

# 폐암세포주에서 NF- $\kappa$ B 활성 억제를 통한 Proteasome 억제제 MG132의 TRAIL-유도성 Apoptosis 감작 효과

<sup>1</sup>단국대학교 의과대학 흉부외과교실, <sup>2</sup>건국대학교 의학전문대학원 내과학교실  
서필원<sup>1</sup>, 이계영<sup>2</sup>

## The Proteasome Inhibitor MG132 Sensitizes Lung Cancer Cells to TRAIL-induced Apoptosis by Inhibiting NF- $\kappa$ B Activation

Pil Won Seo, M.D.<sup>1</sup>, Kye Young Lee, M.D.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Thoracic Surgery, Dankook University College of Medicine, Cheonan, <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Konkuk University School of Medicine, Seoul, Korea

**Background:** TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand) is a newly identified member of the TNF gene family which appears to have tumor-selective cytotoxicity due to the distinct decoy receptor system. TRAIL has direct access to caspase machinery and induces apoptosis regardless of p53 phenotype. Therefore, TRAIL has a therapeutic potential in lung cancer which frequently harbors p53 mutation in more than 50% of cases. However, it was shown that TRAIL also could activate NF- $\kappa$ B in some cell lines which might inhibit TRAIL-induced apoptosis. This study was designed to investigate whether TRAIL can activate NF- $\kappa$ B in lung cancer cell lines relatively resistant to TRAIL-induced apoptosis and inhibition of NF- $\kappa$ B activation using proteasome inhibitor MG132 which blocks I $\kappa$ B $\alpha$  degradation can sensitize lung cancer cells to TRAIL-induced apoptosis.

**Methods:** A549 (wt p53) and NCI-H1299 (null p53) lung cancer cells were used and cell viability test was done by MTT assay. Apoptosis was confirmed with Annexin V assay followed by FACS analysis. To study NF- $\kappa$ B-dependent transcriptional activation, a luciferase reporter gene assay was used after making A549 and NCI-H1299 cells stably transfected with IgG $\kappa$ -NF- $\kappa$ B luciferase construct. To investigate DNA binding of NF- $\kappa$ B activated by TRAIL, electromobility shift assay was used and supershift assay was done using anti-p65 antibody. Western blot was done for the study of I $\kappa$ B $\alpha$  degradation.

**Results:** A549 and NCI-H1299 cells were relatively resistant to TRAIL-induced apoptosis showing only 20~30% cell death even at the concentration 100 ng/ml, but MG132 (3  $\mu$ M) pre-treatment 1 hour prior to TRAIL addition greatly increased cell death more than 80%. Luciferase assay showed TRAIL-induced NF- $\kappa$ B transcriptional activity in both cell lines. Electromobility shift assay demonstrated DNA binding complex of NF- $\kappa$ B activated by TRAIL and supershift with p65 antibody. I $\kappa$ B $\alpha$  degradation was proven by western blot. MG132 completely blocked both TRAIL-induced NF- $\kappa$ B dependent luciferase activity and DNA binding of NF- $\kappa$ B.

**Conclusion:** This results suggest that inhibition of NF- $\kappa$ B can be a potentially useful strategy to enhance TRAIL-induced tumor cell killing in lung cancer. (*Tuberc Respir Dis 2008;65:476-486*)

**Key Words:** TRAIL, NF- $\kappa$ B, Lung cancer, Proteasome inhibitor, Apoptosis

## 서 론

TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand)은 TNF- $\alpha$ 와 FasL와 같은 TNF 유전자 가족군의 일원으로서, DR4 및 DR5와 같은 death 수용체 외에 DcR1 및 DcR2와 같은 decoy 수용체 체계를 동시에 가지고 있어 정상세포는 보호하고 종양세포만 선택적으로 살상시킨다는 장점으로 주목받고 있는 유망한 항암제이다<sup>1-3</sup>. DcR1은 세포질 내 death domain이 미완성(truncated) 형태로 존재하

Address for correspondence: Kye Young Lee, M.D., Ph.D.  
Department of Internal Medicine, Konkuk University School of Medicine, 4-12, Hwangang-dong, Gwangjin-gu, Seoul 143-729, Korea  
Phone: 82-2-2030-7521, Fax: 82-2-2030-7748  
E-mail: kyleemd@kuh.ac.kr

Received: Nov. 18, 2008

Accepted: Dec. 16, 2008

고 DcR2는 death domain이 존재하지 않기 때문에 아포프토시스(apoptosis) 신호전달을 수행할 수 없기 때문이다<sup>4</sup>. 반면 TRAIL도 TNF 유전자 가족군의 일원으로서 TNF- $\alpha$ 와 같이 NF- $\kappa$ B를 활성화시키는 것으로 밝혀져 있는데, NF- $\kappa$ B는 잘 알려진 아포프토시스 억제 인자로서 TNF- $\alpha$ 는 물론 TRAIL에 대해서도 내성인자로 작용할 가능성이 있어 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화를 차단한다면 TRAIL의 효과를 상승시킬 수 있음이 알려져 있다<sup>5</sup>.

