

특집 : 생리활성물질탐색의 최근 동향(V)

전사인자 NF- κ B 활성화 저해제 탐색

이정준 · 이정형 · 김항섭 · 황방연 · 구태현

생명공학연구소 항암물질연구실

1. 전사인자 NF- κ B

전사인자 NF- κ B(nuclear factor kappa B)는 1986년 B cell에서 immunoglobulin κ light chain에 결합하는 인자로서 발견된 이래 가장 연구가 활발히 진행된 전사인자중의 하나이다 (Baueurie PA et al., 1996). p50 subunit family(p50, p52)와 p65 subunit family(p65, c-Rel, RelB)의 homodimer 또는 heterodimer로 구성된 NF- κ B는 정상상태에서는 그 inhibitor인 I κ B proteins(I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl3)들과 결합한 불활성화된 상태로 세포질에 존재한다. 그러나 cytokine(예, TNF- α , IL-1), bacterial/viral infection(예, LPS, dsRNA), stress(예 ROI, UV, adriamycin, 방사선)등의 다양한 자극에 의해 I κ B proteins이 인산화 되어 분해됨으로서 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- κ B binding site(consensus sequence: 5'-GGGpuNNPyPyCC-3')에 결합하여 유전자의 발현을 유도하게 된다. I κ B proteins의 인산화는 I κ B kinase로 알려진 IKK(IKK α , β)에 의해 일어나게 되는데 IKK의 활성화는 다양한 자극에 의해 유도되어 I κ B proteins의 serine residue(I κ B α 는 Ser32와 Ser36, I κ B β 는 Ser19와 Ser23) 인산화 시킴으로서 인산화된 I κ B protein은 ubiquitination되어 26S proteasome에 의해 분해되게 된다. 최근에 IKK α 와 IKK β 의 세포내 기능이 자세히 밝혀지면서 선택적인 NF- κ B 활성화 조절제의 개발 가능성을 시사하고 있다(Mireille D et al., 1999. Takeda K et al., 1999. Hu Y et al., 1999. Li Q et al., 1999). IKK α 는 초기 발생단계에서 피부나 골격의 형성에 관여하고 IKK β 는 염증반응이나 anti-apoptotic 유전자의 발현에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. TNF- α 나 LPS 등에 의한 NF- κ B 활성화 경로, 즉 I κ B 단백질의 인산화 경로는 비교적 잘 알려져 있으나 UV, γ -ray 등의 radiation에 의한 활성화 경로는 아직 자세히는 밝혀지지 않고 있다. UV가 ROI를 생성하고 growth factor receptor의 활성화에 의한다는 보고도 있으나(Huang R-P et al., 1996), 흥미로운 사실은 자연 환경에서 인체에 가장 문제가 되는 UVB의 경우 TNF의 receptor을 활성화시켜 TNFR-TRAF2의 경로를 통하여 NF- κ B를 활성화시킨다는 점인데(Tobin D et al., 1998), TNF에 의해 유도되는 유전자의 대부분이 UV에 의해서도 유도된다는 사실이 이러한

표 1. 전사인자 NF- κ B에 관련된 질병

septic shock	AIDS
Inflammatory disease	cancer
· asthma	atherosclerosis
· rheumatoid arthritis	노화
· inflammatory bowel disease	기타
· psoriasis	

사실을 뒷받침하고 있다.

이와 같이 전사인자 NF- κ B는 발생, 면역반응 등의 정상생리 기능에도 중요하지만 비정상적인 NF- κ B 활성화는 여러 질병의 병리기전과도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있으므로 비정상적인 NF- κ B의 활성화를 조절하면 퇴행성·난치성질환의 발병이나 진행을 억제할 수 있어 의약품개발의 target으로서 주목을 받고 있다.

2. NF- κ B와 세포사멸

Apoptosis에서의 NF- κ B는 다양한 apoptotic stimuli에 의해 활성화되어 antiapoptotic 기능을 갖는 다양한 protein들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. NF- κ B에 의해 조절되며 anti-apoptotic 유전자로서 확인된 것은 caspases의 저해활성이 있는 것으로 증명된 IAP류(Inhibitor of Apoptosis Protein, cIAP-1, cIAP-2, XIAP), prosurvival Bcl-2 family로서 Bfl-1/A1(Zong W-X et al., 1999), TNFR-associated factor인 TRAF-1, -2(Wang C-Y et al., 1998), zinc-finger protein인 A20(Krikos A et al., 1992), 그리고 IEX-1L(Wu MX et al., 1998)등이 알려져 있다. Anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 기능 중에 하나는 I κ B protein의 분해를 유발시켜 NF- κ B를 활성화하여 antiapoptotic 유전자의 발현을 유도하는 것으로 보고되어 있으며 또한 신경세포인 primary Hippocampal neuron에서는 NF- κ B의 활성화에 의해 Bcl-2와 Bcl-XL의 발현이 유도되는 것으로도 알려져 있다(Tamatani M et al., 1999).

