

신기능생물소재기술개발사업

Studies on Development of Novel
Functional Biological Molecules

혈액응고인자 대체 단백질체제의 탐색 개발

Studies on the Development of blood
coagulating factor using the proteins

연구기관

생명공학연구소

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “혈액응고인자 대체단백질 제제의 탐색 개발”의 선도기술개발 사업의 최종 보고서로 제출합니다.

1998. 7. 29.

주관연구기관명 : 생명공학연구소

총괄연구책임자 : 김 승 호

연구 원 : 이 우 일

김 동 호

석 경 호

이 진 영

최 낙 식

채 창 훈

김 형 근

가 순 일

백 미 영

여 백

요 약 문

I. 제 목

혈액응고인자 대체단백질제제의 탐색 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

생리 활성 물질은 대개 미량으로 존재하고 있기때문에 이들을 이용한 질환의 진단 및 치료제로서 탐색하기 위하여서는 어려움이 많으나 일단 탐색되어진 생리활성 단백질성 물질은 생리적으로 대량생산이 가능하여 활성이 보다 높게 유지되는 대체물질로서 높은 부가가치가 예상된다. 혈액 응고제제는 선진 외국에서 여러 종류가 개발되어 시판되고 있다. 그 중에는 효능은 탁월하나 취급하기가 힘들고 가격이 고가이거나, 경구 복용이 가능하고 가격은 저렴하지만 지혈 효능이 떨어지는 단점이 노출되어 있기 때문에 선진 제약회사를 중심으로 새롭고 안전한 약제의 개발과 복합제제를 이용하여 혈액 응고 효과를 높이는 방향으로 활발히 연구가 진행되어가고 있는 상황이다.

급속한 경제성장과 동시에 사회 전반적인 혈관 질환의 심각성에 대한 계몽이 잘 되어 있지않은 국내 현실에 비추어 볼때, 멀지않은 장래에 서구에서 보이고 있는 여러가지 혈관 질환의 사회적 심각성에 관심이 미치게 될것이 분명하여 이에 대한 대비책 강구가 시급하다고 생각된다.

본 연구에서는 이에 대한 대비책으로 우선 혈관질환의 폐해에 대한 국가적 차원에서의 계몽 활동과 동시에 대체 단백질을 이용하여 저렴하고 빠르고 정확한 진단제제의 개발과 함께 안전하고 저렴한 치료제의 개발을 위한 탐색하고 이를 응용하는 실용화 기술개발을 목표로 하는 연구를 수행하고자 한다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1차년도

- 혈전 관련 단백질의 screening
- 혈액 응고인자 관련 단백질의 분리 정제
- Transglutaminase의 발현 확인

2차년도

- 신호전달 효소를 이용한 혈액 응고 활성화 증진 연구
- 다량체 피브린의 형성과 단백질의 안정성 연구
- 단백질의 구조와 활성화간의 상관관계 연구

3차년도

- 혈액응고인자 factor III의 유전자 추출
- 발현벡터 제조 및 분석
- 변이 단백질의 분리정제 및 분석
- 인산화 피브리노겐의 특성연구

IV. 연구개발 결과

혈관 질환 특히 혈액 응고에 대한 진단 혹은 치료제로서 개발을 위한 활성 대체 단백질의 탐색 연구로서 혈전 형성을 일으키는 작용 기작중에서 혈액응고 인자 작용 기작 관여 단백질의 분리 정제 및 활성화, 혈소판의 응집 능력을 응용하기위한 방법으로 혈소판의 응집에 관여하고 있다는 단백질의 사람의 혈소판에서 분리 정제, 피브린 중합체 형성에 관여하는 Factor XIII의 가능성 타진, 트롬빈 효소에 의한 기질 즉 피브리노겐의 구조적 변화와 혈액 응고 활성 증진을 위하여 기질과 효소간의 구조와 기능에 관한 상관성 특히 피브리노겐의 인산화, 활성의 증진을 위한 지질이나 polycationic compounds 물질을 이용한 피브리노겐의 gelation 속도 증진효과에 관한 연구를 시도하여 이를 이용한 가능성을 탐색하였다. 사람 혈소판의 막에서 분리 정제한 단백질은 혈소판 감소성 자반증 환자에서 발현되는 단백질과 결합함으로써 혈소판의 응집을 유도하여 혈전을 형성시키고 결과를 얻었으며 이러한 혈소판 응집 효과를 갖는 단백질을 이용한 혈액응고 활성 촉진 혹은 저해제의 탐색 개발은 암 억제제나 뇌졸중에 관련되는 치료제로 개발될 가능성이 높다. 혈액응고 대체 단백질로서 Transglutaminase의 효과를 측정하고 이를 이용하기위한 연구로서 효소를 사람의 침샘에서 발현되는 것을 확인하였다.

트롬빈에 의한 피브리노겐의 구조적 변화와 혈액응고 인자의 활성의 증진으로 피브리노겐의 인산화와 분리정제, 인산화 효소단백질 혹은 polycationic 물질을 이용한 gelation에 관한 연구 결과로서 casein kinase-II와 같은 효소를 이용한 gelation은 트롬빈만으로 형성되는 속도보다 훨씬 빠르게 증진시키고 있음이 관찰되었으며 지질의 첨가는

피브린의 복합체 형성 반응의 kinetics면에서 더욱 촉진하고 있는 결과로서 이를 이용한 혈액응고 촉진제의 가능성을 타진하였다.

본 연구를 통하여 혈액응고 작용기작에 작용하는 인자를 이용한 혈액응고 능력을 진단하는 시약과 치료제제로서 활용이 가능한 결과를 얻었다. 소의 뇌 추출물로부터 손상된 외부조직의 혈액응고 과정에서 인자를 활성화 시킴으로서 다단계의 연속적인 생리적인 응고 과정을 효율적으로 수행하게 하는데 최초의 단계에서 Tissue Factor가 매우 중요한 역할을 담당하고 있는데 이렇게 중요한 인자인 Tissue Factor 단백질의 분리 정제에 대한 연구로서 소 조직에서 분리된 Tissue Factor는 순도는 좋으나 상업화로서 수율이 낮으며 직접 이를 주사제제의 치료에의 응용 가능성이 희박하다는 결과를 얻고 사람의 태반에서 유전자 조작을 통한 대량생산 체계를 확립하기위하여 단백질을 발현시키기 위한 벡터를 제조하고 이를 이용한 변이 단백질을 생산하였다. 생산된 발현 단백질을 이용한 사람의 혈장에서의 혈액응고 능력을 측정 한 결과, 현재 시판되고 있는 진단시약과 거의 동일한 효과를 나타내고 있는 결과를 얻었다. 특히 이와같이 사람에서 발현되는 단백질을 시스템이 전혀 다른 대장균에서 발현시킨 결과는 획기적인 것으로서 이를 활용하여 타 질환 진단 혹은 수술시의 혈액 응고 활성 능력 여부를 진단하는 진단용 kit 시약으로 활용이 가능하며, 이를 응용하여 타 질환 관련 단백질의 발현의 가능성을 부여한 결과를 얻었다. 또한 혈액응고 활성에 가장 중요한 단백질은 트롬빈으로서 앞으로의 연구 추진과 이용면에서 고부가 가치가 있는 트롬빈을 소의 혈액으로부터 분리 정제하였다. 트롬빈의 분리 정제는 본 연구의 수행에 크게 도움을 줄 뿐만아니라 약 50억의 국내 시장을 가지고 있는 산업화에 기여할 것으로 생각된다.

V. 사업수행 (연구개발) 결과의 활용계획

혈전에 의한 여러 질환에 효과적으로 진단하고 치료하기 위해서는 이에 대한 원인과 작용기작을 이해하는 것이 필요하다. 현재 혈액응고 인자 제제들은 혈액에서의 추출시 효능은 좋으나 비용이 많이 들며 부작용의 위험 등의 많은 문제점을 안고 있어서 값싸고 안전한 혈액응고 인자 대체 단백질의 개발로 이러한 문제점을 효과적으로 진단하고 치료하기 위해서는 이미 잘 알려진 자료와 이를 응용하는 방법을 확립시키는 것이다. 새로운 혈액응고 인자 대체 단백질을 개발하기 위한 노력이 선진국을 중심으로 치열하게 전개되고 있으나 아직 괄목할 만한 연구 결과는 없는 편이다. 그렇기 때문에 혈액응고 인자 대체 단백질 개발에 대한 연구는 새로운 idea 개발과 같은 노력으로 국내 연구 수준으로도 접근할 수 있어 외국과의 경쟁 가능성이 매우 높다. 따라서 본과제에서는 혈액응고 활성의 작용기작을 이용한 탐색 연구를 수행하였고 이를 응용하는 기술개발로 혈전에 대한 진단 및 치료제로서 활용하고자 한다. 또한 기존의 혈관질환 치료에 대한 문제점들을 해결할 수 있는 차세대물질로 혈전용해 활성을 지니는 물질 탐색이나 다른 질병의 개발에도 이용하여 효과적인 혈전 관련 질환 치료제로서 활용하고자 한다.

여 백

S U M M A R Y

The primary goal of the present study is to search and develop the proteins comparable to the biological macromolecules involved in the blood coagulation. The proteins related to the platelet aggregation have been isolated from human platelets and analyzed using various biochemical techniques. The development of the activator or inhibitor for the blood coagulation based on the structural and functional relation between substrates and the proteins having the blood clotting activity has a high potentiality for the development of cancer suppressant or apoplexia cerebri.

The fibrin polymerization is accomplished by the activity of transglutaminase and the structural change of fibrinogen substrate induced by thrombin. Therefore the structural and functional relation between substrate and enzyme was investigated by carrying out the phosphorylation of fibrinogen and the gelation of substrate with the phosphorylated protein and polycationic materials in order to increase the activity of the factors involved in the blood coagulation. The gelation induced by casein kinase-II, which can phosphorylate fibrinogen, has shown to be faster than that by just thrombin itself. It has been also demonstrated that the addition of lipids accelerates the fibrin

polymerization.

Based on the results of the current study, the diagnostic reagents using the factors involved in the blood clotting process has been attempted to estimate the blood coagulation activity of samples. The purification of Factor III(Tissue factor) known as the initiator of blood coagulation cascade was carried out from bovine brain, the yield was not high though. The cDNA coding Fcator III was prepared by RT-PCR with mRNA from human placenta and cloned into an expression vector. The recombinant protein was successfully produced in E. coli. and showed the activity comparable to the natural factor. The recominant factor will be able to be used as the diagnostic kit for the blood clotting activity.

Thrombin has been also purified from bovine blood. The isolated thrombin was very useful to perform the present study and would contribute the economics which has a market volume of 500 million wons for it.

C O N T E N T S

1. Introduction	15
2. Present research status in foreign and our country	25
3. Contents and results	27
(1) Materials and Methods	27
(2) Results	33
1) Purification of fibrinogen	33
2) Analysis of phospho-fibrinogen on HPLC	36
3) Peptide mapping of phospho-fibrinogen	37
4) Analysis of phospho-fibrinogen on gelation	37
5) Effect of sphingolipide on gelation	38
6) Effect of Polycationic compound on gelation	39
7) Activity of human Tissue Factor using APTT	40
4. Accomplishment of research proposal	43
5. Application of results	47
6. References	49

여 백

목 차

제 1 장 서 론	15
제 2 장 국내 외 기술개발 현황	25
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과	27
가. 실험재료 및 방법	27
나. 실험 결과	33
1. Fibrinogen의 분리	33
2. 인산화 fibrinogen의 HPLC	36
3. 인산화 fibrinogen의 펩타이드 비교	37
4. 인산화 fibrinogen의 gelation 분석	37
5. Sphingolipide의 gelation 효과	38
6. Polycationic compound의 gelation 효과	39
7. APTT 이용한 사람 Tissue Factor의 활성화	40
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도	43
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	47
제 6 장 참 고 문 헌	49

여 백

제 1 장 서 론

Blood coagulation의 mechanism에 대해서는 옛부터 여러 해석이 있었으나 가장 널리 알려진 학설은 Morawitz에 의해 1904년에 제창된 것이다. 그 개요는 혈소판에서 방출된 thrombokinese가 Ca^{2+} 의 존재하에서 혈장중의 prothrombin 을 활성화해서 생성된 thrombin이 fibrinogen을 fibrin으로 만들어서 혈액 응고가 종료되는 메카니즘 응고에 대한 연구가 진행됨에 따라 차츰 새로운 학설로 발전되었다. 혈액 혈전 형성 작용 기작은 혈액속의 coagulation factor만이 관여하는 내인성 기전과 혈액내에 조직액의 tissue factor가 들어갔을 경우의 외인성 기전으로 나눌 수 있다. 즉, intrinsic mechanism에 의한 응혈 제 1상은 activated blood thromboplastin이 생성되는 시기이고 접촉인자인 factor XII가 다른 물질의 표면에 접촉함으로써 활성화되어 factor XI을 활성화한다. 다시 factor IX, XIII, X, V 이 외에 platelet factor III과 Calcium ion(factor IV)이 반응해서 activated blood thromboplastin이 만들어 진다. 혈관질환의 주를 이루는 Atherosclerosis(동맥경화증)와 Thrombosis(혈전증)는 혈관의 비후 및 혈전의 형성으로 생명현상의 유지에 필요한 중요 영양 대사물질과 산소를 운반해야 하는 혈액의 흐름을 억제하여 그 vital한 기능을 저해함으로써 21세기에 있어 암, 교통사고 등과 함께 생명을 위협하는 주요 사망원인이 되고 있고, 또한 날로 그 사망률이 증가추세에 있는 중요 연구대상 질환이다. Thrombosis는 생명을 위협하는 질병을 일으키는 주요 원인중의 하나로서 효과적인 혈전 용해제는 급성 심근경색, 뇌 경색, 정맥 thromboembolism 등의 주요 질병을 비상시 초기 치

료하기 위한 약제로 사용될 수 있다.

Thrombin은 serine 계열 단백질 분해 효소로서 혈액 응고 형성시에는 fibrinogen에 작용해서 fibrinopeptide A,B와 fibrin monomer로 만들어준다. 이 fibrin monomer는 2개의 N-terminal glycine group을 갖게 되며 이것이 calcium 이온과 공존해서 수소결합에 의해 fibrin polymer로 된다. 또 thrombin의 작용으로 factor XIII은 activated type의 효소(transamidase 또는 transglutaminase)와 더불어 수소결합에 의해서 생긴 fibrin polymer에 작용해서 peptide 결합으로 crosslink된 fibrin polymer가 형성된다. 이 fibrin polymer는 urea 등에서 녹지않는 안정된 생리적인 fibrin이다. blood coagulation pathway의 연구로 현재 많은 coagulation factor가 보고되고 있으며 이들과 관련되는 각종 단백질중에서 coagulation factor를 제제화하여 지혈제로 이용하려는 노력이 선진 제약회사에 의하여 가속화 되어가는 실정이다.

혈액 응고의 마지막 단계에서의 지혈제제는 선진 외국에서 여러 종류가 개발되어 시판되고 있다. 그 유형으로는 혈액 응고인자 (III, VII, VIII, IX, XIII), tranexamic acid, p-aminomethyl benzoic acid, ε-aminocaproic acid, epinephrine, aprotinin, batroxobin, thrombin 등이 알려져 있으나 thrombin과 혈액 응고인자들은 효능은 탁월하나 취급하기가 힘들고 가격이 비싼 단점이 있고, ε-aminocaproic acid, epinephrine 등은 가격이 저렴하고 경구 복용이 가능하나 지혈 효능이 떨어지는 단점이 노출되어 있기 때문에 선진 제약회사를 중심으로 새롭고 안전한 약제의 개발과 복합제제를 이용하여 혈액 응고효과를 높이는 방향으로 활발히 연구가 진행되어가고 있는 상황이다. 혈관 내에서는 혈액이 유동성을 가지고 몸 속을 순환하고 있으나 일단 혈관

밖으로 노출되어져 나왔을 때는 급속히 응고된다. 혈관이 손상을 받으면 출혈이 일어나는데 동맥이나 큰 혈관일때는 수술로서 막을 필요가 있으나 작게 손상받은 혈관에서는 일반적으로 자연히 지혈된다. 혈관의 내부 표면은 정상적인 상황에서는 혈액의 응고를 억제하고 손상이 일어날 경우에는 신속하게 지혈하게하는 내피세포로 둘러 쌓여 있다. 혈관 내피세포의 항응고(antithrombosis)활성은 표면이 혈소판의 표면과 같이 음전하를 띠고 있고, thrombomodulin이나 heparan sulfate 등의 강력한 혈액 응고 억제인자를 분비하고 있어 유지된다. Heparan sulfate는 antithrombin III의 활성을 촉진시키는 작용을하며, thrombomodulin은 thrombin의 효소 활성을 억제하는 동시에 protein C를 활성화하여 혈액의 응고를 방지한다. 그러나, 여러가지 요인으로 혈관이 손상되어 출혈이 일어나면 혈관내에서 생리적 방어기작인 지혈반응이 일어나 혈액의 손실을 방지하게 된다. 즉 혈관이 손상되면 smooth muscle cell이 수축하여 lumen을 감소시킴으로서 혈액의 흐름과 유출을 방지한 다음, 순환하는 혈소판을 subendothelium 구조에 점착하게 만든다. 그 뒤 혈소판이 점착하고 응집하여 plug 를 형성하고, 마지막으로 손상된 혈관 주변의 내피세포와 혈소판의 작용으로 혈액응고 경로를 통하여 폭발적인 thrombin 생성을 유발한다. 생리적 상태에서 지혈 현상은 반드시 손상된 혈관 주변에서만 제한적으로 일어나며 다른 부위로 진행되지 않는다. 지혈과정이 완전히 이루어지고 혈관 조직의 재생이 이루어지면 형성된 fibrin polymer는 혈전 용해계에서 plasminogen이 활성화되어 생성된 plasmin에 의해 용해된다. Fibrin의 용해는 fibrinolysis의 주효소인 plasmin에 의해 일어나지만 plasmin은 혈액 응고에 중요한 fibrinogen에 대해서도 높은 분해 활성을 가지고 있다. 따라서 free한 plasmin이 과량 존재하면 출혈의 위험성이 높게

되므로 이러한 문제를 극복하기 위해 α_2 -antiplasmin과 α_2 -macro-globulin 같은 생체내 억제인자가 존재하고 있다. 또한 plasminogen activator에 의한 plasminogen의 활성화도 fibrin clot이 형성된 곳에서만 일어나도록 plasminogen activator inhibitor(PAI)가 정교하게 조절하고 있다. 정상 조직의 Homogenate는 혈액 응고를 현저하게 증진 시켜준다는 사실은 지난 100여년전부터 잘 알려진 사실로서 여기에 관련되고 있는 물질을 tissue factor라고 명명하게 되었는데 이 tissue factor는 plasma membrane에 가장 많이 존재하는 특이한 transmembrane 당단백질로서 factor III 혹은 thromboplastin으로도 불리어지고 있다. 뇌, adventitia(혈관외막), organ capsules, epidermis(표피)와 같은 다양한 조직은 혈관이 손상을 입어 혈액이 조직에 노출되었을 경우 혈액의 지혈기작을 활성화시킬 필요성을 요구하기때문에 많은 tissue factor를 가지고 있다. tissue factor는 phosphatides, lipoprotein과 cholesterol의 particulate complex로서 다양한 표품의 분자량은 53,000에서 425,000 까지의 범위로 lung, brain, placenta 에서 주로 분리 정제되고 있다. tissue factor는 유기용매 추출에 의해 phosphatides와 apoprotein으로 분리 되는데 apoprotein은 bovine lung apoprotein에는 분자량이 220,000과 330,000의 두종류가 있으며 사람 tissue factor apoprotein은 52,000의 분자량을 가지고 있다. phosphatides 분획에는 sphingosine, phosphatidylinositol, phosphatidyl choline, phosphatidyl ethanolamine 과 phosphatidylserine으로 구성되어 있다. 혈관 손상후 혈액과 접촉하기 시작하는 부위와 조직혈관 외막속에 존재하는 human tissue factor apoprotein은 263개의 아미노산으로 되어있으며 phospholipide와 견고하게 결합되어 있는 integral membrane

glycoprotein이다. 혈액 응고경로중에서 외인성 경로는 tissue factor가 칼슘 이온의 존재하에서 factor VII과 1:1 complex를 형성함으로써 factor VII이 factor VIIa 로 전환됨으로서 응고가 시작된다. Tissue factor와 factor VII은 서로에 대하여 높은 친화력을 가지고 있으며 이들 component는 각각은 procoagulant 활성을 가질 수 없으나 함께 존재할 경우 활성을 나타낸다. Tissue factor의 extracellular 또는 cellular surface domain은 Trp-Lys-Ser의 반복된 서열을 포함하고 49번 Cys와 57번 Cys 그리고 186번의 Cys과 209번의 Cys이 두개의 disulfide bond 결합을 갖는 219개의 잔기로 되어 있다. Tissue factor의 membrane-spanning region 은 23개의 아미노산으로 이 분자의 C-말단의 cytoplasmic portion은 palmitic과 stearic acid에 의해 아실화된 half-Cys 잔기를 가지고 있다. 비록 vascular endothelium은 Tissue factor가 전혀 없거나 미량 존재하지만 phytohemagglutinin, endotoxin, IL-1, TNF, Phobol esters와 thrombin 같은 몇가지 agents에 의한 stimulation에 의해 유도될 수 있다. Tissue factor gene의 transcription은 같은 agonists에 의해 혈액 monocytes에서 증가될 수 있다. Tissue factor는 몇몇 thrombohemorrhagic diseases, thrombogenesis, hemostasis와 coagulation의 regulation과 initiation속에서 다른 cellular receptor와 함께 증추적인 역할을 한다고 생각되어지고 있으며 plasma coagulation molecule과 비교하여 자연적으로 발생하는 돌연변이에 의한 질병과 physiology에서 그들의 역할에 대해서 상당한 지식을 얻을 수 있다. human plasma 속에서 heterologous tissue factor 의 상대적인 coagulant 활성은 진단학적인 중요성을 가진다.

