

Current Understanding of HMGB1-mediated Autophagy

Man Sup Kwak¹ and Jeon-Soo Shin^{1,2,*}

¹Department of Microbiology, ²Institute for Immunology and Immunological Diseases and Severance Biomedical Science Institute, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Reactive oxygen species (ROS) is an oxidative stress to which cells respond by activating various defense mechanisms or cell death. Autophagy associated with oxidative stress response is a process to degrade and recycle macro-molecule as well as organelles in eukaryotic cells. HMGB1, a ubiquitous nuclear protein, is actively released in eukaryotic cells under oxidative stress. HMGB1 plays an important role as regulator of autophagy in nuclear, cytosolic and extracellular level. Nuclear HMGB1 regulates the expression of heat shock protein β -1 (HSPB1), which is critical for dynamic intracellular trafficking during autophagy and mitophagy. Cytoplasmic HMGB1 can bind to a beclin 1 by the intramolecular disulfide bridge using cysteine 23 and 45, which dissociates its inhibitory partner Bcl-2 and induces autophagy. Extracellular HMGB1 binds to receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) which inhibits mammalian target of rapamycin (mTOR) and then promotes the formation of the belin1-PtdIns3KC3 complex. Furthermore, endogenous HMGB1 is an intrinsic regulator of autophagy, and it enhances chemoresistance in diverse cancer cells. Here, we review recent reports suggesting a novel mechanism of diverse cancer cell resistance to therapy facilitated by HMGB1-mediated autophagy.

Key Words: HMGB1, Autophagy, ROS, Drug resistance

서론

산화 스트레스는 활성화 산소(ROS) 생성과 세포손상으로부터 회복 혹은 중간산물 반응에서의 신속히 독소를 제거시키기 위해 이루어지는 생화학적 시스템 능력 사이의 불균형에서 발생한다 (1). 활성화 산소는 superoxide anion (O_2^-), hydroxyl radical ($\cdot OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2), 그리고 singlet oxygen (1O_2) 같은 매우 작은 분자로 이루어진, 산소 원자를 포함하고 있는 유리기를(free radical) 말한다. 즉, 활성화 산소는 균형을 이룬 안정한 전자가 아닌 짝을 이루지 못한 불안정한 상태에서 강하게 발생

한다. 세포 내에서 발생하는 활성화 산소 대부분은 미토콘드리아(mitochondria)와 nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) 산화효소에 의해 생성된다. 산화 스트레스에 중요한 역할을 하는 활성화 산소는 세포의 생존과 사멸을 조절하는 다양한 신호전달 기작에 매우 중요한 분자로 알려져 있다. 산화 스트레스가 발생하면 이를 제거하기 위해, 프로테아좀(proteasome)이 과 발현하여 oxidatively modified된 단백질을 유비퀴틴(ubiquitin) 특이적으로 제거하기도 하고 (2), 자식작용(autophagy)을 통해 불필요한 단백질과 조직을 제거하는 (3) 등 다양한 방어 메커니즘이 작용한다. 이중 자식작용은 불필요한 단백질과 조직들을 라이소좀(lysosome)을 이용하여 분해하여 에

Received: May 29, 2013/ Revised: May 31, 2013/ Accepted: June 1, 2013

*Corresponding author: Jeon-Soo Shin. Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, 50 Yonsei-ro Seodaemun-gu, Seoul 120-752, Korea.

Phone: +82-2-2228-1816, Fax: +82-2-392-7088, e-mail: jsshin6203@yuhs.ac

**This work was supported by grants from the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST) (No. 2011-0017611), and the Brain Korea 21 Project for Medical Sciences, Republic of Korea.