암세포에 있어서 NF- κ B의 활성화는 anti-apoptotic pathway을 활성화시켜 apoptosis에 대한 내성(resistance)을 유발시킴으로서 chemotherapy나 radiotherapy에 대한 내성의 원인이 되며 암의 성장 또는 악성화에 유리하게 작용하는 것으로 알

표 2. 전사인자NF- κ B에 의해 조절되는 anti-apoptotic 유전자
 cIAP(Inhibitor of Apoptosis protein) -1, -2, xIAP
 Mn-SOD, A20, TRAF-1, -2
 Bfl-1/A1, IXL-1L

려져 있다. 암세포에 TNF- α 나 etoposide, doxorubicin, radiation 등의 apoptotic stimuli를 처리하면 NF- κ B가 활성화되어 이들 약물에 의해 유도되는 세포사멸을 억제하게 되는데 암세포에 이런 apoptotic stimuli에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화를 유전자조작이나 약물에 의해 억제하면 apoptosis가 증가되어 이들 약물의 세포독성이 현저히 증가되는 것으로 알려져 있으며(Beg AA et al., 1996, Wang C-Y. et al. 1996), 동물실험 모델에서 암세포의 NF- κ B 활성화를 저해하면 TNF- α 나 CPT-11와 같은 암화학요법에 대한 “inducible resistance”가 나타나지 않아 암세포가 완전히 치료되는 것으로 보고되었다(Wang C-Y et al., 1999). 더구나 일부 악성 암세포에서는 NF- κ B가 활성화되어 있는 것으로도 알려져 있고 NF- κ B에 조절되는 antiapoptotic 유전자인 Bfl-1/A1이 위암 등의 일부 암에 과발현되어 있다.

신경세포에서의 NF- κ B의 활성화는 각 연구자의 실험 system에 따라 신경세포의 사멸을 억제한다는 보고와 사멸유도를 시킨다는 보고도 있지만 신경세포에서도 NF- κ B가 세포사멸에 중요한 역할을 하고 있다. 쥐에 있어, 뇌 허혈이나 외상에 의한 손상시 hippocampus와 cerebral cortex에서 TNF- α 양이 급격한 증가는 NF- κ B의 활성화를 유도시켜 신경세포의 사멸을 억제하는 antiapoptotic signal일 것으로 생각된다. 실제로 TNF- α 나 ceramide로 hippocampal neuron 배양계에서 NF- κ B를 활성화시키면 amyloid peptide나 철이온에 의한 oxidative stress로부터 세포를 보호하며 oxidative stress (amyloid peptide와 hydrogen peroxide)에 내성이 높은 PC12 cell-line에서도 NF- κ B의 활성이 높은 것으로 알려져 있다 (Lezoualc'h F et al., 1998). 또한 IGF-1에 의한 신경세포 보호효과도 NF- κ B의 활성화에 기인한다고 알려져 있다. 이와는 반대로 NF- κ B가 활성화되어 신경세포의 사멸을 유도한다는 보고도 있다. 예로서 Alzheimer's disease 환자의 경우 신경독성 peptide인 β -amyloid가 침착되는데 이 peptide는 glutamate 경로를 거쳐, oxygen radical을 생성하여 전사인자 NF- κ B를 활성화시키게 되며 Alzheimer's disease 환자의 병소 주위에 다량의 활성화된 NF- κ B가 발현되고 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 실험동물 model에서 glutamate에 의해 유발되는 신경손상(apoptosis)은 NF- κ B의 활성화 저해제로 알려진 aspirin으로 처리하면 저해된다고 보고되어 있다(Grilli M et al., 1996). 또한 다른 ischemia 동물모델에서 ischemia에 의해 NF- κ B가 활성화되어 신경세포의 사멸을 촉진시키는데 NF- κ B의 p50 family의 knock-out mouse에서는 ischemia에 의한 신

생물산업

경세포의 사멸이 현저히 감소되는 것으로 알려져 있다(Schneider A et al., 1999).

