	19
그림 3. Inflammasome 매개 peroxiredoxin2의 분비에서 caspase-1 억제 효과 측정	22
그림 4. NLRP3 결손 마우스 BMDM 세포에서 peroxiredoxin2의 분비 측정	24
그림 5. 정제된 peroxiredoxin1과 peroxiredoxin2 단백질 확 인	26
그림 6. Peroxiredoxin1, peroxiredoxin2와 C1q의 결합 확인	28
그림 7. Peroxiredoxin1, peroxiredoxin2와 C1q의 결합에 따른 C4b 및 C5b-9의 형성	30

그림 8. 용혈 보체 검정	33
그림 9. 면역세포에서 peroxiredoxin2에 의해 증가된 C3c의 형성	35
그림 10. 면역세포에서 peroxiredoxin2에 의해 증가된 C5b- 9의 형성	37
그림 11. 보체 활성화 경로	38

약자

ATP	adenosine triphosphate
BMDM	bone marrow-derived macrophage
CRP	C-reactive protein
DAMP	danger-associated molecular pattern
HMGB1	high mobility group box 1
IL	interleukin
LPS	lipopolysaccharide
MAC	membrane attack complex, C5b-9
NLRP	nucleotide-binding oligomerization domain, leucine rich repeat and pyrin domain containing
Prx	peroxiredoxin
TLR	toll-like receptor
TNF	tumor necrosis factor

국문요약

인플라마솜 매개 peroxiredoxin2의 분비와

보체 고전경로 활성화

Peroxiredoxins (Prxs)은 다양한 세포 구성 요소에서 발견되는 단백질이다. 세포 내에서 존재하는 Prxs은 활성산소를 제거하거나 활성산소에 의해 매개되는 신호전달을 억제하는 역할을 한다. 세포 내 Prxs의 역할은 이미 잘 알려져 있지만, 분비된 Prxs의 역할에 대해서는 많은 연구가 진행되어 있지 않다. 최근에 Prxs이 허혈성 뇌 증후군에서 분비되어 염증 반응을 유도하는 danger-associated molecular pattern (DAMP) 단백질로서 역할을 한다고 보고되었다. 본 연구에서는 허혈성 뇌 증후군과 같은 세포 괴사에 의한 분비뿐만 아니라 LPS 또는 LPS와 ATP처럼 염증반응을 유도하는 자극원에 의해서도 Prxs이 분비됨을 확인하였다. LPS와 ATP를 함께 이용한 자극은 면역세포에서 inflammasome (인플라마솜)을 활성화시키는 자극원으로 널리 알려져 있다. Inflammasome이 세포 내에서 형성된 후에는 caspase-1의 활성화에 의해 IL-1 β 가 잘리게 되고, 잘린 IL-1 β 는 세포

밖으로 분비되어 염증반응을 유도하는 사이토카인으로 작용하게 된다. Prx2의 분비가 실제로 inflammasome 형성에 의한 것인지 확인하기 위해 caspase-1 억제제를 처리하거나 NLRP3가 결손된 마우스 유래 세포에 LPS와 ATP로 자극하였을 때, Prx2의 분비가 감소함을 관찰하였다. Prx2와 보체의 상호작용을 통한 보체 활성화에 미치는 영향을 관찰한 결과 보체 고전경로의 개시자인 C1q와 결합하고 이후 보체 활성화를 통해 C4b 및 C5b-9의 형성을 유도함을 확인하였다. 본 연구를 통하여 세포 내 항산화 단백질인 Prx2가 inflammasome 매개 기전으로 분비되고 C1q 단백질과의 결합을 통해 보체 고전경로를 활성화시킴을 제시하는 바이다.

핵심되는 말: peroxiredoxin, danger-associated molecular pattern, inflammasome, complement

인플라마솜 매개 peroxiredoxin2의 분비와

보체 고전경로 활성화

<지도교수 신 전 수>

연세대학교 의과학과

이 현 숙

I. 서 론

Peroxiredoxins (Prxs)은 과산화수소 (hydrogen peroxide)와 알킬 하이드로과산화물 (alkyl hydroperoxide)을 환원시키는 항산화 단백질이며, 세포질, 미토콘드리아, 퍼옥시좀, 소포체 등 세포 내 다양한 위치에서 발현하고 있다.¹ Prxs이 항산화 단백질로서의 역할을 수행하기 위해서는 두 개의 redox-active cysteine이 필요하다.^{2,3} 포유류에서는 6개의 동형 단백질 (isoform)이 발견되었으며, Prxs은 redox-active cysteines에 따라 두 개의 카테고리 나뉜다. Cysteine 잔기의 수에 따라 1-Cys와 2-Cys Prxs이 존재하며, 2-Cys Prx에는 ‘typical’ 과 ‘atypical’ 형이 존재한다.^{4,6} 6개의 동형 단백질 중 typical 2-Cys Prx에 속하는 Prx1, 2, 3, 4 단백질의 역할에 대한 연구가 많이

진행되어 왔다. Prx1 결손 마우스에서 증가된 DNA 손상과 Prx2 결손 마우스에서 나타난 적혈구 용혈현상이 항산화 단백질로서 Prxs의 역할을 보여준다.^{7,8}

Prxs은 세포 내에서 DNA, RNA, 단백질 손상을 유발할 수 있는 과산화수소를 환원시키는 강력한 산화제이다.⁹ 세포 내 Prxs 역할 규명에 비해 세포 밖에서 Prxs이 어떠한 역할을 하는지는 아직 잘 알려진 바가 없다. 최근에 한 그룹에 의해 허혈성 뇌 질환 모델에서 Prxs이 다량 존재하고, 분비된 Prxs이 허혈성 뇌 증후군 이후에 나타나는 염증 반응의 중요한 유도자로 작용한다는 것이 제시되었다.¹⁰ 또한 glutathionylated Prx2가 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 이합체로 분비되고, 분비된 glutathionylated Prx2는 효소활성을 갖는 이합체 형태이기 때문에 수용체의 이황화 결합을 유도하고 결과적으로 염증성 사이토카인의 분비를 유도할 수 있음을 통해 DAMP 분자로서의 역할이 제시되었다.¹¹ DAMP는 세포 내에서 내생적으로 존재해야 하며, 세포 자극에 의해 세포 밖으로 분비되어 염증반응을 유발할 수 있어야 한다.¹² 본 연구에서 Prxs 단백질이 LPS 자극뿐만 아니라 inflammasome 자극원에 의한 분비도 확인하고자 하였다. Inflammasome은 다양한 염증반응 유도 자극원을 인지하는 단백질 복합체 그룹이다. 자극원을 인지한 후, IL-1 β 와 IL-18 같은 중요한 염증성 사이토카인의 생산을 조절한다.^{13,14} IL-1 β 는 분비와 관련된 신호 서열 (signal sequence)을 갖고 있

지 않다. 대신 이러한 IL-1 β 의 활성화와 분비는 caspase-1에 의해 조절된다. Caspase-1은 IL-1 β 외에도 IL-18, IL-1 α , fibroblast growth factor-2의 분비에도 관여한다.^{15,16}

보체계 (complement system)는 미생물 감염에 대한 숙주 방어 기전으로서 알려진 대표적인 선천성 면역 기전 중의 하나이다. 패혈증은 보체를 과도하게 활성화 시키며, 이로 인해 C5a와 같은 보체계 산물을 과다 생산한다. 패혈증에서 증가된 C5a는 대식 세포로부터 TNF와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 증가시키며, 상피 세포로부터 응고 인자들을 분비해 내거나 호중구에 의한 탐식 작용을 방해하는 작용을 한다.¹⁷⁻²³ 패혈증에서 초기에 분비되는 염증성 사이토카인 중 하나인 IL-6는 C-reactive protein (CRP)를 매개로 하여 보체를 활성화 시킴으로써 패혈증에서 또 다른 기능을 하는 것으로 알려져 있다.²⁴ 보체는 고전 경로 (classical pathway), 렉틴 경로 (lectin pathway), 대체 경로 (alternative pathway)를 통해 활성화된다. 보체계의 3가지 활성화경로 중 면역 복합체를 인지하여 고전 경로 (classical pathway)를 시작하게 하는 보체 구성 성분인 C1q는 β -amyloid fibrils와 같은 자체로부터 변형된 구조, prion 단백질과 같은 병원성 형태, 세포 사멸이 일어나는 세포 (apoptotic cell)의 표면에 결합하여 보체를 활성화시킨다.²⁵⁻²⁸ C1q는 사멸 세포에 의해 노출되는 phosphatidylserine에 결합하여 탐식 세포에 의한 탐식 작용을 촉진시키는 분자로서도 역할을 한다.²⁹

위와 같이 선천 면역에서 보체는 감염에 대한 첫 번째 방어선으로서 숙주를 보호하는 역할을 수행하지만, 증가된 활성화에 의해 오히려 면역 반응을 과도하게 증가시킬 수 있다. 최근에 밝혀진 것처럼 다양한 환경에서 분비된 Prxs이 염증 반응 유도자로서 작용한다는 것을 볼 때, 어떠한 자극에 의해 분비된 Prxs이 혈중에 다량 존재하고 있는 보체와의 상호작용이 일어날 수 있음을 시사한다. 또한, 이러한 상호작용에 의해 염증 반응이 과도하게 일어나고, 염증 반응에 의해 나타나는 질병 또한 악화될 수 있음을 예상할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 DAMP로 작용한다고 알려진 Prxs의 분비가 inflammasome 매개 기전과 관련성이 있는지를 확인하고, 분비된 Prxs이 보체 활성화에 관련성이 있는지를 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

