

IKK γ Facilitates the Activation of NF- κ B by Hsp90

Jeong Ah Lee and Dong Wan Kim*

Department of Biohealth sciences, College of Natural Sciences, Changwon National University, Changwon 51140, Korea

Received January 11, 2022 / Revised February 9, 2022 / Accepted February 11, 2022

NF- κ B acts as a critical transcription factor in inflammation and innate immunity, and it is also closely involved in cell survival and tumorigenesis via induction of anti-apoptotic genes. In these processes, NF- κ B cooperates with multiple other signaling molecules and pathways, and although many studies have demonstrated that Hsp90 regulates NF- κ B activity, the exact mechanism is unclear. In this study, we investigated the relationship between Hsp90 and IKK γ in the regulation of NF- κ B using expression plasmids of IKK complex components. Wild-type and deletion mutants of IKK γ were expressed together with Hsp90, and the combined regulatory effect of Hsp90 and IKK γ on NF- κ B activation was assayed. The results show that Hsp90 activates NF- κ B by promoting the phosphorylation and degradation of I κ B α and that activation of NF- κ B by NIK and LPS was increased by Hsp90. IKK γ elevated the effect of Hsp90 on NF- κ B activation by increasing phosphorylation and degradation of I κ B α . The positive regulation on NF- κ B by Hsp90 and IKK γ was also proved in analysis with IKK β -EE, the constitutively active form of IKK β . In experiments with the deletion mutants of IKK γ , the N-terminal IKK β binding domain, C-terminal leucine zipper, and zinc finger domains of IKK γ were found not necessary for the positive regulation of NF- κ B activity. Additionally, the expression of pro-inflammatory cytokines was synergistically elevated by Hsp90 and IKK γ . These results indicate that inhibiting the interaction between Hsp90 and IKK γ is a possible strategic method for controlling NF- κ B and related diseases.

Key words : Hsp90, inflammation, IKK β , IKK γ , NF- κ B

서 론

Hsp90 (Heat shock protein 90)는 진핵생물에 필수적인 ATP 의존성 사패론이며 다양한 단백질의 활성화와 안정화에 관여한다. Hsp90가 작용하는 단백질에는 tyrosine kinase, Akt, NF- κ B를 비롯한 다양한 세포 주기 조절인자와 신호전달 단백질이 있으며[9] 이러한 단백질은 악성종양의 생존과 사멸, 전이, 혈관 증식 등에 관여한다. 그러므로 Hsp90를 표적으로 억제하게 되면 악성종양이 개선된다고 보고되었다[6, 23, 25, 28].

한편, NF- κ B는 면역 시스템과 관련된 유전자의 발현을 조절하는 전사 인자이다. 면역 시스템을 구성하는 세포와 조직의 유지뿐만 아니라 면역의 발달, 면역 반응, 염증 및 암의 발생과 유지에 중요한 역할을 하는 전사인자이다[8, 19, 22]. NF- κ B는 I κ B kinase (inhibitor of nuclear factor- κ B kinase)에 의해 조절되며 I κ B가 인산화를 거쳐 분해됨에 따라 세포질에 머물러 있던 NF- κ B가 핵 속으로 들어가 활성화된다[16, 17].

I κ B kinase 외에도 NF- κ B를 활성화시키는 cytokine에는 TNF- α , IL-1, IL-6 등이 있고 bacteria의 LPS (lipopolysaccharide) 또한 NF- κ B를 활성화 시킨다[2]. NF- κ B에 의해 생산이 유도되는 효소에는 대표적으로 COX-2, iNOS가 있으며 이들은 NF- κ B 활성화와 더불어 체내에서 만성 염증의 유발 및 악성종양의 전이 뿐 아니라 cytokine storm도 유발하여 각종 합병증을 유발하기도 한다[2, 7, 26].

NF- κ B의 활성화에 핵심역할을 하는 IKK complex에는 I κ B kinase로서 IKK α 와 IKK β 가 있고 조절 인자인 IKK γ (NEMO)와 그 외 여러 가지 단백질이 포함되어 있다. IKK γ 는 IKK α , IKK β 와 달리 kinase 활성이 없는 단백질이지만 C 말단에 CCD (coiled-coil domain)와 LZD (leucine zipper domain)를 가지고 있어 단백질 간의 상호작용이 이루어져 IKK complex에 구조적인 안정성을 제공한다[4, 12, 16].

Hsp90는 NF- κ B 활성화 경로에 중요한 역할을 하고 Hsp90의 세포 내 과발현은 NF- κ B의 활성화 증가와 함께 여러가지 종양에서 유의하게 나타난다고 알려져 있고[18], IKK γ 는 NF- κ B의 활성을 조절하는 것으로 알려져 있으나[1, 16] Hsp90와 IKK γ 의 상호작용 및 연관성에 대해서는 명확하게 알려지지 않았다. 따라서 본 연구는 Hsp90와 IKK γ 의 NF- κ B 활성화 과정에서의 역할을 확인하고 Hsp90와 IKK γ 의 상호작용에 의한 NF- κ B의 활성화 기전을 규명하여 NF- κ B의 과다 활성화에 의해 유발되는 염증 질환과 암의 발생을 예방하고 치료하는 데 도움을 주고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-55-213-3482, Fax : +82-55-213-3489

E-mail : dwkim@changwon.ac.kr

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>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

세포배양 및 transfection

쥐의 대식세포인 RAW264.7 세포를 실험에 사용하였으며 세포의 배양은 FBS (Fetal Bovine Serum)가 10% 함유된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지로 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. FBS와 DMEM은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)의 제품을 사용하였다. 사용한 발현 plasmid는 사람의 IKK β [10], IKK β -EE [15], NIK [10], Hsp90 [18]의 cDNA와 mouse IKK γ [10]의 cDNA를 pCMV5 벡터에 cloning한 것이며, plasmid DNA의 세포 내 도입을 위한 transfection은 FuGENE[®] (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 lipofection을 진행하였다. Plasmid DNA를 serum free DMEM과 FuGENE6가 20:1의 비율로 혼합된 혼합액에 섞고 실온에서 20분 동안 반응시켜 복합체를 형성시킨 후 60~70%의 밀도로 배양된 RAW264.7 세포에 적하하고 배양하였다.