3. Caspase 활성화와 NF- κ B

NF- κ B가 anti-apoptotic protein의 발현을 조절하여 antiapoptosis기능을 갖는 전사인자라는 사실이 밝혀진 이래 위에서 언급한 수종의 anti-apoptotic 단백질이 동정되어 왔으며 그 중에서 IAP류에 대한 연구가 가장 활발히 연구되어 왔다(Deveraux QL et al., 1999, LaCasse EC et al., 1998). IAP protein은 최초로 baculovirus에서 발견된 이래 사람 및 동물 세포에서 그 homologue 단백질이 발견되어 새로운 family의 anti-apoptotic protein을 이루고 있으며 사람으로부터는 현재 까지 NIAP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, Survivin, BRUCE 등 6종의 IAP류가 동정되었는데 대부분이 NF- κ B에 의해 그 발현이 조절되는 것으로 알려져있다(Chu Z-L et al., 1997, Wang C-Y et al., 1998, Stehlik C et al. 1998). 세포에 IAP류 protein을 과발현 시켰을 경우 TNF, FAS, etoposide 등의 다양한 proapoptotic signal에 의해 유도되는 apoptosis를 저해하는데 이는 IAP류 protein의 caspases저해 활성화에 기인한다. Death receptor를 통하여 FADD를 매개로한 caspase-8의 활성화와 다양한 proapoptotic signal에 의한 Apaf-1를 매개로한 caspase-9의 활성화는 caspases의 활성화cascade에 있어서 가장 중요한 두 개의 경로로 알려져 있다. XIAP, c-IAP1, c-IAP2는 etoposide, stress, radiation 등의 다양한 자극에 의해 mitochondria로부터 유리되는 cyt c에 의해 유도되는 procaspase-9의 활성화 경로를 저해하여 apoptosis를 저해할 뿐만 아니라 caspase-8에 의해 활성화되는 caspase-3와 caspase-6, -7 등의 활성을 직접 저해함으로써 TNF, FAS, etoposide 등의 광범위한 자극에 의

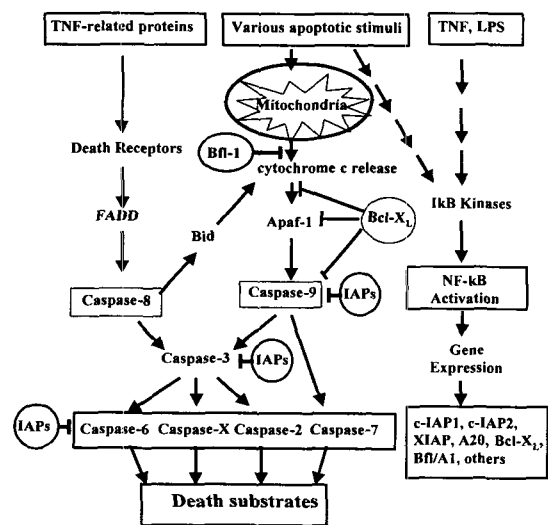


그림 1. NF- κ B에 의해 조절되는 antiapoptotic 단백질과 caspases의 상호작용.

한 apoptosis를 효과적으로 저해하는 것으로 알려져 있다 (Deveraux QL et al., 1998).

4. NF- κ B와 염증반응

전사인자 NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β 등의 proinflammatory cytokines과 LPS 등에 의해 활성화되어 TNF- α , cyclooxygenase-2, iNOS 등의 많은 염증유발인자들의 발현을 증가시켜 염증반응을 유도한다(표 3). 대표적인 항염증제로 알려진 glucocorticoid 류나 aspirin류의 항염증작용의 중요한 mechanism으로서 NF- κ B의 활성화를 저해하는 것으로 알려져 있으며 한방이나 민간에서 항염증제로 사용되어왔던 약물들도 NF- κ B의 활성화를 저해하는 기전에 의해 그 활성을 나타내는 경우가 많다. 또한 많은 실험모델에서 유전자조작이나 약물에 의해 NF- κ B의 활성화를 저해하면 염증유발인자들의 발현의 감소와 함께 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있다.

상기에서 서술한 바와 같이 전사인자 NF- κ B는 세포사멸뿐만 아니라 염증반응 모두에 중요한 "Dual Effect"를 가지고 있다. 따라서 NF- κ B의 활성을 조절함으로써 비정상적인 세포사멸과 염증반응에 기인한 난치성질환을 치료할 수 있다. 한 예로서 퇴행성질환 중에 하나인 류마티스의 경우를 들 수 있다. 류마티스의 특징은 염증반응과 hyperplasia인데 여기에 모두 NF- κ B가 관여하고 있다. 류마티스의 synovium의 synoviocyte는 다양한 자극에 의해 NF- κ B가 활성화되고 이 활성화된 NF- κ B는 염증유발인자를 발현시키는 동시에 synoviocyte의 apoptosis를 저해함으로써 염증반응과 hyperplasia를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 류마티스의 동물실험 모델에서 유전자조작이나 약물에 의해 NF- κ B의 활성화를 저해하면 염증유발인자의 생성이 감소되고 더불어 apoptosis가 증가되어 류마티스의 염증반응과 hyperplasia모두 현저히 저해되는 것으로 알려져 있다(Miagkov AV et al., 1998).