Fibrinogen은 여섯 개의 복합단백질 사슬이 disulfide bond에 의해서

형성된 340,000 Da의 인단백질이며 이 단백질은 혈액에서 존재하는 단백질로 혈액응고에 관련된 중요한 기능을 담당하는 생체내 단백질로 존재하는데 대부분이 간에서 합성되어 혈류속으로 유입된다고 알려져 있다. 최근의 연구보고에 따르면 개의 Fibrinogen이 생체내에서 인산화된 형태로 방출된다는 보고가 있었으며 또한 인간의 혈액세포에서도 단백질 Kinase를 발견하였으며 이를 바탕으로 몇가지 종류의 단백질 Kinase 즉 Protein Kinase C, Casein Kinase I, Casein Kinase II로 Fibrinogen을 인산화 하였으며 이에 따른 생물학적 활성을 측정해 본 결과 다른 단백질 Kinase 보다 Casein Kinase II가 높게 나타난 보고가 있었다. 생체외 에서 인산화 과정에 따른 신호 전달에 관한 연구가 많은 과학자에 의 해서 연구되었으며 Fibrinogen에 인산화 되는 부위도 현재 알려져있다. 그러나 Fibrinogen이 인산화 되었을 때 물리역학적인 명확한 메카니즘이 알려져 있지 않으며 단지 혈액의 응고 시간을 촉진한다는 보고가 있으며 또한 Thrombin에 의해서 인산화 된 Fibrinogen이 Fibrin될 때 어떠한 구조변화와 그에 따른 분자생물학적인 기능의 변화에 실험의 목적을 정했다. 또한 인산화된 Fibrinogen의 인산화 메카니즘과 그에 따른 구조 변화를 연구하기 앞서 인산화된 Fibrinogen를 순수 분리하고 전구물질인 Fibrinogen의 Gelation비교 결과를 보고자 한다.

최근의 생명공학 기술이 발전함에 따라 단백질 공학적인 방법으로 Fibrinogen의 분자구조를 변경함으로써 더 큰 안정성과 기능성이 높은 단백질을 개발하려는 노력은 국내외적으로 활발히 진행중이며 이에 발맞추어 더욱 기능성이 향상된 단백질을 산업적으로 이용할 수 있는 노력이 따른다면 지금까지 Fibrinogen에 대해서 여러 가지 실험을 통해 얻어진 결과들은 의료과학계에 커다란 공헌을 하게 될것이고 그 만큼

그 실험들이 가치있는 일이라고 생각되어지고 상업적 가치를 더 한층 배가 시킬만한 결과 들이 이루어질것이다.

우리몸이 여러 가지 외부자극에 의해 상처를 입었을 때 출혈이 계속된다면 생명을 유지하기가 힘들어질 것이다. 그런 불상사를 예방하기 위해 우리몸은 분출되는 혈액을 어느정도 시간뒤에 덩어리지게 하는 하나의 방어막을 형성하게 된다. 이것은 더 이상의 출혈을 막을 뿐만 아니라 바이러스나 세균같은 이물질들이 상처를 통해 직접 혈액으로 침입하지 못하도록 하는 바리케이트 역할 까지도 수행한다는 장점을 가지고 있다. 그러므로 혈액응고 인자중에서 초기 반응을 시작하는 tissue factor만큼이나 중요한 단백질인 것이다. 지금까지 fibrinogen에 대해서 여러 가지 실험을 통해 얻어진 자료들은 의료계에 커다란 공헌을 하게 될것이고 그 만큼 그 실험들이 가치있는 일이라고 생각되어진다. 이를 반영하듯 fibrinogen에 대한 연구는 많이 진척되어 fibrinogen의 반응기작 및 구조와 기능 그리고 분자생물학적인 수준까지 시도되어 상업적 가치를 더 한층 배가 시킬려는 노력들이 이루어지고 있다.

위에서 언급했듯이 fibrinogen이 가지는 중요성은 매우크므로 그 실험 결과 만들어지는 파급효과라는 것은 더더욱 말할것도 없을 것이라고 사료되어진다. fibrinogen 실험의 궁극적 목적은 fibrinogen이 가지는 기능 즉 혈액응고에 관련된 부분이 현 의료계에서 지대한 부분이 될것이라고 여겨진다.

선진국에서 개발된 혈액 응고인자 제제의 지혈제는 대부분 recombinant이거나 혈액추출 제제들이다. 그러나 이러한 혈액응고 인자 제제들은 혈액에서의 추출시 효능은 좋으나 비용이 많이들며 recombinant를 이용했을 경우에는 효능이 떨어지고 부작용의 위험이

있기 때문에 많은 문제점을 안고 있으나 값싸고 안전한 혈액응고 인자 대체 단백질의 개발로 이러한 문제점을 해결해 나갈 수 있기 때문에 새로운 혈액응고 인자 대체 단백질을 개발하기 위한 노력이 선진국을 중심으로 치열하게 전개되고 있으나 아직 괄목할 만한 연구 결과는 없는 편이다. 그렇기 때문에 혈액응고 인자 대체 단백질 개발에 대한 연구는 새로운 idea개발과 같은 노력으로 국내 연구 수준으로도 접근할 수 있어 외국과의 경쟁 가능성이 매우 높다.

혈관이 손상되었을 때, 일련의 과정에 의해 용액상태의 혈액이 gel로 변환된다. 이과정의 중요성은 혈액의 흐름을 막는 지혈을 유도한다는 데 있다.

정상적인 지혈의 중요성은 심한 hemorrhagic diathese나 hemophilias를 고려할 때 명백해진다. 즉 혈액의 흐름도 중요하지만 지혈도 또한 생명을 유지하는데 필수적이다. 대부분의 혈액응고인자는 비활성 zymogen으로 존재하며 순차적으로 활성화되어 다음 단계의 혈액응고인자를 활성화시킨다. 활성화된 zymogen은 trypsin-like serine endopeptidase가 된다. 혈액응고계 반응의 각 단계에는 Ca^{++} 가 필요하며, Factor II, VII, IX, X, protein C와 protein S는 N-terminal 근처의 glutamic acid의 posttranslational carboxylation을 통해 gamma carboxyglutamic acid residue(Gla)를 형성하는데 vitamin K를 필요로 한다. Gla는 Ca^{++} 을 결합하여 혈액응고인자가 phospholipid 표면에 모일 수 있게 calcium 가교를 형성한다(3)

혈액응고계는 intrinsic pathway와 extrinsic pathway를 통해 factor X이 활성화 되고 이어 common pathway를 통해 thrombin을 생성한 다음 fibrin을 형성하는데, 각각 contact activation system, intrinsic TENase, extrinsic TENase 및 prothrombinase등과 같이 관련 혈액응고

계 인자들이 복합체를 이루어 반응함으로써 효율이 극대화된다(4). Intrinsic pathway는 체내에서는 손상된 혈관의 subendothelial surface, 체외에서는 유리 또는 kaolin같은 음전하를 띠는 표면에 접하면 활성화된다. 즉 factor XII는 음전하 표면에 부착되면 형태의 변화를 초래하여 활성화되어 prekallikrein을 kallikrein으로 변화시킨다. 반면 extrinsic pathway는 혈관내피세포에서 유리되는 tissue factor에 의해 활성화된다.

혈액응고에 관여하는 인자들의 전구체의 활성화는 응고의 시작단계에 의존한다. 이 초기 과정에 관여하는 인자가 바로 tissue factor이다. Tissue factor(TF)는 세포의 표면에 존재하는 당단백질이며, 세포막을 관통하는 수용체로써 extrinsic과 intrinsic 혈액응고 과정을 개시한다(5,6,7,8) Human cDNA 클로닝으로 밝혀낸 바에 의하면 263개의 아미노산으로 구성되며, 세 개의 domain을 지닌다(9,10,11) 1-219번째 아미노산까지는 extracellular domain이며 220-242까지는 transmembrane domain, 그리고 243-263까지는 cytoplasmic domain이다. TF는 혈액응고 인자 Factor VII 과 결합하여 단백질 분해에 의한 Factor VIIa 로의 전환을 증진한다. 결국 TF와 Factor VIIa의 active한 복합체는 제한된 단백질 분해에 의해 Factor IX를 IXa로 그리고, X를 Xa로 변환시켜 이하의 응고단계를 진행시킨다. TF의 생화학적 측면은 haemostasis 와 다양한 병리학적 현상에 관여한다. 정상적인 생리적 조건하에서 extravascularcell 과 perivascular cell에서 발현된다(12) 혈관의 손상은 혈액 내에서 순환하는 응고인자들이 perivascular layer에서 TF와 접촉하는 기회를 제공하며 이것이 응고 과정을 개시한다.

응고의 주된 경로는 Factor VII 또는 Factor VIIa 와 TF의 촉매적 복

합체의 형성에 의해 시작된다. 효소들과 그들의 보조인자 사이의 복합체 형성은 되풀이하여 일어나며, 반면에 TF는 완전하게 활성화된 상태로 존재하므로 변형된 필요가 없다. 조효소들과 tissue factor 그리고 Factor V 과 VII는 plasma membrane에 존재한다. 이 때문에 Tissue factor에 의존하는 응고반응들은 사실상 편재화 되어있다(13, 14)

따라서, 본 연구의 주된 목적은 혈액응고반응의 초기에 관여하는 Tissue factor를 human으로부터 일련의 유전자적 조작을 통하여 발현시킨후, 대량생산 체제를 구축하고자 하는 것이다.

제 2 장 국내 · 외 기술개발 현황

혈액 응고인자를 이용한 지혈제제로는 Novo-Nordisk APR의 factor VII, Rhone-Poulenc Rorer, Genetics institute Baxter international MAR, Genentech Bayer, Sclavo, Chiron Novo-Nordisk APR, Kabi-Pharmacia, Viagene Bayer Genentech APR 등의 factor VIII, Immuno Nov, Green cross, Rhone-Poulenc Rorer APR, Kabi pharmacia, Cell Genesys APR, Emisphere Technologies Nov, Genentech MAR, Novo-Nordisk APR의 factor IX, Novo-Nordisk APR, Hoechst 등의 factor XIII, Genentech Baxter international의 Tissue factor 등이 생산되고 있으며 이것들은 대부분 recombinant 이거나 혈액 추출 제제들이다. 그러나 이러한 혈액 응고인자 제제들은 혈액에서의 추출시 효능은 좋으나 비용이 많이들며 recombinant를 이용했을 경우에는 효능이 떨어지고 부작용의 위험이 있기 때문에 많은 문제점을 안고 있으나 값싸고 안전한 혈액 응고인자 대체 단백질의 개발로 이러한 문제점을 해결해 나갈 수 있다.

혈전 응고인자 또는 섬유소 용해계 효소가 모두 serine protease임에 대해 factor XIII_a는 transglutaminase 작용을 갖는 SH 효소이다. 혈중의 factor XIII는 30-34만의 당단백질로서 분자량 75-81 kDa의 a(A) 사슬과 76-88 kDa의 b(S)사슬로 이루어진 tetramer a₂b₂이며, thrombin에 의해 a사슬로부터 peptide가 유리되어 중간체 a₂'b₂가 되며 Ca²⁺에 의해서 a₂'과 b₂로 해리되는 동시에 a₂'는 a₂"로 활성화된다. 현재 국내의 경우 혈액 응고 인자 관련 지혈제는 생명공학 연구소와 몇몇 제약회사를 중심으로 연구되고 있으나 그 연구 상황이 아직은 미

미한 형편으로 이연합성이 소혈장에서 분리한 thrombin, 트롬보키나제와 녹십자의 HICON VIII가 유일하게 국내 기술로 생산되고 있는 것이며 그 밖에 한독약품의 수입제제와 근화제약, 삼일제약 등에서 수입하는 thrombin 등이 있다. 혈액 응고 인자에 대한 연구는 전무한 상태로 항혈전성 물질의 분리 정제를 시도하여 구조적, 생화학적 성질을 규명하고자하는 연구가 연구소 학교 등 몇몇 실험실에서 이루어지고 있는 정도이다.

분자생물학적 생화학적 측면에서의 tissue factor에 대한 접근은 많이 이루어져 있는 상태이다. Human kidney 293 세포와 *E. coli*에 의해 생산된 recombinant tissue factor가 동일한 활성을 갖고 있으며(15), 생물학적 기능을 유지하기 위해서는 lipid와의 결합이 필요한 것으로 보고되었다(16) 또한 extracellular domain(1-219)만을 *Saccharomyces cerevisiae*와 *E. coli*에서 발현시켰을 때에도 동일한 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다(17)

최근의 연구에 의하면 tissue factor는 fibrin 형성, atherogenesis, angiogenesis 그리고 tumor cell migration을 포함하는 몇몇 중요한 생물학적 과정에 관련되어 있는 것으로 확인되었으며, Endothelial cell의 경우 tissue factor가 cell surface에서는 발현이 되지 않지만, cytokine과 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 자극에 의해 발현이 유도됨이 보고되었다(18)

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 실험재료 및 방법

1. 실험재료

DNA 조작에 필요한 제한효소 및 modifying enzymes은 Promega (Madison, WI, USA), New England Biolabs(Beverly, MA, USA), KOSCO Biotech(한국) 에서 구입하여 사용하였다. DNA 염기서열 결정 실험은 United States Biochemical(Cleveland, OH, USA)의 Sequenase version 2.0 kit를 사용하였고 PCR반응에 필요한 중합효소는 Perkin-Elmer(Foster, CA, USA)의 AmpliTaq™ DNA polymerase를 사용하였다. Oligonucleotides는 (주)바이오니아에 의뢰하여 Applied Biosystems(Foster, CA, USA)의 DNA synthesizer Model 380A 기계를 이용, 합성 후 polyacrylamide gel 전기영동에 의하여 분리정제한 것을 사용하였다. 세포배양용 배지 및 시약은 GIBCO/BRL(Grand Island, NY, USA)에서 tissue culture grade를, 일반 chemical 들은 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA) 등에서 reagent grade를 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

가. 혈전 생성 활성 측정

트롬빈 0.8 ml(0.25 NIH Unit에 해당)와 12mM MgCl₂, 1mM ATP를 포함하는 100mM Tris-Cl 완충액(pH 7.4)에 casein kinase-II를 용해시킨 용액을 전혈 1ml에 넣어 25°C에서 5분간 방치하여 혈전 형성 정도를 분석하였다.

나. Fibrinogen의 분리

Sigma 회사로부터 구입한 Fibrinogen을 SDS-PAGE 로 확인한 결과 다른 단백질들이 검출되어 4°C에서 12,000rpm에서 1시간동안 원심분리하는 glycine 응집 방법을 사용하여 실험 조건에 부합되는 Fibrinogen을 취한 다음 2.2 M glycine 용액에 녹인 Fibrinogen을 다시 0.1M Tris-HCl (pH 7.5)용액중에서 2일 동안 투석을 실시하고 순도를 SDS-전기영동과 HPLC에서 확인하였다.

다. Fibrinogen 의 Gelation 분석

12mM MgCl₂ 가 포함된 100 mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4) 1 ml에 피브리노겐 1.2 mg의 농도로 녹인 용액의 0.7 ml과 트롬빈(1NIH Unit/ml), CK-II(40 nUnit/ml), polylysin(0.05 to 0.25 mg/ml), spermine(0.2 mg/ml)과 spermidine(0.2 mg/ml)들의 조합에 의한 용액의 0.3 ml을 혼합하여 25°C에서 잘 섞어주고 방치한 후에 633 nm에서 나타나는 흡광도로서 Fibrinogen 의 Gelation정도를 측정하였다.

라. Protein Kinase 효소 반응

단백질 농도가 결정된 상기의 Fibrinogen 일정량에 ml 당 0.5 mU에 해당되는 Casein Kinase-II, 10mM MgCl_2 , ATP을 넣어 Fibrinogen과 잘 섞어준 다음 실온에서 1시간동안 방치하여 기질에 인산화 반응을 시켰다.

마. HPLC상에서 인산화 Fibrinogen의 분리 및 확인

단백질의 분리 정제 혹은 확인 은 고압 액체 크로마토그래피를 이용하였다. Beckman 회사(모델 Gold system), C_{18} Column (YMC-Pack ODS-AP)을 이용하였다. 인산화된 Fibrinogen 250 μl 취하여 미리 0.1% TFA(Trifluoroacetic acid) 용매로 평형화시켜둔 column에 주입시킨 후 시료를 90% acetonitrile 용매를 이용하여 linear gradient로서 1 ml/min 의 속도로 용출시키고 225nm에서 용출액을 검출하였다.

바. 트립신 효소에 의한 펩타이드 분리

피브리노겐의 인산화시킨 후 얻어지는 인산화 펩타이드를 확인하기 위하여 인산화시킨 피브리노겐과 천연의 피브리노겐을 되도록 소량의 50 mM ammonium acetate Buffer(pH 8.0)에 녹인다음 미리 완충용액으로 녹여둔 TPCK-Trypsin을 처리하는 피브리노겐의 100분의 1에 해당되는 양을 넣어준 후 37°C에서 4시간동안 반응시켰다. 반응시킨 용액에 trypsin inhibitor를 넣어 주어 반응을 완료시킨 다음 HPLC상에서 C_{18} Column(ODS column, 4.6 X 250 mm)을 이용하여 분석하였다.

사. 시간에 따른 단백질 Kinase 처리 한 Fibrinogen의 HPLC 분석

Fibrinogen의 인산화 메카니즘을 분석하기위해 단백질 Kinase을 처리

한 시간 부터 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 180분 마다 2mL씩 검출하여 2.2M glycine으로 응집시킨다음 다시 2번의 glycine으로 씻어주고 Tris-HCl (pH7.5)용매에 녹였다. 다음으로 각 Fibrinogen에 Thrombin을 처리하여 gelation을 시킨다음 12,000rpm 10분 4°C 원심분리후 상등액을 얻은 다음 위에서 사용한 Beckman C₁₈ Column으로 HPLC분석을 하였다.

아. Gelation 효과 측정

Fibrinogen이 중합체를 형성하는 Gelation효과를 측정하기 위한 방법으로 피브리노겐에 트롬빈을 처리하여 피브리노겐에서 펩타이드가 절단되어 얻어지는 피브린이 중합체를 형성되므로서 흡광도 면에서 통과하는 빛의 투과율이 저하되는 성질을 이용하여 Spectrophotometer (Beckmann회사, model 70U)로 Gelation 되어지는 시간을 측정하였다. 일정량의 피브리노겐이 Gelation이 형성되는데 필요한 시료를 첨가하고 잘 섞어준 즉시 Spectrophotometer상에서 방치하여 Gelation 정도를 633nm에서 일정한 흡광도를 유지할 때까지 매분간격으로 측정하였다.

자. 단백질 N-말단 아미노산 배열 분석

분리 정제된 단백질의 아미노 말단의 아미노산 배열을 결정하기 위하여 먼저 일정량을 SDS-폴리아크릴아미드 겔에 전기영동한 후 얻어진 단백질을 electrotransfer 장치(Hoeffer회사)를 이용하여 Towin의 방법에 따라 PVDF 막에 옮기고 Coomassie blue로 염색한 후 해당 밴드를 잘라낸 시료를 기초과학지원센터에 의뢰하여 Edman degradation과 HPLC 방법에 의한 peptide

sequencing을 시행하였다.

차. 사람 tissue factor 유전자의 분리 및 클로닝

사람의 태반으로부터 total RNA를 추출하여 reverse transcription 방법으로 cDNA를 얻었다. 이 cDNA로부터 두 개의 primer를 디자인하여 PCR(polymerase chain reaction)을 통해 사람 tissue factor의 유전자를 증폭하였다. 디자인한 각각의 primer는 HNp(cgg gat cca act ggt aga cat g)와 HCp(ggg gta cca gaa tgc taa tgg t)이며, HNp는 human tissue factor의 N-terminal 부위에 해당하는 DNA의 염기서열을 참조하였고, HCp는 C-terminal 부위의 염기서열을 참조하였다(그림. 23). PCR은 94°C에서 1분간의 denaturation, 54°C에서 1분간 annealing, 그리고 72°C에서 1분간의 polymerization을 시켰다. 이 증폭된 DNA는 TA vector를 이용해 ligation한 후 *E. coli* DH5 α 에 transformation시켰다. 여기에서 얻어진 recombinant DNA를 expression vector (pRSET A, B, and C, Invitrogen)에 옮긴 후 다시 *E. coli* BL21을 이용해 transformation시켜 protein expression을 준비하였다(그림. 24).

