

## 세포사멸 조절 단백질인 IEX-1의 새로운 결합단백질로서의 CATHEPSIN B의 발견

유상미<sup>1</sup> · 이강석<sup>1</sup> · 배지현<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>중앙대학교 자연과학대학 생명과학과, <sup>2</sup>중앙대학교 약학대학 약학부

### Identification of CATHEPSIN B as a Novel Binding Protein of the Cell Death Regulating Protein IEX-1

Sang-Mi Ryou<sup>1</sup>, Kangseok Lee<sup>1</sup> and Jeehyeon Bae<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Life Science, College of Natural Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**ABSTRACT** : Previously, we identified that the overexpression of IEX-1 induces apoptosis in ovarian cancer cells. Herein we report a new binding partner of IEX-1, CATHEPSIN B, as a lysosomal enzyme which contributes to the various apoptotic signaling in tumor cells. To investigate how IEX-1 regulates cellular survival and death event, we performed yeast two-hybrid screening of rat ovarian cDNA library using IEX-1 as the bait and found CATHEPSIN B. In the present study, CATHEPSIN B and IEX-1 proteins were overexpressed in 293T cells and their specific association was determined by immunoprecipitation and immunoblot analysis. In addition, the endogenous interaction between CATHEPSIN B and IEX-1 was confirmed in HeLa cells. The current finding of lysosomal CATHEPSIN B as the IEX-1-binding partner implies that IEX-1 may involve in lysosome-mediated apoptotic signaling pathways.

**Key words** : IEX-1, CATHEPSIN B, Apoptosis

**요 약** : 선행연구에서 본 연구자는 IEX-1 단백질이 난소 암세포에서 세포사멸(apoptosis)을 유도하는 기능을 수행함을 확인하였으나, 세포사멸과 세포생존의 여러 단계에서 어떠한 신호전달 체계로 IEX-1이 작용하는지는 정확히 알지 못하고 있다. 따라서 IEX-1 단백질과 결합하는 새로운 단백질을 찾기 위해 yeast two-hybrid system을 이용하였다. 그 결과 IEX-1이 여러 다양한 인간 암 세포에서 세포사멸을 유도하는 CATHEPSIN B 단백질과 결합함을 밝혔다. 본 연구에서는 리소좀 프로테아제의 일원인 CATHEPSIN B 단백질과 IEX-1 단백질의 결합을 면역침강법과 western blot 분석으로 확인하였다. 그러므로 이 결과들을 통해서 IEX-1과 CATHEPSIN B는 세포 내에서 서로의 기능에 영향을 미칠 것으로 예상되며, 세포사멸을 유도하는 IEX-1 단백질이 lysosome-mediated apoptotic pathway에 관여할 가능성을 시사한다.

### 서 론

Immediate early gene X-1(IEX-1, 또는 *Dif2*, murine orthologs *gly96*, *PRG1*)은 세포의 성장과 세포사멸(apoptosis)을 조절하는 중요한 단백질로 알려져 있으며(Charles et al., 1993; Kumar et al., 2004), 방사선조사(X-, UV-irradiation),

stress 혹은 성장인자(epidermal growth factor), inflammatory stimuli(lipopolysaccharide, ceramide) 등의 요인에 의해 초기에 발현이 조절되어지는 것으로 알려져 있다(Kobayashi et al., 1998; Kondratyev et al., 1996). 또한 steroid hormones (1 $\alpha$ , 25-dihydroxyvitamin D3), p53의 과다 발현에 의해 IEX-1의 발현양이 감소하는 것으로 알려져 있다(Im et al., 2002; Kobayashi et al., 1998). IEX-1의 발현증가는 keratinocytes와 HeLa 세포의 성장률 증가와 관련이 있으며(Arlt et al., 2001; Schilling et al., 2001), 발현감소는 hepatocyte와 293T 세포의 성장증식 감소에 관련 있다고 보고되었다.