표 3. NF- κ B에 의해 조절되는 염증유발인자들

Pro-inflammatory cytokines	Inflammatory enzymes
· Tumor necrosis factor- α	· iNOS
· Interleukin-1 β	· COX-2
· Interleukin-2	· 5'-lipoxigenase
· Interleukin-6	· cPLA ₂
· GM-CSF	
Chemokines	Adhesion molecules
· Interleukin-8	· ICAM-1
· RANTES	· VCAM-1
· Macrophage inflammatory protein-1 α	· E-selectin
· Macrophage chemotactic peptide-1	Receptors
· Eotaxin	· Interleukin-2 receptor (α -chain)
	· T-cell receptor(β -chain)

5. 연구동향

세포사멸에 대한 연구는 세계적으로 가장 활발히 연구되고 있는 분야중의 하나이며 세포사멸 네트워크의 조절을 통한 새로운 치료제의 개발에 현재 미국, 일본, EU를 중심으로 많은 투자를 하고 있는 실정이다. 세포사멸기전에 대한 연구는 지난 수년간 눈부신 발전을 거듭하여 세포가 다양한 신호에 반응하여 세포사멸을 일으키는 "death signal"과 이에 대응하는 "survival signal"이 복잡하고 정교한 조화에 의해 조절되고 있음이 밝혀지고 있다. Anti-apoptotic Bcl-2 family protein의 발견과 pro-apoptotic Bcl-2 family의 발견, 그리고 이들이 다양한 세포의 자극에 반응하여 서로 상호작용에 의해 섬세하게 조절되고 있는 것이 밝혀지고 있다. 또한 Apoptosis의 집행자인 caspase가 소위 "death receptor"를 통한 caspase-8의 활성화를 통한 경로와 genotoxic agent 등에 의한 mitochondria를 경유한 caspase-9의 활성화를 통한 경로가 밝혀졌고 또한 Bid에 의해 이들 두 경로가 서로 연결되었다는 사실과 caspase들의 기질단백질도 잘 알려져 있다. 뿐만 아니라 proapoptotic signal에 대응하는 antiapoptotic 유전자의 발현은 NF- κ B에 의해 조절되며 caspase 저해활성이 있는 IAP류를 비롯한 수종의 유전자가 NF- κ B에 의해 조절되는 antiapoptotic 유전자로 밝혀졌다. 특히 세포사멸의 네트워크의 조절을 통하여 암, Alzheimer's disease, stroke, ischemia, 류마티스 등의 많은 난치성 퇴행성질환을 효과적으로 치료할 수 있는 가능성을 제시하고 있다. 예를 들어 암의 경우 NF- κ B활성화 저해제와 기존의 항암제와 병용 투여하면 내성이 유발되지 않고 효과적으로 암을 치료할 수 있으며, 또한 류마티스의 경우도 NF- κ B 활성화 저해제에 의해 염증반응이 억제되고 세포사멸이 유도되어 우수한 치료효과를 나타낸다는 사실도 밝혀 졌다. 또한 caspase 저해제에 의해 다양한 동물모델에서 ischemia, stroke, Alzheimer's disease, Huntington's disease등에서 유도되는 신경세포의 사멸을 저해할 수 있다는 것이 증명되었다.

이러한 이유에서 Merck, Kyowa Hakko 등을 비롯한 선진

표 4. NF- κ B 활성화 저해제 개발 기업

기업명	연구목표
Signal Pharmaceuticals사	MAPK 및 전사인자 AP-1, NF- κ B의 활성화조절물질
Prolifix	IAP(inhibitor of apoptosis protein)의 발현조절물질
Apoptogen사	비정상적인 세포사멸을 조절하는 화합물
Vertex Pharmaceuticals사	caspase의 활성조절물질
MitoKor사	미토콘드리아를 target으로한 신경 세포 사멸조절물질

표 5. 천연물에서 보고된 NF- κ B 활성화 저해물질

화합물명	자극의 종류	참고문헌
Curcumin	TNF- α , IL-1	Biochem. Pharmacol. 55, 965-973, 1998
Capsaicin	TNF- α , PMA	J. Immunol., 157, 4412-4420, 1996
Hymenialdisine	TNF- α	J. Pharmacol. Exp. Ther., 282, 459-466, 1997
Helénalin	TNF- α	J. Biol. Chem., 273, 33508-33516, 1998
Thujopsis lignan	IL-1	일본특허, JP 96-335396
Sulfasalazine	TNF- α , LPS, PMA	J. Clin. Invest., 101, 1163-1174, 1998
Sanguinarine	TNF- α , LPS, PMA	J. Biol. Chem., 272, 30129-30134, 1997
Taxol	PMA	Oncogene, 18, 495-505, 1999
silymarin	okadaic acid	FEBS Letter, 440, 8-12, 1998
Triptolide	TNF- α	J. Biol. Chem., 274, 13451-13455, 1999

국들의 많은 제약기업에서 세포사멸을 조절할 수 있는 저분자 약물의 개발에 많은 투자를 하고 있으며 몇 가지 예를 들면 표 4와 같다.