카. 대장균을 이용한 사람 tissue factor의 발현

위에서 얻어진 *E. coli* transformant를 이용한 tissue factor 단백질의 정제는 먼저 올바른 사람 tissue factor 유전자를 지니고 있는 *E. coli* BL21 균주를 포화 농도까지 배양하였다(그림. 25). 이를 500 ml의 LB media에 접종한 후 cell의 농도가 $A_{595} \cong 0.5$ 가 될 때까지 배양하여 IPTG를 최종 1 mM이 되게 첨가하였다. 첨가한 후 18시간을 더 배양하여 cell 내에서 사람 tissue factor의 단백질이 충분히 생성되도

록 유도한 다음, 배양액을 원심 분리하여 상등액은 버리고 침전물을 얻었다(그림. 26).

타. 사람 tissue factor의 발현 정제

변이 대장균의 사람 tissue factor 단백질의 정제는 Lin et al(20)의 방법에 의해서 정제하였다. 대장균에서의 사람 tissue factor의 단백질은 inclusion body의 상태로 존재하기 때문에 원심분리하여 얻어진 pellet 상태의 cell을 최소량의 100 mM phosphate saline 완충액(pH 7.5)(5 mM EDTA, leupeptin(1 μ g/ml), aprotinin(20 μ g/ml), PMSF(0.5 mM) 함유)으로 잘 녹인 다음 sonication을 통해 lysis 시켰다. 여기에 RNase A(10 μ g/ml;최종농도)과 DNase I(40 μ g/ml;최종농도)을 첨가하고 실온에서 10분간 방치시켰다. 방치후 13000 \times g에서 10분간 원심 분리하여 얻어진 침전물을 25% sucrose, 5mM EDTA, 1% Triton X-100을 포함하는 40ml의 phosphate-saline 완충용액 W에 resuspend 하여 얼음상에서 10분간 방치하였다. 이 단계를 두 번 반복하여 세포 내에 존재하는 대장균의 단백질들과 lipid 성분을 제거한 후, 10 ml의 buffer D(50 mM Tris.Cl(pH 8.0), 5 M guanidinium chloride, 5 mM EDTA)를 첨가하여 sonication을 통하여 pellet을 녹였다. 이것을 2 M Urea를 이용하여 이틀간 dialysis 시킨후, 2.5 mM의 GSH와 0.5 mM의 GSSG를 첨가하여 12시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 섞어주었다.

제 2 절 실험결과

1. Fibrinogen의 분리

Fibrinogen은 여섯 개의 복합단백질 사슬이 disulfide bond에 의해서 형성된 340,000 Da의 인단백질이며 이 단백질은 혈액에서 존재하는 단백질로 혈액응고에 관련된 중요한 기능을 담당하는 생체내 단백질로 존재하는데 대부분이 간에서 합성되어 혈류속으로 유입된다고 알려져 있다. 최근의 연구보고에 따르면 개의 Fibrinogen이 생체내에서 인산화된 형태로 방출된다는 보고가 있었으며 또한 인간의 혈액세포에서도 단백질 Kinase를 발견하였으며 이를 바탕으로 몇가지 종류의 단백질 Kinase 즉 Protein Kinase C, Casein Kinase I, Casein Kinase II로 Fibrinogen을 인산화시켜서 이에 따른 생물학적 활성을 측정해 본 결과 다른 단백질 Kinase 보다 Casein Kinase II가 높게 나타난 보고가 있었다. 생체외에서 인산화 과정에 따른 신호 전달에 관한 연구가 많은 과학자에 의해서 연구되었으며 Fibrinogen에 인산화 되는 부위도 현재 알려져있다. 그러나 Fibrinogen이 인산화 되었을 때 물리역학적인 명확한 메카니즘이 알려져 있지 않으며 단지 혈액의 응고 시간을 촉진한다는 보고가 있으며 또한 Thrombin에 의해서 인산화된 Fibrinogen이 Fibrin으로 될 때에 어떠한 구조변화를 가져오며 변화된 구조에 의해서 그에 따른 분자생물학적인 기능의 변화로서 이를 이용한 혈액 응고 촉진 효과를 가져올 수 있는 가능성 여부에 그 실험의 목적을 정했다. 또한 인산화된 Fibrinogen의 인산화 메카니즘과 그에 따른 구조 변화를 연구하기 앞서 시중에 시판되고 있는 Fibrinogen으로 탐색 실험을 시도하였으나 순도면에서의 차이로 재현성을 갖고,

Fibrinogen에 인산화를 시키기위해서는 먼저 Fibrinogen를 순수 분리해야 하는 결론을 얻어 Fibrinogen의 순수 분리를 시도하고 이를 이용한 Fibrinogen의 Gelation 정도를 탐색하여 보았다.

먼저 상업적으로 시판되는 fibrinogen의 순도를 전기영동으로 확인하여 순수한 fibrinogen을 2.2M glycine처리 함으로서 얻을 수가 있었다. 그런다음 HPLC chromatography와 전기영동으로 확인한 결과 순수한 fibrinogen만을 얻을 수 있었다. 다음으로 fibrinogen에 인산화를 다음과 같은 시료들을 혼합해서 반응을 하였다. 즉 casein kinase II, $MgCl_2$, ATP을 실온에서 1시간 반응을 하여서 인산화 과정을 하였다. 인산화 과정이 끝나자마자 즉시 2.2M glycine을 처리하여 casein kinase II, $MgCl_2$, ATP을 씻어내었다. 다시 인산화된 fibrinogen의 gelation을 확인하기 위하여 thrombin을 처리하여 gelation되는 속도를 spectrophotometer로 확인을 하였다. 인산화된 fibrinogen과 인산화 처리을 하지않은 fibrinogen을 C_{18} HPLC chromatography방법으로 분석하여 인산화된 fibrinogen을 비교 확인할 수 있었다(그림.1).

인산화된 fibrinogen을 thrombin처리했을 때 gelation되는 시간이 인산화 하지않은 것에 비해서 gelation시간이 크게 증가한 것을 볼 수 있었다. 즉 인산화 과정에서 fibrinogen의 구조변화가 생겨 thrombin이 활성을 나타내면서 fibrinogen의 기능을 증가시키는데 기여하지 않았나 보아진다. 또한 인산화된 fibrinogen을 증명하기 위해 HPLC chromatography방법으로 분석한 결과 결과 인산화 되어진것과 않된 것을 확인할 수 있었다. 아직 임상실험에 들어가지 않았지만 인산화된 fibrinogen을 분리 정제 후 사용한다면 매우 가치가 있을 것이다. 또한 인산화된 fibrinogena의 정확한 기작을 연구함으로써 새로운 기작

의 체계를 알 수 있을 것이며, 나아가 산업응용으로 확대해서 적용한다면 유용한 생물자원이 될것이다.

Fibrinogen은 Glycine에 의해서 단백질이 응집되므로 이를 응용한 분리 방법을 이용하여 분리된 Fibrinogen을 역상 고압 액체 크로마토그래피상에서 분석한 결과 단일한 밴드로서 순수한 단백질을 얻을 수 있었다. 또한 SDS-전기영동 상에서 분석한 결과 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 의 fibrinogen 단백질 밴드를 확인할 수 있었다. 이러한 방법으로 분리 정제된 fibrinogen을 실험시의 재료로서 이용하였다.

먼저 상업적으로 시판되는 fibrinogen의 순도를 전기영동으로 확인하여 순수한 fibrinogen을 2.2M glycine처리 함으로서 얻을 수가 있었다. 그런다음 HPLC chromatography와 전기영동으로 확인한 결과 순수한 fibrinogen만을 얻을 수 있었다. 다음으로 fibrinogen에 인산화를 다음과 같은 시료들을 혼합해서 반응을 하였다. 즉 casein kinase II, $MgCl_2$, ATP을 실온에서 1시간 반응을 하여서 인산화 과정을 하였다. 인산화 과정이 끝나자마자 즉시 2.2M glycine을 처리하여 casein kinase II, $MgCl_2$, ATP을 씻어내었다. 다시 인산화된 fibrinogen의 gelation을 확인하기 위하여 thrombin을 처리하여 gelation되는 속도를 spectrophotometer로 확인을 하였다. 인산화된 fibrinogen과 인산화 처리를 하지않은 fibrinogen을 C_{18} HPLC chromatography방법으로 분석하여 인산화된 fibrinogen을 비교 확인할 수 있었다.

인산화된 fibrinogen을 thrombin처리했을 때 gelation되는 시간이 인산화 하지않은 것에 비해서 gelation시간이 크게 증가한 것을 볼 수 있었으며 실제적으로 전혈에 대한 CK-II 효소의 혈액 응고 활성 정도를 비교하여 보았다(그림. 6). 즉 인산화 과정에서 fibrinogen의 구

조변화가 생겨 thrombin이 활성을 나타내면서 fibrinogen의 기능을 증가시키는데 기여하지 않았나 보아진다. 또한 인산화된 fibrinogen을 증명하기 위해 HPLC chromatography방법으로 분석한 결과 결과 인산화되어진것과 아님된 것을 확인할 수 있었다. 또한 인산화된 fibrinogen의 정확한 기작을 연구함으로써 새로운 기작의 체계를 알 수 있을 것이며, 나아가 산업 응용으로 확대해서 적용한다면 유용한 생물자원이 될것이다.

한편 피브리노겐의 인산화에 따른 혈액응고 활성의 증진을 확인하고 있으나 이러한 작용 기작을 이루기 위해서는 트롬빈의 존재가 절대적으로 필요하다. 즉 지혈을 필요로하는 경우 의료용 트롬빈제재가 다량 필요로하며 이를 원료로서 공급이 원활하도록 소의 혈액에서 트롬빈을 정제하였다. 소의 혈액을 구입 즉시 Alserver's 용액을 처리한 후 에탄올을 넣어 얻은 침전물을 원심 분리하여 침전물을 회수하였다. 침전물을 완충용액으로 녹인다음 DEAE-Toyopearl 컬럼에 흡착시켜 프로트롬빈을 용출시켰다(그림. 7). 용출된 단백질을 활성화시킨 다음 트롬빈에 해당되는 부분을 모아서 효소로 활성화 시킨다. 활성화된 트롬빈을 분획을 다시 컬럼에 흡착시켜 용출시킨 후 각 분획을 SDS-전기영동으로 트롬빈의 분획을 확인하였다(그림. 8). 순수 분리된 단백질의 아미노산 배열을 결정과 APTT 시간을 측정하여 트롬빈임을 확인하였다.

2. 인산화 Fibrinogen의 역상 고압 액체 크로마토 그래피

Casein kinase-II로 fibrinogen을 인산화 시킨 후에 인산화 시키지 않은 피브리노겐과 함께 Fibrinogen을 역상 HPLC로 분석한 결과, 인산화된 Fibrinogen이 용출되는 시간이 인산화시키지 않은 본래의 피브리노

겐보다 빠르게 용출되고 있다는 것을 확인하였다. 이러한 현상은 protein kinase에 의해서 Fibrinogen에 인산기가 첨가되므로써 본래의 단백질 성질이 소수성으로 치환되어 역상 column에 결합하는 정도가 다르게 나타나고 있음을 알 수 있으며 이를 이용하여 인산화된 피브리노겐을 서로 분리가 가능함을 제시하고 있다 (그림. 2).

3. 인산화 Fibrinogen의 펩타이드 비교

피브리노겐에 인산기의 결합에 있어서 결합 부위의 펩타이드를 확인하기 위하여 피브리노겐에 인산기를 결합시킨 후에 펩타이드 mapping을 시도하였다. 기존의 피브리노겐과 인산화 시킨 피브리노겐에 일정량의 트립신 효소를 처리한 후 각각을 HPLC로 비교한 결과 용출 시간에서 차이를 나타내는 2개의 펩타이드 물질이 존재하고 있음을 확인하였다 (그림. 3).

4. 인산화된 Fibrinogen의 Gelation 분석

Protein kinase인 CK-II를 Fibrinogen의 농도에 따라(...;10 nM, △;7nM, ○;5nM) 처리한 시료와 처리하지 않은 Fibrinogen의 농도 (...;10nM, ▲;7nM, ●;5nM)의 Thrombin에 의한 Gelation되는 속도가 Kinase을 처리한 피브리노겐 즉 인산화된 피브리노겐이 gelation 되는 속도가 농도에 따라 현저하게 증가한 것을 볼 수 있었다(그림. 5). CK-II의 Kinase 활성으로 인산기의 결합에 의한 Fibrinogen의 구조적인 변화가 Thrombin의 활성 즉 피브리노겐의 펩타이드 절단과 동시에 피브린 중합체 형성이 촉진되도록 기여한 것으로 보인다. 한편 인

산화된 Fibrinogen를 단백질 Kinase을 처리한 시간 부터 10분 간격으로 반응 용액으로부터 일정량의 시료를 취하여 시간별로 역상 HPLC상에서 분석한 결과, 피브리노겐이 인산화되고 중합체를 형성한 후 90분 정도 경과된 후에 피브리노겐에서 유래된 펩타이드성 물질이 생성되고 있음을 확인할 수가 있었다 (그림. 4).

5. sphingolipid의 gelation 효과

상기의 결과로부터 CK-II 효소에 의한 fibrinogen에의 인산화는 피브리노겐의 gelation을 촉진시키고 있음을 확인하였다. 한편 blood factor의 조절과 동시에 지혈 작용의 조절에서 tissue factor에 의해서 factor VII이 활성화되고 이것이 피브린의 중합체를 형성시켜 혈액 응고 활성이 나타나게 하는 작용 기작에서 tissue factor가 존재하지 않는 상태에서도 phospholipide vesicle에 의해서 factor VII가 활성화 되었다는 결과를 Ilno, M et. al 이 보고하였다. 이러한 결과로부터 sphingolipid 에 의한 fibrinogen의 중합체 형성 즉 gelation에 lipid의 효과가 있을 수 있다는 가정하에 sphingolipid의 효과 정도를 확인하여 보았다. 트롬빈에 의해서만 형성되는 피브린의 중합체 형성 정도는 인산화된 피브리노겐에서 두세배의 gelation 정도가 증가하고 있는 것을 알 수 있으며(그림. 9) 여기에 sphinglipid 의 첨가는 gelation의 형성 시간을 신속히 촉진할 뿐만아니라 중합체가 형성되는 양에서도 현저하게 촉진되고 있는 결과를 얻었다 (그림. 10).

한편 sphingosin과 CK-II이 피브리노겐의 gelation의 효과를 상승시킨다는 결과로부터(그림. 11) 여러 sphingosin 유도체 즉 sphingomyelin, C₂-ceramide sphingosine-1-phosphate, 들의 효과를

측정하였다(그림. 12). 이들 유도체들의 농도 변화에 따른 피브리노겐의 gelation 효과를 측정한 결과 거의 유사한 결과를 얻었다. 이러한 결과로부터 sphingosin과 CK-II는 피브리노겐의 gelation을 촉진시키는데 효과가 있음을 증명하였다.

6. polycationic compound의 gelation 효과

피브린의 중합체 형성은 혈액 응고과정에서 가장 중요한 부분이다. 이러한 피브리노겐의 gelation에 CK-II이 관여하고 지질의 효과를 확인하였다. CK-II의 효소 활성의 증대에 polycationic compound 즉 polyamine, spermine, spermidine이 관여하고 있다는 보고에 따라 이들이 피브리노겐의 gelation에 대한 영향을 타진하여 보았다. polylysine이나 polyamine 들의 자체만으로는 피브리노겐의 gelation 증진 효과에는 관여하고 있지 않았으나 CK-II와 동시에 첨가하였을 경우에는 CK-II만이 존재했을 경우보다 큰 효과를 나타내고 있었다(그림.13-15).

이와같이 피브리노겐의 gelation에 대해서 얻어진 결과로부터 이러한 polycationic compound가 혈소판 응집에 대해서는 어떠한 효과를 나타내는가를 확인하여 보았다(그림. 16-19). 혈소판을 응집시키는 결과는 CK-II와 polycationic compound를 첨가한 결과는 피브리노겐의 gelation에서 얻어지는 결과와 거의 유사한 결과를 얻는다는 사실을 알았다. 혈소판이 응집 효과는 나타내기 위해서는 혈소판 자체의 응집이 일어나기도 하지만 혈소판이 혈전 플러그를 형성하거나 혈전이 형성되는데 관여되어 응집 현상이 일어난다는 사실은 이미 잘 알려진 사실이며 혈소판 응집이 되도록 혈소판 사이에 피브린의 결합으로 다중

구조적인 결합이 형성되도록 유도되는 것으로 알려져 있다. 따라서 이와같이 얻어진 결과는 혈소판 자체의 응집보다 피브리노겐의 gelation에 관여하여 혈소판 응집의 효과가 더욱 크게 관여된 것으로 추정된다.

이와같은 결과는 혈액에서 세포자체 혹은 세포간의 phosphorylation의 효과는 미량의 혈장 protein kinase와 ATP의 존재로도 혈액 응고 효과가 이루어질 수 있다는 것과 트롬빈이 활성화 되었을 경우 방출된 protein kinase에 의해서 혈소판의 세포 표면에서 응집이 쉽게 형성될 수 있다는 것과 CK-II의 활성화는 생리학적으로 중요한 위치를 가지고 있는 결과를 얻었다.

7. APTT를 이용한 사람 tissue factor 활성화

혈액응고에 관여하는 인자들의 전구체의 활성화는 응고의 시작단계에 의존한다. 이 초기 과정에서 최초로 관여하는 인자가 바로 tissue factor로서 중요한 인자이다. Tissue factor는 세포의 표면에 존재하는 당단백질이며, 세포막을 관통하는 수용체로써 extrinsic과 intrinsic 혈액응고 과정을 개시한다(5, 6, 7, 8) Human cDNA 클로닝으로 밝혀낸 바에 의하면 263개의 아미노산으로 구성되며, 세개의 domain을 지닌다(9, 10, 11) 1-219번째 아미노산까지는 extracellular domain이며 220-242까지는 transmembrane domain, 그리고 243-263까지는 cytoplasmic domain이다. Tissue factor는 혈액응고 인자 Factor VII 과 결합하여 단백질 분해에 의한 Factor VIIa 로의 전환을 증진한다. 결국 Tissue factor와 Factor VIIa의 active한 복합체는 제한된 단백질 분해에 의해 Factor IX를 IXa로 그리고, X를 Xa로 변환시켜 이

하의 응고단계를 진행시킨다. 정상적인 생리적 조건하에서 extravascular cell 과 perivascular cell에서 발현되는데 이때 혈관의 손상은 혈액 내에서 순환하는 응고인자들이 perivascular layer에서 Tissue factor와 접촉하는 기회를 제공하며 이것이 응고과정을 개시한다. tissue factor 고유의 활성화는 extracellular domain에서 나타나는 것으로 보고되어 있다(19)

따라서 tissue factor의 중요성을 인지하여 이를 이용한 진단 시약의 개발을 시도하기 위하여 Tissue factor의 발현을 시도하였다. 상기의 extracellular domain을 T7 RNA promoter를 지닌 vector에 클로닝 시키는 작업을 통하여 *E. coli*로부터 단백질을 분리하여 활성을 측정하였다. *E. coli* BL21에 transformation시켜 inclusion body로 expression시킨 변이 대장균의 사람 tissue factor 단백질의 정제는 Lin et al(20)의 방법에 의해서 정제하였다. 대장균에서의 사람 tissue factor의 단백질은 inclusion body의 상태로 존재하기 때문에 원심분리하여 얻어진 pellet 상태의 cell을 최소량의 phosphate saline 완충액 (5 mM EDTA, leupeptin(1 μ g/ml), aprotinin(20 μ g/ml), PMSF(0.5 mM) 함유)으로 잘 녹인 다음 sonication을 통해 lysis 시키고 난 후 RNase A(10 μ g/ml)과 DNase I(40 μ g/ml)을 첨가하고 실온에서 10분간 방치 후 원심 분리하여 얻어진 침전물에서 두 번 반복하여 세포 내에 존재하는 대장균의 단백질들과 lipid 성분을 제거한 후 얻어진 tissue factor의 refolding을 시도하였다. refolding 시킨 후에 APTT assay를 실시해본 결과 refolding과 activity에서 시중에 판매되는 tissue factor와 차이가 없음이 확인되었다(그림. 20-22).

여 백

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 대외기여도

혈관이 손상되었을 때, 일련의 과정에 의해 용액상태의 혈액이 gel로 변환된다. 이과정의 중요성은 혈액의 흐름을 막는 지혈을 유도한다는 데 있다.

정상적인 지혈의 중요성은 심한 hemorrhagic diathese나 hemophilias를 고려할 때 명백해진다. 즉 혈액의 흐름도 중요하지만 지혈도 또한 생명을 유지하는데 필수적이다. 대부분의 혈액응고인자는 비활성 zymogen으로 존재하며 순차적으로 활성화되어 다음 단계의 혈액응고인자를 활성화시킨다.

생리 활성 물질은 대부분 미량으로 존재하고 있기때문에 이들을 이용한 질환에 대한 진단이나 치료제로서 개발을 위한 탐색되어지기 위하여서는 여러가지 어려움이 많지만 일단 탐색되어진 단백질 생리활성 물질은 대량 생산이 가능하며 생리적으로 활성이 보다 높게 유지되는 대체 물질로서 높은 부가 가치를 가지고 있다. 혈액 응고제제는 선진 외국에서 여러 종류가 개발되어 시판되고 있다. 그 중에는 효능은 탁월하나 취급하기가 힘들고 가격이 매우 비싸다거나, 경구 복용이 가능하고 가격도 저렴하지만 지혈 효능이 떨어지는 단점이 노출되어 있기 때문에 선진 제약회사를 중심으로 새롭고 안전한 약제의 개발과 복합제제를 이용하여 혈액 응고효과를 높이는 방향으로 활발히 연구가 진행되어가고 있는 상황이다.