©This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

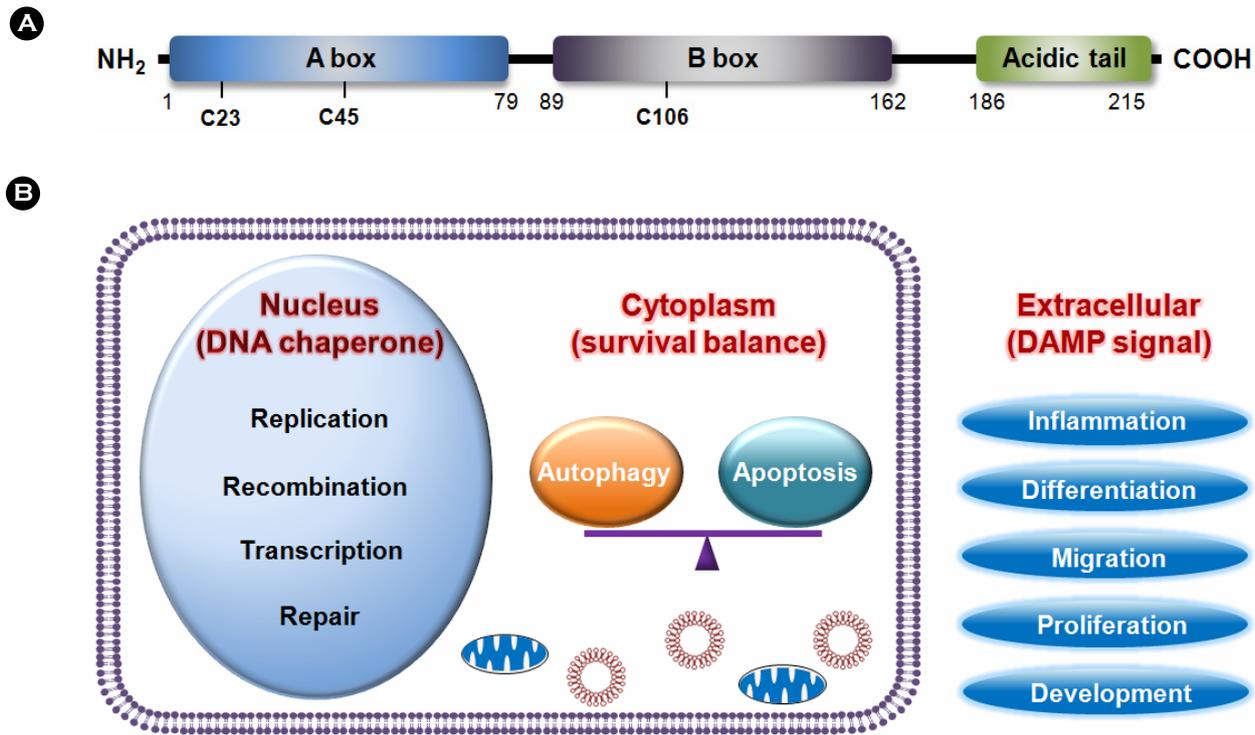


Figure 1. The structure and function of HMGB1. (A) HMGB1 is composed of three domains: two DNA binding domains (the A and B boxes) and a negatively charged carboxyl terminus. Three cysteines are encoded at position 23, 45, and 106. (B) HMGB1 is present in almost all of eukaryotic cells. In nucleus, HMGB1 plays roles in the DNA replication, recombination, transcription, and repair. In cytoplasm, HMGB1 regulates the balance between autophagy and apoptosis. Extracellular HMGB1 mediates the response to inflammation, differentiation, migration, proliferation, and development.

너지원으로 재사용하는 주요 기작이다. 자식작용은 비정상적 단백질과 조직을 비특이적으로 제거하기도 하지만, 활성화 산소에 의해 발생한 것들을 선택적으로 제거하기도 한다. 또한, 세포 내 감염을 일으키는 박테리아나 바이러스를 제거하기 위한 방어기전으로도 이용된다 (4). 마이토파지(mitophagy)는 잠재적 산화 스트레스 영향을 받을 수 있는 비 정상적인 미토콘드리아를 선택적으로 제거하는 자식작용의 한 방법으로 분류된다. 세포핵 단백질 HMGB1은 산화 스트레스에 의해 세포질로 분비되며, 다양한 기작을 통해 자식작용을 유도한다고 알려져 있다.

