

A Screening System for Development of NF- κ B Modulators

이정형 · 이정준
생명공학연구소

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 [1]. p50 subunit family(p50, p52)와 p65 subunit family (p65, c-Rel, RelB)의 homodimer 또는 heterodimer로 구성된 NF- κ B는 보통 상태에서는 세포질에서 그 inhibitor인 I κ B proteins(I κ B α , I κ B β , I κ B γ , I κ B ϵ , Bcl3)들과 결합하고 있어 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 인산화되어 분해됨으로서 유리된 NF- κ B는 핵으로 들어가 target 유전자의 NF- κ B binding site (consensus sequence: 5'-GGGpuNNPyPyCC-3')에 결합하여 염증 관련 유전자, antiapoptosis 유전자 등의 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) 인산화시킴으로서 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 활성화조절제의 개발 가능성을 시사하고 있다[2-5]. 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, 흥미로운 사실은 자연 환경에서 인체에 가장 문제가 되는 UVB의 경우 TNF의 receptor를 활성화시켜 TNFR-TRAF2의 경로를 통하여 NF- κ B를 활성화시킨다는 점인데[6], TNF에 의해 유도되는 유전자의 대부분이 UV에 의해서도 유도된다는 사실이 이러한 사실을 뒷받침하고 있다.

전사인자 NF- κ B는 발생, 면역반응 등의 정상 생리기능에도 중요하지만 비정상적인 NF- κ B활성화는 여러 질병의 병리기전과도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다(표 1). 따라서, 이러한 비정상적인 NF- κ B활성화의 조절을 통하여 퇴행성·난치성 질환을 조절할 수 있는 많은 실험증거들이 보고되어 있어 전사인자 NF- κ B는 의약품개발의 target으로서 현재 세계적으로 주목을 받고 있다.

NF- κ B와 염증 반응

전사인자 NF- κ B는 TNF- α , IL-1 β 등의 proinflammatory cytokines과 LPS 등에 활성화가 유도되어 TNF- α , cyclooxygenase-2 등의 많은 염증유발인자들의 발현을 증가시켜 염증반응을 유도한다[7, 표 2]. 대표적인 항염증제로 알려진 glucocorticoid류나 aspirin류의 항염증작용의 중요한 mechanism으로서 NF- κ B의 활성화를 저해하는 것으로 알려져 있으며 한방이나

표 1. 비정상적인 NF- κ B의 활성화와 관련된 질병

septic shock	AIDS
Inflammatory disease	Cancer
· Asthma	Atherosclerosis
· Rheumatoid arthritis	기타
· Inflammatory bowel disease	
· Psoriasis	

표 2. 전사인자 NF- κ B에 의해 조절되는 염증유발유전자들

Pro-inflammatory cytokines	Inflammatory enzymes
· Tumor necrosis factor- α	· iNOS
· Interleukin-1 β	· COX-2
· Interleukin-2	· 5'-lipoxygenase
· Interleukin-6	· cPLA2
· 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)

민간에서 항염증제로 사용되어왔던 약물들도 NF-κB의 활성을 저해하는 것에 의해 그 활성을 나타내는 경우가 많다. 또한 많은 실험모델에서 유전자조작이나 약물에 의해 NF-κB의 활성화를 저해하면 염증유발인자들의 발현의 감소와 함께 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있다.

한 예로서 퇴행성질환 중에 하나인 류마티스의 경우를 들 수 있다. 류마티스의 특징은 염증반응과 hyperplasia인데 여기에 모두 NF-κB가 관여하고 있다. 류마티스의 synovium의 synoviocyte는 다양한 자극에 의해 NF-κB가 활성화되고 이 활성화된 NF-κB는 염증유발인자를 유발시키는 동시에 synoviocyte의 apoptosis를 저해함으로써 심한 염증반응과 hyperplasia를 유발시키는 것으로 알려져 있다. 류마티스의 동물실험 모델에서 유전자조작이나 약물에 의해 NF-κB의 활성화를 저해하면 염증유발인자의 생성의 감소와 더불어 apoptosis가 증가되어 류마티스의 염증반응과 hyperplasia 모두 현저히 저해되는 것으로 알려져 있다[8].