전사인자 NF- κ B나 initiator caspase인 caspase-8, -9의 활성화 조절물질의 개발현황을 보면 initiator caspases들의 활성화저해제가 천연물로부터 개발되었다는 보고는 아직 없으나 NF- κ B의 활성화를 조절하는 화합물의 개발은 좀더 진척되어 있다. 대표적인 항염증제인 glucocorticoid나 aspirin이 NF- κ B 활성화저해제로 밝혀진 이래 세포사멸조절제, 항암제, 염증성질환 치료제, 패혈증치료제 등의 개발목적으로 천연물로부터 수종의 저해제가 보고되고 있으며 그 예는 표5와 같다.

6. 연구 방법 및 결과

6-1. 세포 및 세포배양

Mouse의 대식세포인 RAW264.7세포주, 사람의 경부암 HeLa세포주, 쥐의 신경세포인 B103세포주, 사람의 유방암 MCF-7세포주는 10% FBS를 함유한 DME(Dulbecco's Modified Eagle)배지로, U937, HL-60세포주는 10% FBS가 함유된 RPMI배지로 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 배양하고 일주일에 2회씩 계대하여 유지하였다. NF- κ B reporter vector를 넣은 세포주들은 각 세포의 배양배지에 G418이 0.8mg/ml을 넣어 배양하였다. Reporter 유전자는

생물산업

secreted alkaline phosphatase 유전자를 사용하였고, AP-1의 활성화에는 영향 없이 NF- κ B의 활성을 선택적으로 조절하는 물질의 검색을 위하여 AP-1 reporter 벡터를 조제하여 각각의 세포에 도입시켜 사용하였다.

6-2. NF- κ B 활성측정

각 세포주들이 TNF- α , LPS, oxidative stress, UV 등의 다양한 자극에 반응하여 활성화되는 NF- κ B의 양을 reporter인 alkaline phosphatase의 활성으로 측정하였다. HeLa-NF-AP세포를 이용하여 TNF- α 에 의한 NF- κ B의 활성을 측정한 예를 들면 다음과 같다. G418이 0.5mg/ml이 함유된 DME배지에 배양한 세포를 trypsin/EDTA로 처리하여 세포를 떼어내고 FBS가 0.5% 함유된 DME배지에 2×10⁵ cells/ml이 되도록 세포수를 조정하여 96-well에 200 μ l씩 넣고 37°C, CO₂ incubator에서 3시간 동안 배양한 후 다양한 농도의 TNF- α 세포를 자극한 후 37°C, CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양한 후, 배양액 100 μ l를 회수하여 새로운 96-well plate에 넣고 배지에 분비된 alkaline phosphatase 활성을 측정하였다. 또한 시료의 NF- κ B에 대한 효과를 측정하기 위한 실험에서는 시료 2 μ l를 넣고 최종 TNF- α 의 농도가 2ng/ml로 되도록 한 다음 alkaline phosphatase의 활성을 측정하였다. Alkaline phosphatase 활성의 측정은 회수한 배양액 100 μ l를 65°C에서 10분 동안 가열한 후 동량의 2X SEAP buffer(2M의 diethanolamine, 1 mM의 MgCl₂ 및 20mM의 L-homoarginine이 함유)을 가해 주고 37°C에서 10 분간 배양한 후 1X SEAP buffer(1M의 diethanolamine, 0.5mM의 MgCl₂ 및 10mM의 L-homoarginine이 함유)에 기질인 p-nitrophenyl phosphate(31.6 mg/ml stock solution)를 20 μ l씩 넣고 37°C에서 3시간 배양한 후, ELISA reader를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 예로서 본 시스템을 이용하여 HeLa-NF-AP세포의 UV 및 TNF- α 에 대한 NF- κ B의 활성화를 아래에 보였다.

6-3. Gel-Shift Assay를 이용한 NF- κ B 활성측정법

10cm 세포배양 dish에 80% 정도로 자란 세포에 다양한 자극으로 자극한 다음 원하는 시간만큼 배양한 다음 PBS로 3회 세척한 후 세포를 모은다. 이 세포 pellet에 400 μ l의 Buffer

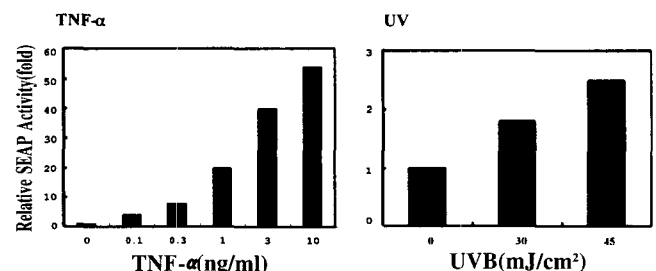


그림 2. HeLa-NF-AP세포의 자극에 대한 반응성.