본 연구에서는 상기와같은 문제점을 해결할 수 있는 혈액응고 활성을 갖는 대체 단백질의 탐색 연구로서 혈전 형성을 일으키는 작용 기작중에서 중요한 인자인 tissue factor의 유전자 조작을 통한 변이 균주의 개발과 이를 이용한 단백질의 분리정제 및 활성화로 진단시약으로서의

개발, 혈소판의 응집 능력을 응용하기 위한 방법으로 사람의 혈소판에서 혈소판의 응집에 관여하고 있다는 단백질을 분리 정제하고 이를 이용한 결합력을 분석하였다. 분리 정제한 단백질은 혈소판의 막단백질로서 혈소판 감소성 자반증 환자에서 발견되는 단백질과 결합함으로써 혈전을 형성하고 결합하는 결과를 얻었다. 이러한 혈소판과 응집 효과를 갖는 단백질을 이용한 혈액응고 활성 촉진 혹은 저해제의 탐색 개발은 암 억제제나 뇌졸중에 관련되는 치료제로서 개발될 가능성을 제시하고 있다.

혈전이 형성되어지기 위해서는 피브리노겐의 펩타이드가 절단되어 피브린이 형성되고 형성된 피브린이 중합체를 형성되도록 factor XIII이 활성화되어야 한다. factor XIII은 Transglutaminase라고도 불리는데 이러한 factor XIII을 이용한 혈액 응고 활성의 촉진 증대의 가능성을 부여하기 위해서 Transglutaminase의 효과를 사람의 침샘에서 발견되는 것을 확인하였다.

혈액 응고 능력은 최종적으로 피브린 중합체 형성이 중요한 인자이다. 혈전 효과는 트롬빈에 의한 기질의 구조적 변화와 피브린 형성의 영향을 받으므로 혈액 응고 인자와 피브리노겐의 활성 증진에 관한 연구가 추진되어야 한다. 기질과 효소간의 구조와 기능간의 상관성 즉 피브리노겐의 인산화와 분리 정제, 인산화 효소 단백질 혹은 polycationic 물질을 이용한 피브리노겐의 gelation 속도 증진에 관한 연구를 시도하였다. 얻어진 결과로서 casein kinase-II와 같은 인산화 효소를 이용한 피브리노겐의 gelation 효과는 트롬빈 자체에 의해서 형성되는 속도보다 훨씬 빠르게 증진시키고 있음이 관찰되었으며 기질의 첨가는 피브린의 복합체 형성 반응면에서 CK-II만의 효소에 의한 활성을 보다 더 촉진하고 있는 결과를 얻었다. 손상된 외부조직의 혈액응고 과정

에서 인자를 활성화 시킴으로서 다단계의 연속적인 생리적인 응고 과정을 효율적으로 수행하게 하는데 최초의 단계에서 Tissue Factor가 매우 중요한 역할을 담당한다는 사실은 이미 잘 알려진 사실이다. 본 연구를 통하여 혈액응고 작용기작에 작용하는 인자를 이용한 혈액응고 능력을 진단하는 시약과 치료에의 활용이 가능한 제제로서 Tissue Factor를 활용하는 연구를 시도하였다. 소의 뇌 추출물로부터 Tissue factor 단백질을 분리 정제하고 이를 이용한 진단이나 치료제로서 일차적인 가능성을 살펴보았다. tissue factor는 막단백질로서 혈관벽에 존재하는 단백질로서 단백질 자체를 혈관에 투여했을 경우 혈관벽에 부착되는 부작용을 가질수 있는 가능성이 있다. 따라서 소 조직에서의 tissue factor 단백질의 분리 정제는 자체의 tissue factor를 산업화로서는 수율이 낮고 직접 이를 치료제로서 가능성을 주기위한 주사제제로의 응용 가능성은 매우 희박하다는 결과를 얻게되어 사람의 태반에서 유전자 조작을 통한 tissue factor의 단백질 발현 체계를 확립하고 대장균에서 분리 정제한 tissue factor를 취하여 사람의 혈장에서 혈액응고 능력을 측정하는 결과, 현재 시판되고 있는 진단시약과 거의 동일한 효과를 나타내고있는 결과를 얻었다. 변이 대장균의 tissue factor 대량생산 체계의 확립은 사람의 유전자를 대장균에서 발현시키게된 획기적인 연구 결과로서 이를 활용하여 타 질환 진단 혹은 수술시의 혈액 응고 활성화 능력 여부를 진단하는 진단용 kit 시약으로 활용하고자 한다. 또한 혈액응고 활성화에 가장 중요한 단백질은 트롬빈으로서 앞으로의 연구 추진과 이용면에서 고부가 가치가 있는 트롬빈을 소의 혈액으로부터 분리 정제하였다. 트롬빈의 분리 정제는 본 연구의 수행에 크게 도움을 줄뿐만아니라 약 50억의 국내 시장을 가지고 있는 산업화에 기여할 것으로 생각된다.

여 백

제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획

본 연구에서는 혈관내에서의 혈전 형성의 특이성을 이용하여 지혈제제로서의 진단 및 치료제로서의 가능성을 부여하기 위하여 혈관에 상용적으로 존재하는 단백질을 이용하여 지혈 형성 속도를 촉진하고 혈전 형성에 관여하는 혈액응고 인자 단백질의 유전자를 확보하였다. 이는 지금까지 동물 특히 사람에게 존재하는 유전자를 대장균에서 발현시켰다는 결과는 획기적인 연구 성과로서 타 분야에의 응용과의 동시에 이를 이용하여 새로운 혈액 응고 활성을 갖는 유전자 단백질의 발현으로 궁극적으로는 최종목표물인 새로운 차원의 혈전 관련 활성의 단백질을 개발하는 데 활용하고자 한다. 이는 앞으로 질환에 대한 특이성을 지니며, 혈전에 의한 부작용을 극복할 수 있는 효유높은 치료제로서의 활용뿐만아니라 확립된 기술을 이용하여 타 질환에 대한 치료제로서 응용가능한 자료로서도 또한 유용하게 활용할 수 있을 것으로 사료된다. 이와같은 혈액 응고 관련 작용 기작을 이용한 혈전 관련 활성의 인공단백질로 개발하면 한국을 비롯한 전 세계적으로 높은 사망율을 가지고 있는 뇌졸중, 혈전증 및 기타 질병의 치료제로서도 무한한 개발 잠재력을 가지고 있는 것으로 전망된다.

여 백

제 6 장 참고 문헌

1. Kraus, J., Lin, T. C., Nemerson, Y., and Konigsberg, W. H. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84:5148-5152
2. Bennet. J. S. (1984) *Med. Clin. North Amer.* 68: 557-576
3. Brandt, J. T., Schaefer, J. L., Triplett, D. A. and Jolgren, V. R., (1983) *Current Hematol.*, 2: 375-404
4. Mann. K. G. and Fass. D. N., (1983) *Current Hematol*, 2: 347-374
5. Nemerson, Y. (1988) *Blood* 71: 1-8
6. Bach, R.R. (1988) *CRC Crit. Rev. Biochem.* 23:339-368
7. Edgington, T. S., Mackman, N., Brand, K. and Ruf, W. (1991) *Thrombo Haemost.* 66:67-79
8. Davie, E. W., Fujikawa, K. and Kisiel, W. (1991) *Biochemistry* 30: 10363-10370
9. Fisher, K. L., Gorman, C. M., Vehar, G. A., O'Brien, D. P., and Lawn, R. M. (1987) *Thromb. Res.* 48:89-99
10. Morrissey, J. H., Revak, D., Trjada, P., Fair, D. S., and Edgington, T. S. (1988) *Thromb. Res.* 50:481-493
11. Scarpati, E. M., Wen, D., Broze, G. J., Jr., Miletich, J. P., Flandermeyer, R. R., Siegel, N. R., and Sadler, J. E. (1987) *Biochemistry* 26: 5234 - 5238
12. Drake, T. A., Morrissey, J. H. and Edgington, T. S. (1989) *Am. J. Pathol.* 134: 1087-1097
13. Maynard JR, Heckman CA, Pitlick FA, Nemerson Y, (1975) *J. clin. Invest* 55: 814

14. Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS (1989) *J Cell Biol* 109: 389
15. Paborsky, L. R., Tate, K. M., and Gordon A. V., (1989) *Biochemistry*, 28: 8072-8077
16. Pitlick, F. A., and Nemerson. Y. (1970) *Biochemistry*, 9:5105-5113
17. Stone, M. J., Ruf, W., and Wright, P. E., (1995) *Biochem. J.*, 310: 605 - 614
18. Yutaka Matsumoto, Yhko kawai, Yasuo Ikeda, (1998) *Blood* 91: 4164 - 41720
19. Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., Perry, H. M., Gottesman, K.S., and Foeller, C. (1991) *Sequence of Proteins of Immuno logical Interest*, 5th Ed., US Department of Health and Human Services, Public Health Services, National Institute of Health, Bethesda, MD.
20. Harris, L., and Bajorath, J. (1995) Profiles for the analysis of immunoglobulin sequences: Comparison of V gene subgroups. *Protein Science* 4, 306-310.
21. Collen, D. and Lijnen, H. R. (1994) Staphylokinase, a fibrin-specific plasminogen activator with therapeutic potential? *Blood* 84, 680-686.
22. Granelli-Piperno, A. and Reich, E. (1978) A study of proteases and protease-inhibitor complexes in biological fluids. *J. Exp. Med.* 148, 223-234.
23. Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor laboratory, New York.

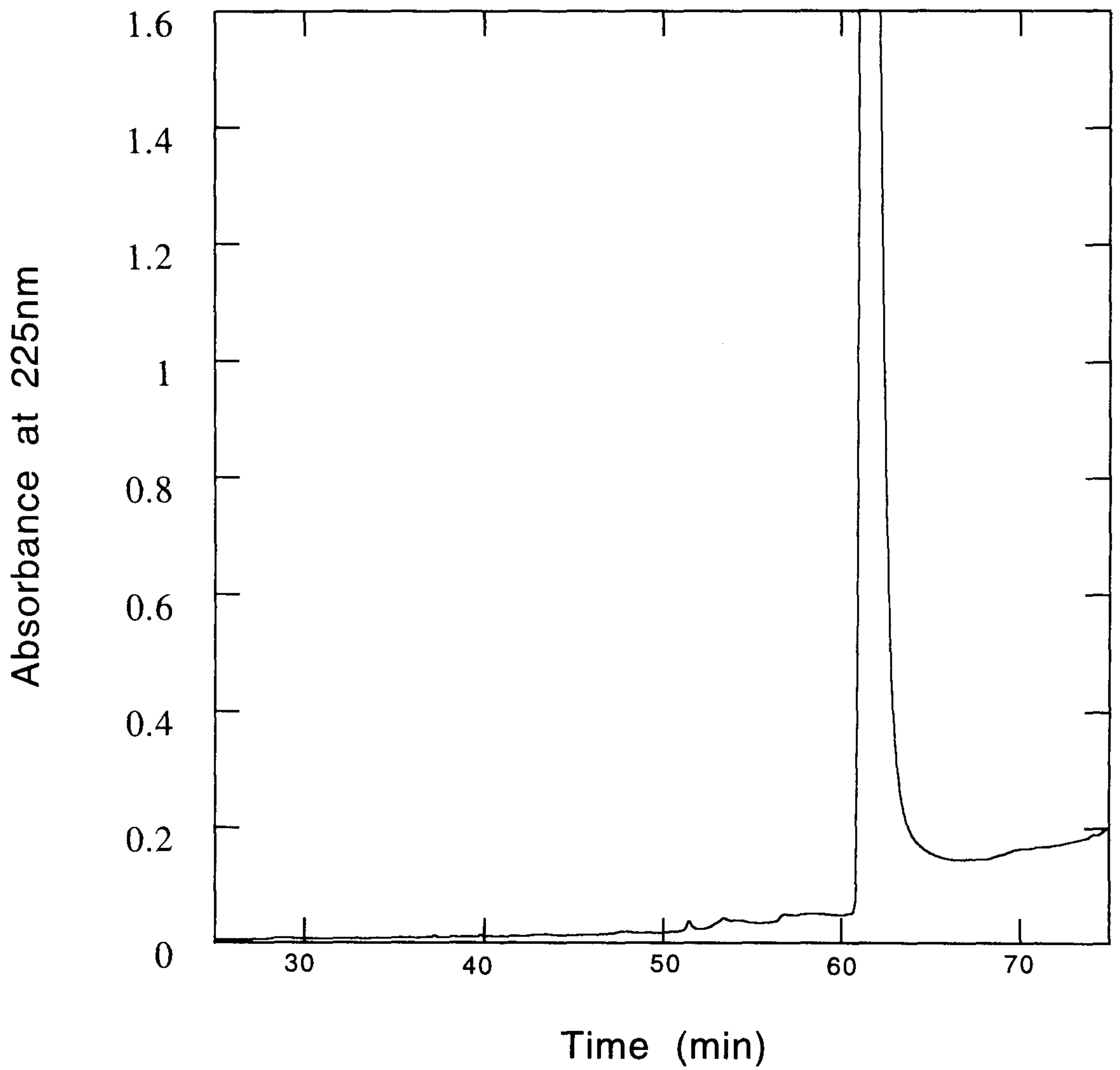


Fig. 1. Reverse-phase HPLC chromatogram of the purified fibrinogen

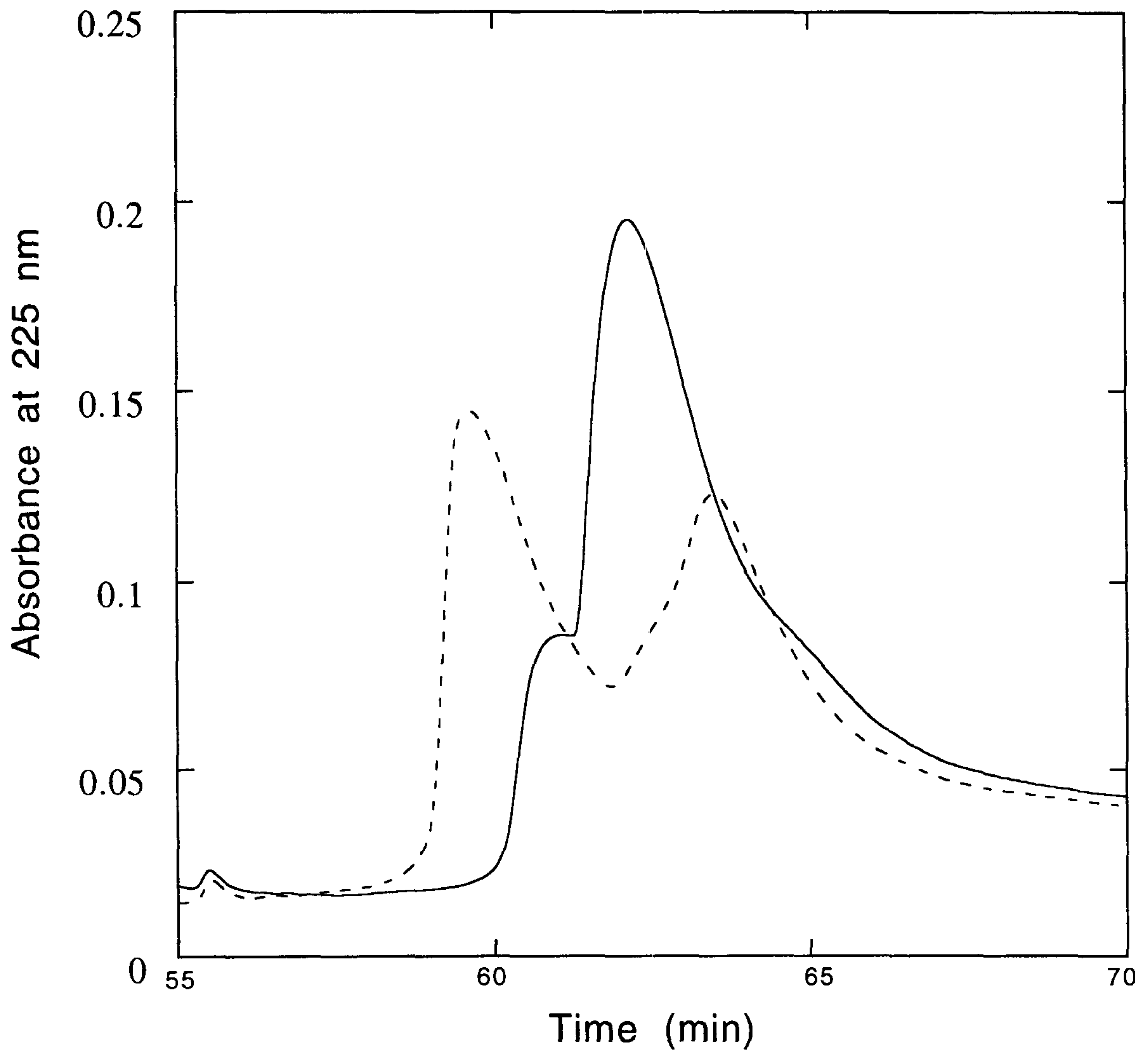


Fig. 2. Chromatogram of protein kinase-treated and control fibrinogen. (----): Protein kinase-treated fibrinogen (—): Protein kinase-untreated fibrinogen

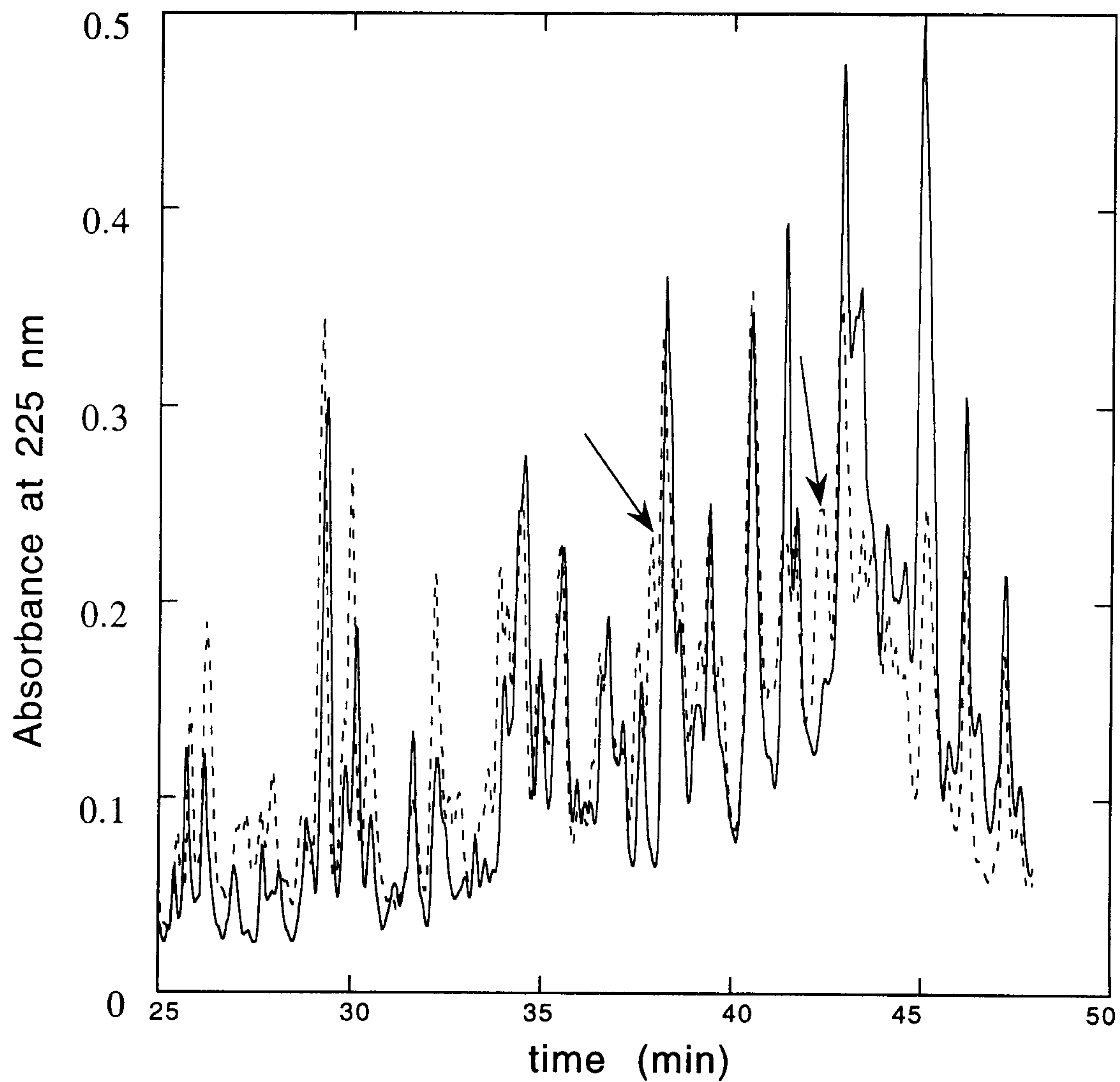


Fig. 3. Tryptic peptide fragments of fibrinogen. (---) and protein kinase-treated fibrinogen (—) and protein kinase-untreated fibrinogen. The arrow indicates the peptide fragment derived by tryptic digestion of fibrinogen