세포추출물(total cell lysate)의 제조

배양한 RAW264.7 세포를 PBS (phosphate-buffered saline)로 두 번 세척한 후 1,000 rpm, 3분 동안 원심분리하여 harvest하고 Total lysis buffer [20 mM Hepes (pH7.9), 25% glycerol, 450 mM NaCl, 0.4 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF (complete EDTA free), 1% NP-40]로 suspension하여 on ice에서 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 12,000 rpm, 4°C, 15분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하였다.

Luciferase assay

Luciferase gene을 포함한 NF- κ B의 reporter plasmid는 pNL3.2- κ B-RE (Promega, code N1111)를 사용하였으며 이는 Luciferase promoter 부위에 5개의 NF- κ B 결합 부위를 가지고 있다. Luciferase activity의 측정은 Nano-Glo[®] Substrate (Promega)를 Nano-Glo[®] buffer (Promega)에 100배 희석하여 사용하였으며 cell lysate는 96-well plate에 50 μ l씩 분주하여 사용하였다. Substrate는 Luminoskan (Thermofisher, USA)을 이용하여 노즐을 70% Ethanol로 10회 wash하고 멸균 증류수로 10회 세척한 후 투여하였다. 효소반응은 50 μ l씩 substrate가 분주되도록 하였으며 luciferase activity를 10초 간격으로 측정하였다.

Western blotting

Total cell lysate를 Bradford assay로 단백질질을 정량한 후 4X SDS sample buffer (1 M Tris-HCl, 10% Glycerol, 10% β -Mercaptoethanol, 2% SDS, 0.1% Bromophenol blue)를 첨가하여 6분간 100°C에서 denaturation시키고 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후, 실온에서 90 V, 2시간 동

안 nitrocellulose membrane (Amersham, UK)에 electro transfer하였다. 그 후 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 TBS-T [Tris buffered saline (0.2 mM Tris, 137 mM NaCl, 0.1% Tween-20, 485.4 mM HCl)] 용액으로 1시간 동안 실온에서 blocking 하였다. Membrane을 1차 항체와 실온에서 3시간 동안 반응시키고 TBS-T 용액으로 3번 세척한 후 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체로 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 TBS-T로 3번 세척한 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL, Amersham Corp., Arlington Heights, UL, USA)로 반응시킨 후 Amersham Imager 600 (GE healthcare Life Science, Germany)을 이용하여 결과를 확인하였다. Membrane의 strip은 stripping buffer [6.25 mM Tris-HCl (pH6.7), 2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol]를 이용하여 50°C에서 30분 동안 처리한 후 TBS-T 용액으로 10분씩 2회 세척하였다. 사용한 1차 항체는 anti-P-I κ Ba monoclonal antibody (sc-8404), anti-I κ Ba polyclonal antibody (sc-371), anti-COX-2 polyclonal antibody (sc-1745), anti-iNOS polyclonal antibody (sc-651), anti-HA-probe monoclonal antibody (sc-7392), anti-Actin polyclonal antibody (sc-1616) (Santa Cruz Bio Technology, CA, USA), anti-Flag tag polyclonal antibody (ab1162), anti-Myc tag polyclonal antibody (ab9106) (Abcam, Cambridge, UK)을 제조사의 사용법에 따라 사용하였다.

RT-PCR

세포를 Trizol[®] (Ambion, CA, USA)용액으로 처리하여 total RNA를 분리한 후 Accupower ROKetscript cycle RT pre-mix (Bioneer Corp., Daejeon, Korea)을 이용하여 cDNA를 합성한 후 PCR에 이용하였다. PCR조건은 94°C 3분간 pre-denaturation하고 94°C 30초 denature, 60°C 30초 annealing, 72°C 1분 extension을 30 cycle 거친 후, 72°C 10분으로 완료하였다. PCR의 결과는 2.5% agarose gel에서 확인하였다. 사용한 primer는 Table 1과 같다.

통계처리

실험은 3회 반복하였고, 결과는 Graphpad Prism5를 이용하여 평균(mean) \pm 표준편차(SD)로 나타내었다. One way ANOVA와 tukey's test를 이용하여 통계적으로 분석하였으며, *p*값이 0.05 이하이면 유의성이 있다고 판단하였다.

결 과

NF- κ B의 활성화에 대한 Hsp90의 영향

NIK (NF- κ B inducing kinase)은 IKK β 를 인산화하여 활성화시키는 kinase이며 IKK β 는 IKK complex의 구성성분으로 NF- κ B의 inhibitor인 I κ B를 인산화시켜 분해를 유도하고 NF- κ B를 활성화시키는 kinase이다[2]. NF- κ B의 활성화에서 Hsp90

Table 1. Primer sequences for RT-PCR

Gene name	Primer sequences (5' → 3')	Amplicon length
iNOS	F:TTCCAGAATCCCTGGACAAG R:TGGTCAAACCTCTTGGGGTTC	180
COX-2	F:AGAAGGAAATGGCTGCAGAA R:GCTCGGCTTCCAGTATTGAG	194
TNF α	F:GAAAGTCAGCCTCCTCTCCG R:CTCCAAAGTAGACCTGCCCG	194
IL-1 β	F:ACCTGTGTCTTTCCCGTGG R:TCATCTCGGAGCCTGTAGTG	159
IL-17	F:CTTCCCCCGGACTGTGATGGTCAA R:TCATGTGGTAGTCCACGTCCCAT	212
IL-6	F:GATAAGCTGGAGTCACAGAAGG R:GAAACCATCTGGCTAGGTAACA	412
GAPDH	F:GAAGGTGAAGGTCGGAGTCAA R:GCTCCTGGAAGATGGTGATG	179