\* 교신저자: 배지현, 서울 동작구 흑석동 221 중앙대학교 약학대학 약학부. (우) 156-756, (전) 02-820-5604, (팩) 02-816-7338, E-mail: jeehyeon@cau.ac.kr

(Arlt et al., 2003; Yoon et al., 2009). 이와는 다르게, 세포 성장신호의 억제 효과를 나타내는 것이 보고되었다. 예를 들어, IEX-1 단백질은 TNF- $\alpha$  신호전달 체계억제와 PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)와 AKT의 활성화 억제, 그리고 anti-apoptotic BCL-2 family member인 MCL-1의 발현 억제를 유도하는 것으로 보고되었다(Osawa et al., 2003; Schilling et al., 2001; Zhang et al., 2003; 김 등, 2011). 즉, IEX-1은 세포의 사멸을 유도하거나, 세포의 성장을 촉진하는 신호체계에 관여하는 등 서로 상반된 기능을 동시에 가지는 단백질이다(Arlt et al., 2001; Arlt et al., 2003). 또한 IEX-1은 난소에서 중요한 기능을 수행하는 유전자이며, fertility에 밀접하게 관여한다고 보고되었다(Schilling et al., 2001; Tilly et al., 1991).

단백질 분해효소(Protease: peptidase)는 catalytic mechanisms에 따라 aspartic, cysteine, glutamic, metallo, threonic, 그리고 serine proteases로 구분되어진다(Barrett, 1994). Caspases는 가장 많이 연구된 cysteine proteases로 세포사멸 조절에 여러 기작을 통해 관여하는 것으로 알려져 있다. 다른 cysteine protease 중 하나인 CATHEPSIN은 1920년도에 처음으로 보고되었으며, 'lysosomal proteolytic enzyme'로 알려져 있다. 11개의 human CATHEPSIN이 보고되었으며(CATHEPSIN B, H, L, S, F, K, C, W, X, V, 그리고 O), 그 중 많은 양의 CATHEPSIN B와 L이 리소솜에 존재하며(Turk et al., 2002), CATHEPSIN은 불활성 형태인 preproenzyme으로 합성되어 성숙한 활성형인 형태로 리소솜에서 세포질로 분비된다(Felbor et al., 2000).

세포사멸은 specific nuclease의 활성화에 의해, 세포의 plasma membrane 내에서 발생하는 세포가 죽어가는 방식의 한 형태이다. 세포사멸의 신호전달은 death receptor와 ligand 결합에 의한 caspase-8 또는 caspase-10 그리고 caspase-3의 활성화가 유도되는 extrinsic pathway와 미토콘드리아 의존적인 cytochrome *c* 분비를 이용한 intrinsic pathway가 존재한다. 분비된 cytochrome *c*에 의해 caspases-9/3의 활성화는 membrane blebbing, cell shrinkage 그리고 DNA fragmentation과 같은 세포사멸의 형태적 특징을 유발한다(Green & Reed, 1998). 또한 세포사멸은 다양한 기작으로, 다양한 proteolytic enzyme을 통해 작용된다. 최근 발표된 논문에서 cell damage 또는 특정 stimulation 조건에서 caspase-mediated proteolysis에 의한 세포사멸 조절에 CATHEPSIN

과 같은 다른 proteases가 관여한다고 보고되었으며, 또한 그 중 CATHEPSIN B, L 그리고 D가 세포사멸 조절에 중요한 역할을 하는 것이 밝혀졌다(Koblinski et al., 2000). 일단 세포질로 CATHEPSIN B가 분비되면 세포사멸 기작을 활성화 시키거나 증가시키는 것으로 알려져 있다. Caspase-2/-8에 의해서 CATHEPSIN B는 리소솜에서 분비되고, 미토콘드리아에서 cytochrome *c* 분비를 촉진하여 caspase-3/-9의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한 CATHEPSIN B는 procaspase-1과 procaspase-11의 processing에도 관여하여 nuclear apoptosis를 유도하는 것이 보고되었다(Vancompermolle et al., 1998). CATHEPSIN B의 세포 내 발현량 증가 및 감소 현상은 많은 종양(tumor) 종류에서 다양하게 나타났으며, 이는 세포의 전이과정에 직접적으로 연관이 있음을 시사한다(Tait et al., 1999). 최근 이러한 과정이 'lysosomal pathway of apoptosis'로 명명되었다(Li et al., 2000). 그러나 CATHEPSIN B의 직접적인 target protein-substrate는 아직 밝혀지지 않았다. 또한 이러한 기작은 CATHEPSIN B inhibitor인 Spi2A에 의해 발현 유도되어지는 전사 인자인 NF- $\kappa$ B에 의해 억제되어 지는 것이 보고되었으며, 이 억제 기작은 death receptor를 매개로 하는 세포사멸 임이 확인되었다(Li et al., 2003; Manna et al., 1998). 본 연구에서는 IEX-1이 세포 종류에 따라 어떻게 다양한 기능을 가질 수 있는지, 어떻게 세포사멸을 유도할 수 있는지 확인하고자 새로운 결합 단백질을 찾자 하였다. 선행연구에서 본 연구자들은 yeast two-hybrid 시스템으로 IEX-1을 bait로 하여 human ovarian cDNA library에서 IEX-1과 결합하는 단백질을 확인하였다. 그 중에서 'lysosomal pathway of apoptosis'에서 중요한 역할을 하는 cystein protease member인 CATHEPSIN B가 IEX-1과 강하게 결합력을 나타냄을 확인하였으며, yeast two-hybrid 결과를 바탕으로 인간 암 세포주에서 두 단백질이 직접적으로 결합하는 것을 확인하였다. 이 두 단백질의 결합은 IEX-1 단백질의 카복시 말단 부위를 통해 이루어짐을 예측하였다. 이런 결과를 통해 세포사멸이 진행되는 동안 lysosomal protease에 의해 특이적으로 분해되는 기질 연구와 같은 lysosomal permeabilization의 작용 기작과 signaling pathway에 관한 연구는 apoptosis pathway에 앞선 연구를 제시할 수 있으며, lysosome dysfunction과 관련된 질병의 치료에 적용할 수 있는 큰 잠재성이 있음을 시사하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 세포주 및 세포배양