본 론

HMGB1은 비히스톤 DNA 결합 인자들과 구조적으로 매우 유사하며, 핵을 가지고 있는 모든 세포에서 강하게 발현하고 있다. HMGB1의 구조를 살펴보면, DNA에 결합하는 A-box와 B-box, 마이너스 성질을 띠는 산성기

의 C-말단기로 구성되어 있고, 이 C-말단기는 A-box와 B-box에 높은 친화력을 가지고 있다 (5). 215개의 아미노산으로 구성된 human HMGB1은 약 30 KDa의 크기이며, 23번째와 45번째, 그리고 106번째 아미노산이 시스테인(cysteine) 잔기로 이루어져 있다(Fig. 1A). HMGB1 시스테인 잔기는, 약한 산화스트레스 상태에서는 23번째와 45번째가 이황화물(disulfide) 결합을 이루는 반면 106번째 시스테인 잔기는 노출된 상태로 존재하게 된다 (6). 세포핵 단백질 HMGB1은 DNA의 복제, 재조합, 전사조절, repair와 같은 DNA 샤페론(chaperon)으로써 역할을 수행하기도 하며, p53, p73, retinoblastoma protein, Rel/NF-κB, estrogen receptor 등과 같은 전사조절 인자들과의 상호작용을 통해 전사를 촉진시키기도 한다. 또한, HMGB1은 핵에서의 역할 외에 세포 밖 분비를 통해 염증, 면역, 세포분화, 세포이동, 조직재생을 하는 동안에 신호전달 물질로서 중요한 역할을 수행한다 (7) (Fig. 1B).