NF-κB와 세포사멸

Apoptosis에서의 NF-κB는 다양한 apoptotic stimuli에 의해 활성화되어 antiapoptotic 기능을 갖는 다양한 protein들의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다. NF-κB에 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[9], TNFR-associated factor인 TRAF-1, -2[10], zinc-finger protein인 A20[11], 그리고 IEX-1L[12] 등이 알려져 있다[표 3]. Anti-apoptotic protein인 Bcl-2의 기능 중에 하나는 IκB protein의 degradation를 유발시켜 NF-κB의 활성화하여 antiapoptotic 유전자의 발현을 유도하는 것으로 보고되어 있으며 또한 신경세포인 primary Hippocampal neuron에서는 NF-κB의 활성화에 의해 Bcl-2와 Bcl-X_L의 발현이 유도되는 것으로도 알려져 있다[13].

암세포에 있어서 NF-κB의 활성화는 anti-apoptotic pathway를 활성화시켜 apoptosis에 대한 내성(resistance)을 유발시킴으로서 chemotherapy나 radiotherapy에 대한 내성을 유도하거나 또는 암의 성장 또는 악성화에 유리하게 작용하는 것으로 알려져 있다. 암세포에 TNF-α나 etoposide doxorubicin, radiation 등의 apoptotic stimuli를 처리하면 NF-κB가 활성화되어 이들 약물에 의해 유도되는 세포사멸을 억제하게 되는데 암세포에 이런 apoptotic stimuli에 의해 유도되는 NF-κB의 활성화를 유전자조작에 의해 또는 약물에 의해 억제하면 apoptosis가 증가되어 이들 약물의 세포독성이 현저히 증가되는 것으로 알려져 있으며[14, 15], 동물 실험모델에서 암세포의 NF-κB 활성화를 저해하면 TNF-α나 CPT-11와 같은 암화

약오법제에 대한 “inducible resistance”가 나타나지 않아 암세포가 완전히 치료되는 것으로 보고되었다[16]. 더구나 일부 악성 암세포에서는 NF-κB가 활성화되어 있는 것으로도 알려져 있고 NF-κB에 조절되는 antiapoptotic 유전자인 Bfl-1/A1이 위암 등의 일부 암에 과발현되어 있다.

신경세포에서의 NF-κB의 활성화는 각 연구자의 실험 system에 따라 신경세포의 사멸저해 또는 사멸유도를 시킨다는 논란이 아직 계속되고 있지만 신경세포에서도 NF-κB가 세포사멸에 중요한 역할을 하고 있다. 쥐에 있어, 뇌 허혈이나 외상에 의한 손상시 hippocampus와 cerebral cortex에서 TNF-α양이 급격한 증가는 NF-κB의 활성화를 유도시켜 신경세포의 사멸을 억제하는 antiapoptotic signal일 것으로 생각된다. 실제로 TNF-α나 ceramide는 hippocampal neuron 배양계에서 NF-κB를 활성화시키면 amyloid peptide 나 철이온에 의한 oxidative stress로부터 세포를 보호하며 Oxidative stress(amyloid peptide와 hydrogen peroxide)에 내성이 높은 PC12 cell-line에서도 NF-κB의 활성이 높은 것으로 알려져 있다[17]. 또한 IGF-1에 의한 신경보호효과도 NF-κB의 활성화에 기인한다고 알려져 있다. 이와는 반대로 NF-κB가 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-κB를 활성화시키게 되며 Alzheimer’s disease 환자의 병소 주위에 다량의 활성화된 NF-κB가 발현되고 있는 것으로 알려져 있으며, 또한 실험 동물 model에서 glutamate에 의해 유발되는 신경손상(apoptosis)은 NF-κB의 활성화 저해제로 알려진 aspirin으로 처리하면 저해된다고 보고되어 있다[18]. 또한 다른 ischemia 동물모델에서 ischemia에 의해 NF-κB가 활성화되어 신경세포의 사멸을 촉진시키는데 NF-κB의 p50 family의 knock-out mouse에서는 ischemia에 의한 신경세포의 사멸이 현저히 감소되는 것으로 알려져 있다[19].