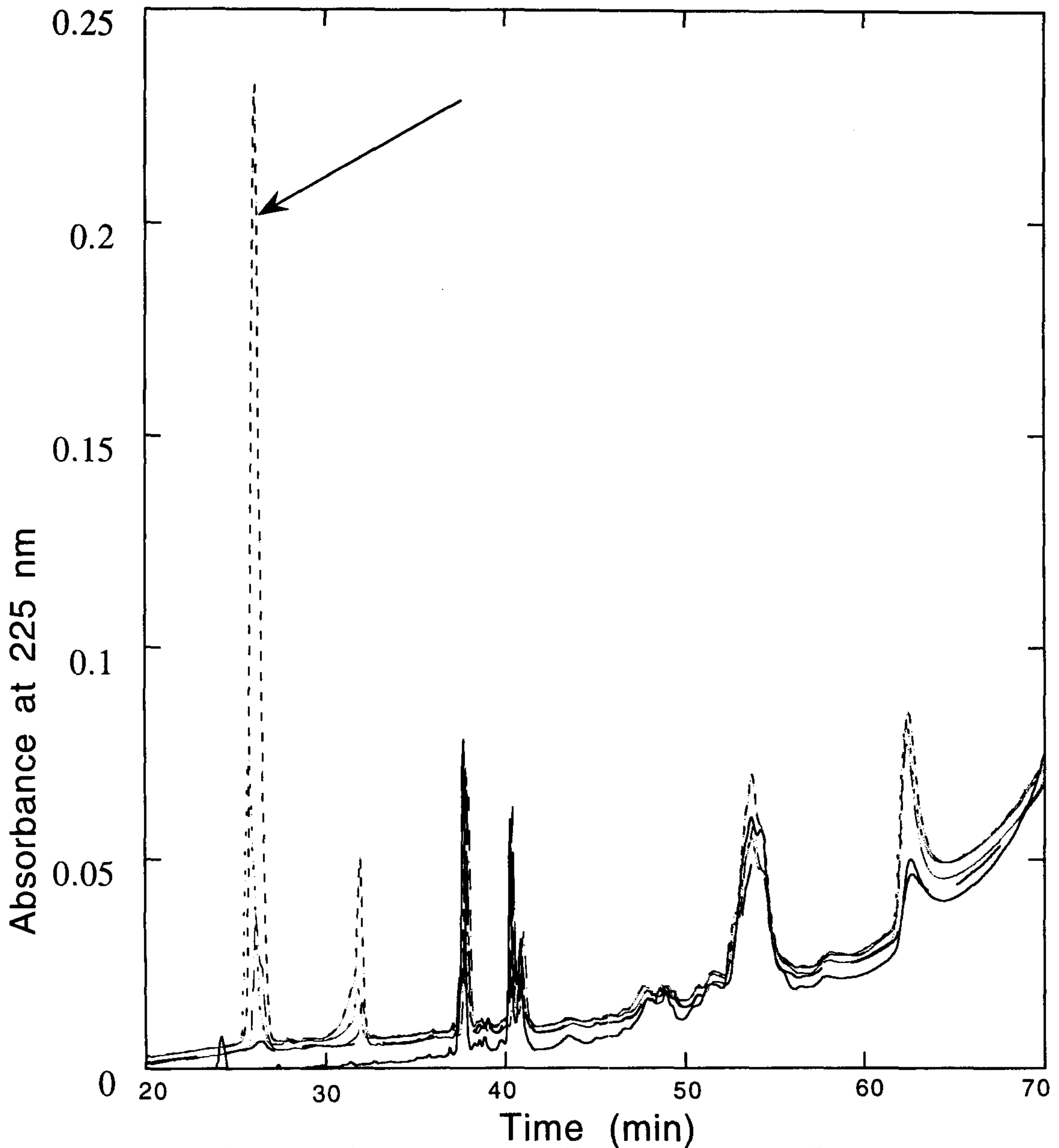


Fig. 4. Analysis of the protein kinase-treated fibrinogens on the HPLC at different time intervals. An aliquot was taken at different time intervals, gelled by thrombin, and analyzed by HPLC. The arrow indicates the unknown peptide fragment derived by protein kinase-treated fibrinogen(90) — not treated by casein kinase II — — treated by casein kinase II(30) — — · — treated by casein kinase II(60) — — — treated by casein kinase II(90) - - - - treated by casein kinase II(120)

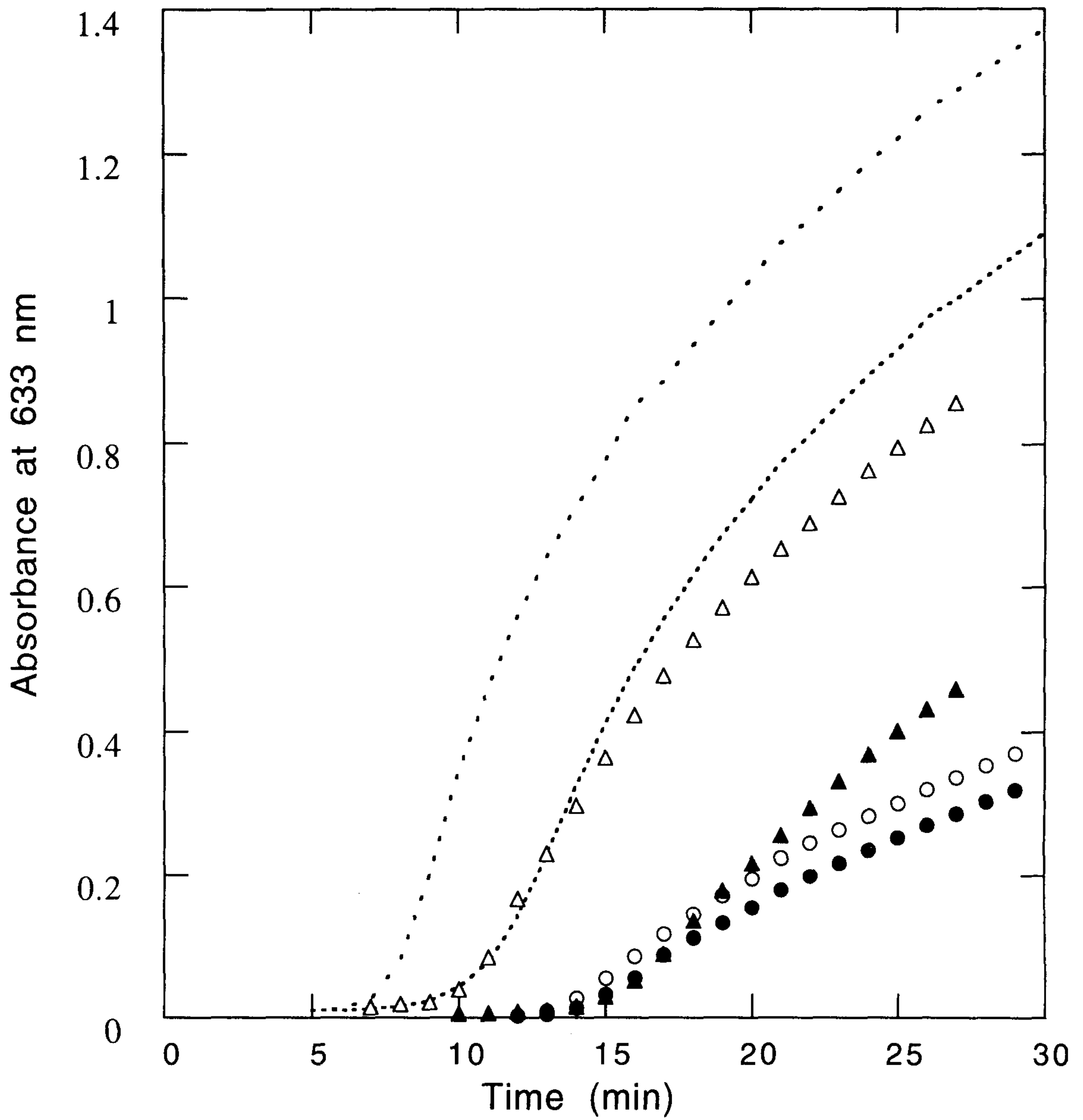


Fig. 5. After gelation by thrombin and analysis of the spectrophotometer at different concentration intervals.

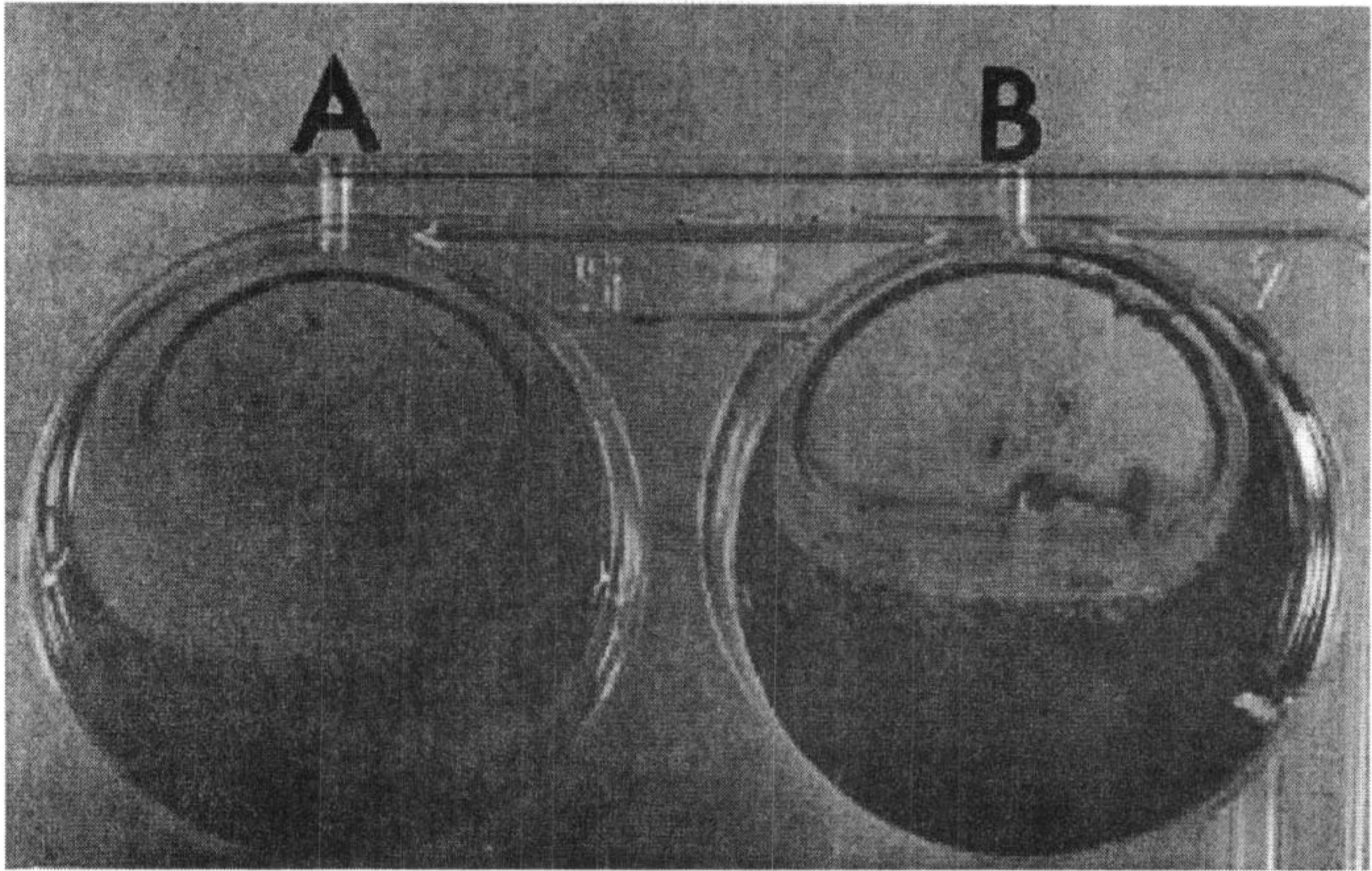


그림 6. CK-II stimulation of whole blood coagulation
(A, thrombin alone; B, CK-II and thrombin)

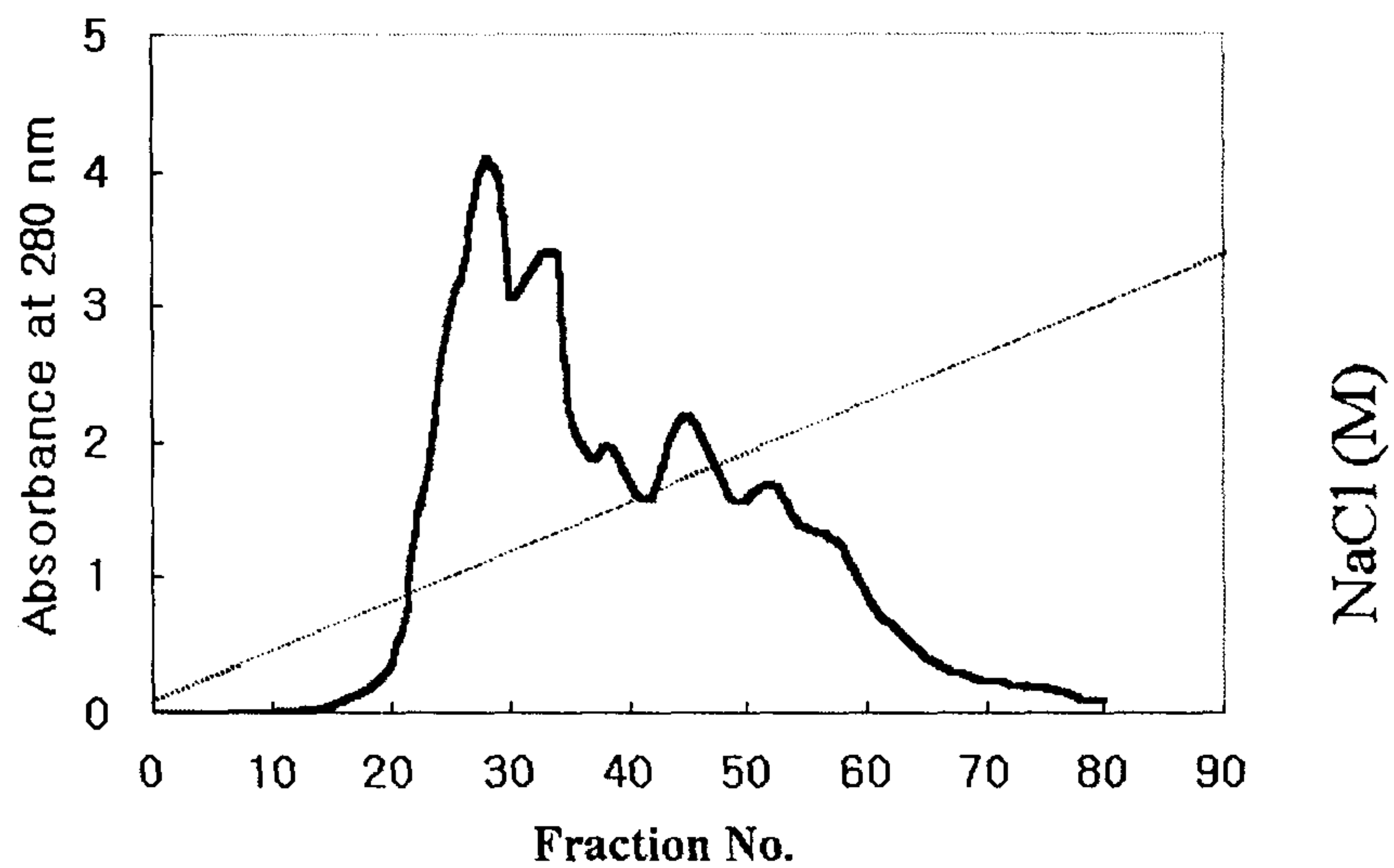


그림. 7. Chromatogram of DEAE-Toyopearl 650M

ETHANOL PRECIPITATED SAMPLE WAS APPLIED TO DEAE-TOYOPEARL 650M CHROMATOGRAM COLUMN (20 × 3.0 CM) EQUILIBRATED WITH 25 MM HEPES BUFFER (PH 7.2) AND ELUTED WITH 0.0 TO 0.3M NA CL GRADIENT.



그림. 8. SDS-PAGE analysis of thrombin purification from bovine blood
(A, non-reduced thrombin; B, reduced thrombin)

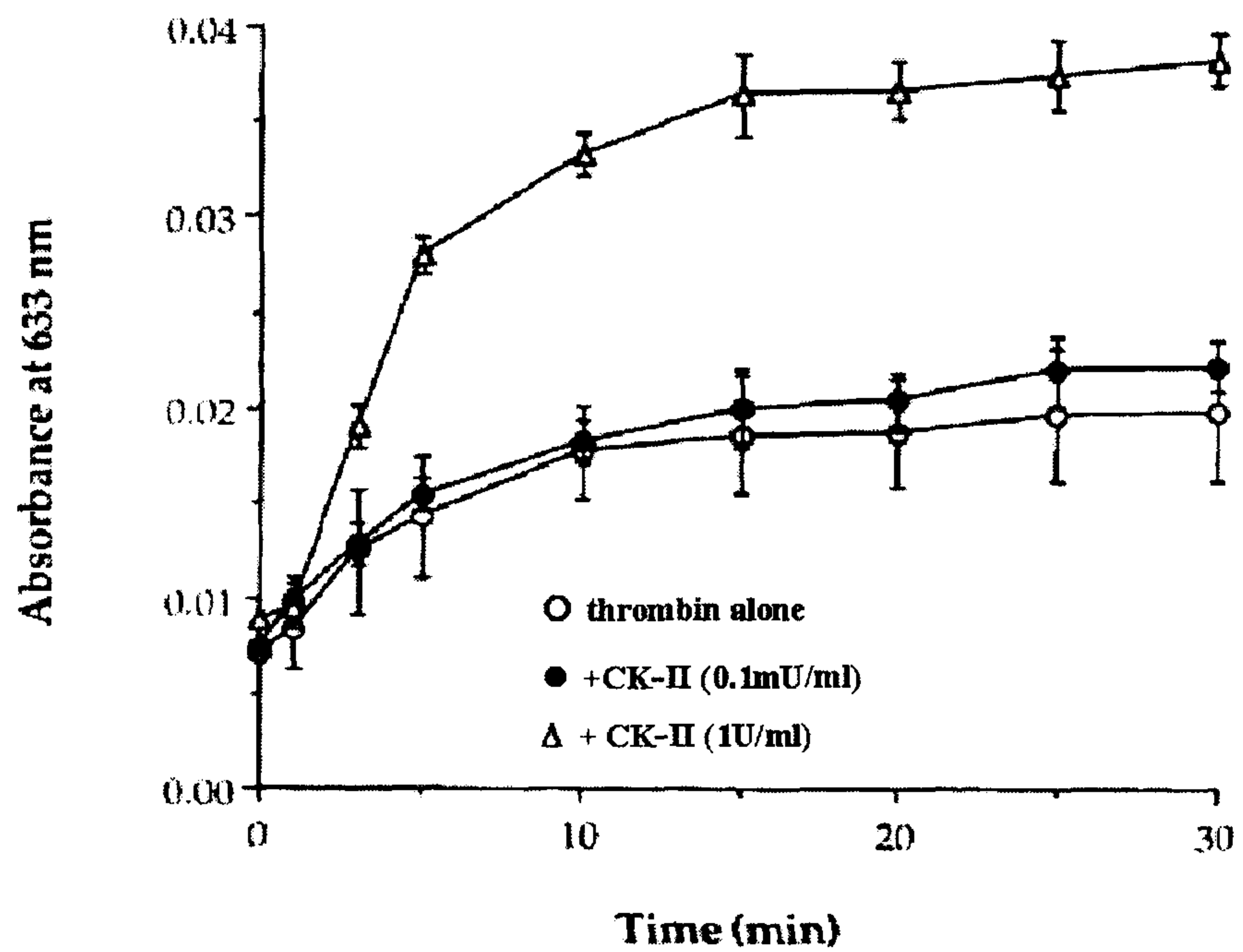


그림. 9. Dose-dependent stimulation of thrombin-induced gelation of fibrinogen by Casein kinase II