항체는 rabbit anti-Prx2 antibody (Abcam, Cambridge, UK), mouse anti-NLRP3 antibody (Adipogen, San diego, CA, USA), mouse anti-caspase-1 antibody (Adipogen), goat anti-IL-1 β antibody (R&D systems, Mineapolis, MN, USA), rabbit anti-His tag antibody (Abcam), rabbit anti- β -actin antibody (Cell signaling technology, Danvers, MA, USA), rabbit anti-GAPDH antibody (Abfrontier, Seoul, Korea)를 사용하였다. Rabbit anti-Prx1, Prx2, Prx3, Prx4, Prx5, Prx6 antibodies와 tag 펩타이드가 결합되지 않은 사람 Prx1 (hPrx1), 사람 Prx2 (hPrx2), 마우스 Prx1 (mPrx1), 마우스 Prx2 (mPrx2) 단백질은 연세대학교 의과대학 의생명과학부 이서구 교수님 연구실로부터 제공받았으며, 재조합 hPrx1 및 hPrx2 단백질은 분리 정제하여 사용하였다.

pET17b 발현 벡터 (Novagen, Darmstadt, Germany)에 C 말단에 6xHis가 tag 된 hPrx1-His와 hPrx2-His를 클로닝하였다. 발현 벡터를 *E. coli* BL21에 형질전환 시킨 뒤 ampicillin이 첨가된 LB plate에 도말하여 37°C에서 하루 밤 동안 배양하였다. 형질 전환된 집락을 ampicillin이 첨가된 LB 배지에 접종하여 37°C에서 OD₆₀₀ 0.5~0.6 정도가 되도록 배양한 후 1 mM IPTG를 이용하여 단백질 생성을 유도하였다. *E. coli* pellet을 모아 sonication을 통하여 용해시키고, Ni²⁺ resin과 섞어 4°C에서 하루 밤 동안 부착시켰다. Imidazole

을 이용해서 최저 20 mM에서 최고 200 mM의 버퍼를 만들고, 이를 통해 재조합 hPrx1-His와 hPrx2-His 단백질 (rhPrx1-His, rhPrx2-His)을 분리 정제하였다. 내독소는 Triton X-114를 이용하여 제거하였다.³⁰

2. 세포배양

마우스 대식세포 주 J774A.1 세포와 마우스 골수 유래 대식세포 (mouse bone marrow-derived macrophage, BMDM)를 사용하였다. 세포는 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum, FBS)(Gibco, Rockville, MD, USA)과 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin이 포함된 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

마우스 골수 유래 대식세포를 추출하기 위하여 마우스의 넓적 다리뼈와 정강이뼈를 분리하였다. 분리된 뼈를 양끝을 절단하고 주사기를 이용하여 골수를 세척한 후 cell strainer를 이용하여 단일 세포를 준비하였다. 적혈구 용해 용액인 ammonium-chloride-potassium 버퍼 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA)를 상온에서 5분간 반응시켜 적혈구를 제거하였다. 얻어진 단일 세포를 RPMI 1640 배지로 여러 차례 씻은 후 FBS가 10% 포함된 RPMI 1640 배지에 마우스 mGM-CSF (R&D systems)를 20 ng/ml이 되게 첨가하여 일주일간 분화시켰다. 분화되어 배양 용기 바닥에 부착한 세포를 실험에 이

용하였다.

3. Inflammasome 유도 및 Western blot 분석

Prxs 단백질의 inflammasome 매개 분비를 관찰하기 위하여 J774A.1 세포와 BMDM 세포를 FBS가 포함되지 않은 RPMI 1640 배지로 교환해 준 후 LPS (Sigma Aldrich) 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리한 후에 추가로 ATP (Sigma Aldrich)를 1.5 mM 또는 2.5 mM로 30분 처리하여 자극하였다. 또 다른 NLRP3 inflammasome 자극원인 nigericin (Sigma Aldrich)과 alum (Invivogen, San Diego, CA, USA)은 LPS 처리 후에 각각 5 μM 을 30분, 0.5 mg/ml을 6시간 처리하여 자극하였다. 이 후 세포배양액을 농축시켜 SDS-PAGE를 시행하고 nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ)에 transfer한 후 Western blot을 시행하였다.

Caspase 억제제에 의해 inflammasome 매개 Prx2의 분비가 감소하는지 확인하기 위하여 pan-caspase 억제제인 Z-VAD (R&D systems) 또는 caspase-1 억제제인 YVAD (Calbiochem, Darmstadt, Germany) 10 μM 과 함께 LPS 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리한 후에 추가로 ATP 를 2.5 mM로 30분 처리하여 자극하였다. 이 후 세포배양액을 농축시켜 Western blot을 시행하였다.

분비된 Prx2가 효소활성을 갖는 이합체 형태인지 확인하기 위해 LPS 0.063, 0.125, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리하거나 LPS 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리한

뒤 ATP 1.5 mM을 30분 동안 처리하였다. 이 후 세포배양액을 농축시켜 non-reducing condition의 SDS-PAGE를 시행하고 nitrocellulose membrane에 transfer한 후 Western blot을 시행하였다.

NLRP3 의존적인 Prx2의 분비를 확인하기 위하여 C57BL/6 야생형 마우스와 NLRP3 결손 마우스에서 추출한 BMDM에 동일하게 LPS 0.25 µg/ml을 2시간 처리한 후에 ATP를 0.5 mM 또는 1.5 mM로 30분 처리하여 자극하였다. 이 후 세포배양액을 농축시켜 Western blot을 시행하였다.

4. 효소면역항체법 (ELISA)

C1q와 Prx1, Prx2의 직접적인 결합 여부를 알아보기 위하여 효소면역항체법을 실시하였다. Microtiter plate (Corning costar, Corning, NY, USA)에 PBS에 희석한 Prx2를 1 µg/ml으로 4°C에서 16시간 동안 고정 시키고, 3% BSA (Sigma Aldrich) PBST (0.05% Tween 20이 포함된 PBS)를 상온에서 2시간 반응시켜 blocking 하였다. 재조합 C1q 단백질 (Sigma Aldrich)의 농도를 PBS에 농도 별로 희석하여 2시간 상온에서 반응 시켰다. PBST를 사용하여 세척한 후 rabbit anti-C1q antibody (Dako, Glostrup, Denmark)를 상온에서 1시간 반응시켰다. PBST로 세척한 후 peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, USA)를 상온에서 40분 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 후에 TMB 용액 (KPL,

Gaithersburg, MD, USA)으로 30분 반응시킨 뒤, 2.5 N H₂SO₄를 넣어 반응을 멈추고 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

5. Complement activation assay

C1q와 Prx2의 결합을 통한 보체의 활성화를 알아보기 위하여 microtiter plate에 PBS에 희석한 Prx2를 1 µg/ml으로 4°C에서 16시간 동안 고정 시키고, 1% BSA PBST를 상온에서 2시간 반응시켜 blocking 하였다. 사람 혈청을 Veronal buffer (Lonza, Walkersville, MD, USA)에 농도 별로 희석하여 반응시켰다. C4b 형성을 관찰하기 위하여 20분, C5b-9 형성을 관찰하기 위하여 45분 동안 상온에서 반응시킨 뒤, 차가운 PBST를 이용하여 반응을 종결시켰다. 형성된 C4b와 C5b-9을 확인하기 위하여 각각 rabbit anti-C4b antibody (Dako) 및 mouse anti-C5b-9 antibody (Quidel, San Diego, CA, USA)를 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG 또는 goat anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories)를 상온에서 40분 반응시켰다. PBST로 세척한 후 TMB 용액으로 반응시킨 뒤 위와 마찬가지로 흡광도를 측정하였다.

Prx2에 의한 보체의 활성화가 C1q 의존적인 반응인지 확인하기 위하여 실시하며, microtiter plate에 PBS에 희석한 Prx2를 1 µg/ml으로 4°C에서 16시간 동안 고정 시키고, 1% BSA PBST를 상온에서 2시간 반응시켜 blocking

하였다. C1q 결핍된 사람 혈청 (Quidel)과 여기에 C1q 단백질을 정상 수준으로 첨가한 각각의 시료를 Veronal buffer로 희석하고 45분 동안 반응시켰다. 차가운 PBST를 사용하여 혈청 반응을 종료시킨 후 보체 활성화에 의한 C5b-9 형성을 확인하였다. C5b-9에 대한 항체를 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 peroxidase가 결합된 goat anti-mouse IgG를 상온에서 40분 반응시켰다. 이후 PBST로 세척한 후에 TMB 용액으로 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다.

또한 Prx2에 의한 보체 활성화로 C5b-9이 세포 표면에 퇴적되는지 확인하고자 하였다. J774A.1 세포를 FBS가 포함되지 않은 RPMI 1640 배지로 교환해 준 뒤 사람 혈청 10%에 Prx2를 5 µg/ml 넣은 후 2시간 처리하였다. 이후 세포배양액을 제거하고 세포를 용해하여 SDS-PAGE 및 Western blot을 시행하여 mouse monoclonal anti-C5b-9 antibody (Quidel)로 검출하였다.

6. 용혈 보체 검정 (Hemolytic complement 50, CH50 assay)

사람 혈청을 Veronal buffer에 순차적으로 희석하여 항체로 감작된 면양 적혈구 (antibody sensitized sheep erythrocytes, EA)와 round bottom microtiter plate (Corning costar)에 넣은 다음 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 차가운 Veronal buffer로 반응을 중지시키고 원심분리를 통해 상층액을 flat bottom microtiter plate (Corning costar)로 옮겨 405 nm 파장에서 적혈구의 용혈 정도

를 확인하여 50% 용해 값을 갖는 혈청의 희석 농도를 정하였다.

이 값을 대조군 (50% 용해 혈청)으로 하고 Prx2를 50% 용해 혈청에 순차적인 농도로 희석하여 37°C에서 10분 동안 반응시켰다. 이 후, round bottom culture plate에 옮기고 37°C에서 30분 동안 EA와 반응시켰다. 차가운 Veronal buffer로 반응을 중지시키고 원심분리를 통해 상층액을 flat bottom microtiter plate로 옮겨 405 nm 파장에서 적혈구의 용혈 정도를 확인하였다.