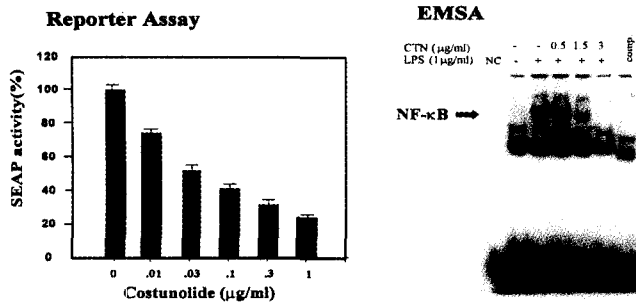


그림 3. Costunolide의 NF-κB 활성화 저해.

A(10mM HEPES-KOH pH 7.9, 1.5mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5mM dithiothreitol, 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 가하고 얼음 위에서 10분간 배양한 후 10초 동안 vortex 한 후 핵을 15,000 rpm에서 10초 동안 원심분리하여 모은다. 이 핵에 50 μl의 buffer B(20mM HEPES-KOH pH 7.9, 25% glycerol, 420 mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.5 mM dithiothreitol, 0.2mM phenylmethylsulfonyl fluoride)를 넣고 얼음 위에서 20동안 배양한 후 핵 추출물을 15,000rpm에서 2분 동안 원심 분리하여 조제한다. 이 핵 추출물을 이용하여 Promega사(Promega, Madison, WI, USA)의 Gel-shift assay kit를 이용하여 ³²P로 표식된 NF-κB 및 AP-1의 consensus sequence에 결합하는 NF-κB 및 AP-1의 양을 정량한다. 본 실험실에서 분리한 NF-κB 활성화저해제인 costunolide의 실험예를 LPS에 대한 NF-κB 활성화저해효과를 reporter assay 결과와 함께 다음에 나타내었다.

6-4. 활성물질의 분리정제 및 동정

6-4-1. 검색시료의 조제

방선균, 곰팡이의 배양액의 50% acetone추출물과 식물의 추출액을 검색에 사용하였다. 활성 시료에 대하여서는 용매 분획을 실시한 후 재차 활성검색을 하여 활성을 확인 및 활성 물질의 성질을 파악한 후 시료를 대량 확보하여 분리 정제하였다.

6-4-2. 활성물질의 분리정제 및 구조결정

용매분획, silica gel column chromatography, HPLC, TLC 등의 각종 천연물화학적 기법을 이용하여 활성물질을 순수하게 분리 정제하였다. 순수하게 분리된 화합물에 대하여 각종 이화학적 상상 및 UV, IR, HR-MS, 1H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, COSY, HMBC등의 기기분석을 통하여 그 구조를 동정하였다.

본 연구를 통하여 다양한 자극에 대한 NF-κB활성화조절제로 분리 정제하여 구조 동정한 화합물 중 몇 종의 예를 다음에 나타내었다.

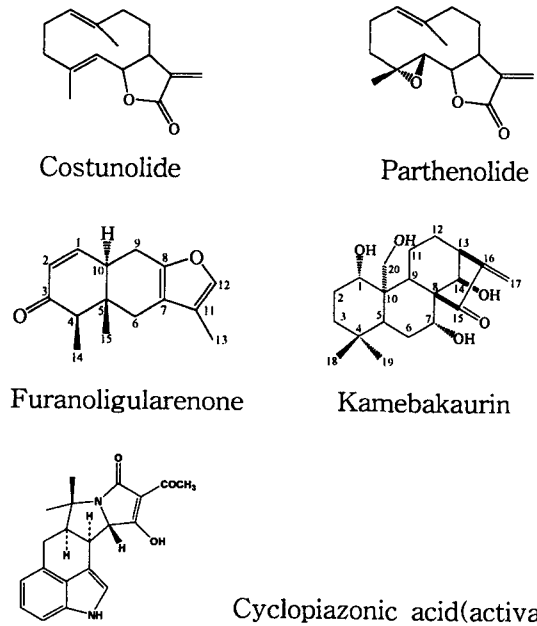


그림 4. 본연구에서 분리한 NF-κB활성 조절물질.