F : forward R : reverse

의 영향을 알아보기 위해 Luciferase gene의 promoter 부위에 5개의 NF- κ B 결합부위를 가진 pNL3.2- κ B-RE Luciferase reporter plasmid를 이용하였다. 그 결과 예상한대로 NIK은 NF- κ B를 활성화시켰으며 IKK β 가 과량 발현될 때 NIK에 의한 NF- κ B의 활성화는 더욱 증가하였다(Fig. 1A lane 3, 4). 또한 Hsp90도 NF- κ B를 활성화시켰으며 IKK β 가 과량발현될 때 활성화 효과가 증가하였다(Fig. 1A lane 5, 6). 이로부터 NIK과 마찬가지로 Hsp90도 IKK β 를 경유하는 NF- κ B회로를 활성화 시킬 수 있었다. 이와 더불어 NF- κ B의 inhibitor인 I κ B α 의 인산화와 분해를 검토한 결과에서도 NIK과 Hsp90은 I κ B α 의 인산화와 분해를 촉진하였고(Fig. 1B lane 3, 5) IKK β 가 과량발현 될 때 인산화와 분해는 더욱 증가하였다(Fig. 1B lane 4, 6). 이 결과로부터 Hsp90은 NIK과 마찬가지로 IKK β 에 의

한 I κ B α 의 인산화와 분해를 통한 NF- κ B의 활성화를 촉진함을 알 수 있었고, 또한 Hsp90가 IKK β 와 IKK γ 를 포함하는 IKK complex에 작용하여 NF- κ B를 활성화시킬 가능성이 있음을 알 수 있었다.

NIK에 의한 NF- κ B의 활성화에서 Hsp90 및 IKK γ 의 영향

세포 외부로부터 NF- κ B를 활성화시키는 자극이 작용하였을 때 NF- κ B의 신호전달회로에서 가장 초기에 작용하는 upstream kinase인 NIK이 활성화되어 IKK β 의 인산화 및 활성화가 일어나고 이것이 I κ B α 를 인산화 및 분해하여 NF- κ B를 핵 내로 이동시킨다[13, 19]. 이에 따라 NIK에 의해 NF- κ B가 활성화 될 때 Hsp90은 어떠한 영향을 미치는지, 이 때 IKK complex에서 조절인자로 작용하는 IKK γ 는 어떤 역할을 하는지

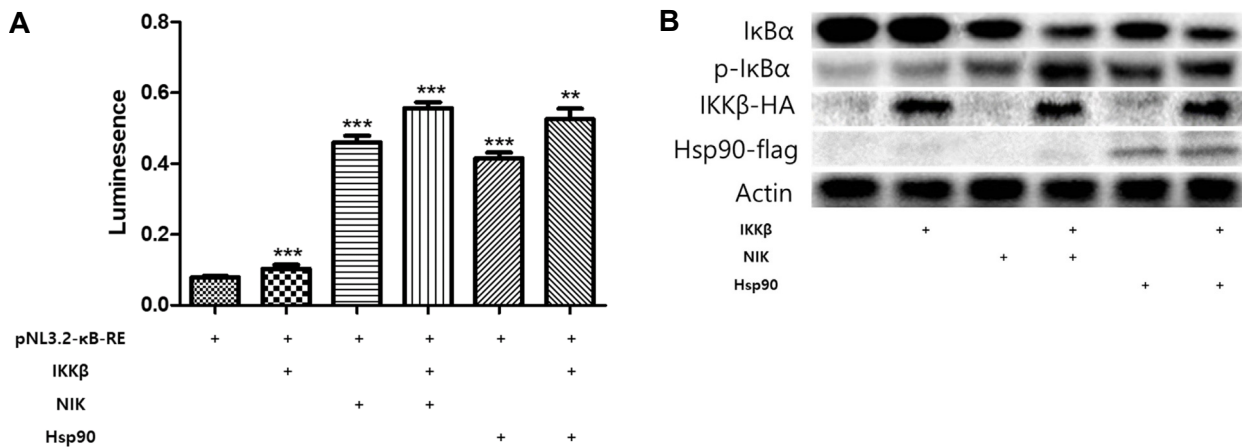


Fig. 1. Effect of Hsp90 on the activation of NF- κ B. RAW264.7 cells were co-transfected with pNL3.2- κ B-RE reporter plasmid and the expression plasmids of IKK β , NIK, Hsp90 as indicated. Luciferase assay was performed after 40 hr of transfection. (A) (mean \pm SD, n=3, ** p <0.01, *** p <0.001), and the proteins in total cell lysates were detected by Western blotting (B).

알아보기 위해 IKK β , NIK, Hsp90, IKK γ 의 발현 plasmid를 세포에 도입하고 luciferase reporter gene assay를 실시하였다. 그 결과, IKK γ 는 NIK에 의한 NF- κ B의 활성화에 영향이 없었으나(Fig. 2A lane 3, 5), Hsp90는 NIK에 의한 NF- κ B의 활성화를 약하게 상승시켰으며(Fig. 2A lane 3, 4), 이러한 상승 작용은 IKK γ 를 과발현 시켰을 때 더욱 증가하였다(Fig. 2A lane 4, 6). 이러한 Hsp90와 IKK γ 의 상호협력적인 NF- κ B의 활성화를 I κ B α 의 인산화와 분해로 확인한 결과 Hsp90는 NIK에 의한 I κ B α 의 인산화와 분해를 촉진하였고(Fig. 2B lane 3, 4), 이러한 Hsp90의 촉진효과는 IKK γ 가 과량 발현되었을 때 더욱 증가하였다(Fig. 2B lane 5, 6). 이 결과로부터 IKK γ 는 HSP90에 의한 NF- κ B의 활성화를 더욱 상승시킴을 알 수 있었다. 아울러 이러한 Hsp90와 IKK γ 에 의하여 NF- κ B가 활성화