Relative complement consumption (%) = $[1 - (OD_{\text{sample}} - OD_{\text{spontaneous hemolysis}}) / (OD_{\text{hemolysis by normal human serum}} - OD_{\text{spontaneous hemolysis}})] \times 100$ 으로, spontaneous hemolysis는 EA에 Veronal buffer만을 넣어줬을 때 자발적으로 일어나는 용혈현상이고, hemolysis by normal human serum은 EA에 Prx2를 넣지 않고 50% 용해 값을 갖는 혈청만을 넣어줬을 때 일어나는 용혈현상이다

7. 면역세포형광염색

LabTek2 8-wells chambers (Nunc, Roskilde, Denmark)에 J774A.1 세포를 배양한 후 세포 배양액을 FBS가 포함되지 않은 RPMI 1640 배지로 교환해준다. 10% 사람 혈청과 사람 Prx2 단백질을 1 µg/ml 또는 5 µg/ml으로 37°C에서 2시간 동안 처리하였다. 세포배양액을 제거한 후 4% paraformaldehyde (Biosesang, Seongnam, Korea)로 상온에서 30분 반응하여 세포를 고정하였다.

PBS를 이용해 세척한 후 PBS에 녹인 1% BSA로 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. Mouse anti-C3c-FITC antibody (Abcam)를 1:300으로 희석하여 상온에서 2시간 반응시킨 뒤 PBST로 세척하였다. DAPI 염색액 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 이용하여 핵을 염색한 후 FV1000 공초점 현미경 (Olympus Optical, Tokyo, Japan)을 통하여 세포 표면에 퇴적된 C3c를 관찰하였다.

III. 결 과

1. LPS 및 ATP 처리에 따른 Prxs의 분비

포유류에는 6개의 Prxs 동형 단백질이 존재한다. 이러한 Prxs은 세포 괴사에 의해 세포 밖으로 분비될 수 있다.¹⁰ 세포 괴사에 의한 수동적인 분비가 아닌 특정한 자극에 의해서도 Prxs이 분비되는지 확인하였다. 염증 반응 유발 자극원인 LPS 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리하거나 inflammasome 형성을 유도하기 위해 LPS 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리한 뒤 ATP 1.5 mM을 30분 동안 처리하였다. 세포 배양액으로 분비된 Prxs을 Western blot 방법을 통하여 확인하였다. 마우스 대식세포 주 J774A.1 세포에서는 LPS와 ATP를 통해 inflammasome을 활성화 시켰을 때 6개의 Prxs 동형 단백질 중 Prx1, 2, 5, 6이 세포 배양액으로 분비되었다(그림 1A). 마우스 BMDM 세포에서 LPS와 ATP를 통해 inflammasome을 활성화 시켰을 때 Prx1, Prx2, Prx5가 세포배양액으로 분비되었으며, Prx6의 경우도 미약하나마 분비됨이 관찰되었다(그림 1B). 양성 대조군으로 LPS와 ATP 모두를 처리하였을 때 IL-1 β 가 세포 밖으로 분비되는 것으로 보아 inflammasome 형성이 유도되었음을 확인할 수 있다.

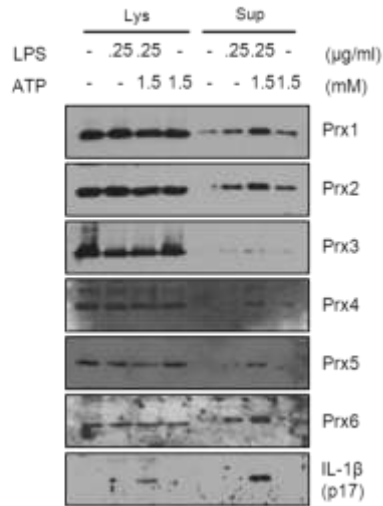
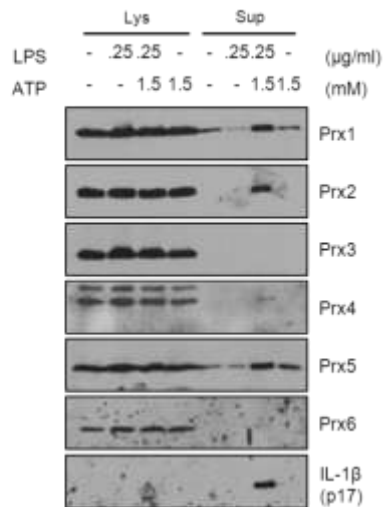
A**B**

그림 1. 면역세포에서 LPS와 ATP 자극 후 Prxs의 분비 측정. (A) J774A.1 세포와 (B) BMDM 세포에 LPS 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리하거나, LPS 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리하고 ATP 1.5 mM을 30분 처리한 후, 세포 용해물 (lysates, lys)과 세포 배양액 (supernatants, sup)을 수합해 Western blot 방법으로 Prx1, Prx2, Prx3, Prx4, Prx5, Prx6의 발현을 관찰함.

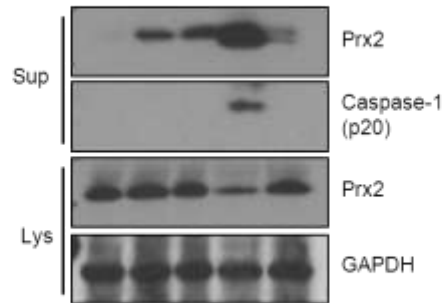
2. LPS 및 ATP, nigericin, alum 처리에 따른 Prx2의 분비

J774A.1 세포와 BMDM 세포 모두에서 다른 Prxs 동형단백질에 비해 Prx1, Prx2가 inflammasome 자극원에 의해 많은 양이 세포배양액으로 분비되었다. Prx2가 LPS 단독 자극에 의해서도 분비되는지 확인하였다. J774A.1 세포에서 Prx2는 LPS 단독 자극에 의해서도 소량 세포 배양액으로 분비되지만, inflammasome 자극원을 처리했을 때 더 많은 양이 분비되었다(그림 2A). 이를 통해, Prx2는 inflammasome 의존적 신호 전달, inflammasome 비의존적 신호 전달에 의해 분비될 수 있음을 확인하였다. 다양한 inflammasome 중, NLRP3 inflammasome은 ATP와 nigericin 등에 의한 칼륨 배출, alum과 같은 particulate에 의해 활성화 될 수 있다.^{31,32} 본 실험에서도 J774A.1 세포에 LPS 0.25 µg/ml을 2시간 처리한 후 ATP 2.5 mM 또는 nigericin 5 µM을 30분, alum 0.5 mg/ml을 6시간 추가 처리하여 Prx2의 분비를 확인하였다. 그 결과, 다양한 NLRP3 inflammasome 자극원에 의해 Prx2의 분비가 더욱 증가함을 확인하였다(그림 2B). LPS와 ATP, nigericin 혹은 alum을 처리한 경우에만 IL-1β가 세포 밖으로 분비되는 것으로 보아 inflammasome 형성에 의한 Prx2의 분비임을 확인할 수 있다. 기존에 항산화 단백질로서 알려져 있던 Prx2는 이황화 결합으로 이합체가 형성되는데, 이러한 이합체로 존재할 때 효소활성을 나타낸다.³³ Inflammasome 자극원에 의해 분비되는 Prx2가 효소활성이 있는 이합체 형태인지 확인하기 위

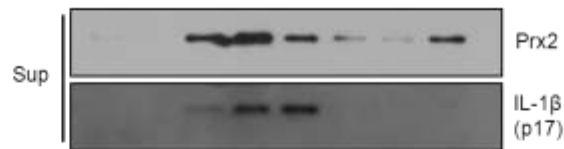
해 LPS 0.063, 0.125, 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리하거나 ATP 1.5 mM을 30분 동안 추가 처리하였다. Non-reducing condition의 SDS-PAGE에서 확인한 결과 LPS 단독 자극과 inflammasome 자극원에 의해 세포 배양액으로 분비되는 Prx2는 이합체로 관찰되었다(그림 2C). 관찰된 사이즈가 이합체 형태의 Prx2임을 확인하기 위해 dithiothreitol (DTT)를 처리한 세포 배양액도 함께 확인하였다. 강력한 환원제인 DTT를 처리한 세포 배양액에서는 Prx2의 단량체 형태만 관찰되었다.

A

LPS	-	0.25	0.5	0.25	-	($\mu\text{g/ml}$)
ATP	-	-	-	2.5	2.5	(mM)

**B**

LPS	-	0.25	0.25	0.25	0.25	-	-	-	($\mu\text{g/ml}$)
ATP	-	-	2.5	-	-	2.5	-	-	(mM)
Nigericin	-	-	-	5	-	-	5	-	(μM)
Alum	-	-	-	-	0.5	-	-	0.5	(mg/ml)

**C**

							+DTT						
LPS	-	63	125	250	250	-	-	63	125	250	250	-	(ng/ml)
ATP	-	-	-	-	1.5	1.5	-	-	-	-	1.5	1.5	(mM)

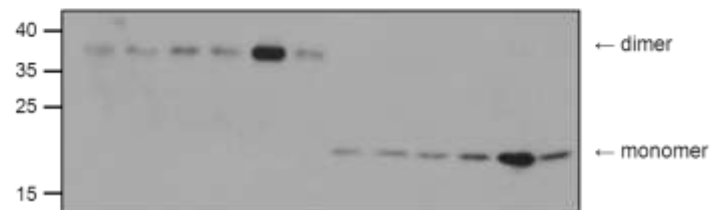


그림 2. 면역세포에서 LPS와 ATP, nigericin, alum 자극 후 Prx2 분비 측정.
(A) J774A.1 세포에 LPS를 2시간 처리하고 ATP를 30분 추가 처리한 후 세포 용해물 (lys)과 세포 배양액 (sup)을 수합해 Western blot 방법을 이용하여 Prx2를 확인함. (B) J774A.1 세포에 LPS를 2시간 처리하고 ATP, nigericin 또는 alum을 각각 30분, 30분, 6시간 추가 처리한 후 세포 배양액을 수합해 Western blot 방법으로 Prx2 분비를 관찰함. (C) J774A.1 세포에 LPS 2시간 처리하고 ATP 30분 추가 처리한 후 세포 배양액의 1/2은 dithiothreitol (DTT)을 37°C에서 30분 동안 반응시킨 뒤 non-reducing condition에서 Prx2의 발현을 Western blot으로 관찰함.