6-5. Immunoblot Analysis

활성물질에 의해 발현이나 processing이 조절되는 단백질에 대하여 immunoblot를 이용하여 분석한다. Immunoblot은 10 cm 배양dish에 80-90% 자란 세포에 다양한 자극과 시료의 존재 하에 자극한 다음 PBS로 3회 세척한 후 0.2ml의 ice-cold lysis buffer(50mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% Nonidet P-40, 1mM EDTA, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1μg/ml leupeptin, 150mM NaCl)를 넣고 homogenize하여 total cell lysate를 얻고 Bradford의 방법으로 단백질을 정량한 후 목적에 따라 50-100μg/lane의 단백질을 6%-10% SDS-polyacrylamide gels에 roading한 후 30mA에서 2시간 동안 running한 후 단백질을 PVDF membrane에 옮긴다. 이 membrane을 5% skim milk로 blocking한 다음 원하는 1차 항체와 2차 항체로 순서대로 배양한 후 Amersham사의 ECL system을 이용하여 원하는 signal을 검출한다. 한 예로서 본 연구실에서 분리한 NF-κB 저해제인 costunolide가 RAW264.7세포에서 LPS에 의한 IκB-α의 인산화저해효과를 immunoblot로 분석한 결과를 다음에 보였다.

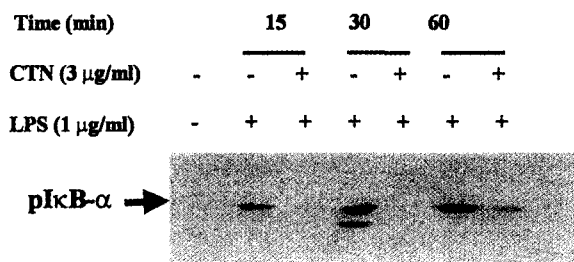


그림 5. Costunolide의 IκB 인산화 저해.

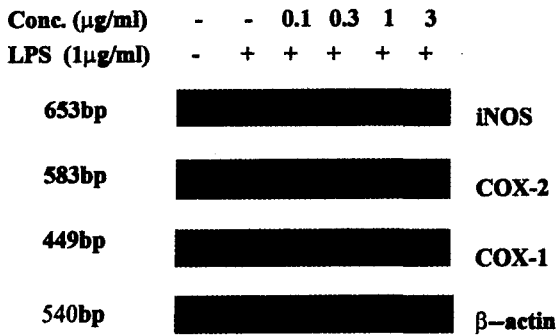


그림 6. Kamebakaurin의 iNOS 및 COX-2mRNA 발현저해활성.

6-6. Northern blot 및 RT-PCR

활성물질에 의해 발현이 조절되는 유전자에 대하여 Northern blot이나 RT-PCR 방법으로 발현에 미치는 영향을 조사한다. Northern blot은 다양한 조건으로 실험한 시료로부터 mRNA 또는 total RNA를 분리한 다음 2.2M formaldehyde가 함유한 1% agarose gel상에서 size-분획한 후 nylon membrane에 RNA를 transfer한 다음 ³²P로 표식된 분석하고자 하는 유전자의 cDNA 단편(probe)과 hybridization을 실시하고 SSC/SDS로 세척한 후 x-ray film에 노출시켜 원하는 signal을 얻는다. RT-PCR은 RNA에로부터 cDNA를 합성한 다음 분석하고자 하는 유전자의 specific primer를 이용하여 PCR을 실시한 후 PCR product를 agarose gel에서 분리하여 분석한다. 예를 들어 본 연구실에서 분리한 NF-κB활성화저해제인 kamebakaurin이 RAW264.7 세포에서 LPS에 의해 유도되며 NF-κB에 의해 발현이 조절되는 iNOS(inducible nitric oxide synthase) 및 cyclooxygenase-2의 발현을 RT-PCR로 분석한 예를 보였다.

7. 참고문헌

1. Baeuerie PA and Baltimore D. 1996. NF-κB: Ten Years After. *Cell* **87**: 13-20.
2. Baker SJ and Reedy EP. 1998. Modulation of life and death by the TNF receptor superfamily. *Oncogene* **17**: 3261-3270.
3. Baldwin AS, Makarov SS. 1998. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 13859-13864
4. Beg AA and Baltimore D. 1996. An essential role for NF-κB in preventing TNF-α-induced cell death. *Science* **274**: 782-784.
5. Chu Z-L, Mckinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH and Ballard DW. 1997. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-κB control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 10057-10062.
6. Deveraux QL and Reed JC. 1999. IAP family proteins-