본 연구에서 293 세포주와 HeLa 세포주를 사용하였다. 세포 배양을 위해 DMEM(Welgene) 배지를 이용하였으며, 10% fetal bovine serum(Welgene)과 1% penicillin streptomycin (Welgene)을 첨가하여 사용하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 세포 배양기를 이용하여 배양하였다.

### 2. 프라이머 제작 및 클로닝

pCDNA3-HA-IEX-1 플라스미드 DNA 클로닝 방법은 기존에 발표된 논문에 설명되었다(Yoon et al., 2009). Human ovarian cDNA로부터 Pfu DNA polymerase(Takara)를 이용한 PCR을 통해 Human CATHEPSIN B(BC010240) open reading frame을 증폭시켰다. 사용된 프라이머는 CTSB-(SfiI)-F (5'- ATG GCC ATG GAG GCC ATG TGG CAG CTC TGG GCC TCC), CTSB-(Xho I)-R (5'-ACC TCG AGA TTA GAT CTT TTC CCA GTA CTG)이다. PCR product는 제한효소 XhoI과 SfiI(Takara)을 이용하여 pCMV-Myc vector로 클로닝하여 염기분석하였다.

### 3. Immunoprecipitation과 Western Blot

배양 세포를 수거하여 4°C, 8,000 rpm에서 원심분리하여 PBS(phosphate buffered saline)를 이용해 세포를 세척하였다. NP-40 lysis용액(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.15M NaCl, 1% NP-40)을 이용하여 세포 내 전체 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질의 정량을 위해 Bradford protein assay (Bio-rad)를 실시하였다. 50 µg의 단백질을 10% 또는 15% SDS 단백질 전기영동을 실시하였다. NC membrane에 단백질을 transfer한 후 anti-IEX-1(Yoon et al., 2009) 또는 anti-CATHEPSIN B, anti-HA(Sataacruz), anti-Myc 항체를 이용하여 단백질을 확인하였다. 세포에서 IEX-1과 CATHEPSIN B 단백질의 결합을 확인하기 위해서 면역침강법(Immunoprecipitation)을 실시하였으며, 실험방법은 기존에 발표된 논문에 설명되었다(Yoon et al., 2009).