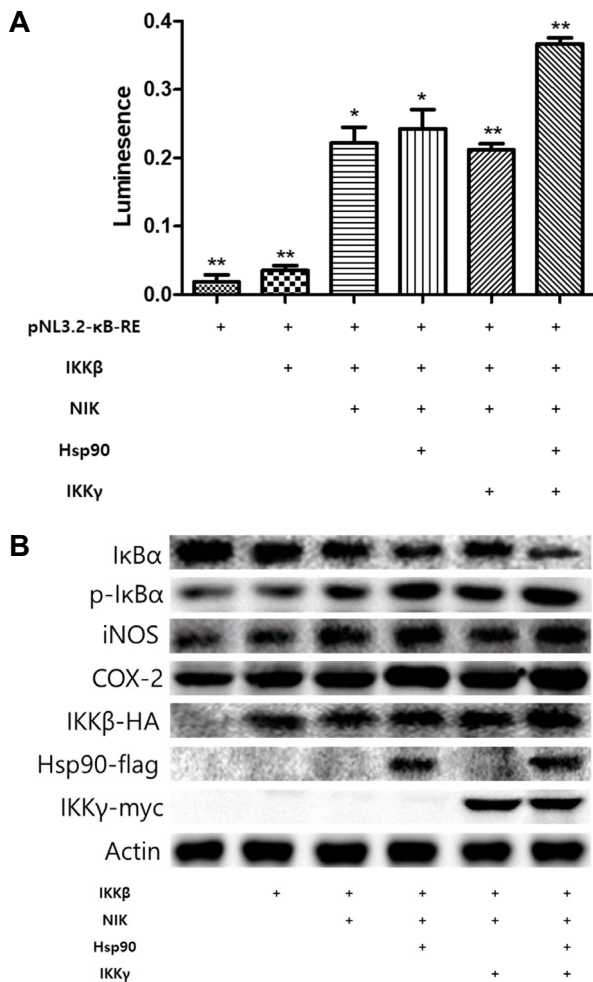


Fig. 2. Synergistic effect of Hsp90 and IKK γ on the activation of NF- κ B by NIK. RAW264.7 cells were co-transfected with pNL3.2- κ B-RE and the expression plasmids as indicated. Luciferase assay was performed after 40 hr of transfection. (A) (mean \pm SD, * p <0.01, ** p <0.001), and the proteins in total cell lysates were detected by Western blotting (B).

되었을 때 NF- κ B의 대표적인 target 유전자인 iNOS와 COX-2의 발현변화를 검토한 결과 Hsp90는 NIK에 의한 iNOS와 COX-2의 발현증가를 더욱 촉진하였고(Fig. 2B lane 3, 4), Hsp90가 IKK γ 와 함께 발현되었을 때 iNOS와 COX-2의 발현이 더욱 상승함을 확인함으로써 Hsp90와 IKK γ 에 의한 NF- κ B의 활성화증가는 NF- κ B 관련 유전자의 발현증가로 이어짐을 알 수 있었다(Fig. 2B lane 4, 6).

LPS에 의한 NF- κ B의 활성화에서 Hsp90 및 IKK γ 의 작용

세포 외부로부터 NF- κ B의 활성화 자극이 작용하였을 때 NF- κ B의 활성화에 미치는 Hsp90와 IKK γ 의 영향을 알아보기 위해 Hsp90와 IKK γ 의 발현 plasmid를 세포 내에 도입하고 NF- κ B의 대표적인 외부 활성화인자인 bacterial LPS (lipopolysaccharide)를 처리한 후 luciferase assay를 실시하였다. 그 결과 LPS에 의해 NF- κ B가 활성화되었고(Fig. 3A lane 2),

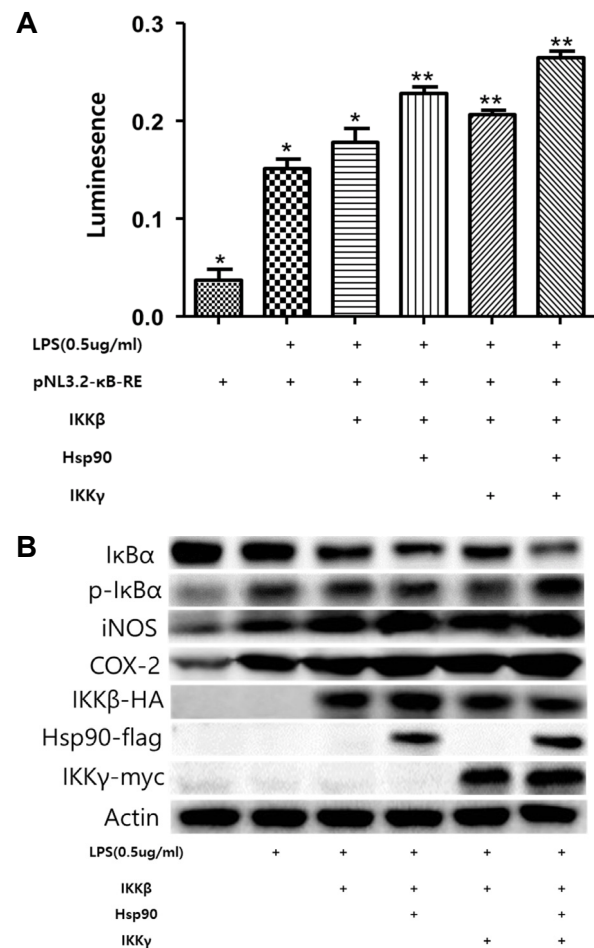


Fig. 3. Synergistic effect of Hsp90 and IKK γ on the activation of NF- κ B by LPS. RAW264.7 cells were co-transfected with indicated plasmids and after 35 hr, the cells were treated with 0.5 μ g/ml of LPS. Luciferase assay (A) (mean \pm SD, * p <0.01, ** p <0.001) and Western blotting (B) were performed after 3 hr of treatment with LPS.

Hsp90는 LPS에 의한 NF-κB의 활성화를 촉진시켰으며(Fig. 3A lane 3, 4), 이는 IKKγ에 의해 더욱 상승하였다(Fig. 3A lane 4, 6). 또한 Hsp90와 IKKγ의 동시발현은 세포 내 IκBα의 인산화 및 분해를 더욱 상승시키는 결과를 나타내어(Fig. 3B lane 4, 6) 세포 외부로부터 작용하는 요인에 의한 NF-κB의 활성화에도 Hsp90와 IKKγ는 상호협력적으로 높은 상승효과를 나타내는 것으로 확인되었다. 또한 LPS에 의한 NF-κB의 활성화로 인하여 발현이 증가하는 대표적인 유전자로 알려진 iNOS와 COX-2 역시 Hsp90와 IKKγ의 동시발현에 의해 발현이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 3B).