3. Caspase-1 의존적인 Prx2의 분비

Prx2가 inflammasome 자극원에 의해서 세포 밖으로 분비되는 것을 확인하였다. 이러한 Prx2의 분비가 inflammasome 형성 과정 중에 활성화되는 caspase-1 의존적인 반응인지 확인하기 위해서 J774A.1 세포에 pan-caspase 억제제인 Z-VAD 10 μ M과 LPS 0.25 μ g/ml을 함께 2시간 처리한 뒤 ATP 2.5 mM을 30분 동안 추가 처리하였다. 그 결과, inflammasome 자극원에 의해 분비되던 Prx2가 pan-caspase 억제제인 Z-VAD에 의해 분비가 감소하는 것을 관찰하였다(그림 3A). Z-VAD는 caspase-1 뿐만 아니라 세포 죽음과 관련된 caspase-3, caspase-7, caspase-9 등도 억제하므로 caspase-1에 의한 특이 반응임을 확인하기 위해 caspase-1 특이 억제제인 YVAD 10 μ M과 LPS 0.25 μ g/ml을 함께 위와 같이 처리하였다. Z-VAD와 동일하게 YVAD 역시 inflammasome 자극원에 의한 Prx2의 분비를 억제하였다(그림 3B). Caspase-1과 IL-1 β 의 분비도 Z-VAD 또는 Y-VAD로 처리한 경우 억제되는 것으로 보아 효과적으로 inflammasome 형성이 억제됨을 확인할 수 있다.

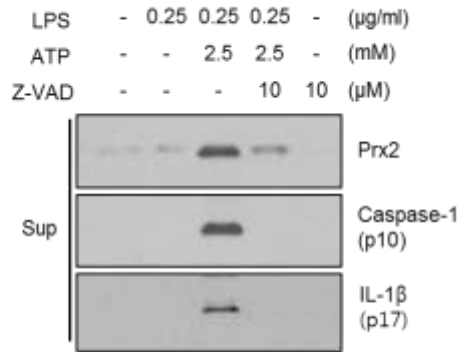
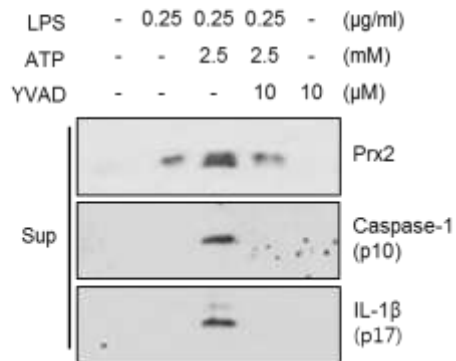
A**B**

그림 3. Inflammasome 매개 Prx2의 분비에서 caspase-1 억제 효과 측정. J774A.1 세포에 Z-VAD 10 μM (A) 혹은 YVAD 10 μM (B)과 LPS를 2시간 처리하고 ATP를 추가로 30분 처리한 후 세포 배양액으로 분비된 Prx2를 Western blot으로 관찰함.

4. NLRP3 의존적인 Prx2의 분비

Prx2의 분비가 NLRP3 의존적인 반응인지 확인하기 위하여, C57BL/6 야생형 마우스와 NLRP3 결손 마우스에서 추출한 BMDM을 이용하였다. 동일하게 inflammasome 형성을 유도하기 위해서 LPS 0.25 $\mu\text{g/ml}$ 을 2시간 처리한 뒤 ATP 1.5 mM을 30분 추가 처리하였을 때, 야생형 마우스 BMDM에서는 분비되던 Prx2가 NLRP3 결손 마우스 BMDM에서는 분비되지 않았다(그림 4). 이를 통해, Prx2의 분비는 NLRP3 의존적인 반응임을 확인하였다. NLRP3 결손 마우스 BMDM에서는 잘린 IL-1 β 및 NLRP3 모두 inflammasome 형성 조건에서 분비되지 않았다.³⁴

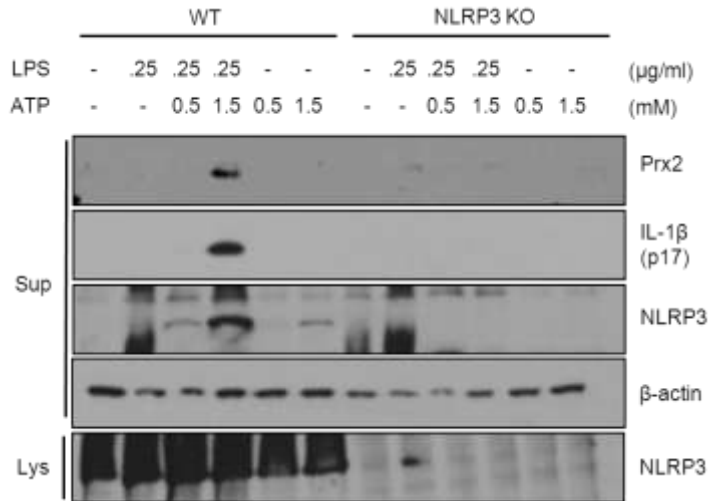


그림 4. NLRP3 결손 마우스 BMDM 세포에서 Prx2의 분비 측정. 야생형 마우스와 NLRP3가 결손 된 마우스의 BMDM 세포를 mGM-CSF 20 ng/ml 로 처리해 분화시킨 후 LPS를 2시간 처리하고 ATP를 30분 추가 처리한 후 세포 배양액 내 Prx2 분비를 관찰함.

5. Prx1과 Prx2 단백질 제조

혈청 내에 다량 존재하는 보체는 선천 면역에서 첫 번째 방어선으로서 중요한 역할을 수행하지만, 활성화된 보체는 과도한 염증반응을 일으켜 자가면역질환을 유발하기도 한다. 실제 *in vivo* 내에서는 세포 밖으로 분비된 Prx2가 혈청 내에 존재하는 보체와 상호작용을 할 수 있다는 가능성에 초점을 두고 두 단백질 간의 상호작용을 확인하기 위해서 재조합 단백질을 제조하였다. 먼저 Prx1-His, Prx2-His 재조합 단백질 발현을 위한 DNA construct를 제작하였다. 박테리아 대량 배양을 통해 Prx1-His, Prx2-His 단백질을 얻고, Ni²⁺ resin을 이용한 affinity column을 통해 정제하였다. 정제된 단백질은 Coomassie blue 염색 방법을 통해 순도를 확인하였다(그림 5A). 또한, anti-His 항체를 이용하여 정제된 단백질을 확인하였다(그림 5B). 정제된 Prxs가 효소활성이 있는 이합체로 존재하는지 확인하기 위하여 non-reducing condition의 SDS-PAGE gel에서 확인한 결과, Prx1과 Prx2 모두 이합체로 존재함을 확인하였다. 또한, 정제된 Prx1은 Prx2에 비해 oligomeric form이 더 잘 형성되었다(그림 5C). Prx1은 다른 동형 단백질들에 비해 쉽게 과산화되는 경향이 있기 때문에 좀 더 안정된 형태의 oligomeric 구조를 이룰 수 있다. 이러한 특징이 Prx1이 Prx2보다 샤페론으로서의 역할을 수행하는데 더 유리함을 보여준다.³⁵

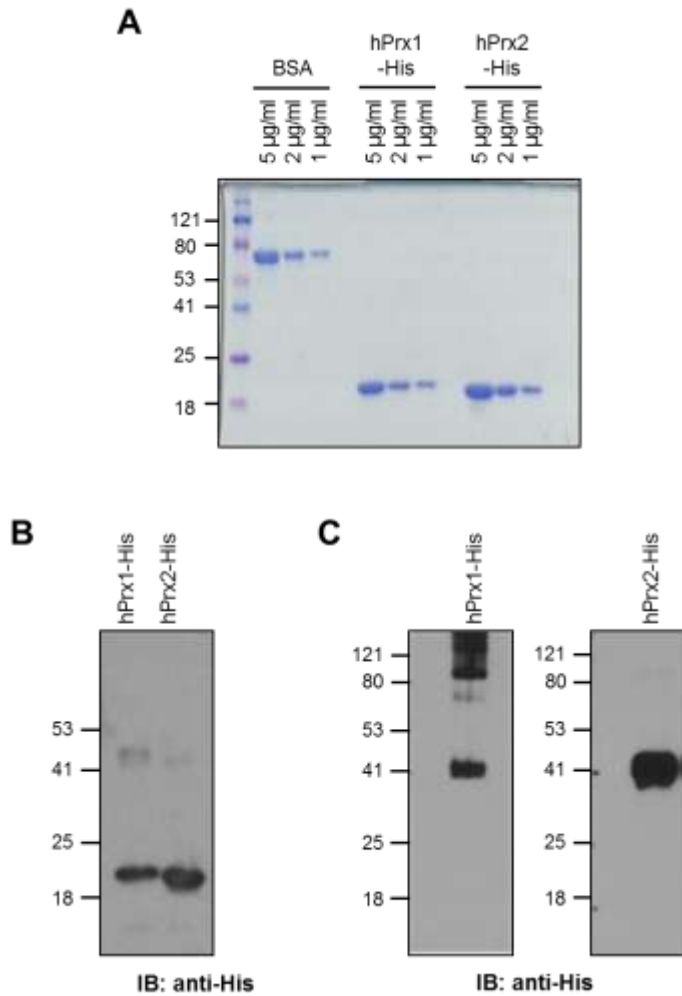


그림 5. 정제된 Prx1과 Prx2 단백질 확인. (A) Coomassie blue 염색을 통해 정제된 사람 Prx1 (hPrx1), 사람 Prx2 (hPrx2) 단백질을 확인함. (B) anti-His antibody를 통해 정제된 hPrx1, hPrx2 단백질을 Western blot 방법을 이용하여 확인함. (C) anti-His antibody를 통해 정제된 hPrx1, hPrx2 단백질의 이합체를 non-reducing condition에서 확인함.