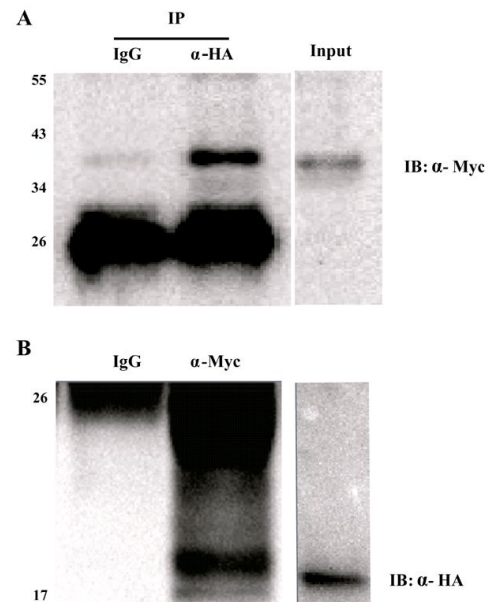
## 결과 및 고찰

IEX-1이 어떻게 세포의 성장과 사멸을 유도하는지 알아

보기 위한 방법으로, IEX-1의 세포 내 새로운 파트너를 찾기 위해 선행연구에서 yeast two-hybrid assay를 수행하였다. IEX-1과 결합하는 DNA insert를 염기 분석하였고, NCBI blast search를 수행한 결과, IEX-1과 강한 결합을 보이는 cysteine protease인 CATHEPSIN B를 최종 검출하였다.

### 1. 인간 암 세포주에서 IEX-1과 CATHEPSIN B 단백질 결합력 조사

Yeast two-hybrid system의 결합을 다시 한번 확인하기 위해서 인간 암 세포주에서 면역침강법을 수행하였다. 두 단백질을 암 세포주에서 과다발현(overexpression)시킨 후 결합을 확인하기 위해 pCDNA3-HA-IEX-1과 pCMV-Myc-CATHEPSIN B 두 플라스미드를 리포솜 방법을 이용하여 293T 세포주에 transfection하였다. 12시간 배양 후 수거한 전체 세포 lysate 250 µg에 anti-HA 또는 anti-Myc 항체를 이용하여 면역침강법을 수행하고, anti-Myc 항체 또는 anti-HA항체를 이용하여 western blot를 실시하였다. Fig. 1처럼, 과다 발현된 IEX-1과 CATHEPSIN B 두 단백질이 인간 세포주에서 직

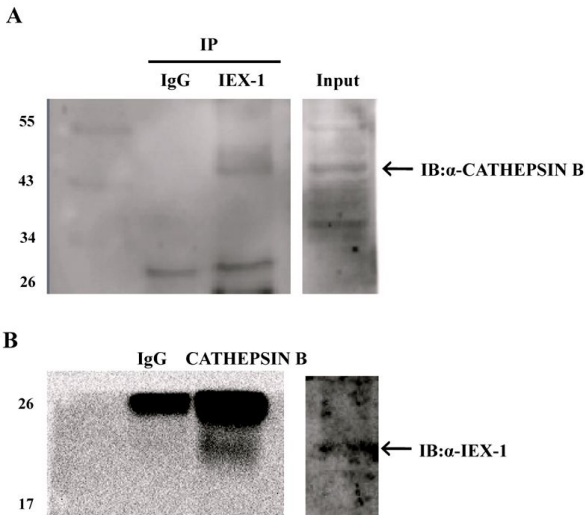


**Fig. 1. IEX-1 interacts with the CATHEPSIN B *in vivo*.** 293T cells were transfected with 3 µg of pCDNA3-HA-IEX-1 and pCMV-MYC-CATHEPSIN B and incubated for 18 h. Cell lysates were used for immunoprecipitation with the anti-HA (A) or anti-MYC (B) antibodies followed by western blots with anti-MYC or anti-HA antibodies.

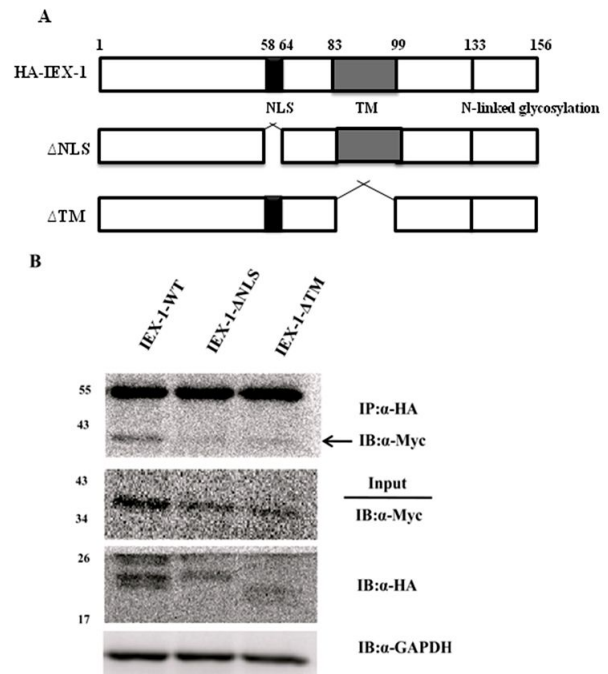
접적으로 결합함을 확인할 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 하여 HeLa 세포에서 endogenous IEX-1과 CATHEPSIN B의 결합을 알아보기 위해 전체 세포 lysate 500 µg에 anti-rabbit IgG 또는 anti-IEX-1(Yoon et al., 2009) 그리고 anti-goat IgG 또는 anti-CATHEPSIN B로 4°C 조건에서 면역침강시킨 후 anti-CATHEPSIN B 또는 anti-IEX-1을 이용하여 western blot를 수행하였다. 그 결과, endogenous level의 두 단백질이 직접적으로 결합하는 것을 확인하였다(Fig. 2A, B). Fig. 2를 통해 두 단백질은 세포 내에서 기능적으로 상관관계의 가능성이 있음을 암시할 수 있다.