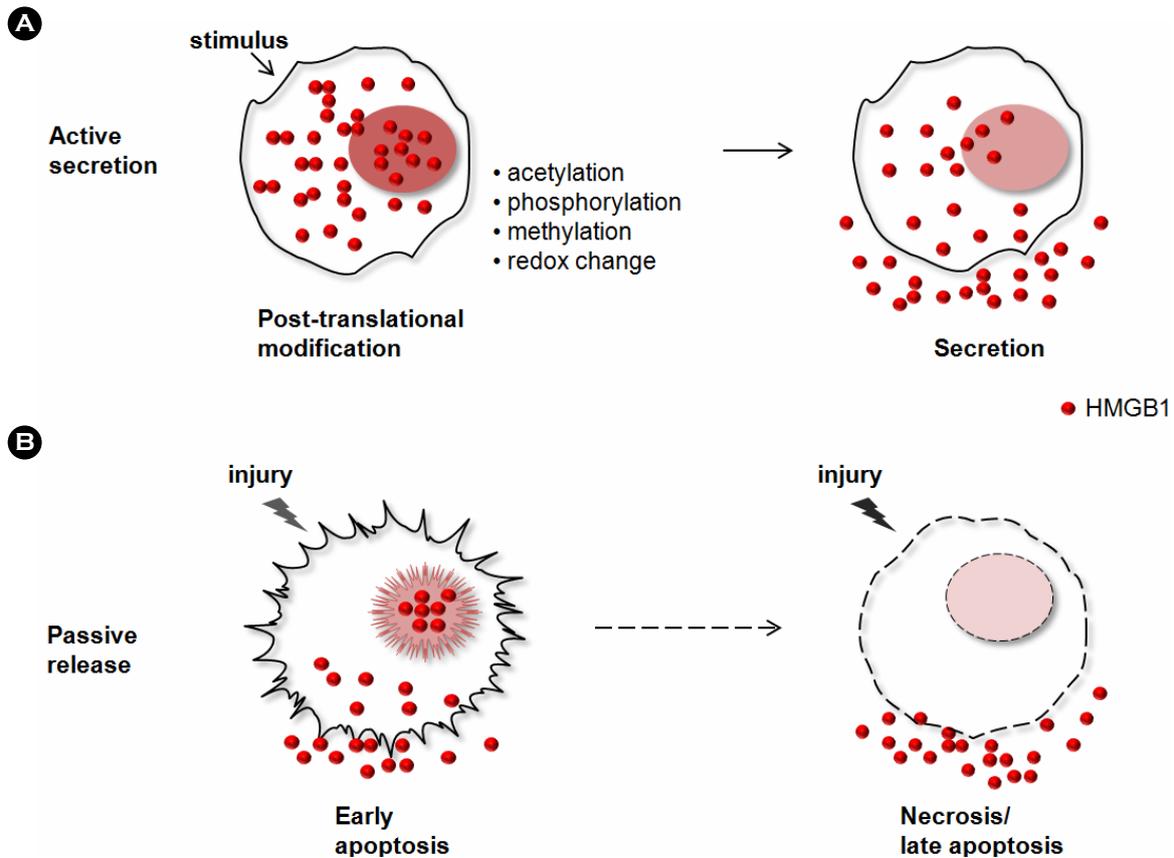


Figure 2. The release of HMGB1. (A) HMGB1 is actively secreted in response to exogenous and endogenous inflammatory stimuli. This translocation is stimulated by post-translational modification. (B) HMGB1 is also passively released by necrotic or apoptotic cells death caused by injury.

세포핵 단백질 HMGB1의 분비

HMGB1의 생화학적 활성은 post-translational modification 과정 및 위치하는 장소에 따라 달라진다. HMGB1은 주로 핵 내에 존재하고 있지만 세포질로 이동하기도 하고 세포 밖으로 분비하기도 한다. HMGB1의 분비 과정은 확연하게 구분된 두 가지 방법에 의해 이루어 지는데, 다양한 면역세포가 리간드와 수용체 결합 관계를 통해 활성화 될 때 혹은 세포괴사(necrosis)나 세포자멸사(apoptosis)가 이루어 지는 과정에서 일어난다(Fig. 2). 다시 말해, 물리적·화학적 영향에 의해 분비되는 HMGB1은 자극에 의존적이라 이야기 할 수 있으며, HMGB1의 분비 과정은 자극에 의한 분비(active secretion)와 수동적 분비(passive release)로 구분 지을 수가 있다. 첫째, 자극에 의한 분비 기작은, 세포가 활성화 되는 동안 lysine 잔기의 아세틸화(acetylation)에 의해 HMGB1이 핵에서 세포

질로 이동하게 되며, 이후 vesicles을 통하여 분비된다고 알려져 있다. 즉, HMGB1의 분비는 염증반응 자극 이후 핵에 존재하는 HMGB1이 세포질로 이동하게 되고, 이후 vesicles과 세포막의 융합을 통해 세포 밖으로의 분비가 이루어진다 (8). HMGB1은 인산화(phosphorylation)에 의해서도 분비가 이루어지는데, HMGB1은 TNF- α , okadaic acid, 그리고 phosphatase inhibitor 같은 자극에 의해 인산화가 이루어지며, 이렇게 hyperphosphorylation된 HMGB1은 핵에서 세포질로 이동을 하게 된다. HMGB1의 핵으로의 이동은 karyopherin- α 1에 의해 이루어 지는데 인산화된 HMGB1은 이 karyopherin- α 1와의 결합이 현저히 떨어져 세포질에 존재하게 됨을 알 수 있다. HMGB1의 인산화 되는 잔기는 NLS (nuclear localization signals)에 존재하는 serine이며, 이 잔기들을 변이시켜 인산화가 되지 못하게 막으면 핵으로 들어가지 못하게 되어 세포질에 존재함으로써 분비가 이루어 진다 (9). 또한, RAW264.7 세포