6. Prx1, Prx2와 C1q의 결합

mPrx1 및 mPrx2, hPrx1 및 hPrx2 단백질에 대한 C1q 결합을 알아보기로 각 Prx 단백질 1 $\mu\text{g/ml}$ 을 ELISA plate에 밤새 부착시킨 후, C1q 단백질을 농도 별로 상온에서 반응시켰다. C1q에 대한 1차 항체와 peroxidase가 결합된 2차 항체를 이용해 결합여부를 관찰한 결과 mPrx1, mPrx2와 hPrx1, hPrx2 모두 C1q의 농도가 높아짐에 따라 결합력이 증가하였다(그림 6A-D). 또한 Prx2 단백질이 Prx1에 비해 C1q와의 결합이 더 강함을 알 수 있었다(그림 6B 및 D).

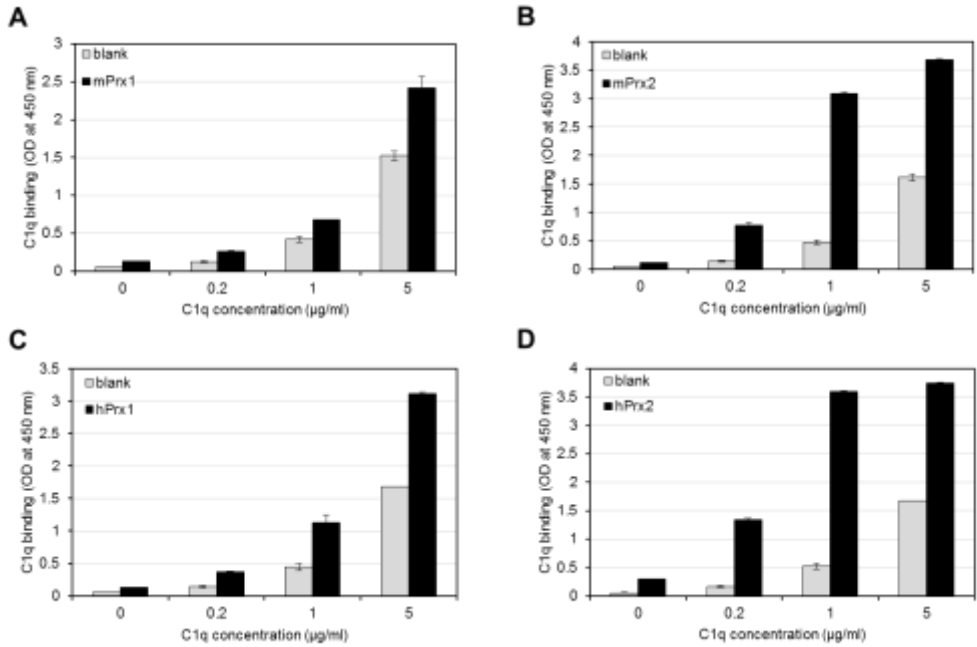


그림 6. Prx1, Prx2와 C1q의 결합 확인. mPrx1 (A) 및 mPrx2 (B), hPrx1 (C) 및 hPrx2 (D) 각각 1 µg/ml 농도로 ELISA plate에 밤새 부착시킨 후 다양한 농도의 C1q를 상온에서 2시간 반응시키고 그 결합을 ELISA 방법으로 확인함.

7. Prx1, Prx2와 C1q의 결합에 따른 보체의 활성화

C1q와 Prx1, Prx2의 물리적인 결합이 보체의 활성화를 유도하는지 확인하기 위하여 보체 활성화 과정 중에 형성되는 C4b, 그리고 보체 활성화의 최종 산물인 C5b-9의 형성을 확인하였다. mPrx1, mPrx2, hPrx1, hPrx2 단백질을 각각 ELISA plate에 고정하고 정상 사람 혈청을 넣어 반응시킨 결과 C4b 생성이 관찰되었고 Prx1에 비해 Prx2에 의해 C4b의 형성이 더 잘 일어남을 관찰할 수 있었다(그림 7A). 마찬가지로 보체 활성화로 인한 membrane attack complex인 C5b-9 형성을 관찰한 결과 위와 유사하게 나타났다(그림 7B). C1q와 Prxs의 결합을 통한 보체의 활성화가 C1q 의존적인 반응인지 확인하기 위하여 C1q가 결핍된 혈청과 이러한 혈청에 정상수준의 C1q를 넣어준 혈청 각각을 이용하여 hPrx2와 반응시킨 뒤, 형성되는 C5b-9을 관찰하였다. 그 결과, C1q가 결핍된 혈청을 이용한 경우에는 C1q가 있는 혈청에 비해 C5b-9의 형성이 크게 감소되었으며 C1q의 첨가에 의해서 어느 정도 회복되는 것을 관찰할 수 있었다(그림 7C).

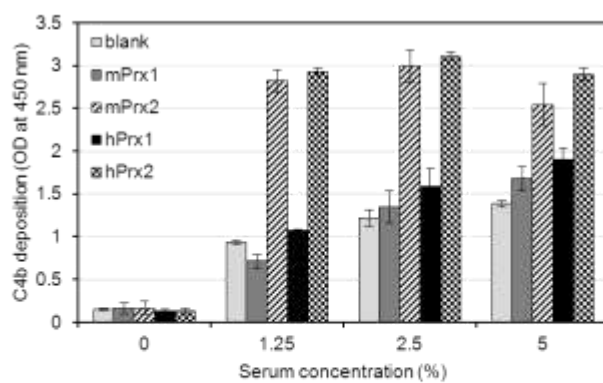
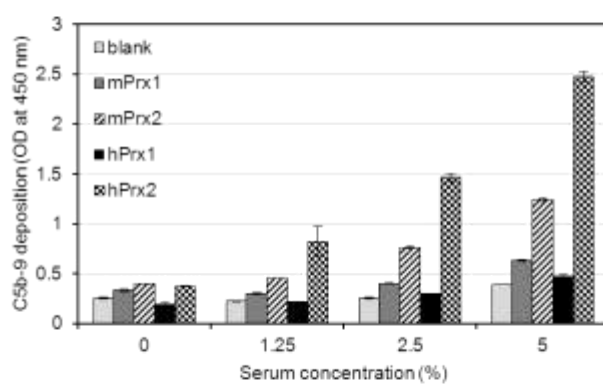
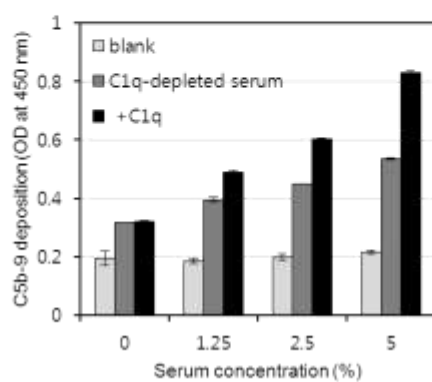
A**B****C**

그림 7. Prx1, Prx2와 C1q의 결합에 따른 C4b 및 C5b-9의 형성. (A 및 B) mPrx1, mPrx2, hPrx1, hPrx2 단백질을 각각 1 µg/ml 농도로 ELISA plate에 밤새 부착시킨 후 다양한 농도의 정상인 혈청을 반응시킴. C4b를 관찰하기 위해서는 상온에서 20분, C5b-9을 관찰하기 위해서는 상온에서 45분 동안 반응시키고 ELISA 방법으로 확인함. (C) hPrx2를 1 µg/ml 농도로 ELISA plate에 밤새 부착시킨 후 C1q가 결핍된 사람 혈청 (C1q-depleted serum)과 여기에 C1q 단백질을 넣어 준 혈청을 다양한 농도로 상온에서 45분 동안 반응시키고 C5b-9 형성을 ELISA 방법으로 확인함.

8. 용혈 보체 검정

Prx1, Prx2 단백질이 C1q와 결합하여 보체를 활성화함을 관찰하였다. 실제로 보체가 활성화 되어 기능적인 역할을 하는 지를 확인하기 위해 용혈 보체 검정을 시행하였다. 먼저 다양한 농도의 사람 혈청을 항체로 감작된 적혈구 (EA)와 반응시켜 50% 용혈이 일어나는 사람 혈청의 반응 농도를 1/35로 정하였다. 희석된 혈청을 hPrx2 단백질과 미리 반응시킨 뒤 EA를 넣어 추가로 반응시켰다. 적혈구의 용혈 정도를 측정하여 보체의 소비 정도로 환산한 결과, hPrx2에 의해 농도 의존적으로 소비된 보체의 양이 증가하였다(그림 8). 이 실험을 통해 hPrx2는 inflammasome 조건에서 분비되어 혈중의 C1q와 결합하고 기능적으로 보체를 활성화하여 염증 반응을 유발 시킬 수 있음을 제시하였다.