NF-κB가 anti-apoptotic protein의 발현을 조절하여 antiapoptosis기능을 갖는 전사인자라는 사실이 밝혀진 이래 상기에서 언급한 수종의 anti-apoptotic 단백질이 동정되어 왔으며 그 중에서 IAP류에 대한 연구가 가장 활발히 연구되어 왔다[20, 21]. IAP protein은 최초로 baculovirus에서 발견된

표 3. 전사인자 NF-κB에 의해 조절되는 anti-apoptotic 유전자

cIAP (Inhibitor of Apoptosis protein) -1, -2
xIAP
Mn-SOD
A20
TRAF-1, -2
Bfl-1/A1
IEL-1L

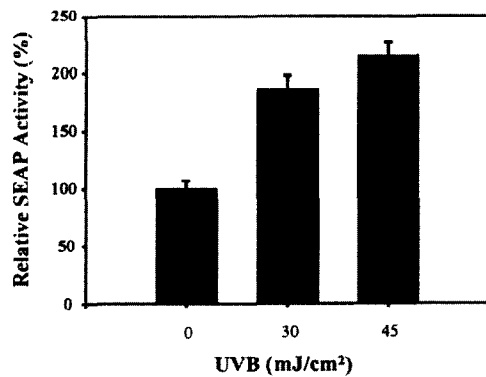
이래 사람 및 동물세포에서 그 homologue 단백질이 발견되어 새로운 family의 anti-apoptotic protein을 이루고 있으며 사람으로부터는 현재까지 NIAP, c-IAP1, c-IAP2, XIAP, Survivin, BRUCE 등 6종의 IAP류가 동정되어 있으며 대부분이 NF- κ B에 의해 그 발현이 조절되는 것으로 알려져 있다[16, 22, 23]. 세포에 IAP류 protein을 과발현 시켰을 경우 TNF, Fas, etoposide 등의 다양한 proapoptotic signal에 의해 유도되는 apoptosis를 저해하는데 이는 IAP류 protein의 caspases를 저해 활성화에 기인한다. Apoptosis경로는 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 cytochrome 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 의한 apoptosis를 효과적으로 저해하는 것으로 알려져 있다[24].

NF- κ B 활성검색계의 개발

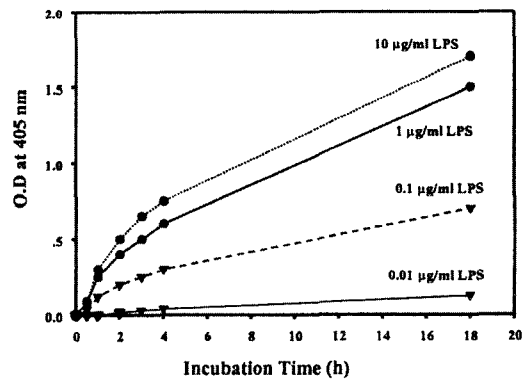
본 연구팀은 염증반응유도인자, apoptosis 유도인자 등의 다양한 자극에 의해 유도되는 NF- κ B활성화를 조절할 수 있는 화합물을 개발하기 위하여 SV40 바이러스의 minimal promoter에 enhancer로 NF- κ B consensus sequence을 9번 반복하여 삽입하여 넣고, reporter로 분비성 alkaline phosphatase하고 neomycin을 selection marker로 하는 vector를 조제하여 macrophage/monocyte 세포주인 RAW264.7와 epithelial 세포주인 HeLa세포에 안정하게 발현되는 RAW-NF-AP세포주와 HeLa-NF-AP세포주를 각각 수립하였다. 이 두 종의 세포주는 LPS (lipopolysaccharide), TNF- α , UV 등의 다양한 자극에 의해 dose-dependent하게 reporter gene의 유전자의 발현이 증가되는 것을 확인하였으며 또한 이러한 NF- κ B의 활성화는 NF- κ B저해제로 알려진 Dexamethasone에 저해됨을 알 수 있었다(그림 1). 따라서, 새로 수립한 세포주들이 다양한 자극에 의해 유도되는 NF- κ B의 활성화를 조절할 수 있는 물질의 탐색에 매우 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

한 예로서 본 연구팀은 새로 개발된 세포주를 이용하여 새로운 NF- κ B활성화 조절제를 개발하기 위하여 우선 지난 수년

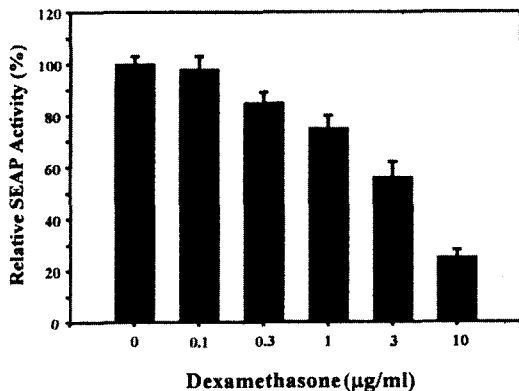
UV-induced NF- κ B Activation in HeLa-NF-AP Cells