와 human peripheral blood monocytes에 LPS 자극을 주어 HMGB1이 세포 밖으로 분비되는 조건을 구현한 후, PI3K inhibitor를 처리하였을 때 HMGB1이 세포 밖으로의 분비가 이루어 지지 않는 실험을 통해, HMGB1의 분비에 PI3K가 중요하게 관련됨을 알 수 있었다. PI3K의 주요 타겟은 phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1)인데, 이것은 protein kinase C (PKC)를 조절한다. PKC inhibitor를 이용하여 HMGB1 분비 정도를 비교해 보면, LPS에 의한 HMGB1의 세포 밖 분비가 현저히 감소가 되고, 이러한 PKC에 의한 분비기전은 칼슘(calcium)에 매우 의존적으로 이루어 지고 있다. 즉, HMGB1의 인산화에 의한 분비 작용기전은 PKC에 의해 일어나며, 이러한 PKC의 활성화는 칼슘 의존적이라 볼 수 있다 (10). 이 외에, 호중구(neutrophil)에서의 HMGB1 42번째 라이신(lysine)잔기가 메틸화(methylation) 되었을 때에도 DNA와의 결합력을 약화시켜 세포질로의 이동을 증가시킨다 (11). 산화·환원 반응에 의해서도 HMGB1의 분비가 이루어 지는데, 단백질간의 이황화물 결합(disulfide bond)은 산화스트레스에 의해 약기되기도 하지만 효소의 촉매반응에 의해 다시 분리되기도 한다. 이러한 과정은 단백질 기능의 조절을 위한 전사 후 번역 메커니즘에도 영향을 미친다. 세포핵 단백질 HMGB1은 산화스트레스로 인한 이황화물 결합에 영향을 받는 3개의 시스테인 잔기(Cys23, Cys45, Cys106)를 가지고 있다. 돌연변이유발(mutagenesis) 방법을 통해 시스테인 잔기에 의한 HMGB1의 위치 변화를 확인해 본 결과, 23번째와 45번째 시스테인 잔기는 단독 혹은 함께 변화를 시켰음에도 불구하고 HMGB1이 핵에 위치하고 있었지만 106번째 시스테인 잔기를 모두 변화시켰을 때에는 HMGB1의 세포질로 분비됨을 확인할 수 있었다 (6). 또한, 핵에 존재하는 heat shock proteins (HSP) 72는 산화스트레스가 일어날 때 peptide binding domain (PBD)을 이용하여 HMGB1과 결합을 함으로써, 산화스트레스에 의한 HMGB1의 세포질로 이동과 세포 밖 분비를 억제하기도 한다 (12) (Fig. 2A). 최근에는 NLRP3 inflammasome으로부터 활성화된 caspase 1에 의해서도 HMGB1의 분비가 이루어진다고 알려져 있다. (13). 둘째, 수동적 분비는 세포괴사 혹은 세포자멸사 같이 세포가 죽어가는 과정에서 일어난다. 세포괴사(necrosis)가 일어나는 동안에는 삼투성(permeability)이 무너지면서 HMGB1이 분비된다 (14). 세포자멸사 과정에서 HMGB1의 분비는 조금 더 복잡하게 일어나는데, 세포자멸사 초기 과정에서는 HMGB1이

대부분 핵에 존재하나, 세포자멸사의 후기 과정이 되면 뉴클레오솜(nucleosome)의 분화가 이루어 지고 동시에 세포 내 삼투압의 변화가 일어나는데 이로 인해 HMGB1이 세포 밖으로 분비된다(Fig. 2B) (15).

HMGB1과 autophagy

세포핵 단백질 HMGB1은 전사조절에 매우 중요한 단백질이다. HMGB1은 미토콘드리아의 역동성과 특성을 조절하는 다른 조절자들의 발현에 영향을 미친다. HMGB1은 세포 내 온도나 올라가거나 스트레스 상태에서 발현이 증가하는 heat shock proteins (HSPs)의 유전자 발현을 조절한다. HMGB1에 의해 발현이 증가된 HSP는 인산화되고, 이는 세포의 actin cytoskeleton 형성을 유도한다. 이렇게 형성된 세포골격은 미토콘드리아의 상해에 반응하여 나타나는 미토콘드리아(mitophagy)를 야기한다. 이 과정을 좀 더 자세히 살펴 보면, 미토콘드리아 바깥 벽에 존재하는 Pink1 (PTEN-induced putative kinase-1)과 Parkin 유전자 결합에 의해 일어나는 Pink1/Parkin pathway는 기능이 상실된 미토콘드리아의 mitophagy에 영향을 미친다. 즉, 양극성을 잃게 된(depolarization) 미토콘드리아의 세포막에는 Pink1을 매개로 스트레스가 유도된 미토콘드리아에 Parkin이 위치하게 되고, 미토콘드리아 세포 외막에 존재하는 voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1)의 27번째 라이신(lysine)을 유비퀴틴화(ubiquitination) 시킨다. 결국 자식작용 어댑터 단백질인 p62는 이러한 VDAC1을 인식하게 되고, 다시 p62는 microtubule 관련 단백질 LC3 (light chain 3)와 결합하여 autophagosomes 형성을 돕는다. 즉, HMGB1은 미토콘드리아가 양극성을 잃게 될 때 Parkin의 이동과 VDAC1의 유비퀴틴화를 조절하여 autophagy를 활성화 시키는 HSPB1 (heat shock protein β -1)의 발현을 증가시킴으로 autophagy 작용에 관여한다(Fig. 3) (16).