IKKβ의 활성형 mutant를 이용한 Hsp90와 IKKγ의 작용검토

세포 내 IKKβ는 평상시에는 활성이 없는 상태로 있다가 세포 외부에서 NF-κB의 활성화 요인이 작용하면 NIK, MEKK 등의 upstream kinase에 의해 인산화되어 활성을 나타낸다 [15, 21]. 이에 비해 IKKβ-EE는 IKKβ의 activation loop의 ser177과 ser181부위를 glutamate로 치환하여 upstream kinase가 없어도 항상 활성화된 상태를 나타내는 IKKβ의 활성형 mutant이다[15]. 이러한 IKKβ-EE에 대한 Hsp90와 IKKγ의 작용을 검토한 결과 IKKβ-EE는 IKKβ와 달리 NIK이나 LPS가 없어도 높은 NF-κB활성을 나타내었으며(Fig. 4A lane 3) Hsp90와 IKKγ가 동시에 발현되었을 때 가장 높은 NF-κB의 활성이 나타났고(Fig. 4A lane 6), IκBα의 인산화 및 분해도 가장 많이 일어났다(Fig. 4B lane 6). 또한 IKKβ-EE에 의한 iNOS와 COX-2의 발현 증가도 Hsp90와 IKKγ가 동시에 발현되었을 때 가장 높게 나타났다(Fig. 4B lane 6). 이러한 결과로부터 Hsp90와 IKKγ의 상호작용에 의한 NF-κB의 활성화 작용은 upstream kinase를 활성화하는 것이 아니라 IKK complex에 직접 작용하는 것임을 알 수 있었다.

IKKγ의 deletion mutant를 활용한 Hsp90와 IKKγ의 상호 작용 기전 검토

위의 결과에서 Hsp90는 NF-κB를 활성화시켰고 IKKγ는 Hsp90의 활성화 작용을 더욱 상승시키는 것으로 나타났다. 그러므로 NF-κB의 활성화 과정에서 Hsp90와 IKKγ의 상호작용 기전을 더욱 상세히 검토하기 위하여 IKKγ의 deletion mutant를 사용하였다. 사용한 mutant는 mouse IKKγ의 N-말단의 IKKβ 결합 부위 100아미노산이 결손된 ΔN과 C-말단의 leucine zipper (LZ)부위와 zinc finger (ZF) 부위를 포함하는 100아미노산이 결손된 ΔC를 사용하였다(Fig. 5) [10]. C-말단의 LZ와 ZF 부위는 IKKγ의 결합을 유도하여 고분자 복합체 형성에 필요한 부위이다[12]. pNL3.2-κB-RE reporter plasmid와 IKKβ, NIK, Hsp90 및 IKKγ의 wild type (WT), ΔC, ΔN의 발현 plasmid를 RAW264.7 세포에 co-transfection한 후 luciferase assay를 실시한 결과 Hsp90는 NIK에 의한 NF-κB의 활성화를 상승시켰고 IKKγ의 wild type, ΔC, ΔN은 모두

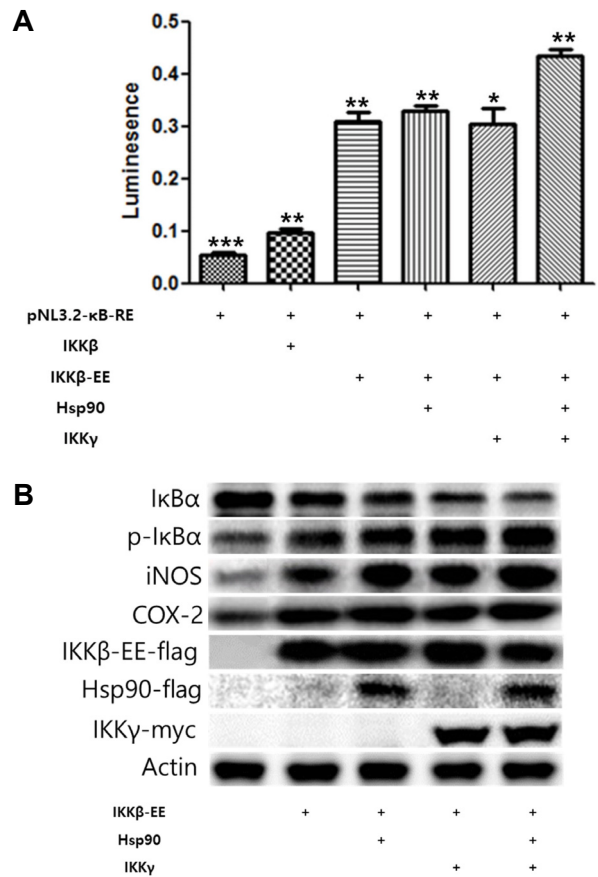


Fig. 4. Synergistic effect of Hsp90 and IKKγ on the NF-κB activation triggered by IKKβ-EE. RAW264.7 cells were co-transfected with indicated plasmids and after 40 hr, luciferase assay (A) (mean ± SD, *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001) and Western blotting (B) were performed.

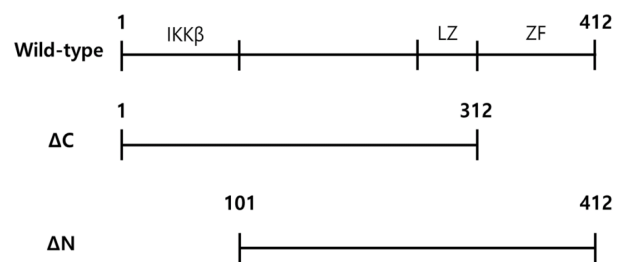


Fig. 5. The structure of wild type, N-terminal and C-terminal deletion mutants of mouse IKKγ. IKKβ binding domain at N-terminal and leucine zipper domain (LZ), zinc finger domain (ZF) at C-terminal were shown. The numbers indicate the number of amino acids.