LPS-induced NF- κ B Activation in RAW-NF-AP Cells



Effect of Dexamethasone on the LPS-induced NF- κ B Activation in RAW-NF-AP Cells



TNF α -induced NF- κ B Activation in HeLa-NF-AP Cells

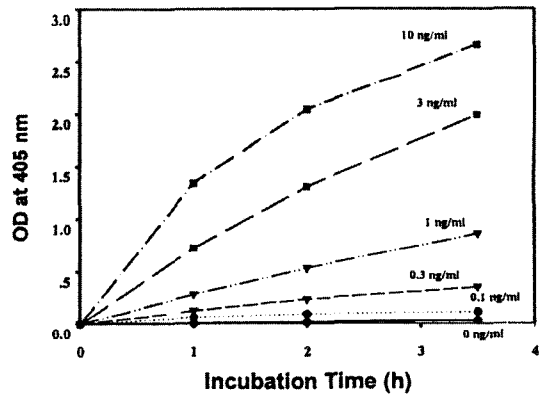


그림 1. 새로 수립한 HeLa-NF-AP세포와 RAW-NF-AP세포의 다양한 자극에 대한 NF- κ B의 반응성 및 Dexamethasone의 효과

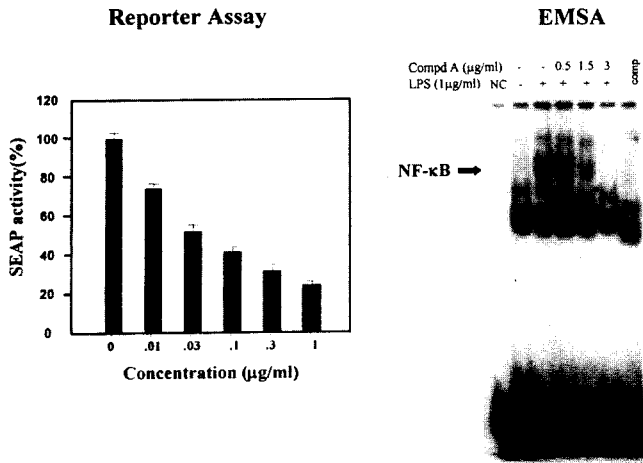


그림 2. RAW264.7세포에서 compound A에 의한 LPS에 의해 유도되는 NF-κB 활성화 저해효과.

간 분 실험실에서 분리 정제한 수 십 종의 물질을 대상으로 하여 활성을 측정된 결과 compound A가 LPS, TNF-α 등에 의해 유도되는 NF-κB의 활성화를 강력히 저해하는 것을 발견하였다.

Compound A는 RAW264.7세포에서 농도 의존적으로 LPS에 의해 유도되는 NF-κB reporter유전자의 발현을 저해하였으며 gel shift assay결과 핵으로 이동된 활성화된 NF-κB을 또한 농도 의존적으로 저해하는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 본 연구팀에서 수립한 NF-AP세포주들은 다양한 자극에 의해 유도되는 NF-κB 활성을 조절할 수 있는 물질의 개발에 매우 유용하게 사용될 수 있으리라 예견되며 현재 본 연구실에서는 상기의 세포주를 이용하여 다양한 자극에 의해 유도되는 NF-κB의 활성화조절제를 천연물 등의 자원으로부터 개발하고 있다.

참고문헌

1. Baeuerie, P.A. and D. Baltimore. 1996. NF-κB: Ten Years After. *Cell* **87**: 13-20.
2. Mireille, D., M. Hayakawa, C. Yi, and M. Karin. 1999. Positive and negative regulation of IκB kinase activity through IKKβ subunit phosphorylation. *Science* **284**: :309-313.
3. Takeda, K., O. Takeuchi, T. Tsujimura, S. Itami, O. Adachi, T. Kawai, H. Sanjo, K. Yoshikawa, N. Terada, and S. Akira. 1999. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKKα. *Science* **284**: 313-316.
4. Hu, Y., V. Baud, M. Delhase, P. Zhang, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, and Karin. 1999. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKα subunit of IκB kinase. *Science* **284**: 316-320.
5. Li, Q., D. van Antwerp, F. Mercurio, K.-F. Lee, and I.M. Verma. 1999. Severe liver degeneration in mice lacking the IκB kinase 2 gene. *Science* **284**: 321-325.