- suppressors of apoptosis. *Genes & Development* **13**: 239-252.
7. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, Alnemri ES, Salvensen GS and Reed JC. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of caspases. *The EMBO Journal* **17**: 2215-2223.
8. Dragovich T, Rudin CM, and Thimpson CB. 1998. Signal transduction pathways that regulate cell survival and cell death. *Oncogene* **17**: 3207-3213
9. Green DR and Reed JC. 1998, Mitochondria and Apoptosis. *Science* **281**: 1309-1312.
10. Grilli M, Pizzi M, Memo M and Spano P. 1996. Neuroprotection by Aspirin and Sodium salicylate through blockade of NF-κB activation. *Science* **274**: 1383-1385.
11. Hu Y, Baud V, Delhase M, Zhang P, Deerinck T, Ellisman M, Johnson R and Karin. 1999. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKα subunit of IκB kinase. *Science* **284**: 316-320.
12. Hu Y, Ding L, Spencer DM and Nunez G. 1998. WD-40 repeat region regulates Apaf-1 self-association and procaspase-9 activation. *J. Biol. Chem.* **273**: 33489-33494.
13. Krikos A, Laherty CD and Dixit VM. 1992. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor α-inducible zinc finger, A20, is mediated by κ B elements. *J. Biol. Chem.* **267**: 17971-17976.
14. Kroemer G, Petit PX, Zamzami N, Vayssiere J-L and Mignotte B. 1992. The biochemistry of Apoptosis. *FASEB Journal* **9**: 1277-1287.
15. LaCasse EC, Baird S, Korneluk RG and MacKenzie AE. 1998. The inhibitors of apoptosis and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**: 3247-3259.
16. Lezoualc'f F, Sagara Y, Holsboer F and Behl C. 1998. High constitutive NF-κB Activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells. *J. Neurosci.* **18**: 3224-3232. 1998.
17. Li Q, Van Antwerp D, Mercurio F, Lee K-F, and Verma IM. 1999. Severe liver degeneration in mice lacking the IκB kinase 2 gene. *Science* **284**: 321-325.
18. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell* **21**;94: 481-90
19. Miagkov AV, Kovalenko DV, Brown CE, Didsbury JR, Cogswell JP, Stimpson SA, Mireille D, Hayakawa M, Chen Yi and Karin M. 1999. Positive and negative regulation if IκB kinase activity through IKKβ subunit phosphorylation. *Science* **284**: 309-313.
20. Nagata S. 1997. Apoptosis by death factor. *Cell* **88**: 355-365.
21. Nunez G, Bebedict MA, Hu Y and Inohara N. 1998.

- Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene* **17**: 3237-3245.
22. Schneider A, Martin-Villalba A, Weih F, Vogel J, Wirth T and Schwaninger M. 1999. NF- κ B is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nature Medicine* **5**: 554-559.
 23. Sheikh MS, Antinore MJ, Huang Y and Fornace Jr. AJ. 1998. Ultraviolet-irradiation-induced apoptosis is mediated via ligand independent activation of tumor necrosis factor receptor 1. *Oncogene* **17**: 2555-2563.
 24. Stehlik C, de Martin R, Kumabashiri I, Schmid JA, Binder BR and Lipp J. 1998. Nuclear-kappaB-regulated x-chromosome-linked iap gene expression protects endothelial cells from tumor necrosis alpha-induced apoptosis. *Journal of Experimental Medicine* **188**: 211-216.
 25. Takeda K, Takeuchi O, Tsujimura T, Itami S, Adachi O, Kawai T, Sanjo H, Yoshikawa K, Terada N and Akira S. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science* **284**: 313-316.
 26. Tamatani M, Che YH, Matsuzaki H, Ogawa S, Okado H, Miyake S, Mizuno T and Tohyama M. 1999. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF-kB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **274**: 8531-8538.
 27. Thornberry NA and Lazebnik Y. 1998. Caspases: Enemies within. *Science* **282**: 1312-1316.
 28. Tobin D, Van Hogerinden M and Toftgard R. 1998. UVB-induced association of tumor necrosis factor receptor 1/TNF receptor-associated factor 2 mediates activation of Rel proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 565-569
 29. Tompson CB. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**: 1456-62.
 30. Wang C-Y, Cusack Jr. JC, Liu R and Baldwin Jr. AS. 1999. Control of inducible chemoresistance: Enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF- κ B. *Nature Medicine* **4**: 412-417.
 31. Wang C-Y, Mayo MW and Baldwin Jr. AS. 1996. TNF- and Cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF- κ B. *Science* **274**: 784-787.
 32. Wang C-Y, Mayo MW, Korneluk RC, Goeddel DV and Baldwin Jr. AC. 1998. NF- κ B Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**: 1680-1683.
 33. Wu MX, Ao Z, Prasad KVS, Wu R and Schlossman. 1998. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF- κ B-mediated cell survival. *Science* **281**: 998-1001.
 34. Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J and Kormeyer SJ. 1996. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X. *Cell* **87**:619-628.
 35. Zong W-X, Edelstein LC, Chen C, Bash J and Gelinas C. 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF- κ B that blocks TNF α -induced apoptosis. *Genes & Development* **13**: 382-387.
 36. Zou H, Li Y, Liu X and Wang X. 1999. An APAF-1 · Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activate procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**: 11549-11556.