Autophagy의 주요 역할은 세포 내 불필요한 단백질이나 조직들을 스스로 제거하기 위해 autophagosome을 형성하고 이후 라이소좀(lysosome)과 결합하여 이를 분해시켜 에너지원으로 사용하기 위함이다. 자식작용을 개시하는 단백질인 Beclin 1은 Bcl-2와 결합한 상태로 존재함으로써, 자식작용이 근본적으로 차단 상태에 놓이게 된다. 하지만, HMGB1이 산화스트레스에 의해 세포질 내로 이동하게 되면, HMGB1의 23번째와 45번째 시스테인 잔기는 자식작용 개시 단백질인 Beclin1과 결합을 하여,

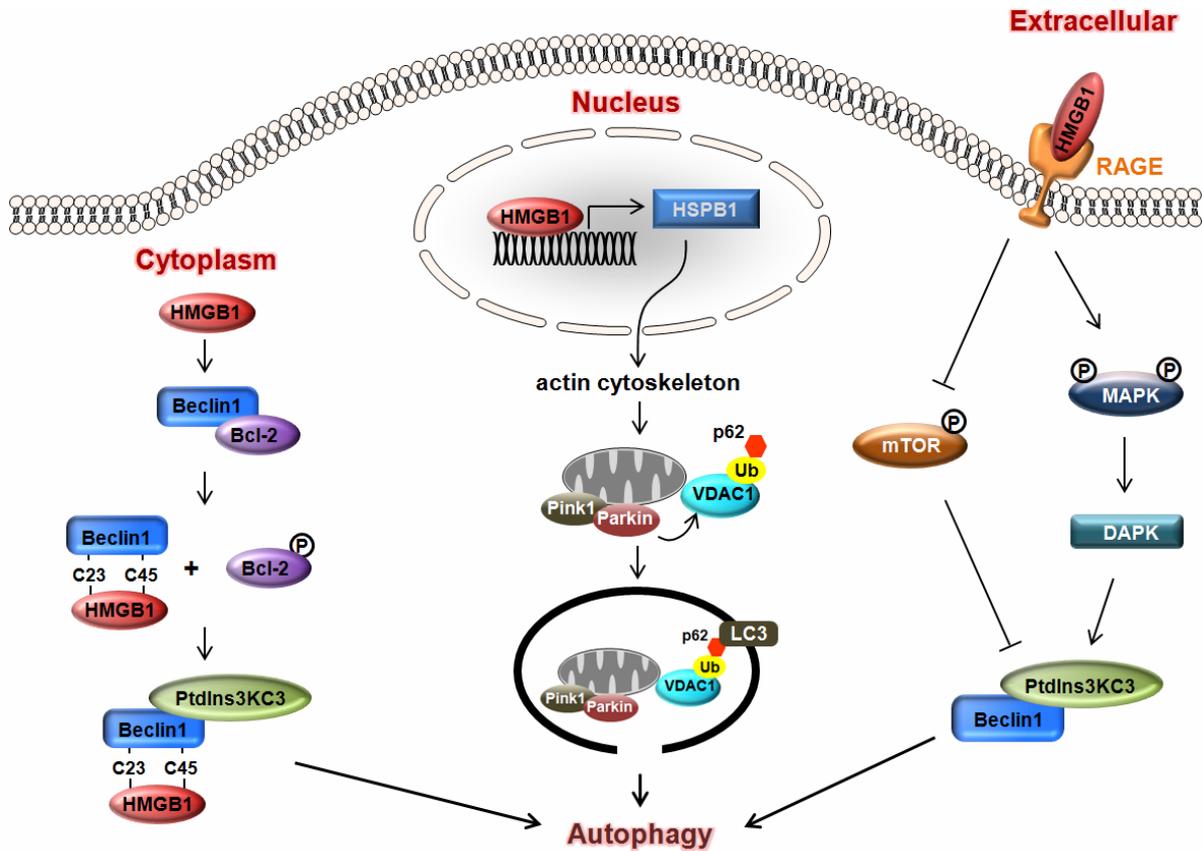


Figure 3. The role of HMGB1 in autophagy. Endogenous HMGB1 competes with Bcl2-Beclin1 complex. The intramolecular disulfide bridge (C23 and C45) of HMGB1 is required for binding to beclin1 and regulate autophagosome formation. The nuclear protein HMGB1 modulates mitochondrial respiration by sustaining autophagy through the regulation of HSPB1. HSPB1 induce the actin filaments, which is involved in the dynamics of autophagy and mitophagy. Secreted HMGB1-RAGE complex sustains autophagy associated with decreased phosphorylation of the mTOR and increased beclin1-PtdIns3KC3 interaction.

자식작용 억제 단백질인 Bcl-2와의 결합을 제거한다. 이후 Beclin 1은 자식작용의 주요 조절자인 class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3KC)와 결합하여 자식작용을 활성화 시킨다(Fig. 3) (17).

Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE)는 생체의 체액성 면역의 주된 역할을 하는 Ig superfamily 중 하나이다. RAGE는 다양한 분자들을 인식하는데 HMGB1 역시 RAGE의 대표적인 리간드이다. 앞서 언급하였듯이 HMGB1은 다양한 형태로 세포 밖으로 분비된다. 분비된 HMGB1은 RAGE와 결합하여 자식작용의 개시단계에서 자식작용 진행을 강하게 억제하는 mTOR (mammalian target of rapamycin)를 억제한다. mTOR의 억제는 자식작용 개시에 중요한 Beclin1/PtdIns3KC3의 결합을 저해하지 못해 자식작용이 활성화 된다. 또한, RAGE에 결합한