Hsp90의 상승 작용을 더욱 증가시켰다(Fig. 6A). 이러한 결과를 IκBα의 인산화와 분해를 통하여 확인한 결과 Hsp90는 NIK에 의해 유도된 IκBα의 인산화 및 분해를 촉진하였고 IKKγ의 wild type, ΔC, ΔN은 모두 Hsp90의 촉진 작용을 더욱 상승시켰다(Fig. 6B lane 5, 6, 7). 이러한 IKKγ의 상승작용은 wild

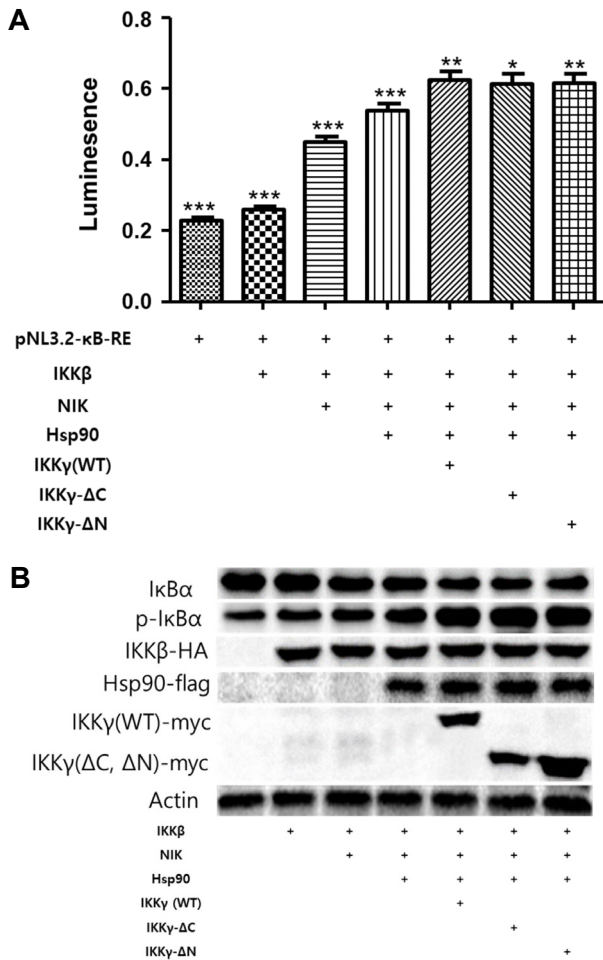


Fig. 6. Effect of IKKγ on the activation of NF-κB by Hsp90. RAW264.7 cells were co-transfected with indicated plasmids, and luciferase assay (A) (mean ± SD, **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001) and Western blotting (B) were performed after 40 hr of transfection.

type, ΔC, ΔN에서 거의 동일하게 나타났으며 이 결과로부터 IKKγ의 N-말단에 의한 IKKβ와 IKKγ의 결합 및 C-말단에 의한 IKKγ의 고분자 복합체 형성은 Hsp90와의 상호작용에 관여하지 않음을 알 수 있었다.

Hsp90와 IKKγ에 의한 pro-inflammatory cytokines의 발현증가

NF-κB의 활성이 증가하면 인체 내 염증이 발생하는 것으로 알려져 있으며 이러한 염증은 NF-κB가 염증을 유발하는 pro-inflammatory cytokines의 발현을 증가시키는 것이 원인으로 알려져 있다[11, 19]. 그러므로 Hsp90와 IKKγ가 pro-inflammatory cytokines의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 검토하였다. RT-PCR을 이용하여 각 단백질의 mRNA양을 측정할 결과 NIK에 의한 NF-κB의 활성화로 인해 pro-inflammatory cytokines의 발현이 증가하였으며(Fig. 7 lane 3) Hsp90는 이러한

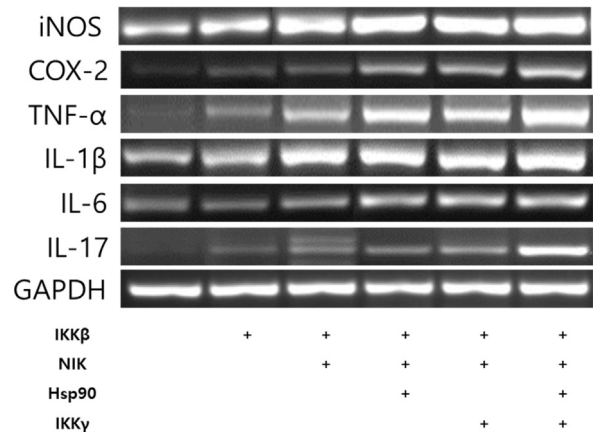


Fig. 7. Elevation of the expression of pro-inflammatory cytokines by Hsp90 and IKKγ. RAW264.7 cells were co-transfected with indicated expression plasmids and after 40 hr, the mRNA level of each protein was evaluated by RT-PCR.

발현 증가를 촉진하였고(Fig. 7 lane 4) Hsp90와 IKKγ가 동시에 발현되었을 때 pro-inflammatory cytokines의 발현은 가장 많이 상승하였다(Fig. 7 lane 6). 이상의 결과로부터 IKKγ는 Hsp90의 NF-κB 활성화 작용을 더욱 상승시키고 이는 인체 내 pro-inflammatory cytokines의 발현을 증가시켜 염증을 비롯한 관련 질병을 유발할 수 있음을 알 수 있었다.

고 찰

NF-κB는 세포에 가해지는 다양한 stress에 대한 방어작용을 위해 면역세포를 활성화하는 것이 주된 역할로 알려져 있으나 세포의 사멸과 증식, 분화 및 발암 등 광범위한 세포 변화에 관여함이 밝혀지면서 NF-κB 활성의 적절한 조절이 각종 질병의 예방과 치료를 위해 중요함이 강조되고 있다[3, 5, 11]. IKKγ는 IKK complex의 구성성분으로 kinase활성은 없으나 NF-κB의 활성화 경로의 조절에 중추적인 역할을 하고 있다. IKKγ가 결핍된 세포는 고분자 IKK complex가 형성되지 않고 TNF-α, LPS 등 세포 외부 인자에 의한 NF-κB의 활성화가 일어나지 않는 것으로 알려져 있다[10, 14, 27].