IEX-1은 156개의 아미노산(amino acid)로 이루어져 있으며, 여러 부위에 ERK phosphorylation site(인산화 부위)를 가지고 있으며(Garcia et al., 2002), PEST like sequence와 nuclear localization sequence(NLS) (Kruse et al., 2005), transmembrane domain(TM) 그리고 N-linked glycosylation site(NLG)를 포함하고 있다. 그러나 아직까지 알려진 consensus domain은 존재하지 않으며, 중간에 염기서열이 잘 보존되어 있는 것으로 알려져 있다. IEX-1 단백질의 CATHEPSIN B

단백질과의 결합도메인을 결정하기 위해 IEX-1 돌연변이체 단백질을 사용하였다. 2종류의 돌연변이체, pCDNA3-HA-IEX-1-ΔNLS(Δ58-64), pCDNA3-HA-IEX-1-ΔTM(Δ83-99) (Fig. 3A)을 사용하여 pCMV-Myc-CATHEPSIN B 유전자와 함께 세포에 과다 발현시켰다. 12시간 배양 후, anti-HA 항체로 면역침강법을 수행한 후 및 anti-Myc 항체 western blot을 실시하였다. 그 결과, CATHEPSIN B 단백질은 IEX-1-ΔNLS와 IEX-1-ΔTM 모두에 결합함을 확인하였다(Fig. 3B). NF-κB(Arlt et al., 2008), p53 등의 세포생장과 세포사멸에 관계된 단백질 및 여러 단백질이 결합한다고 보고되어 있는 IEX-1의 카복시 말단 부위(C-terminal region)에 CATHEPSIN



**Fig. 2. Endogenously expressed IEX-1 protein interacts with CATHEPSIN B *in vivo*.** (A) To identify the interaction between endogenous IEX-1 and CATHEPSIN B proteins, HeLa cell lysates were immunoprecipitated with the anti-IEX-1 antibodies or normal IgG rabbit (B) anti-CATHEPSIN B antibodies or normal IgG mouse followed by western blots with anti-CATHEPSIN B or anti-IEX-1 antibodies.



**Fig. 3. Identification of the CATHEPSIN B binding region within the IEX-1.** (A) Domain structure of IEX-1 protein. Full length IEX-1 protein is 156 amino acids. IEX-1-ΔNLS was deleted at position 58~64 amino acids and IEX-1-ΔTM was deleted at 83~99 amino acids. (B) Identification of the interacting domain of IEX-1 and CATHEPSIN B. 293T cells were transfected with 3 µg of pCDNA3-HA-IEX-1, IEX-1-ΔNLS, IEX-1-ΔTM and pCMV-MYC-CATHEPSIN B and incubated for 18 h. Cell lysates were used for immunoprecipitation with the anti-HA antibodies followed by western blots with anti-MYC antibodies.

B 단백질 역시 결합할 가능성이 크다고 예측할 수 있다. Yeast two-hybrid 스크리닝 결과, IEX-1 full length은 CATHEPSIN B의 카복시 말단과 결합이 확인되었으므로 두 단백질의 카복시 말단부위에서의 직접적인 결합이 이루어질 가능성이 있다.