HMGB1은 MAPK (mitogen-activated protein kinase)를 인산화 시키고, 이후 DAPK (death associated protein kinase)를 활성화 시킴으로 인해 Beclin1/PtdIns3KC3 결합을 유도하여 자식작용을 활성화 시킨다(Fig. 3) (18).

HMGB1 유도 autophagy에 의한 약물 저항성

자식작용은 세포 내 항상성(homeostasis)을 유지하고 세포 독성을 일으키는 물질을 제거하기 위한 매우 중요한 메커니즘이다. 즉, autophagy는 세포자멸사와 같은 예정된 세포 사멸(programmed cell death)에 반하여 예정된 세포 생존(programmed cell survival)이라 인식되어 왔다. 다양한 종류의 암세포에서 자식작용의 증가는 암세포 제거를 위한 약물에 대해 세포 저항성을 증가시킨다. 시스플라틴(cisplatin), 독소루비신(doxorubicin)과 메토틱세이트

(methotrexate)는 골육종(osteosarcoma) 같은 암을 치료하기 위해 쓰이는 일반적인 약물이다. HMGB1에 의해 유도된 자식작용은 골육종 세포에서 이러한 약물의 저항성을 증가시킨다. 반면, HMGB1과 자식작용을 억제시키면 골육종 세포의 약물에 대한 효과를 증가시킨다 (19). 뿐만 아니라, leukemia에서 역시 HMGB1의 발현을 촉진시키면 약물에 대한 감수성이 감소한 반면 발현을 억제시키면 약물 감수성이 증가하게 된다 (20).

결론

활성화 산소에 관여하는 중간매개물들은 세포의 사멸과 생존을 조절하는 여러 가지 메커니즘에 매우 중요한 분자이다. HMGB1은 세포핵 단백질이면서 세포질 내 혹은 세포 밖으로 분비되는 단백질로서, 핵에서는 DNA 샤페론(chaperone) 역할을 하지만 밖에서는 DAMP (danger associated molecular patterns)로서 역할을 수행한다. HMGB1 역시 산화 스트레스에 반응하는 중요한 분자이며, 산화 스트레스가 일어나는 동안 핵과 세포질, 혹은 세포 밖으로 분비되어 활성화 산소에 의해 유도되는 자식작용을 증가시킨다. 이렇게 증가된 자식작용은 여러 가지 암세포에서 암 억제를 위한 약물의 저항성을 높이게 되고, 이러한 결과는 암세포뿐만 아니라 활성화 산소에 의해 야기되는 다양한 질병에서의 약물 저항성에도 영향을 미친다. 즉, HMGB1의 발현을 적절히 제어할 수 있는 물질들을 찾고 이를 활용하는 방법을 개발한다면, 활성화 산소에 의해 일어나는 다양한 질병뿐 아니라 암 치료에 있어서도 의미 있는 결과를 얻을 수 있을 것으로 판단된다.