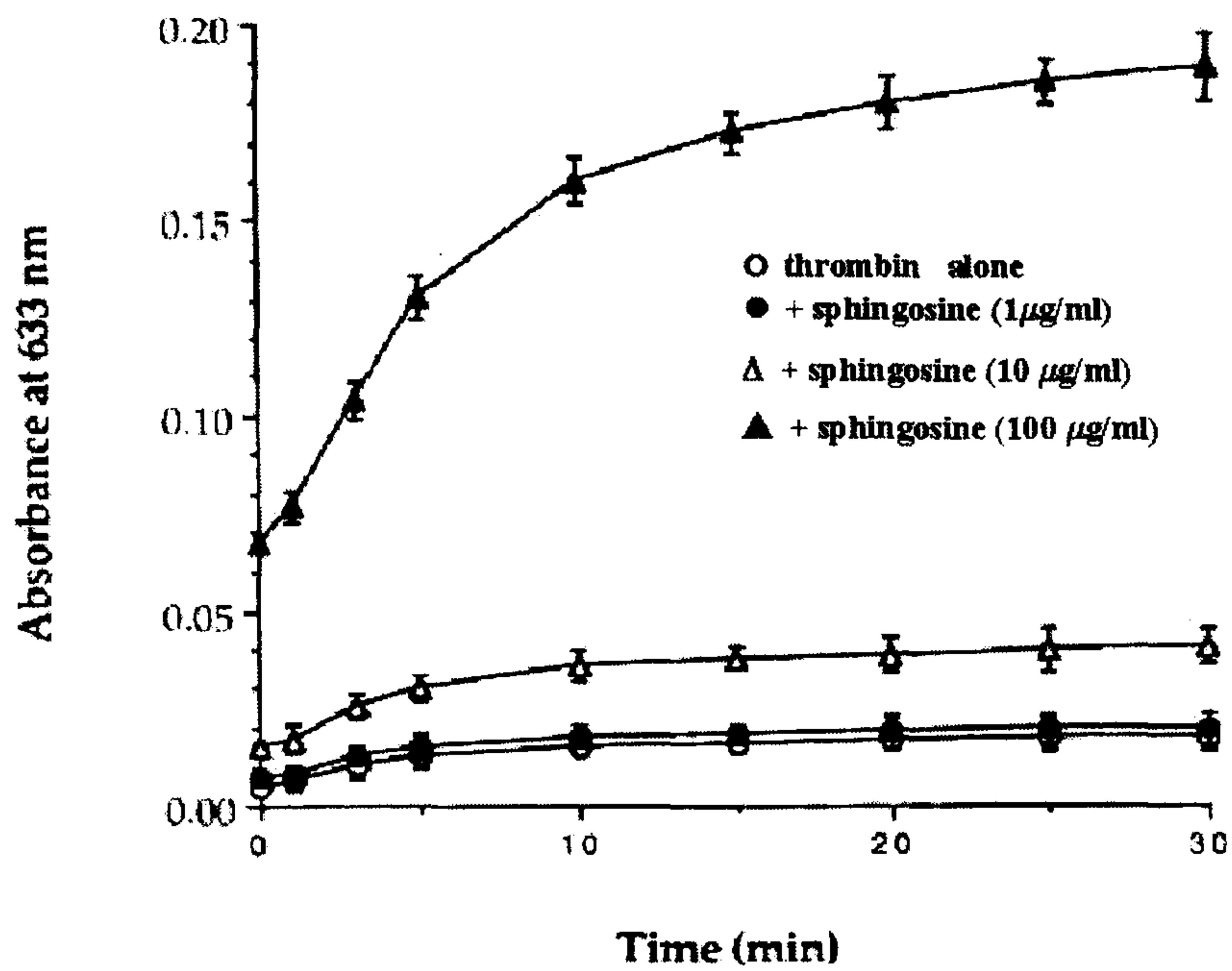


그림 10. Dose-dependent stimulation of thrombin-induced gelation of fibrinogen by sphingosine

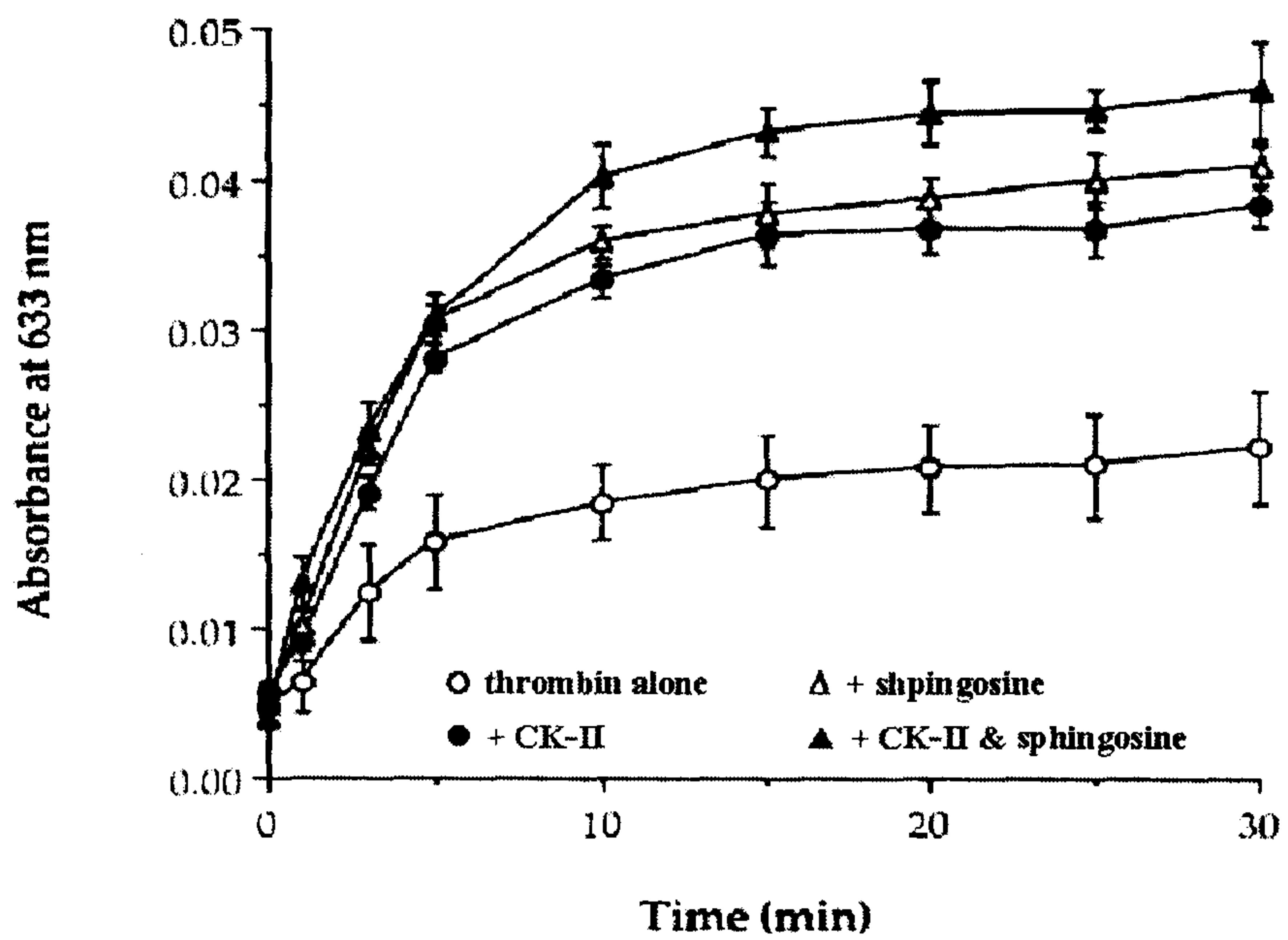


그림 11. Synergistic and specific effects of sphingosine and CK-II on thrombin-induced gelation of fibrinogen

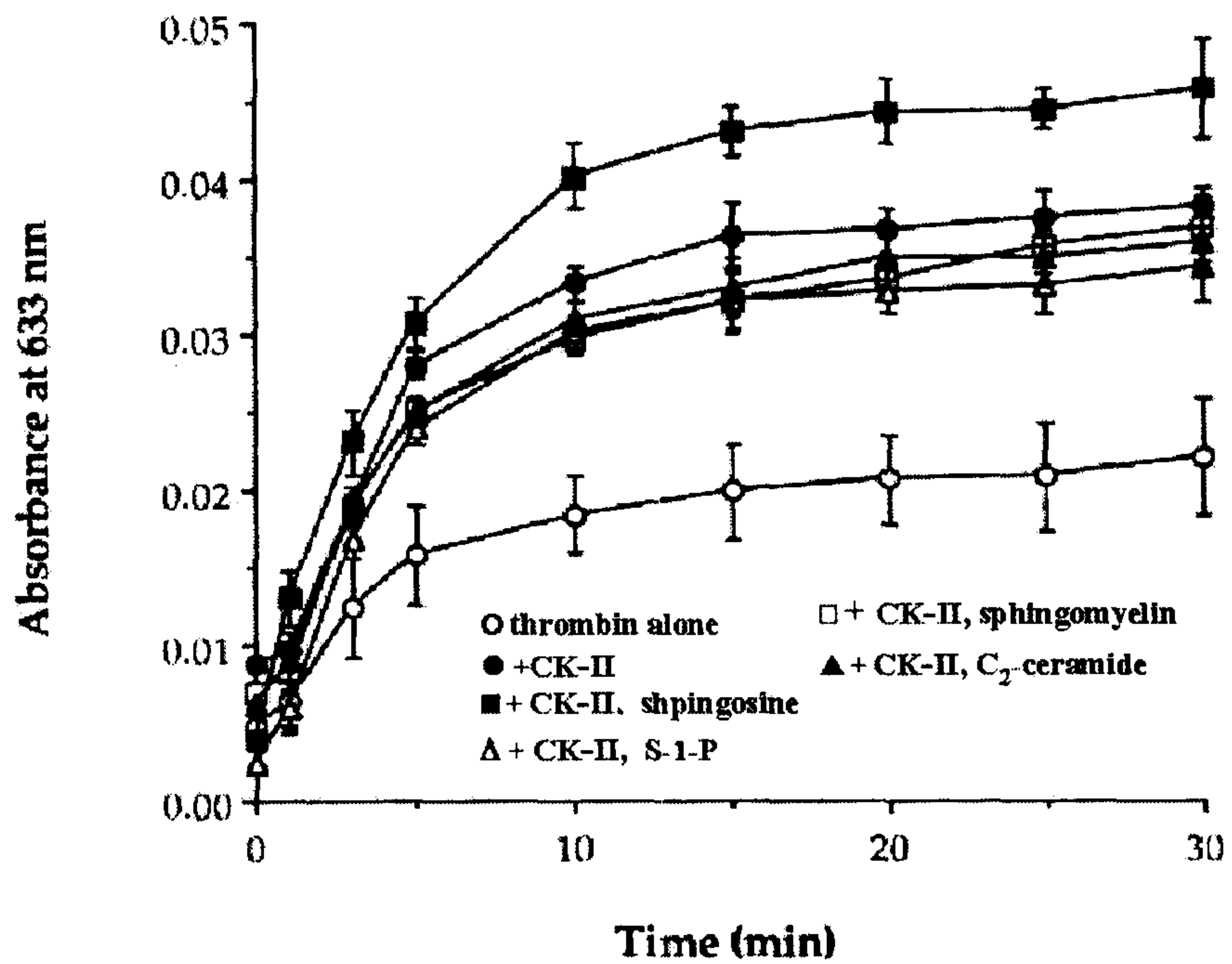


그림 12. Synergistic and specific effects of sphingosine and CK-II on thrombin-induced gelation of fibrinogen

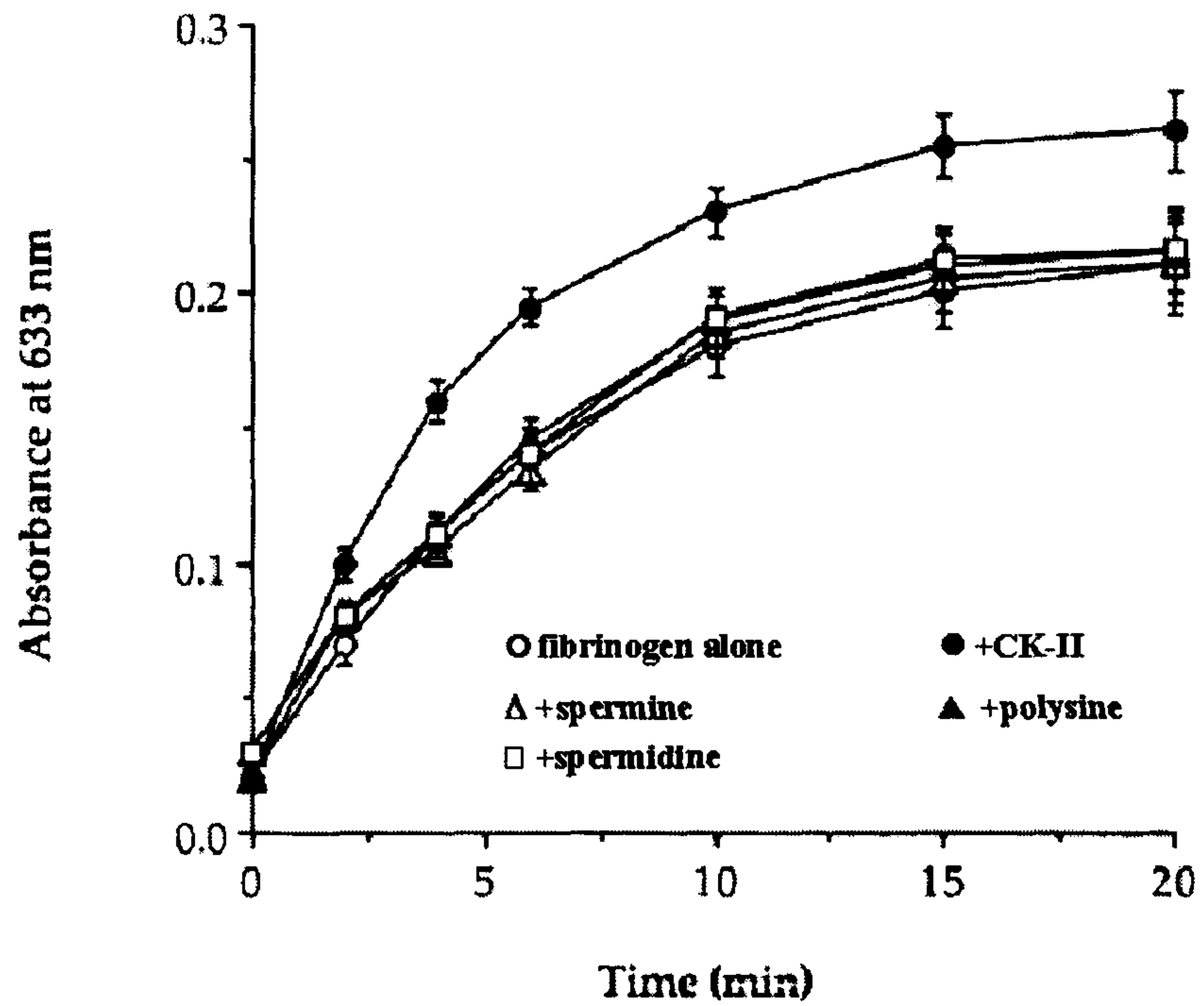


그림 13. Effects of CK-II or polycationic compounds on thrombin-induced gelation of the fibrinogen

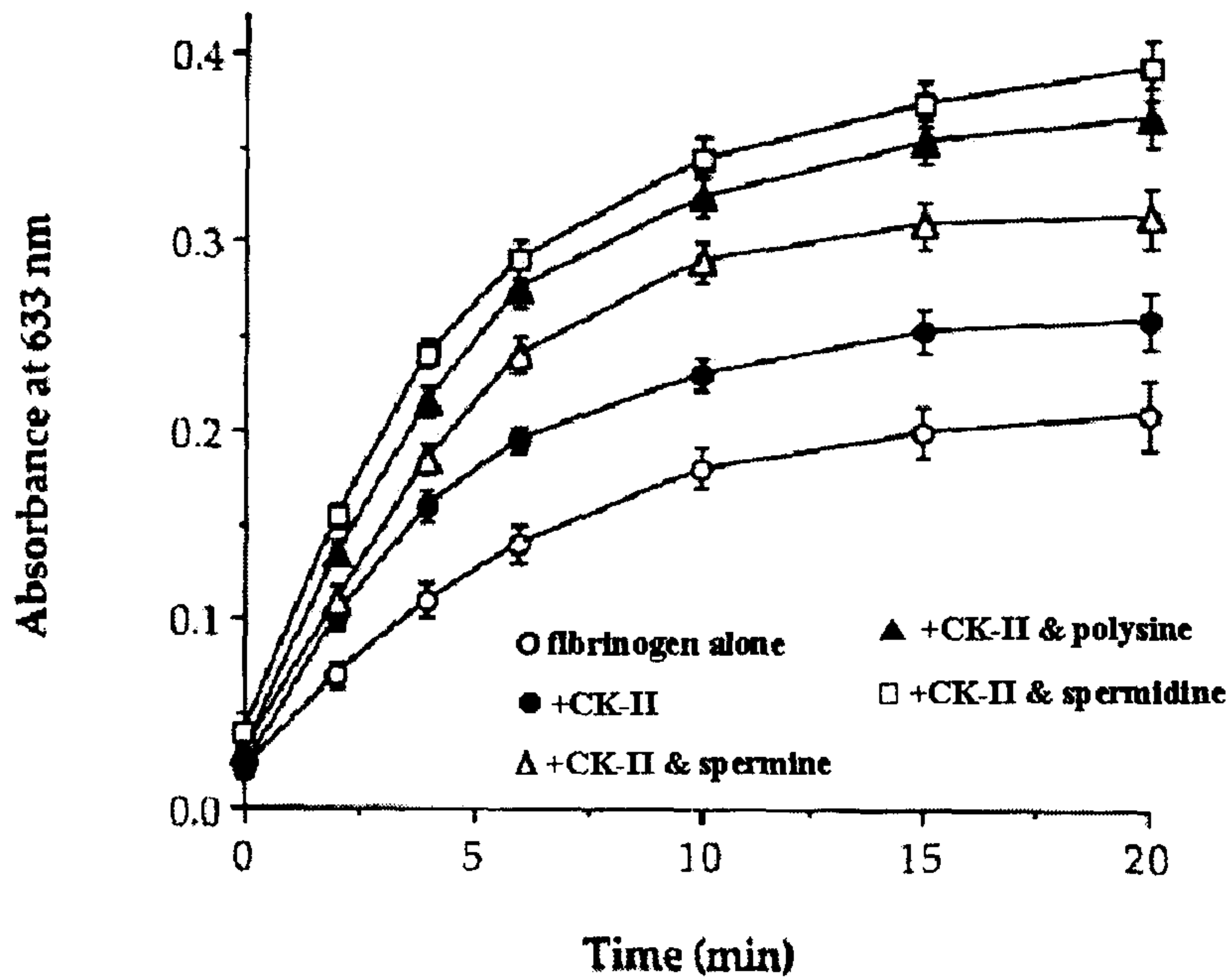


그림 14. Synergistic stimulation of thrombin-induced fibrinogen gelation by CK-II and polycationic compounds

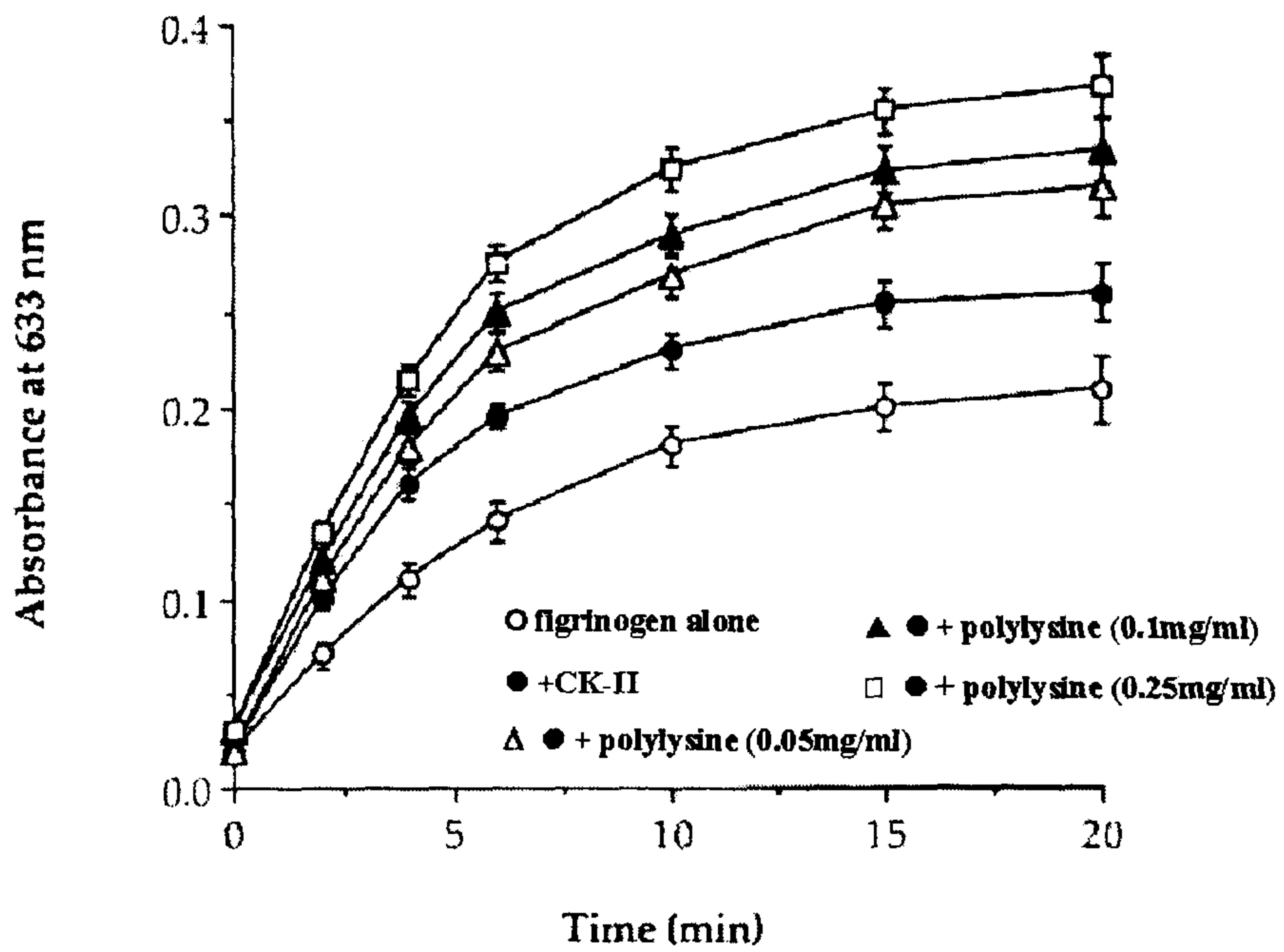


그림 15. Dose-dependent effects of polylysine on CK-II stimulation of fibrinogen gelation