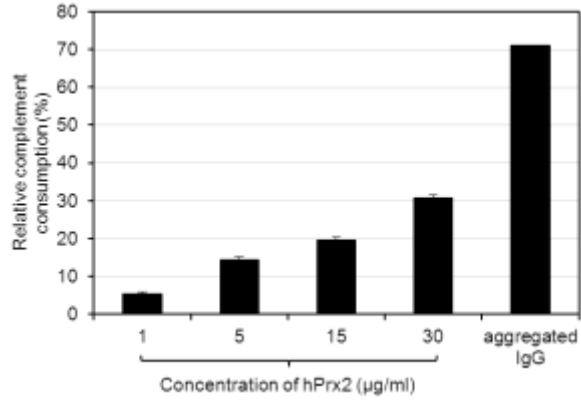


그림 8. 용혈 보체 검정. 다양한 농도의 hPrx2 단백질을 50% 용해 사람 혈청과 37°C에서 30분 배양한 후 EA (2×10^7 cells/well)를 넣고 다시 37°C에서 30분 추가 배양하여 용해되는 정도를 관찰함. 양성대조군으로 65°C에서 30분 동안 반응시킨 aggregated human IgG를 이용함.

9. Prx2에 의해 증가된 C3c의 형성

Prx2와 C1q의 결합을 통해 C4b와 C5b-9이 형성되고, 이러한 보체의 활성화는 보체의 기능적인 활성화 또한 갖고 있음을 확인하였다. Prx2에 의해 활성화된 보체 구성 성분들이 실제 세포 표면에 퇴적되는지 확인하는 실험을 진행하였다. J774A.1 세포에 10% 사람 혈청을 2시간 처리한 경우, 대조군에 비해 7.3배의 C3c가 세포 표면에 퇴적됨을 공초점 현미경을 통해 확인하였다. 이 때 10% 사람 혈청과 hPrx2-His를 1, 5 $\mu\text{g/ml}$ 을 함께 2시간 동안 처리하면 각각 9.1배, 15.3배의 C3c가 퇴적되었다(그림 9A). 즉, C3c의 퇴적은 hPrx2-His의 처리 농도 의존적으로 증가하였다. 세포에 퇴적된 C3c 정도를 형광 강도로 환산하여 그래프로 나타내었다(그림 9B).

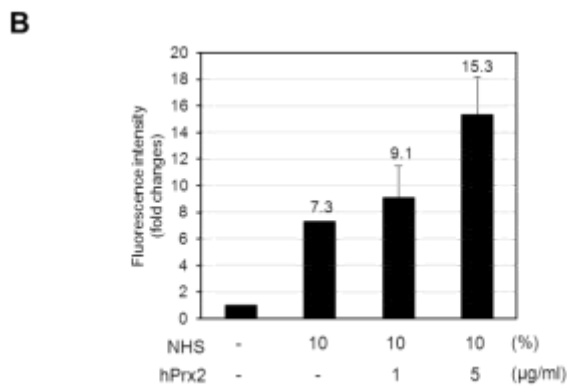
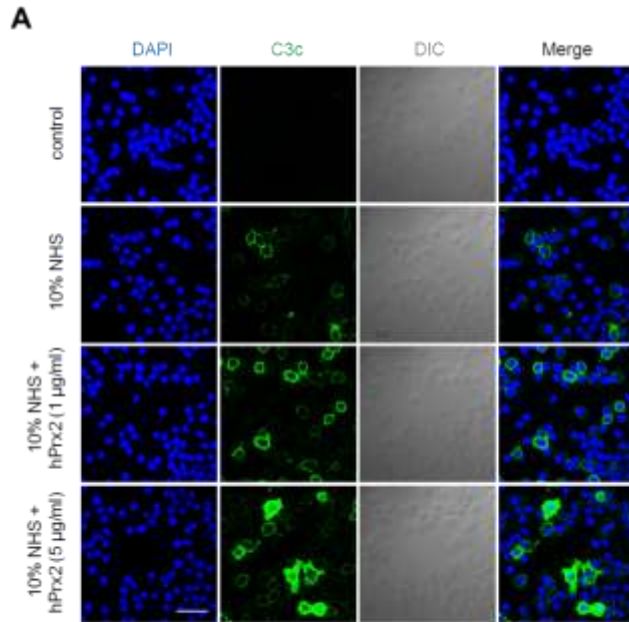


그림 9. 면역세포에서 Prx2에 의해 증가된 C3c의 형성. (A) J774A.1 세포에 사람 혈청 10%를 2시간 처리하거나 hPrx2-His 1, 5 µg/ml과 함께 2시간 동안 처리함. 세포를 고정한 뒤 anti-C3c FITC antibody를 반응시키고 공초점 현미경을 이용해 관찰함. 핵은 DAPI로 염색함. Scale bar는 50 µM. (B) 공초점 현미경으로 관찰한 뒤, FITC의 강도를 Image J 프로그램을 이용해 수치로 환산하여 그래프로 나타냄.

10. Prx2에 의해 증가된 C5b-9의 형성

보체 활성화의 최종 산물인 C5b-9 역시 hPrx2-His에 의해 세포 표면에 퇴적될 수 있는지 확인하는 실험을 진행하였다. J774A.1 세포에 사람 혈청을 다양한 농도, 시간으로 처리하였을 때, 농도 의존적으로 C5b-9의 형성이 증가됨을 확인하였다(그림 10A). 사람 혈청의 낮은 농도에서는 시간 의존적으로 C5b-9의 형성이 증가하지 않았다. 일반적으로 세포들은 보체의 과도한 활성을 억제하는 다양한 요소들을 갖고 있다. 면역세포 역시 CD59라는 C5b-9의 형성을 억제하는 단백질을 세포 표면에 갖고 있다. 이러한 요소들에 의해 적은 농도의 사람 혈청을 처리하였을 때는 시간 의존적으로 C5b-9의 형성이 증가되지 않았음을 예상할 수 있다. 10%의 사람 혈청을 2시간 처리하였을 때, C5b-9이 세포 표면에 형성되었고, hPrx2-His를 5 µg/ml으로 사람 혈청과 함께 2시간 동안 처리하였을 때는 C5b-9의 형성이 크게 증가하였다(그림 10B). 하지만 hPrx1-His를 5 µg/ml으로 사람 혈청과 함께 처리한 경우는 사람 혈청만을 처리한 경우와 유사한 정도의 C5b-9이 형성되었다(그림 10C). 이를 통해, Prx1에 비해 Prx2에 의한 보체의 활성화 효과가 더 큰 것을 확인하였다.

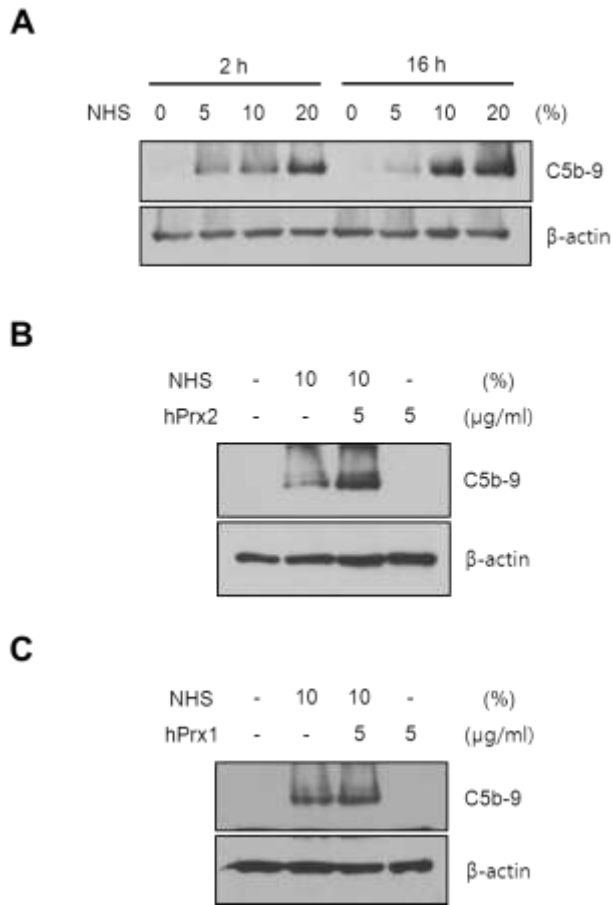


그림 10. 면역세포에서 Prx2에 의해 증가된 C5b-9의 형성. (A) J774A.1 세포에 사람 혈청을 5, 10, 20% 농도로 각각 2시간, 16시간 처리한 후, 세포 용해물을 수합해 western blot 방법을 이용하여 C5b-9의 발현을 확인함. J774A.1 세포에 사람 혈청 10%를 처리하거나 (B) hPrx2-His 5 μg/ml 또는 (C) hPrx1-His 5 μg/ml과 함께 2시간 처리한 후, 세포 용해물을 수합해 western blot 방법을 이용하여 C5b-9의 발현을 확인함.