한편, Hsp90는 chaperon 단백질로서 세포 내 약 300종류의 단백질이 Hsp90의 조절을 받는 것으로 알려져 있으며 IκB kinase를 비롯하여 NF-κB 신호전달 회로에 관여하는 kinase들도 Hsp90의 조절을 받는 것으로 밝혀져 있다[20]. 이에 따라 Hsp90의 inhibitor가 NF-κB의 활성을 억제한다는 연구결과도 다수 보고되었다[24, 25].

본 연구에서는 Hsp90에 의한 NF-κB의 활성 조절 기전을 명확히 하기 위해 Hsp90와 IKKγ의 상호연관성을 검토하였다. 그 결과 Hsp90는 NIK과 LPS에 의한 NF-κB의 활성화를 증가시켰고 IKKγ는 이러한 증가를 더욱 가중시켰다. Hsp90에 의

한 NF- κ B의 활성화 작용이 IKK γ 의 발현 plasmid의 도입으로 IKK γ 가 과발현 될 때 더욱 상승하는 것으로 보아 Hsp90은 IKK γ 와 상호작용하여 NF- κ B를 활성화시킬 가능성이 크다는 결론을 얻을 수 있었다(Fig. 2, Fig. 3). 또한 Hsp90과 IKK γ 에 의한 NF- κ B의 활성화가 I κ B α 의 인산화 및 분해의 증가에 의한 것으로 나타나 Hsp90과 IKK γ 가 I κ B α 의 인산화에 직접 관여하는 IKK complex의 활성을 증가시킬 수 있었다. 또한 Hsp90과 IKK γ 에 의한 NF- κ B의 활성화가 항상 활성화된 상태를 유지하는 IKK β -EE mutant에서도 동일하게 나타난 것으로 보아 Hsp90이 IKK β 를 활성화시키는 upstream kinase에 작용하는 것이 아니라 IKK γ complex에 직접 작용하는 것이며 이때 IKK complex 내에있는 IKK γ 가 Hsp90의 작용을 상승시킬 수 있었다(Fig. 4). 아울러, IKK γ 의 N-말단의 IKK β 결합 부위와 C-말단의 leucine zipper 및 zinc finger 부위가 결손된 IKK γ 에서도 NF- κ B의 활성 증가가 나타난 것으로 보아(Fig. 6) IKK γ 는 IKK β 와 결합하지 않은 상태로, 또한 고분자 복합체를 형성하지 않은 상태에서도 Hsp90과 상호작용 및 NF- κ B를 활성화 함을 알 수 있었다. 그리고 Hsp90과 IKK γ 에 의한 NF- κ B의 활성증가가 실제 NF- κ B의 target 유전자의 발현 증가로 이어지는지 검토한 결과 iNOS, COX-2, TNF- α 를 비롯한 여러 종류의 pro-inflammatory cytokines의 발현 증가가 확인되어(Fig. 7) Hsp90의 비정상적 발현 증가는 인체 내 다양한 염증의 유발과 그로인한 염증성 암의 발생을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 그러므로 Hsp90을 target으로 하는 저해제 뿐 아니라 Hsp90과 IKK γ 의 상호작용을 차단하는 저해제도 NF- κ B의 과다활성으로 인한 질병의 예방과 치료에 도움이 될 수 있을 것으로 사료되며 NF- κ B를 조절하는 다양한 signaling proteins의 작용 기전을 추가로 연구한다면 더욱 효율적인 NF- κ B의 제어방법이 모색될 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 2021-2022년도 창원대학교 지원 연구비에 의해 이루어진 것이며 이에 감사드립니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Bai, L., Xu, S., Chen, W., Li, Z., Wang, X., Tang, H. and Lin, Y. 2011. Blocking NF- κ B and Akt by Hsp90 inhibition sensitizes Smac mimetic compound 3-induced extrinsic apoptosis pathway and results in synergistic cancer cell death. *Apoptosis* **16**, 45-54.
- Baldwin, A. S. Jr. 1996. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 649-683.
- Chariot, A. 2009. The NF-kappaB-independent functions of IKK subunits in immunity and cancer. *Trends Cell Biol.* **19**, 404-413.
- Dai, S., Hirayama, T., Abbas, S. and Abu Amer, Y. 2004. The IkappaB kinase (IKK) inhibitor, NEMO-binding domain peptide, blocks osteoclastogenesis and bone erosion in inflammatory arthritis. *J. Biol. Chem.* **279**, 37219-37222.
- DiDonato, J. A., Mercurio, F. and Karin, M. 2012. NF- κ B and the link between inflammation and cancer. *Immunol. Rev.* **246**, 379-400.
- Garg, G., Khandelwal, A. and Blagg, B. S. 2016. Anticancer inhibitors of Hsp90 function: beyond the usual suspects. *Adv. Cancer Res.* **129**, 51-88.
- Hariharan, A., Hakeem, A. R., Radhakrishnan, S., Reddy, M. S. and Rela, M. 2021. The role and therapeutic potential of NF-kappa-B pathway in severe COVID-19 patients. *Inflammopharmacology* **29**, 91-100.
- Hoesel, B. and Schmid, J. A. 2013. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* **12**, 86.
- Hoter, A., El-Sabban, M. E. and Naim, H. Y. 2018. The HSP90 family: structure, regulation, function, and implications in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2560.
- Kwon, W. J., Kim, S. H., Park, Y. O., Cho, M., Kang, C. D., Lee, G., An, W. G., Joo, W. H. and Kim, D. W. 2004. IKKgamma inhibits activation of NF-kappaB by NIK. *Mol. Cells* **18**, 200-206.
- Lawrence, T. and Fong, C. 2010. The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF-kappaB. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 519-523.
- Li, X. H., Fang, X. and Gaynor, R. B. 2001. Role of IKKgamma/nemo in assembly of the Ikappa B kinase complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 4494-4500.
- Liu, F., Xia, Y., Parker, A. S. and Verma, I. M. 2012. IKK biology. *Immunol. Rev.* **246**, 239-253.
- Mauro, C., Pacifico, F., Lavorgna, A., Mellone, S., Iannetti, A., Acquaviva, R., Formisano, S., Vito, P. and Leonardi, A. 2006. ABIN-1 binds to NEMO/IKKgamma and co-operates with A20 in inhibiting NF-kappaB. *J. Biol. Chem.* **281**, 18482-18488.
- Mercurio, F., Zhu, H., Murray, B. W., Shevchenko, A., Bennett, B. L., Li, J., Young, D. B., Barbosa, M., Mann, M., Manning, A. and Rao, A. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science* **278**, 860-866.
- Mitchell, S., Vargas, J. and Hoffmann, A. 2016. Signaling via the NFkB system. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* **8**, 227-241.
- Oeckinghaus, A. and Ghosh, S. 2009. The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* **1**, a000034.
- Ono, K., Sogawa, C., Kawai, H., Tran, M. T., Taha, E. A., Lu, Y., Oo M. W., Okusha, Y., Okamura, H., Ibaragi, S., Takigawa, M., Kozaki, K. I., Nagatsuka, H., Sasaki, A., Okamoto, K., Calderwood, S. K. and Eguchi, T. 2020. Triple