Proteasome 억제제는 ubiquitin-proteasome 경로를 억제하여 중요한 세포 내 종양 관련 단백질들의 분해를 차단함으로써 암세포의 아포프토시스를 유도하는 유망한 항암약제군이다<sup>6</sup>. 그 기전으로는 p53의 축적, cyclin-dependent kinase 억제단백질인 p21과 p27의 발현, stress-activated protein kinases의 활성화, 그리고 아포프토시스 억제 전사인자인 NF- $\kappa$ B 차단 등이 알려져 있으며 이러한 작용 등으로 인해 항염증효과와 항암효과를 나타낸다<sup>7,8</sup>. 실제로 최근 PS-341 (bortezomib)이 다발성 골수종의 2차 치료 약제로 미국 FDA의 허가를 받아서 국내에서도 사용 중이며 폐암을 비롯한 여러 고형암에서도 임상 시험이 진행되고 있다<sup>9,10</sup>.

이러한 배경에서 저자들은 TRAIL에 비교적 내성을 보이는 폐암세포주에서 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화를 확인하고, proteasome 억제제인 MG132에 의해 TRAIL 유도성 NF- $\kappa$ B 활성화가 차단되면서 TRAIL에 의한 아포프토시스의 항진효과가 발생하는지를 확인함으로써 폐암에서 TRAIL의 내성문제를 극복하고 항암효과를 향상시킬 수 있는 방법으로서 proteasome 억제제와의 병용요법의 타당성을 확인하기 전임상 단계로서 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 세포주

실험 세포주인 A549와 NCI-H1299 세포주는 ATCC로부터 구입하였다. A549 세포주는 wild-type p53을 가지는 폐의 선암세포주이며, NCI-H1299 세포주는 p53 상태가 null인 폐의 대세포암세포주이다. A549 세포주는 F-12K를 NCI-H1299 세포주는 RPMI-1640 배양액을 사용하였고 각각 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, 그리고 100 U/ml streptomycin를 첨가하여 세포배양하였다.

### 2. 시약

TRAIL은 Alexis biochemicals사(San Diego, CA, USA)에서 human recombinant soluble TRAIL (rhsTRAIL) kit를 구입하여 사용하였고, company protocol에 따라 rhsTRAIL 표준농도 100 ng/ml에 enhancer 2  $\mu$ g/ml을 동시에 사용하였다. Enhancer는 TRAIL 결합후 수용체를 삼중체로(trimerization) 만들어 신호전달을 활성화시키는 기능을 갖고 있다. MG132는 Biomol Research Laboratories사(Plymouth Meeting, PA, USA)에서 구입하여 표준 농도를 3  $\mu$ M로 사용하였다. TNF는 R&D system, PMA는 Sigma에서 구입하였다.

### 3. MTT assay

실험 세포주를 96-well plate에 각 well당 세포 10,000 개씩 분주하여 세포를 부착시킨 후 MG132과 TRAIL을 정해진 농도와 시간에 따라 처치하였다. MG132 전처치는 3  $\mu$ M 농도로 TRAIL 처치 1시간 전에 시행하였다. 24시간 후에 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 5 mg/ml 용액 20  $\mu$ l를 첨가하여 2시간 incubation한 후 0.1N acidified  $\text{CH}_3\text{Cl-HCl}$ 을 추가하면 세포들이 용해되는데, iEMS Labystems plate reader에서 590 nm의 파장을 측정하여 다음과 같은 공식에 의해 cell viability를 결정하였다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{\text{sample absorbance} - \text{blank absorbance}}{\text{control absorbance} - \text{blank absorbance}} \times 100$$

blank: well with media only

control: untreated, 100% viable well

### 4. Annexin V assay

TRAIL에 의한 세포사망이 아포프토시스를 확인하기 위하여 세포막에서 일어나는 변화의 하나인 phosphatidylserine의 외전(eversion)을 검출하는 Apo Alert Annexin V Apoptosis Kit (Clontech, Palo alto, CA, USA)를 이용하였다. 6-well 세포배양 용기에서 A549 세포주를 80~90%의 confluency가 되도록 배양한 후 각각 Untreated, MG132 3 microM, TRAIL (Alexis, San Diego, CA, USA) 100 ng/ml, MG132 1시간 전처치 후 TRAIL 처치 등으로 처치한 24시간 후 세포를 harvest하여 제작사 protocol에 따라 1 mg/ml annexin V-FITC로 염색하고 FACS 분석을

하였다.