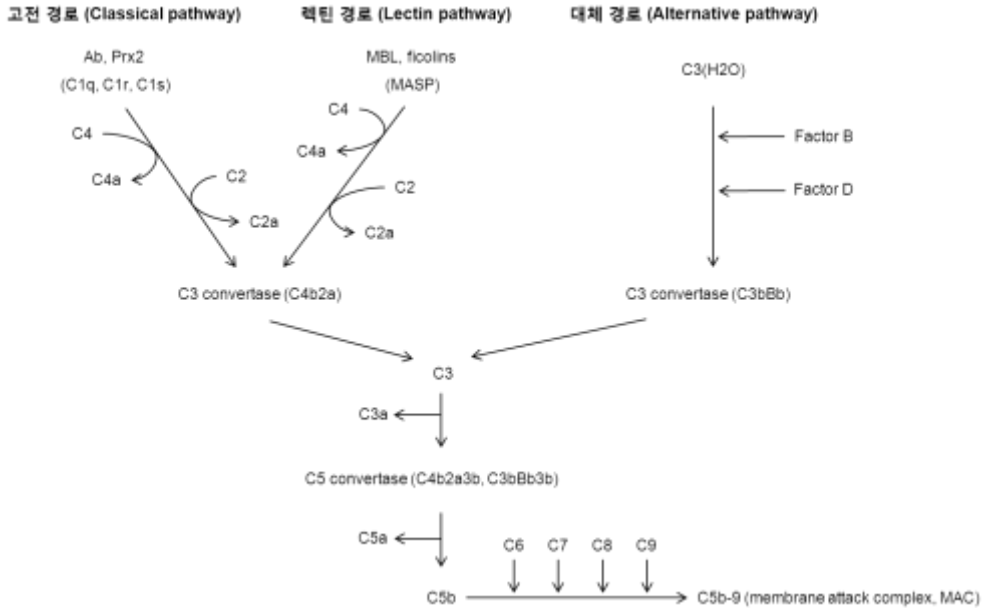


그림 11. 보체 활성화 경로. 보체는 고전경로, 렉틴경로, 대체경로를 통해 활성화된다. 고전경로는 항원-항체 복합체를 인지한 C1q, 렉틴경로는 만노오스 결합 렉틴 (mannose binding lectin, MBL), 대체 경로는 가수분해된 C3에 의해 시작된다. 이후 차례로 C3 convertase와 C5 convertase를 형성하고, 최종적으로 표적 세포 표면에 C5b-9 (membrane attack complex, MAC)을 형성하여 세포를 용해시킨다. 본 연구를 통해 Prx2와 C1q의 결합을 통한 보체 고전경로 활성화를 제시하였다.

IV. 고찰

본 연구에서 다양한 Prxs 단백질이 LPS 자극에 비해 LPS와 ATP 자극원을 통해 inflammasome 형성을 유도하였을 때 보다 많은 양이 분비됨을 확인하였다(그림 1). 포유류에서 Prxs은 6개의 동형 단백질이 존재한다. Prx1, Prx2, Prx5, Prx6는 주로 세포질에 존재하며, Prx3는 미토콘드리아 표적 서열 (mitochondrial targeting sequence)을 갖고 있어서 미토콘드리아에 위치한다.³⁶ Prx4는 대부분이 골지체에 존재한다.³⁷ 6개 동형 단백질의 세포 내 위치에 따라 분비되는 양상이 다름을 확인하였다. 세포질에 존재한다고 알려진 Prx1, 2, 5, 6의 경우에는 inflammasome 자극원에 의해 많은 양이 분비되었지만, 상대적으로 Prx3와 Prx4의 경우에는 적은 양이 분비됨을 확인하였다. Inflammasome 형성에 중요한 caspase-1을 억제시켰을 경우 Prx2의 분비가 확연하게 감소한 것으로 보아 Prx2의 분비는 inflammasome 의존적인 분비와 관련이 있음을 알 수 있었다. 하지만 과도한 LPS 자극은 그 자체만으로 inflammasome 형성을 유도하여 caspase-1을 활성화 시킬 수 있다.³⁸ 실제로 다른 연구를 통해 LPS 단독 자극에 의한 Prx2의 분비가 보고되었다.¹¹ 따라서 inflammasome 비의존적인 반응이 있는지 혹은 과도한 자극에 의한 inflammasome 매개 반응인지는 좀 더 추가적인 연구가 필요하다. Inflammasome이 형성되면 caspase-1이 활성화되고, 활성화된 caspase-1에 의해 잘린 성숙 IL-1 β 가 세포 밖으로 분비된다. 이렇듯 caspase-1은 자

신의 기질이 되는 단백질을 자르거나 그 단백질의 분비를 조절한다.¹⁶ 따라서 caspase-1이 단순히 Prx2의 분비만을 조절하는지 실제 Prx2를 기질로 인식해 Prx2를 자를 가능성이 있는지는 확인이 필요하며 현재 활성을 가진 caspase-1 단백질과 Prx2 단백질을 반응시켜 잘린 형태의 Prx2가 형성되는지 확인하는 실험은 진행 중에 있다. Prx2는 항산화 단백질로서의 효소활성을 가지며 항산화 작용을 통해 동종이합체 (homodimer)로 존재한다.³⁹ LPS 자극에 의해 분비된 Prx2 역시 동종이합체로 존재하며, Prx의 기질로 작용하는 thioredoxin도 함께 분비된다.¹¹ Inflammasome 자극원에 의해 분비된 Prx2 역시 효소활성이 있는 이합체 형태로 존재함을 확인하였다 (그림 2C).

흥미롭게도 Prxs은 염증 반응과 관련하여 양면성을 갖는다. Prxs은 세포 내에서 존재하면서 활성 산소를 제거하거나 활성 산소가 매개하는 신호 전달을 억제하는 역할을 한다. 이러한 Prxs의 역할은 LPS의 자극에서도 확인할 수 있다. LPS 자극은 세포 내에서 활성 산소를 증가시키고 이를 통해 NF- κ B 신호 전달을 유도한다. LPS 자극에 의해 세포 내의 활성 산소가 증가하면 세포 내에 존재하던 Prxs은 활성 산소를 제거함으로써 NF- κ B 신호 전달 억제를 통해 결과적으로 염증성 사이토카인의 분비를 억제하지만, LPS 자극에 의해 분비된 Prxs는 세포 밖에서 DAMP로 작용하여 반대로 염증성 사이토카인의 분비를 유도할 수 있다.^{11,40} LPS 자극에 의해

세포 내에서 활성 산소를 제거하는 Prxs과 LPS 자극에 의해 세포 밖으로 분비되어 DAMP로서 작용을 Prxs 사이에 구조적 또는 기능적 차이가 있음을 예상할 수 있다.

DAMP로 잘 알려져 있는 HMGB1은 핵 내에 존재하는 단백질로 뉴클레오솜을 안정화시키고 핵 내에서 다양한 유전자의 발현을 조절하는 전사인자로 기능하지만, 자극에 의해 분비된 HMGB1은 염증반응을 더욱 악화시킨다.⁴¹⁻⁴³ Prxs 역시 세포 내에서는 항산화 단백질로서 활성 산소를 제거하는 역할을 수행하지만 허혈성 뇌 증후군에서 분비된 Prxs은 IL-23의 유도를 통해 염증반응을 더욱 악화시킨다.¹⁰ 또한, HMGB1은 대식세포나 수지상세포에 주로 발현하는 TLR4에 직접적인 결합을 통해 염증성 사이토카인의 분비를 유도하는데, Prxs 역시 HMGB1과 유사하게 TLR4에 결합하여 TNF- α 와 IL-6의 분비를 유도한다.^{44,45} 이렇듯 대표적 DAMP인 HMGB1과 Prxs의 유사성이 많이 밝혀지면서 Prxs이 새로운 DAMP로서 대두되고 있다. 다양한 세포 내 위치에서 풍부하게 존재하는 Prxs의 특징 역시 DAMP로서 작용할 수 있음을 보여준다.

C1q는 본래 항체와의 결합을 통해 보체를 활성화 시키지만, C-reactive protein, apoptotic 세포, β -amyloid fibrils와 prion과 같은 것들도 인식함으로써 항체 비의존적인 방어 단백질로서의 역할도 수행한다.²⁵⁻²⁸ 이러한 보고들에 근거하여 Prx와 C1q의 결합을 확인한 결과, Prx2가 Prx1에 비해 C1q와

강하게 결합하는 것을 확인하였다(그림 6). 또한 이러한 결합을 통해 활성화되는 보체의 구성 성분 역시 Prx2의 경우에서 더 많이 활성화되었다(그림 7A 및 B). Prx2에 의한 보체의 활성화가 C1q 의존적인 반응인지 확인하기 위해 C1q가 결핍된 사람 혈청을 이용하여 실험을 진행하였다. 보체 활성화의 최종 산물인 C5b-9을 확인해 본 결과, C1q가 결핍된 사람 혈청을 이용한 경우 C5b-9의 형성이 뚜렷하게 감소하는 양상은 확인할 수 있었다(그림 7C).

항산화 단백질로서 효소활성을 갖는 Prx은 동종이합체 형태로 존재하기 때문에 이황화 결합을 이루게 하는 cysteine이 중요한 아미노산으로서 기능하지만, 샤페론으로서 기능하는 Prx은 이황화 결합이 없는 다합체 형태이다.⁴⁶ 따라서 보체 활성화 실험에 사용했던 분리 정제된 Prx2 단백질의 이합체 형태가 이황화 결합을 이룬 상태인지 이황화 결합을 이루지 않은 채로 샤페론으로서의 기능만을 갖고 있는지 확인하는 실험이 필요하다.

실제 면역 세포에서도 Prx2에 의해 활성화된 보체의 구성 성분이 세포 표면에 퇴적되는지 관찰하는 실험을 진행하였다. Prx2의 농도 의존적으로 C3c와 C5b-9의 퇴적이 증가함을 확인하였다(그림 9 및 10B). C5b-9의 퇴적을 확인하는 실험에서, 적은 농도의 사람 혈청을 처리하였을 때는 시간 의존적으로 C5b-9의 형성이 증가되지 않는 것이 관찰되었는데 이는 면역 세포가 본래 갖고 있는 다양한 보체 활성화 억제 분자들에 의한 효과라고

예상할 수 있다. CD55 (decay-accelerating factor)는 C3 convertase의 형성을 조절하고, CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis)는 C5b-9의 형성을 제한하는 보체 조절 단백질(complement regulatory protein)이다.⁴⁷ 이러한 단백질은 세포 내에 존재하며 과도한 보체의 활성화를 막음으로써 염증 반응을 조절한다. 적은 농도의 사람 혈청을 처리하였을 경우에는 보체 조절 단백질에 의한 효과로 처리 시간이 증가하여도 C5b-9의 형성이 크게 증가하지 않았다. 하지만 사람 혈청을 높은 농도로 처리하였을 경우에는 보체 조절 단백질의 효과보다 활성화되는 보체의 양이 많아서 C5b-9의 형성이 시간 의존적으로 나타남을 확인하였다(그림 10A).