현재까지 난포의 성장과 생존에 세포사멸 신호가 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Schilling et al., 2001), 본 연구의 주체인 IEX-1은 난포성장에 필연적인 gonadotropin에 의해 가장 현저하게 발현증가가 일어나는 것으로 밝혀졌다. 현재 난포성장에서 BCL-2 family를 제외한 다른 인자에 관한 연구보고는 극소수에 그치고 있는 현실이다. 그러나 이전 연구에서 IEX-1 단백질은 BCL-2 family 일원인 MCL-1 단백질과 결합하고, 또한 난소 암 세포에서 IEX-1의 과다 발현에 의한 세포사멸이 유도되는 것을 확인하였으며, 또한 IEX-1과 MCL-1은 세포사멸과 생존을 조절하는 서로의 기능에 영향을 미치는 것을 밝혔다(Yoon et al., 2009). 세포의 핵 내에 존재하는 IEX-1은 세포사멸을 유도하지만(Kruse et al., 2005), 미토콘드리아와 같은 세포소기관에 존재할 경우, 세포사멸을 억제할 가능성이 크다고 보고된 바 있다(Shen et al., 2006). CATHEPSIN B 단백질 또한 리소솜에서 분비되어 Bax 또는 Bid와 같은 미토콘드리아 세포사멸을 촉진한다고 보고되었다(Stoka et al., 2001). 이를 통해 두 단백질의 결합에 의해 cytochrome c 분비에 의한 세포사멸을 조절할 기능을 제시할 수 있다. 또한 CATHEPSIN B는 미토콘드리아에서 활성산소(ROS: Reactive oxygen species) 발생을 직접적으로 유도하여 최종적으로 lysosomal permeabilization을 유도하게 된다. 즉 많은 리소솜 효소들이 세포질로 분비되게 되며, 세포에 직접적으로 영향을 미치게 된다. 그러나 세포사멸 동안 IEX-1은 활성산소의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. 즉, 미토콘드리아를 통한 세포사멸 조절과정에서 두 단백질은 서로의 기능에 직접적으로 영향을 미칠 가능성이 크다고 예측할 수 있으며 이를 통해 IEX-1은 CATHEPSIN B의 새로운 기질일 가능성을 제시할 수 있다. 이번 연구를 통해 IEX-1은 한 가지의 정해진 공통적 경로를 통하기보다는 lysosome-mediated apoptotic 경로를 포함한 여러 신호전달 경로에 의해 그 기능이 조절됨을 알 수 있다. 또한 IEX-1의 하위메커니즘을 예측할 수 있으며, 나아가 세포의 생존을 결정하는 새로운 조절네트워크를 밝히기 위해 한발 더 나아감을 의미한다.

## 감사의 글

This work was supported by the National Research Foundation of Korea Grant funded by the Korean Government [NRF-2009-351-1E00019].

이 논문은 2009년 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임 [NRF-2009-351-1E00019].

## 인용문헌

- Arlt A, Grobe O, Sieke A, Kruse ML, Folsch UR, Schmidt WE, Schafer H (2001). Expression of the NF-kappa B target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in Hela cells. *Oncogene* 20:69-76.
- Arlt A, Kruse ML, Breitenbroich M, Gehrz A, Koc B, Minkenberg J, Folsch UR, Schafer H. (2003). The early response gene IEX-1 attenuates NF-kappaB activation in 293 cells, a possible counter-regulatory process leading to enhanced cell death. *Oncogene* 22: 3343-3351.
- Arlt A, Rosenstiel P, Kruse ML, Grohmann F, Minkenberg J, Perkins ND, Folsch UR, Schreiber S, Schafer H (2008). IEX-1 directly interferes with RelA/p65 dependent transactivation and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 1783:941-952.
- Barrett AJ (1994). The possible role of neutrophil proteinases in damage to articular cartilage. 1978. *Agents Actions* 43:194-200; discussion 200-1.
- Charles CH, Yoon JK, Simske JS, Lau LF (1993). Genomic structure, cDNA sequence, and expression of gly96, a growth factor-inducible immediate-early gene encoding a short-lived glycosylated protein. *Oncogene* 8:797-801.
- Felbor U, Dreier L, Bryant RA, Ploegh HL, Olsen BR, Mothes W (2000). Secreted cathepsin L generates endostatin from collagen XVIII. *Embo J* 19:1187-1194.
- Garcia J, Ye Y, Arranz V, Letourneux C, Pezeron G, Porteu F (2002). IEX-1: a new ERK substrate involved in both ERK survival activity and ERK activation.