참고 문헌

- 1) Dimple B, Amábile-Cuevas CF. Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* 1991;67:837-9.
- 2) Grune T, Merker K, Sandig G, Davies KJ. Selective degradation of oxidatively modified protein substrates by the proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:709-18.
- 3) Kiffin R, Bandyopadhyay U, Cuervo AM. Oxidative stress and autophagy. *Antioxid Redox Signal* 2006;8:152-62.
- 4) Liang C. Herpesviral interaction with autophagy. *J Bacteriol Virol* 2011;41:213-23.
- 5) Stott K, Watson M, Howe FS, Grossmann JG, Thomas JO. Tail-mediated collapse of HMGB1 is dynamic and occurs via differential binding of the acidic tail to the A and B domains. *J Mol Biol* 2010;403:706-22.
- 6) Hoppe G, Talcott KE, Bhattacharya SK, Crabb JW, Sears JE. Molecular basis for the redox control of nuclear transport of the structural chromatin protein Hmgb1. *Exp Cell Res* 2006;312:3526-38.
- 7) Tang D, Kang R, Zeh HJ 3rd, Lotze MT. High-mobility group box 1 and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2010;1799:131-40.
- 8) 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.
- 9) Youn JH, Shin JS. Nucleocytoplasmic shuttling of HMGB1 is regulated by phosphorylation that redirects it toward secretion. *J Immunol* 2006;177:7889-97.
- 10) Oh YJ, Youn JH, Ji Y, Lee SE, Lim KJ, Choi JE, et al. HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium-dependent mechanism. *J Immunol* 2009;182:5800-9.
- 11) Ito I, Fukazawa J, Yoshida M. Post-translational methylation of high mobility group Box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils. *J Biol Chem* 2007;282:16336-44.
- 12) Tang D, Kang R, Xiao W, Jiang L, Liu M, Shi Y, et al. Nuclear heat shock protein 72 as a negative regulator of oxidative stress (hydrogen peroxide)-induced HMGB1 cytoplasmic translocation and release. *J Immunol* 2007;178:7376-84.
- 13) Lamkanfi M, Sarkar A, Vande Walle L, Vitari AC, Amer AO, Wewers MD, et al. Inflammasome-dependent release of the alarmin HMGB1 in endotoxemia. *J Immunol* 2010;185:4385-92.
- 14) Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature* 2002;418:191-5.
- 15) Bell CW, Jiang W, Reich CF 3rd, Pisetsky DS. The extracellular release of HMGB1 during apoptotic cell death. *Am J Physiol Cell Physiol* 2006;291:1318-25.
- 16) Kang R, Livesey KM, Zeh HJ 3rd, Lotze MT, Tang D. Metabolic regulation by HMGB1-mediated autophagy and mitophagy. *Autophagy* 2011;7:1256-8.
- 17) Kang R, Livesey KM, Zeh HJ, Loze MT, Tang D. HMGB1: a novel Beclin 1-binding protein active in autophagy. *Autophagy* 2010;6:1209-11.

- 18) Kang R, Tang D, Loze MT, Zeh HJ. Apoptosis to autophagy switch triggered by the MHC class III-encoded receptor for advanced glycation endproducts (RAGE). *Autophagy* 2011;7: 91-3.
- 19) Huang J, Ni J, Liu K, Yu Y, Xie M, Kang R, *et al.* HMGB1 promotes drug resistance in osteosarcoma. *Cancer Res* 2012; 72:230-8.
- 20) Yang L, Yu Y, Kang R, Yang M, Xie M, Wang Z, *et al.* Up-regulated autophagy by endogenous high mobility group box-1 promotes chemoresistance in leukemia cells. *Leuk Lymphoma* 2012;53:315-22.
-