따라서 본 연구에서는 새로운 DAMP로 제시되는 Prxs이 inflammasome 상태에서 세포 밖으로 분비될 수 있으며, 이렇게 분비된 후에는 혈청 내에 존재하는 보체와의 상호작용을 통해 보체 활성화를 유도할 수 있음을 새롭게 제시하는 바이다.

V. 결론

Prxs은 세포 내에서 활성 산소를 제거하거나 활성 산소에 의한 신호 전달을 억제하는 역할을 한다. 포유류에서는 6개의 Prxs 동형 단백질이 알려져 있으며, 각각의 Prxs은 세포 내 다양한 위치에 존재한다. 본 연구에서는, 기존에 알려진 세포 피사에 의한 Prxs의 분비가 inflammasome 자극원에 의해서도 분비될 수 있음을 확인하였다. Inflammasome 형성을 유도했을 때 6개의 Prxs 동형단백질 중 세포질에 존재한다고 알려진 Prx1, 2, 5, 6가 분비되었고, 각각 미토콘드리아와 골지체에 존재한다고 알려진 Prx3와 Prx4는 비교적 적은 양 분비되었다. 특히 Prx2는 caspase-1과 NLRP3 의존적으로 분비되었다. 또한, 염증 반응이 유발되었을 때 분비된 Prx2가 C1q와 결합함을 확인하였다. 이러한 상호작용을 통해 Prx2는 보체의 고전 경로를 활성화시켰다. 본 연구를 통해 염증 반응 상황에서의 Prx2 분비와 분비된 Prx2에 의한 보체의 고전경로 활성화 기전을 규명하였다.

참고문헌

1. Cox AG, Winterbourn CC, Hampton MB. Mitochondrial peroxiredoxin involvement in antioxidant defence and redox signalling. *Biochem J* 2010;425:313-25.
2. Wood ZA, Schroder E, Robin Harris J, Poole LB. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends Biochem Sci* 2003;28:32-40.
3. Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:7017-21.
4. Hofmann B, Hecht HJ, Flohe L. Peroxiredoxins. *Biol Chem* 2002;383:347-64.
5. Ellis HR, Poole LB. Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase. *Biochemistry* 1997;36:15013-8.
6. Choi HJ, Kang SW, Yang CH, Rhee SG, Ryu SE. Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nat Struct Biol* 1998;5:400-6.
7. Neumann CA, Krause DS, Carman CV, Das S, Dubey DP, Abraham JL, et al. Essential role for the peroxiredoxin Prdx1 in erythrocyte antioxidant defence and tumour suppression. *Nature* 2003;424:561-5.

8. Lee TH, Kim SU, Yu SL, Kim SH, Park DS, Moon HB, et al. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood* 2003;101:5033-8.
9. Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2009;8:697-701.
10. Shichita T, Hasegawa E, Kimura A, Morita R, Sakaguchi R, Takada I, et al. Peroxiredoxin family proteins are key initiators of post-ischemic inflammation in the brain. *Nat Med* 2012;18:911-7.
11. Salzano S, Checconi P, Hanschmann EM, Lillig CH, Bowler LD, Chan P, et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:12157-62.
12. Rubartelli A, Lotze MT. Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* 2007;28:429-36.
13. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* 2010;140:821-32.
14. Davis BK, Wen H, Ting JP. The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu Rev Immunol* 2011;29:707-35.
15. Cerretti DP, Kozlosky CJ, Mosley B, Nelson N, Van Ness K, Greenstreet TA, et al. Molecular cloning of the interleukin-1 beta converting enzyme. *Science* 1992;256:97-100.
16. Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. Active caspase-1 is a regulator of

- unconventional protein secretion. *Cell* 2008;132:818-31.
17. Riedemann NC, Guo RF, Ward PA. Novel strategies for the treatment of sepsis. *Nat Med* 2003;9:517-24.
 18. 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.
 19. 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.
 20. Carson SD, Johnson DR. Consecutive enzyme cascades: complement activation at the cell surface triggers increased tissue factor activity. *Blood* 1990;76:361-7.
 21. Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood* 2003;101:3765-77.
 22. Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Schmiege 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.
 23. 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.
 24. 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.
25. Tacnet-Delorme P, Chevallier S, Arlaud GJ. Beta-amyloid fibrils activate the C1 complex of complement under physiological conditions: evidence for a binding site for A beta on the C1q globular regions. *J Immunol* 2001;167:6374-81.
 26. Blanquet-Grossard F, Thielens NM, Vendrely C, Jamin M, Arlaud GJ. Complement protein C1q recognizes a conformationally modified form of the prion protein. *Biochemistry* 2005;44:4349-56.
 27. Klein MA, Kaeser PS, Schwarz P, Weyd H, Xenarios I, Zinkernagel RM, et al. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nat Med* 2001;7:488-92.
 28. Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J Immunol* 1997;158:4525-8.
 29. Elward K, Griffiths M, Mizuno M, Harris CL, Neal JW, Morgan BP, et al. CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J Biol Chem* 2005;280:36342-54.
 30. Liu S, Tobias R, McClure S, Styba G, Shi Q, Jackowski G. Removal of endotoxin from recombinant protein preparations. *Clin Biochem* 1997;30:455-63.
 31. Pelegrin P, Surprenant A. Pannexin-1 couples to maitotoxin- and nigericin-induced interleukin-1beta release through a dye uptake-independent pathway.

- J Biol Chem 2007;282:2386-94.
32. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 2008;9:847-56.
 33. Schroder E, Littlechild JA, Lebedev AA, Errington N, Vagin AA, Isupov MN. Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution. *Structure* 2000;8:605-15.
 34. Baroja-Mazo A, Martin-Sanchez F, Gomez AI, Martinez CM, Amores-Iniesta J, Compan V, et al. The NLRP3 inflammasome is released as a particulate danger signal that amplifies the inflammatory response. *2014;15:738-48.*
 35. Lee W, Choi KS, Riddell J, Ip C, Ghosh D, Park JH, et al. Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2. *J Biol Chem* 2007;282:22011-22.
 36. Rhee SG, Chae HZ, Kim K. Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free Radic Biol Med* 2005;38:1543-52.
 37. Iuchi Y, Okada F, Tsunoda S, Kibe N, Shirasawa N, Ikawa M, et al. Peroxiredoxin 4 knockout results in elevated spermatogenic cell death via oxidative stress. *Biochem J* 2009;419:149-58.
 38. Schumann RR, Belka C, Reuter D, Lamping N, Kirschning CJ, Weber JR, et

- al. Lipopolysaccharide activates caspase-1 (interleukin-1-converting enzyme) in cultured monocytic and endothelial cells. *Blood* 1998;91:577-84.
39. Rhee SG, Woo HA, Kil IS, Bae SH. Peroxiredoxin functions as a peroxidase and a regulator and sensor of local peroxides. *J Biol Chem* 2012;287:4403-10.
40. Yang CS, Lee DS, Song CH, An SJ, Li S, Kim JM, et al. Roles of peroxiredoxin II in the regulation of proinflammatory responses to LPS and protection against endotoxin-induced lethal shock. *J Exp Med* 2007;204:583-94.
41. 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.
42. Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol* 2005;5:331-42.
43. Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285:248-51.
44. Riddell JR, Wang XY, Minderman H, Gollnick SO. Peroxiredoxin 1 stimulates secretion of proinflammatory cytokines by binding to TLR4. *J Immunol* 2010;184:1022-30.
45. Furuta T, Imajo-Ohmi S, Fukuda H, Kano S, Miyake K, Watanabe N. Mast cell-mediated immune responses through IgE antibody and Toll-like

- receptor 4 by malarial peroxiredoxin. *Eur J Immunol* 2008;38:1341-50.
46. Kang SW, Rhee SG, Chang TS, Jeong W, Choi MH. 2-Cys peroxiredoxin function in intracellular signal transduction: therapeutic implications. *Trends Mol Med* 2005;11:571-8.
47. Walport MJ. Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 2001;344:1058-66.

Abstract

Inflammasome-mediated peroxiredoxin2 secretion
and its effect on classical complement pathway activation

Hyun Sook Lee

Department of Medical Science

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeon-Soo Shin)

Peroxiredoxin (Prx) family proteins are expressed in diverse cellular compartments and play roles as antioxidant proteins that control ROS level. Recently, it has been reported that Prxs are released in ischemic brain and aggravate brain inflammation. I, therefore, focused on investigating how Prxs are secreted and the role of released Prxs in inflammation. In this study, I show that Prx1, 2, 5, 6 could be released in inflammasome condition through priming LPS followed by ATP treatment. Complement is an important part of the innate immunity, which serves as one of the first shield against anything foreign, and complement components are abundant in the serum.

Complement can be activated by either the classical, lectin, or alternative pathways. To examine the interaction between released Prxs and complement, we performed *in vitro* binding assay. Recombinant Prx1, 2 proteins bound recombinant C1q protein. Also, we observed membrane attack complex (MAC) in normal human sera, resulting from activation of the complement pathway. To clarify whether these complement activation by Prx2 was a C1q-dependent response; we confirmed the formation of MAC using C1q-depleted human sera. The effect of Prx2 in formation of MAC was significantly reduced in C1q-depleted human sera. Through this, we found that complement activation by Prx2 is a C1q-dependent response. In conclusion, our results reveal that Prxs was released by inflammasome-dependent and -independent pathways in immune cells. Released Prx2, then, binds to C1q and activates the classical complement pathway. These findings suggest that released Prxs may have synergistic effect with complement in inflammation, which can be a possible target in aseptic inflammation therapy.

Key words: peroxiredoxin, danger-associated molecular pattern, inflammasome, complement