- Embo J 21:5151-5163.
- Green DR, Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-1312.
- Im HJ, Craig TA, Pittelkow MR, Kumar R (2002). Characterization of a novel hexameric repeat DNA sequence in the promoter of the immediate early gene, IEX-1, that mediates 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)-associated IEX-1 gene repression. *Oncogene* 21:3706-3714.
- Kim JH, Lee KA, Bae J (2011) BCL2L10 protein induces apoptosis in KGN-human granulosa cells. *Development and Reproduction* 15:113-120.
- Kobayashi T, Pittelkow MR, Warner GM, Squillace KA, Kumar R (1998). Regulation of a novel immediate early response gene, IEX-1, in keratinocytes by 1alpha, 25-dihydroxyvitamin D3. *Biochem Biophys Res Commun* 251:868-873.
- Koblinski JE, Ahram M, Sloane BF (2000). Unraveling the role of proteases in cancer. *Clin Chim Acta* 291:113-135.
- Kruse ML, Arlt A, Sieke A, Grohmann F, Grossmann M, Minkenberg J, Folsch UR, Schafer H (2005). Immediate early gene X1 (IEX-1) is organized in subnuclear structures and partially co-localizes with promyelocytic leukemia protein in HeLa cells. *J Biol Chem* 280:24849-24856.
- Kumar R, Lutz W, Frank E, Im HJ (2004). Immediate early gene X-1 interacts with proteins that modulate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 323:1293-1298.
- Li W, Yuan XM, Ivanova S, Tracey KJ, Eaton JW, Brunk UT (2003). 3-Aminopropanal, formed during cerebral ischaemia, is a potent lysosomotropic neurotoxin. *Biochem J* 371:429-436.
- Li W, Yuan X, Nordgren G, Dalen H, Dubowchik GM, Firestone RA, Brunk UT (2000). Induction of cell death by the lysosomotropic detergent MSDH. *FEBS Lett* 470:35-39.
- Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB (1998). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* 273:13245-13254.
- Osawa Y, Nagaki M, Banno Y, Brenner DA, Nozawa Y, Moriwaki H, Nakashima S (2003). Expression of the NF-kappa B target gene X-ray-inducible immediate early response factor-1 short enhances TNF-alpha-induced hepatocyte apoptosis by inhibiting Akt activation. *J Immunol* 170:4053-4060.
- Schilling D, Pittelkow MR, Kumar R (2001). IEX-1, an immediate early gene, increases the rate of apoptosis in keratinocytes. *Oncogene* 20:7992-7997.
- Shen L, Guo J, Santos-Berrios C, Wu MX (2006). Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1. *J Biol Chem* 281:15304-15311.
- Stoka V, Turk B, Schendel SL, Kim TH, Cirman T, Snipas SJ, Ellerby LM, Bredesen D, Freeze H, Abrahamson M, Bromme D, Krajewski S, Reed JC, Yin XM, Turk V, Salvesen GS (2001). Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not pro-caspases, is the most likely route. *J Biol Chem* 276:3149-3157.
- Tait DL, Obermiller PS, Hatmaker AR, Redlin-Frazier S, Holt JT (1999). Ovarian cancer BRCA1 gene therapy: Phase I and II trial differences in immune response and vector stability. *Clin Cancer Res* 5:1708-1714.
- Turk B, Stoka V, Rozman-Pungercar J, Cirman T, Droga-Mazovec G, Oresic K, Turk V (2002). Apoptotic pathways: involvement of lysosomal proteases. *Biol Chem* 383:1035-1044.
- Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, Sterling A, Fiers W, Vandenebeele P, Grooten J (1998). Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett* 438:150-158.
- Yoon S, Ha HJ, Kim YH, Won M, Park M, Ko JJ, Lee K, Bae J (2009). IEX-1-induced cell death requires BIM and is modulated by MCL-1. *Biochem Biophys*

Res Commun 382:400-404.

Yoon S, Na SY, Kim HM, Lee K, Bae J (2010) Mutual activities of IEX-1 and MCL-1 on the apoptosis of ovarian cancer cells. *Development and Reproduction* 14:83-89.

Zhang Y, Finegold MJ, Porteu F, Kanteti P, Wu MX (2003). Development of T-cell lymphomas in Emu-IEX-1 mice. *Oncogene* 22:6845-6851.

---

(Received 23 March 2012, Received in revised form 12 June 2012, Accepted 20 June 2012)