- knockdown of CDC37, HSP90-alpha and HSP90-beta diminishes extracellular vesicles-driven malignancy events and macrophage M2 polarization in oral cancer. *J. Extracell. Vesicles* **9**, 1769373.
19. Pflug, K. M. and Sitcheran, R. 2020. Targeting NF- κ B-Inducing Kinase (NIK) in immunity, inflammation, and cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8470.
 20. Picard, D. 2015. Hsp90 interactors. <http://www.picard.ch/downloads/Hsp90interactors.pdf> (last accessed on Dec. 21, 2015).
 21. Rapino, F., Abhari, B. A., Jung, M. and Fulda, S. 2015. NIK is required for NF- κ B-mediated induction of BAG3 upon inhibition of constitutive protein degradation pathways. *Cell Death Dis.* **6**, e1692.
 22. Rasmi, R. R., Sakthivel, K. M. and Guruvayoorappan, C. 2020. NF- κ B inhibitors in treatment and prevention of lung cancer. *Biomed. Pharmacother.* **130**, 110569.
 23. Tabata, M., Tsubaki, M., Takeda, T., Tateishi, K., Maekawa, S., Tsurushima, K., Imano, M., Satou, T., Ishizaka, T. and Nishida, S. 2020. Inhibition of HSP90 overcomes melphalan resistance through downregulation of Src in multiple myeloma cells. *Clin. Exp. Med.* **20**, 63-71.
 24. Thangjam, G. S., Birmapas, C., Barabutis, N., Gregory, B. W., Clemens, M. A., Newton, J. R., Fulton, D. and Catravas, J. D. 2016. Hsp90 inhibition suppresses NF- κ B transcriptional activation via Sirt-2 in human lung microvascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **310**, L964-974.
 25. Thangjam, G. S., Dimitropoulou, C., Joshi A. D., Barabutis, N., Shaw, M. C., Kovalenkov, Y., Wallace, C. M., Fulton, D. J., Patel, V. and Catravas, J. D. 2014. Novel mechanism of attenuation of LPS-induced NF- κ B activation by the heat shock protein 90 inhibitor, 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin, in human lung microvascular endothelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **50**, 942-952.
 26. Vannini, F., Kashfi, K. and Nath, N. 2015. The dual role of iNOS in cancer. *Redox Biol.* **6**, 334-343.
 27. Yamamoto, Y., Kim, D. W., Kwak, Y. T., Prajapati, S., Verma, U. and Gaynor, R. B. 2001. IKK γ /NEMO facilitates the recruitment of the I κ B α proteins into the I κ B α kinase complex. *J. Biol. Chem.* **276**, 36327-36336.
 28. Zhang, P. C., Liu, X., Li, M. M., Ma, Y. Y., Sun, H. T., Tian, X. Y., Wang, Y., Liu, M., Fu, L. S., Wang, Y. F., Chen, H. Y. and Liu, Z. 2020. AT-533, a novel Hsp90 inhibitor, inhibits breast cancer growth and HIF-1 α /VEGF/VEGFR-2-mediated angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* **172**, 113771.

초록 : Hsp90에 의한 NF- κ B의 활성화를 촉진하는 IKK γ 의 역할

이정아 · 김동원*

(창원대학교 생명보건학부)

NF- κ B는 염증과 선천성 면역에 중요한 전사인자이며 anti-apoptotic gene을 유도하여 세포의 생존과 발암에도 깊이 연관되어 있으며 많은 신호전달분자 및 신호전달회로와 연결되어있다. 한편, Hsp90은 NF- κ B의 활성을 조절한다는 보고가 이루어졌으나 그 구체적인 기전은 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 IKK complex를 구성하는 인자들의 발현 plasmid를 이용하여 NF- κ B의 활성조절에서 Hsp90과 IKK γ 의 연관성 및 역할을 연구하였다. 그 결과 Hsp90은 I κ B α 의 인산화와 분해를 촉진하여 NF- κ B를 활성화시켰고, NIK과 LPS에 의한 NF- κ B의 활성화는 Hsp90에 의해 더욱 활성이 증가하였다. IKK γ 는 Hsp90에 의해 증가된 I κ B α 의 인산화와 분해를 더욱 촉진함으로써 Hsp90의 NF- κ B 활성화 작용을 상승시켰다. 이러한 Hsp90과 IKK γ 에 의한 NF- κ B의 활성화 현상은 항상 활성화된 상태를 유지하는 IKK β -EE mutant를 이용한 검토에서도 입증되었다. 또한 IKK γ 의 deletion mutant를 이용한 검토에서 IKK γ 의 N-말단에 위치하는 IKK β 결합부위와 C-말단에 위치하는 leucine zipper 및 zinc finger 부위는 IKK γ 와 Hsp90의 NF- κ B에 대한 상호협력적 촉진작용에 필요하지 않았다. 또한 Hsp90에 의해 촉진된 세포내 pro-inflammatory cytokine들의 발현은 IKK γ 에 의해 더욱 상승하였다. 이러한 결과로부터 Hsp90과 IKK γ 의 상호작용을 차단한다면 NF- κ B의 과다활성으로 인한 질병의 예방과 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.