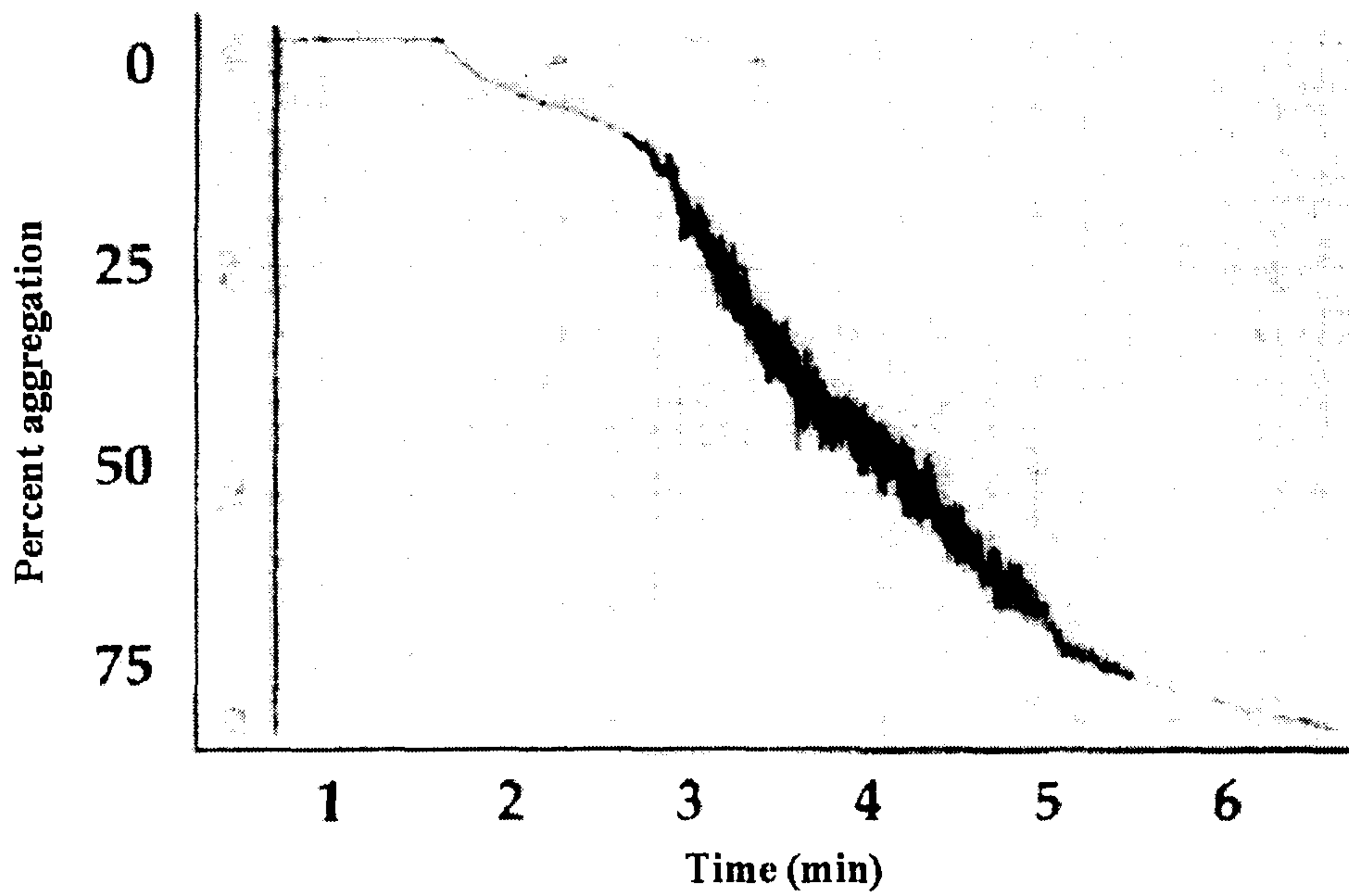


그림 16. Synergistic stimulation of platelet aggregation by thrombin(4 U/ ml) alone

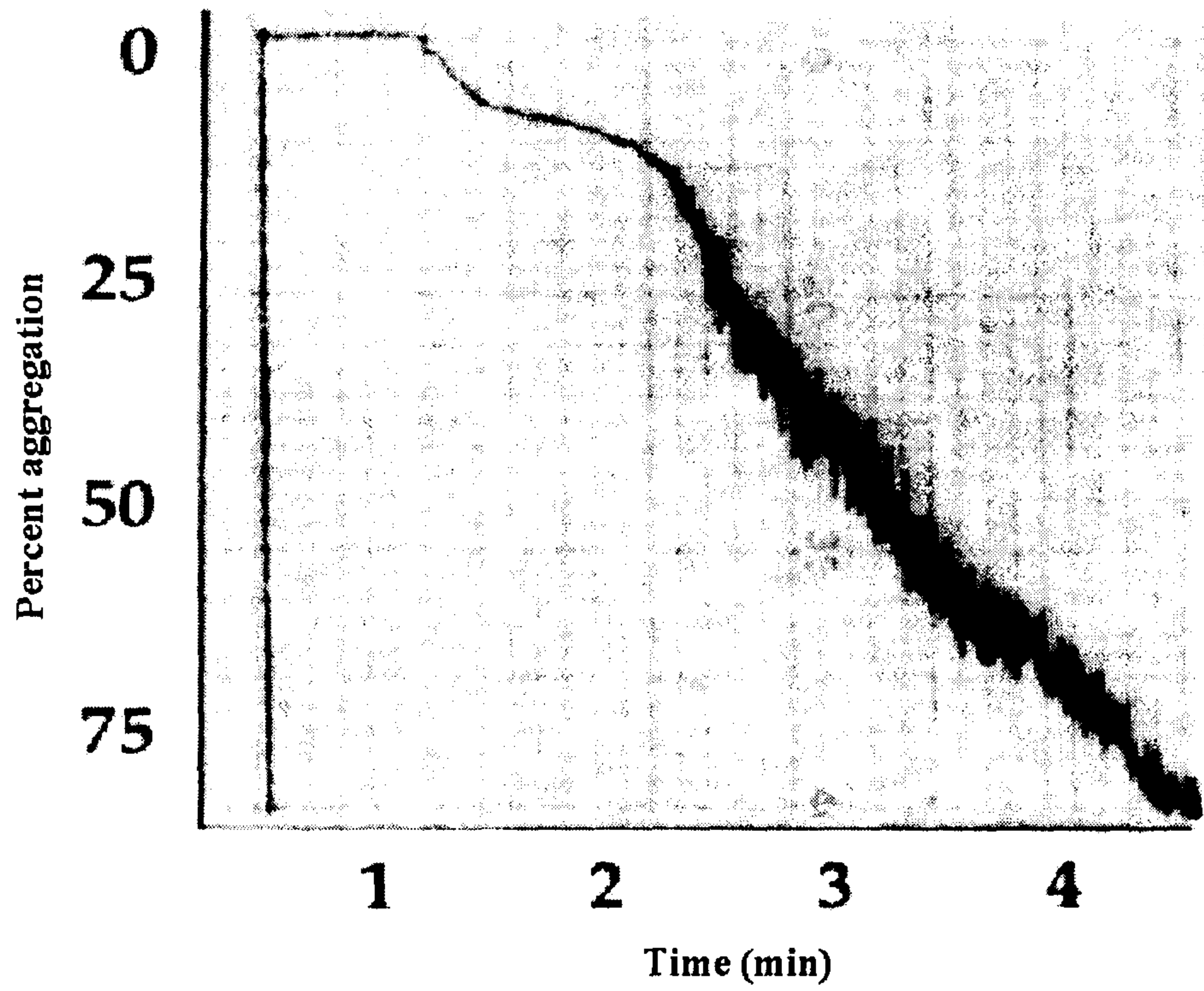


그림 17. Synergistic stimulation of platelet aggregation by CK-II

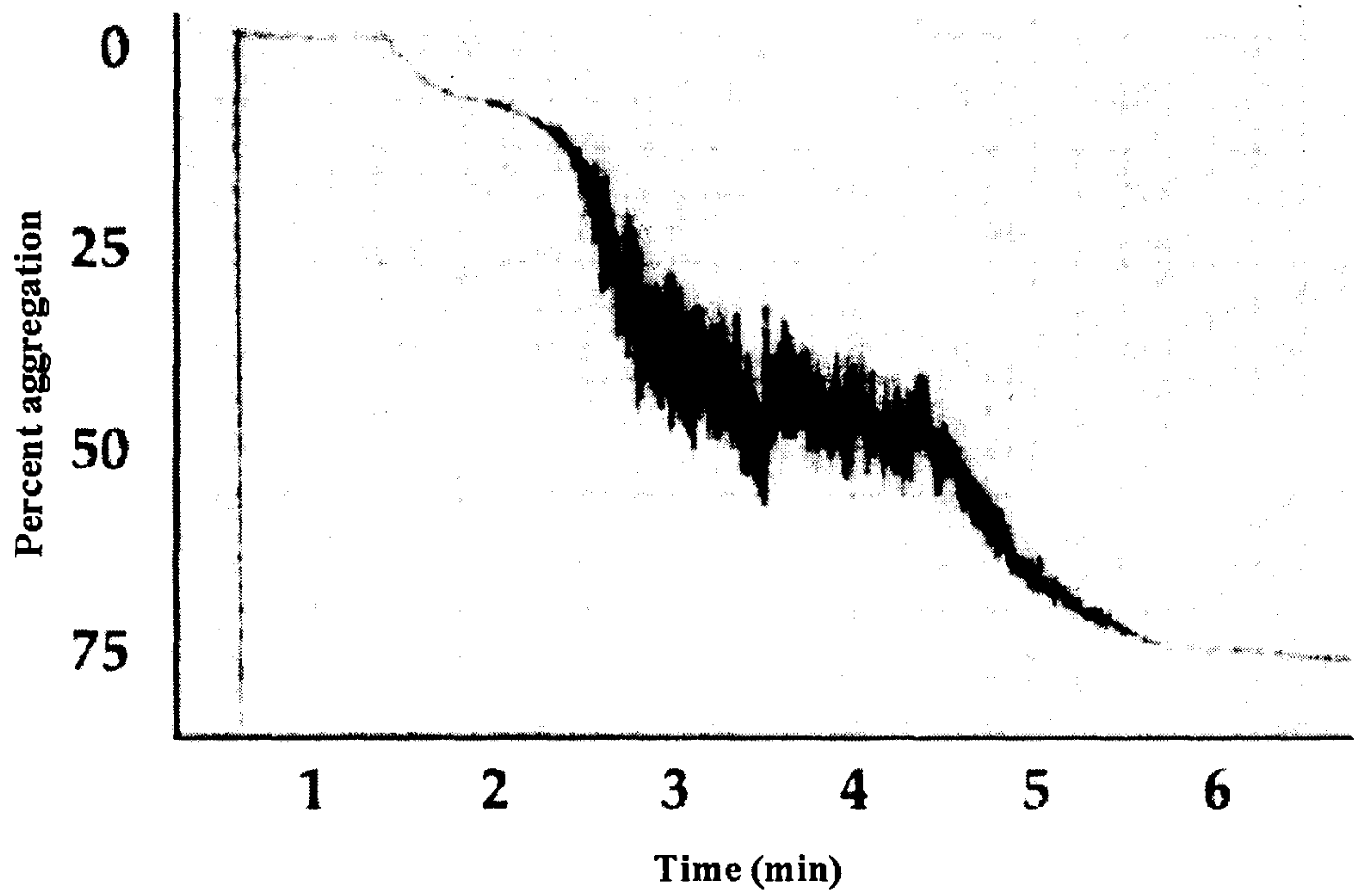


그림 18. Synergistic stimulation of platelet aggregation by CK-II & polylysine

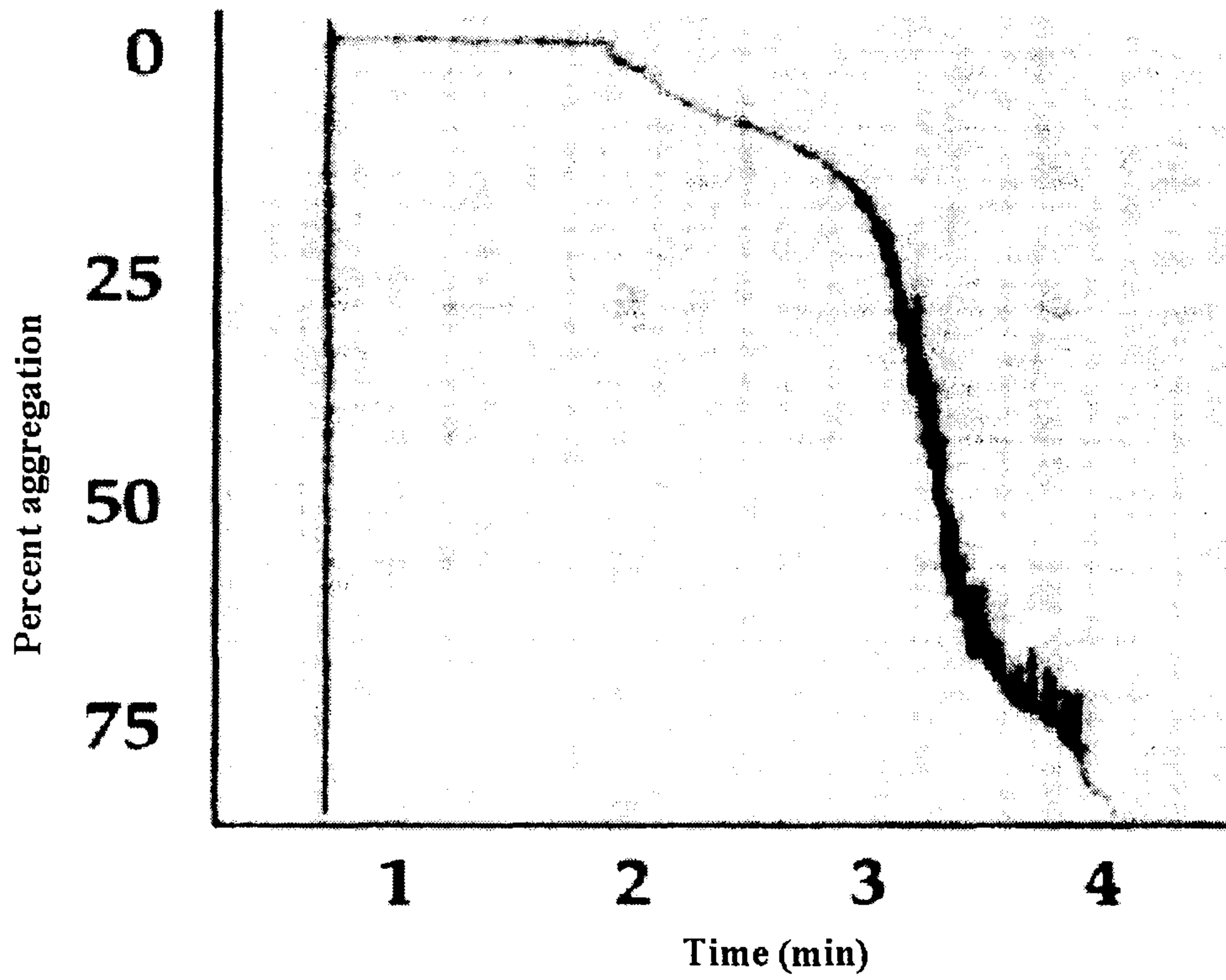


그림 19. Synergistic stimulation of platelet aggregation by CK-II & spermidin

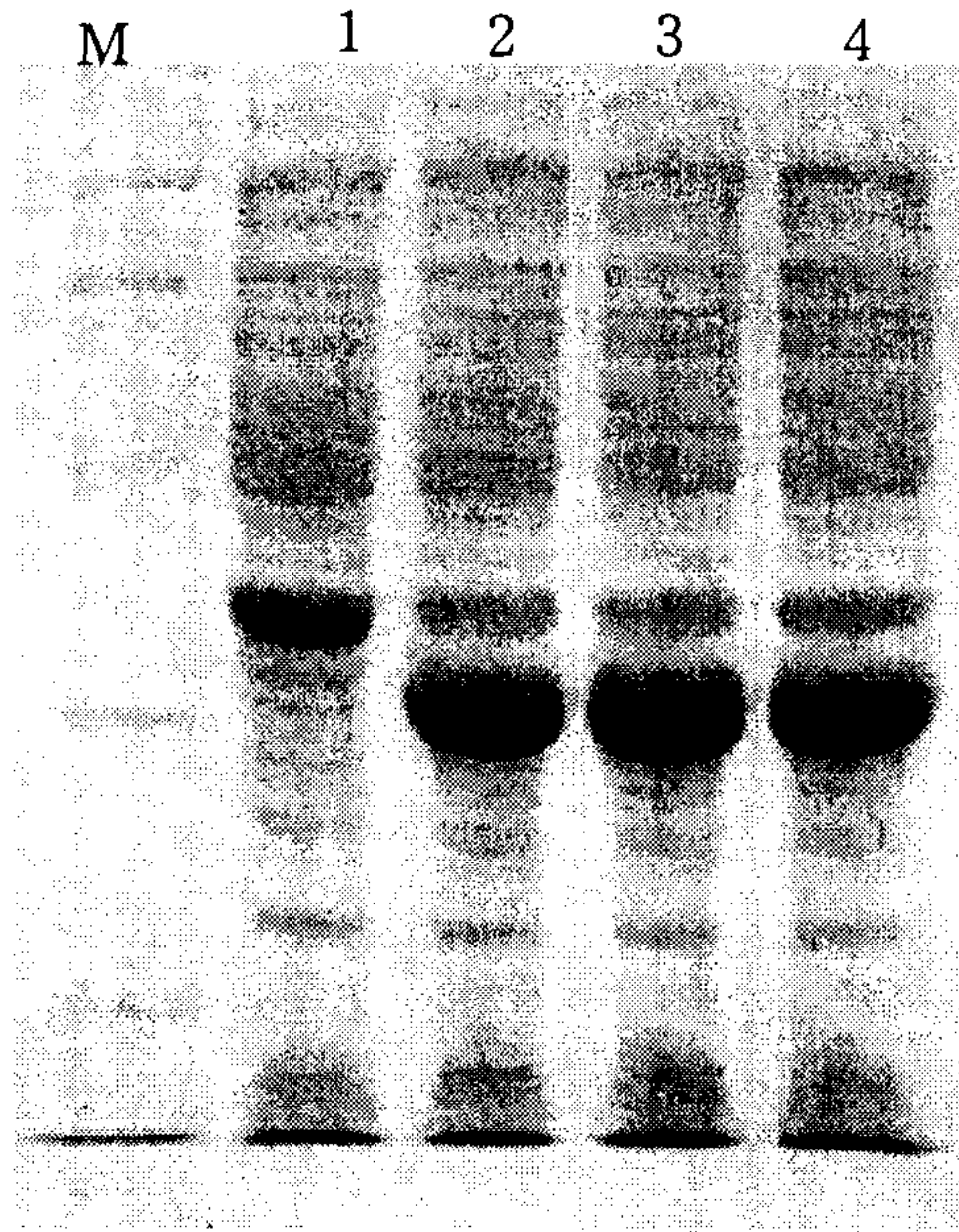


그림 20. IPTG에 의해 induction된 human tissue factor protein. M: molecular weight marker(위로부터 97 kDa, 66 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 21 kDa), 1: membrane domain을 포함한 경우, 2-4: extracellular domain만을 지닌 human tissue factor protein.