6. Tobin, D., M. van Hogerinden, and R. Toftgard. 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.
7. Epstein, F.H. 1997. Nuclear Factor-κ B-a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *The New England Journal of Medicine* **336** **15**: 1066-1071.
8. Miagkov, A.V., D.V. Kovalenko, C.E. Brown, J.R. Didsbury, J.P. Cogswell, S.A. Stimpson, A.S. Baldwin, and S.S. Makarov. 1998. NF-kappaB activation provides the potential link between inflammation and hyperplasia in the arthritic joint. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**: 13859-64
9. Zong, W.-X., L.C. Edelman, C. Chen, J. Bash, and C. Gelinas. 1999. The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-κB that blocks TNFα-induced apoptosis. *Genes & Development* **13**: 382-387.
10. Wang, C.-Y., M.W. Mayo, R.C. Korneluk, D.V. Goeddel, and A.C. Baldwin Jr. 1998. NF-κB Antiapoptosis: Induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to Suppress caspase-8 activation. *Science* **281**: 1680-1683.
11. Krikos, A., C.D. Laherty, and V.M. Dixit. 1992. Transcriptional activation of the tumor necrosis factor α-inducible zinc finger, A20, is mediated by κB elements. *J. Biol. Chem.* **267**: 17971-17976.
12. Wu, M.X., Z. Ao, K.V.S. Prasad, R. Wu, and Schlossman. 1998. IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-κB-mediated cell survival. *Science* **281**: 998-1001.
13. Tamatani, M., Y.H. Che, H. Matsuzaki, S. Ogawa, H. Okado, S. Miyake, T. Mizuno, and M. Tohyama. 1999. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NF-κB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* **274**: :8531-8538.
14. Beg, A.A. and D. Baltimore. 1996. An essential role for NF-κB in preventing TNF-α-induced cell death. *Science* **274**: 782-784.
15. Wang, C.-Y., M.W. Mayo, and A.S. Baldwin Jr. 1996. TNF- and Cancer therapy-induced apoptosis: Potentiation by inhibition of NF-κB. *Science* **274**: 784-787.
16. Wang, C.-Y., J.C. Cusack Jr., R. Liu, and A.S. Baldwin Jr. 1999. Control of inducible chemoresistance: Enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-κB. *Nature Medicine* **4**: 412-417.
17. Lezoualc'f, F., Y. Sagara, F. Holsboer, and C. Behl. 1998. High constitutive NF-κB Activity mediates resistance to oxidative stress in neuronal cells. *The Journal of Neuroscience* **18**: 3224-3232.
18. Grilli, M., M. Pizzi, M. Memo, and P. Spano. 1996. Neuroprotection by Aspirin and Sodium salicylate

- through blockade of NF- κ B activation. *Science* **274**: 1383-1385.
19. Schneider, A., A. Martin-Villalba, F. Weih, J. Vogel, T. Wirth, and M. Schwaninger. 1999. NF- κ B is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nature Medicine* **5**: 554-559.
 20. Deveraux, Q.L. and J.C. Reed. 1999. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes & Development* **13**: 239-252.
 21. LaCasse, E.C., S. Baird, R.G. Korneluk, and A.E. MacKenzie. 1998. The inhibitors of apoptosis and their emerging role in cancer. *Oncogene* **17**: 3247-3259.
 22. Chu, Z.-L., T.A. McKinsey, L. Liu, J.J. Gentry, M.H. Malim, and D.W. Ballard. 1997. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- κ B control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 10057-10062.
 23. Stehlik, C., R. de Martin, I. Kumabashiri, J.A. Schmid, B.R. Binder, and J. Lipp. 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.
 24. Deveraux, Q.L., N. Roy, H.R. Stennicke, T. van Arsdale, Q. Zhou, S.M. Srinivasula, E.S. Alnemri, G.S. Salvensen, and J.C. Reed. 1998. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of caspases. *The EMBO Journal* **17**: 2215-2223.