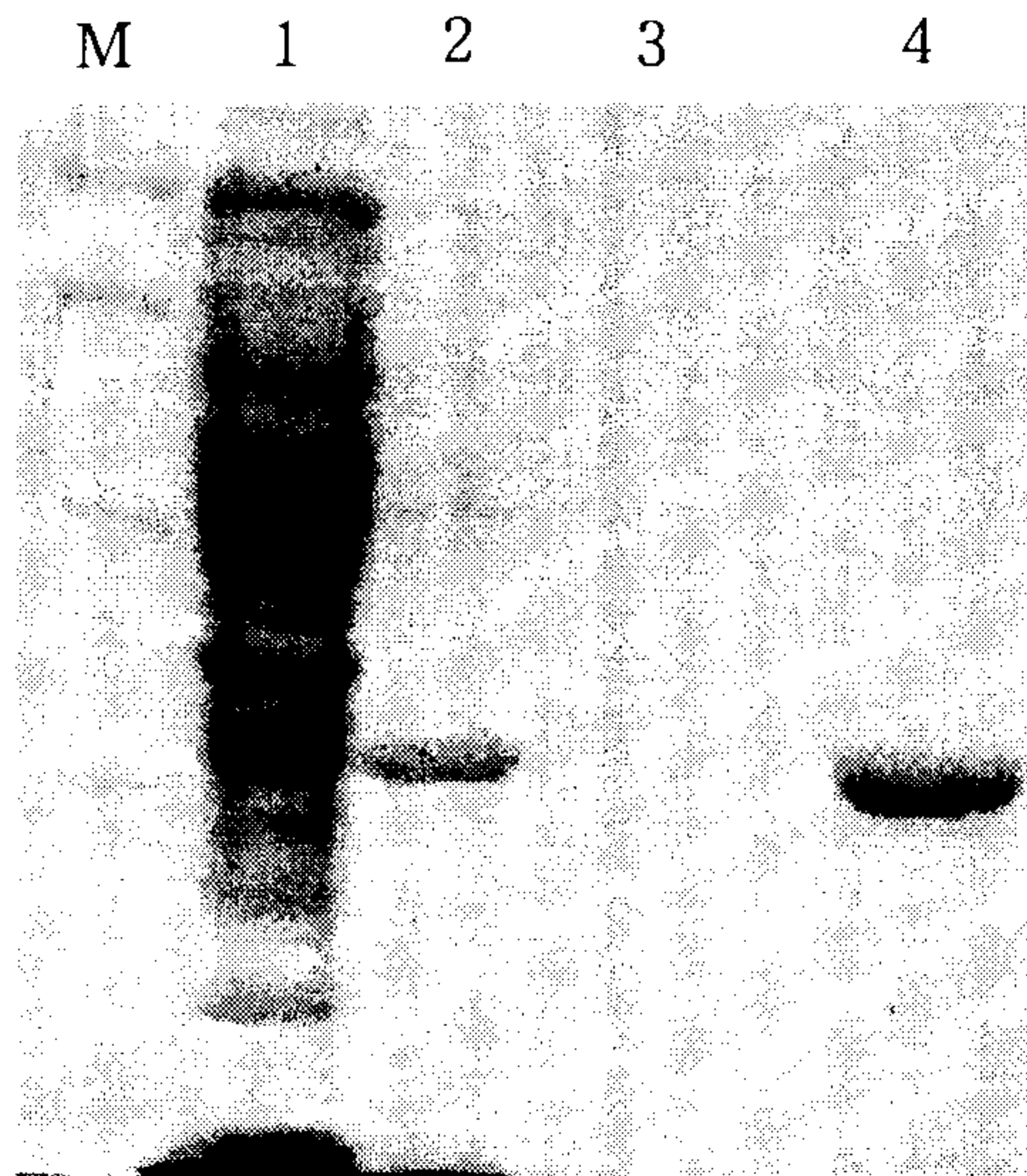


그림 21. Induction된 protein의 inclusion body를 정제한 SDS-PAGE 사진. M: molecular weight marker, 1-3: 제거된 E. coli protein(각 step 별로 centrifuge 후의 supernatent), 4: 정제된 inclusion body protein.

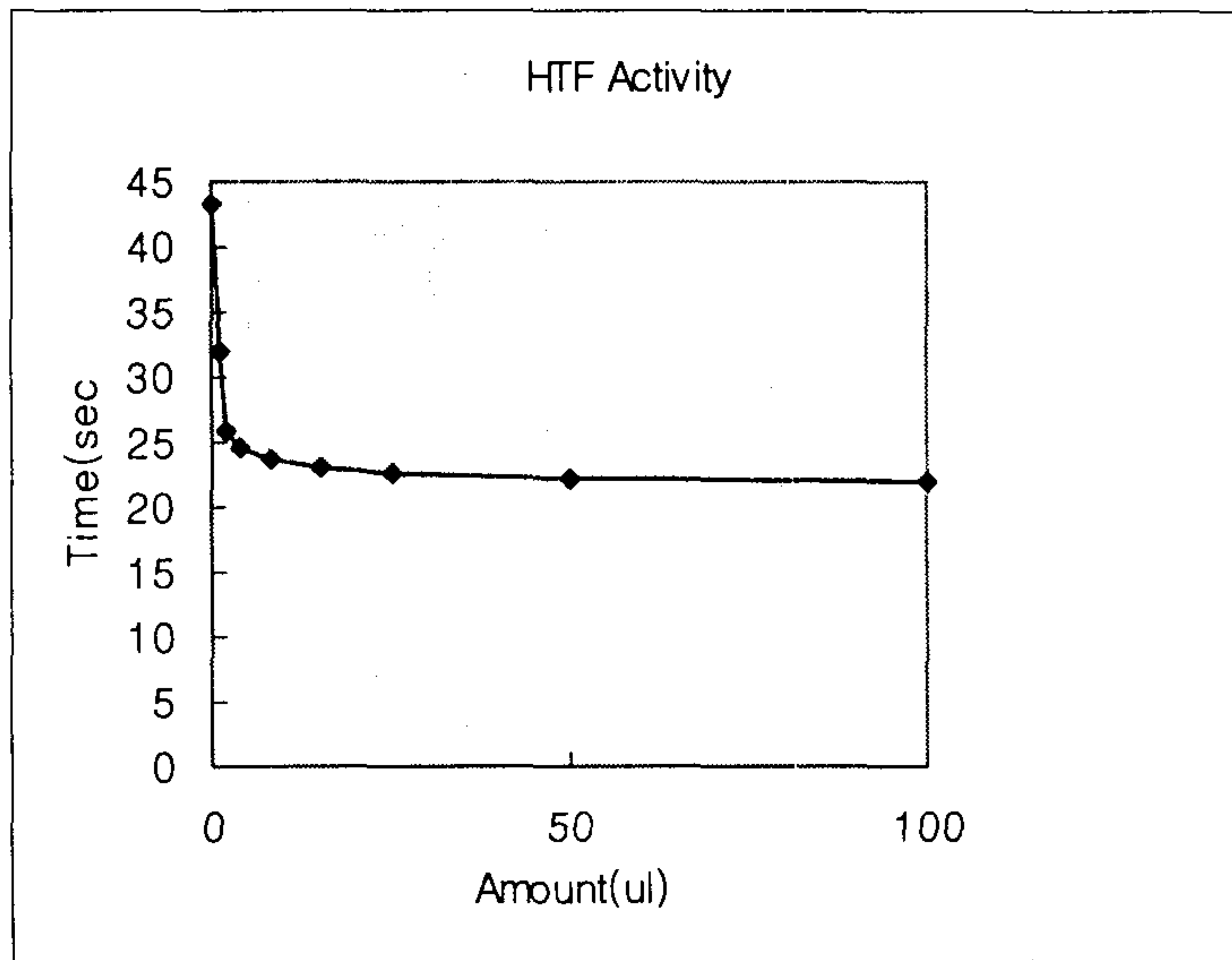


그림 22. APTT를 통한 human tissue factor 의 activity

A
HNp: CG GGATCC AACTGGTAGACATG
Bam HI

HCp: GG GGTACC AGAATGCTAATGGT
Kpn I

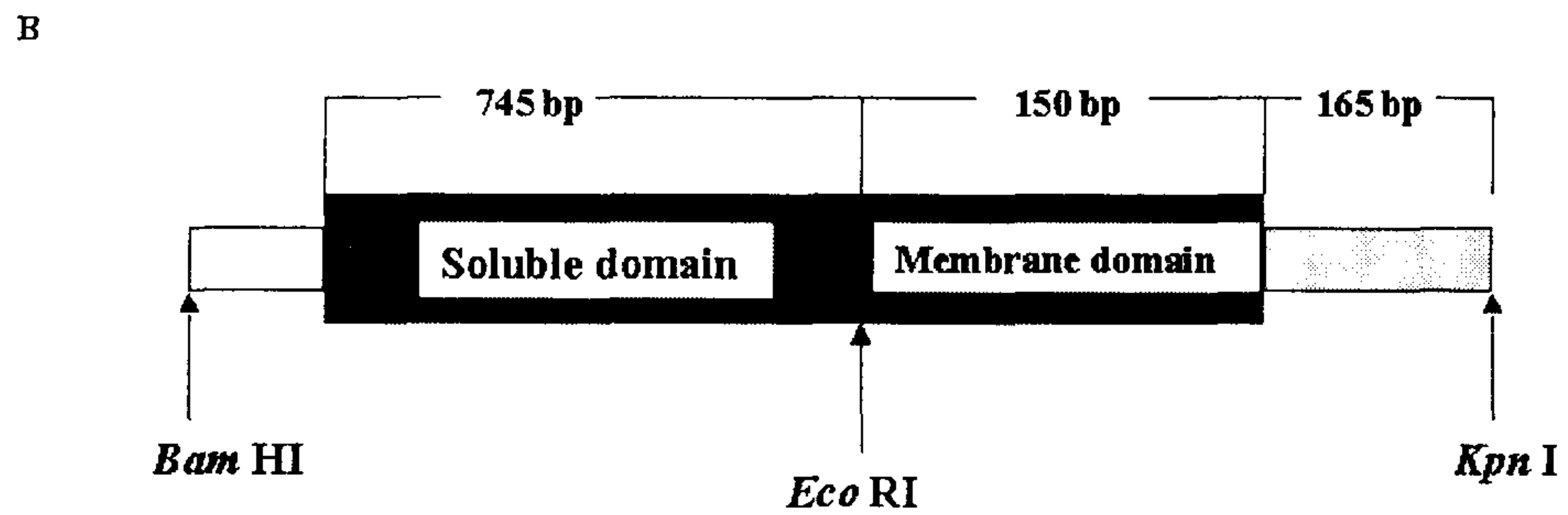


그림 23. A: Oligonucleotide primers used in PCR reaction. (HNp: 5'- primer. HCp: 3'- primer) B: Full gene structure of HTF from PCR product

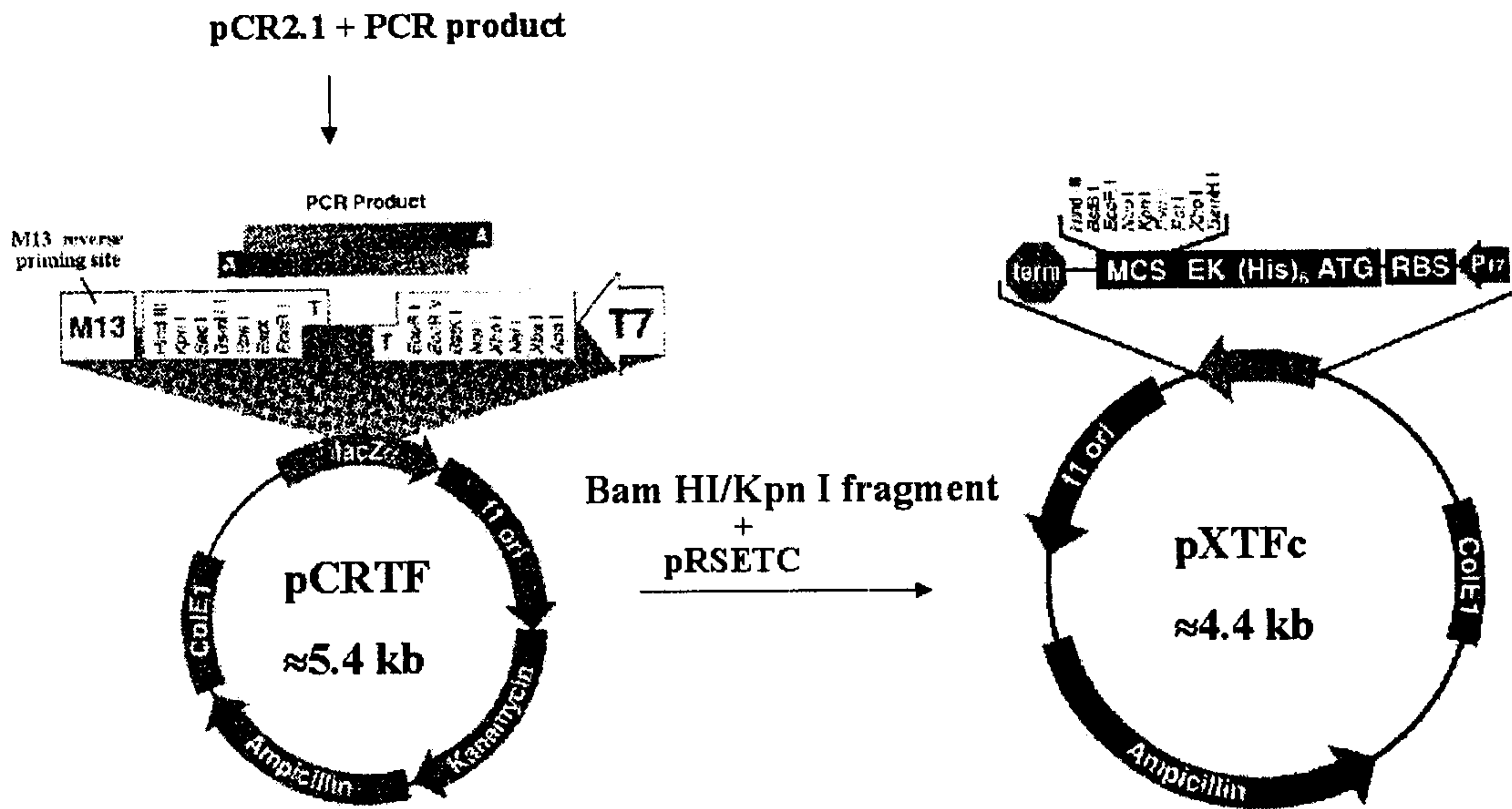


그림 24. Diagram showing the construction of pXTFc for the expression of HTF in *E. coli*

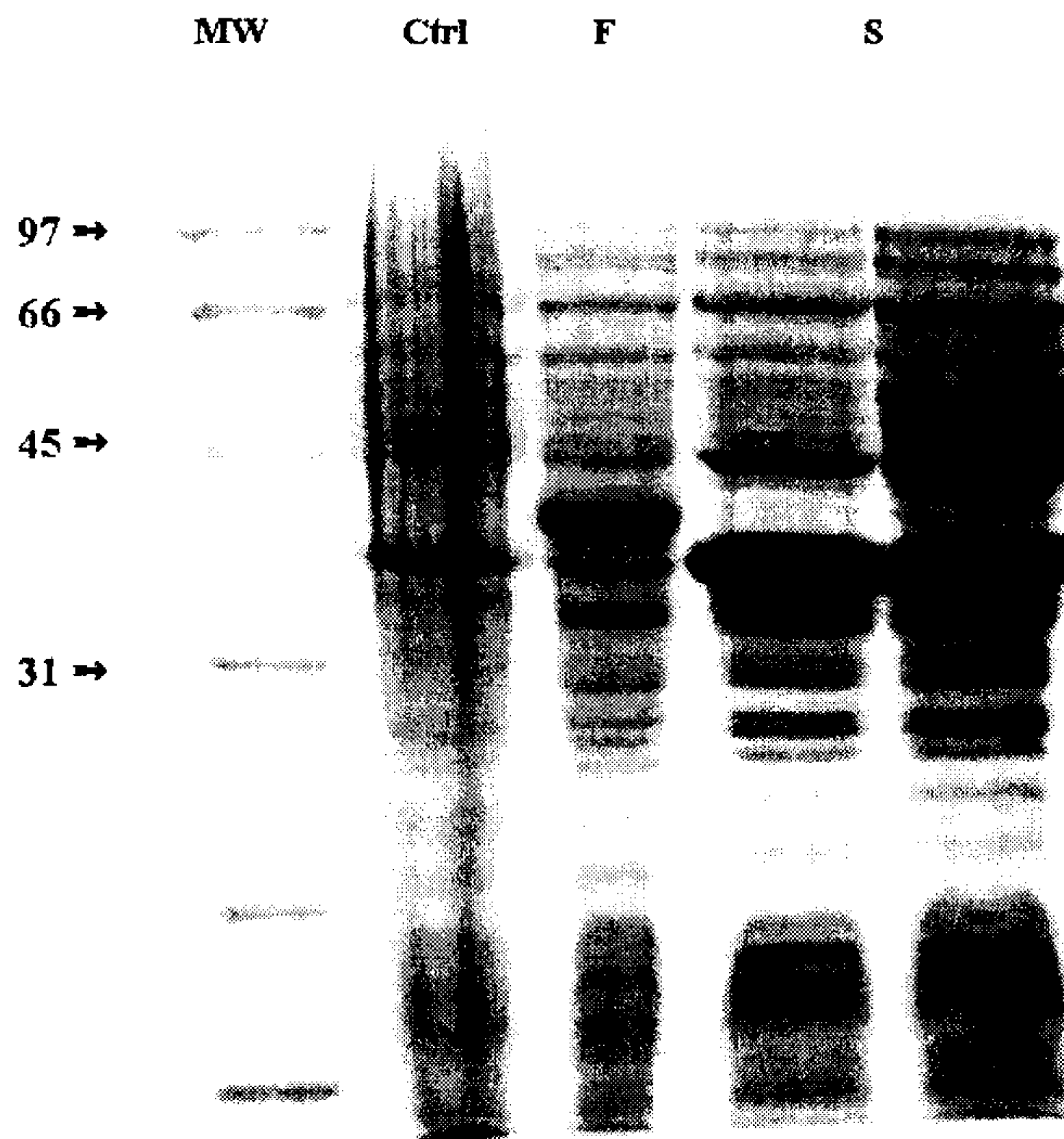


그림 25. SDS-PAGE analysis of HTF expressed in *E. coli*
(F: full-size, S: soluble domain of HTF)

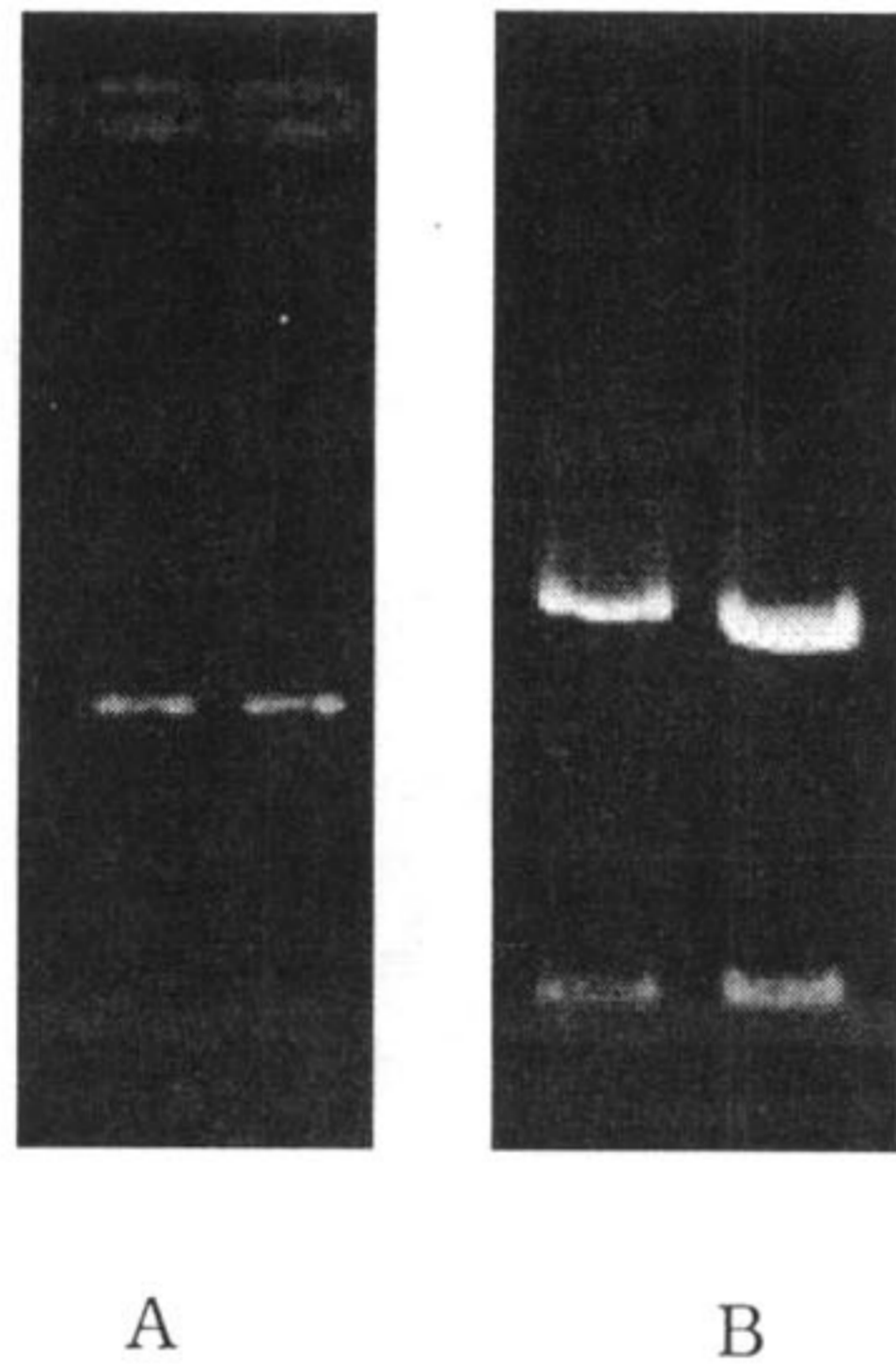


그림 26. A: PCR을 통해 증폭된 human tissue factor 유전자. B: Expression vector에 클로닝된 human tissue factor 유전자를 restriction enzyme(BamH I, EcoR I)을 이용해 확인한 agarose gel 사진.