### 5. Plasmid: IgG $\kappa$ -NF- $\kappa$ B luciferase reporter gene construct

NF- $\kappa$ B 활성 변화에 의한 전사조절을 평가하기 위하여 reporter gene assay를 시행하는 것이 보편적인 방법으로 써 과거에는 CAT gene을 많이 사용하였으나 근자에 이르러서는 동위원소를 사용하여야 하는 번거로움 때문에 luciferase gene을 많이 사용하는 추세이다. 본 연구자도 NF- $\kappa$ B 의존성 전사활성을 평가하기 위하여 luciferase reporter gene assay를 도입하기로 결정하였고 이를 위해 NF- $\kappa$ B의 원조격인 IgG kappa chain 유전자의 NF- $\kappa$ B binding site인 IgG  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B site (sequence 5-GGGG-ACTTTC-3) oligonucleotide가 minimal IL-8 promoter (position -67 to +44)의 상류(upstream)에 위치하도록 구축된 luciferase reporter gene construct를 이용하였다<sup>5</sup>. 대조 plasmid construct로는 NF- $\kappa$ B 결합 부위가 제거되고 minimal IL-8 promoter만 삽입된 min-IL-8-luciferase reporter gene construct를 이용하였다.

### 6. 유전자이입

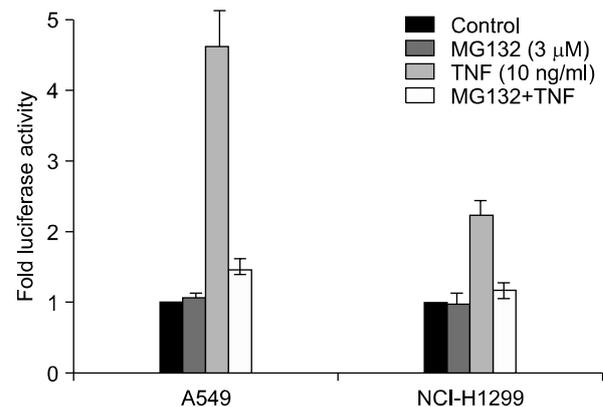
A549 세포주와 NCI-H1299 세포주에서 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성을 평가하기 위하여 상기한 IgG  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B luciferase construct를 lipofectamine (Gibco-BRL) 방법으로 유전자 주입을 시행한 후 G418 400~600  $\mu$ g/ml의 조건 하에서 선택 배양하여 내성 clone을 모아서 IgG  $\kappa$ B-luc 세포주를 획득한다. IgG  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B site가 없고 minimal IL-8 promoter만 존재하는 control vector를 이용하여 같은 방법으로 minimal IL-8 luciferase 세포주를 획득하여 대조군으로 사용하였다.

### 7. Luciferase reporter gene assay

상기에서 획득한 세포주의 NF- $\kappa$ B 의존성 luciferase 발현여부의 적정성을 확인하기 위하여 각 IgG  $\kappa$ B-luc 세포주와 대조 세포주인 min-IL-8-luc 세포주를 대표적인 NF- $\kappa$ B 자극물질인 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)과 PMA (20 ng/ml)로 자극한 후 luciferase assay를 시행하였다. 각 세포주를 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)와 PMA (100 ng/ml)로 6시간 자극한 후 0.1 ml의 lysis buffer (0.1 M HEPES, pH 7.6, 1% Triton-X, 1 mM DTT and 2 mM EDTA)를 직접 첨가하여 수확(harvest)한 후 4°C에서 10분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 세포 단백을 얻었다. Bradford assay (Bio-

Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 단백질 농도를 측정한 후 20  $\mu$ g의 단백질을 luciferase assay mix [25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 5 mM ATP and 1 mM D-luciferin (Analytical Luminescence Laboratory, San Diego, CA, USA)]에 첨가한 후 Monolight 2010 (Analytical Luminescence Laboratory)을 이용하여 20초간 luminescence를 3회 반복 측정하였다. 그 결과 A549 IgG  $\kappa$ B-luc 세포주에서는 TNF- $\alpha$  (10 ng/ml)자극에 의해서 4.61 $\pm$ 0.52배, PMA (20 ng/ml) 자극에 의해서 5.35 $\pm$ 0.62배의 luciferase 활성 증가를 보인 반면 대조세포주인 A549 min-IL-8-luc 세포주에서는 기저수준이  $\kappa$ B-luc 세포주의 10분의 1 수준의 활성을 보였고 TNF- $\alpha$ 와 PMA 자극에 의해서 전혀 활성 증가가 관찰되지 않아, A549세포주에서 NF- $\kappa$ B에 특이적인 전사활성 여부를 평가할 수 있는 안정된 세포주를 획득하였음을 확인할 수 있었다(data not shown). 마찬가지로 NCI-H1299 IgG  $\kappa$ B-luc 세포주에서도 대조세포군에서 함께 TNF와 PMA 자극에 의한 luciferase assay를 통하여 NF- $\kappa$ B에 특이적 전사활성을 확인함으로써 NF- $\kappa$ B에 대한 전사활성을 평가할 수 있는 system을 획득하였다.

양 세포주에서 본 연구에서 사용할 MG132에 의해 NF- $\kappa$ B가 억제되는지를 확인하기 위하여 대표적인 NF- $\kappa$ B



**Figure 1.** MG132 inhibits TNF- $\alpha$  induced NF- $\kappa$ B dependent transcriptional activation in both A549 and NCI-H1299 cells. A549 and NCI-H1299 cells which stably expressed an IgG  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B luciferase reporter gene construct were pretreated with MG132 (3  $\mu$ M) for 1 h followed by the addition of TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) for 6 h. The cells were then harvested for analysis of luciferase activity. Values are mean of three experiments  $\pm$  SD.

활성 유도물질인 TNF를 이용하여 NF- $\kappa$ B 활성억제를 시험하여 보았다. MG132는 TNF 처치 1시간 전에 처치하였다. A549 세포주에서 TNF 자극에 의해  $4.61 \pm 0.52$ 배의 활성 증가가 있었으나 MG132 전처치로  $1.47 \pm 0.14$ 배로 거의 기저 수준으로 감소되었다. NCI-H1299 세포주에서도 TNF 자극에 의해  $2.23 \pm 0.21$ 배의 활성 증가가 있었으나 MG132 전처치로  $1.16 \pm 0.12$ 배로 거의 기저 수준으로 감소되어 같은 결과를 나타내었다(Figure 1).

## 8. Electromobility shift assay (EMSA)

세포주를 네 개의 100 mm dish에서 80~90% confluency되게 배양한 후 TRAIL 100 ng/ml로 0, 1, 2, 4시간 처치한 후 Trypsin/EDTA로 harvest한다. 100  $\mu$ l Buffer A (10 mM HEPES pH7.9, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.2% NP-40 with protease inhibitors)를 첨가한 후 25G 주사바늘로 5~6회 통과시켜 세포막을 파괴시키고 4°C에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 세포핵 pellet을 얻은 후, 100  $\mu$ l Buffer C (20 mM HEPES pH7.9, 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA plus protease inhibitors)를 이용하여 핵막을 파괴시키고 4°C에서 30분간 석어준다. 4°C에서 14분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 chromatin을 pellet시켜 핵추출(nuclear extraction)성분을 얻은 후 4°C에서 Buffer D [20 mM HEPES pH7.9, 20% glycerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1mM dithiothreitol (DTT)]로 6시간 투석하여 핵단백을 획득한 후 Bradford assay로 단백질 농도를 측정한다.

EMSA는 추출된 핵단백 7.5  $\mu$ g을 1  $\mu$ g의 poly(dI-dC) : poly(dI-dC)와 2.5 pg의 [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>] - labeled oligonucleotide probe ( $1 \times 10^5$  cpm)이 포함된 20  $\mu$ l의 binding buffer (25 mM HEPES pH7.6, 0.1 mM EDTA, 10% glycerol, 50 mM KCl, 0.05 mM DTT)에 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시킨 후 0.5 $\times$ Tris-Borate EDTA (pH8.3) buffer에서 4% nondenaturing polyacrylamide gel을 전기영동하여 단백질-DNA 복합체를 분리하여 autoradiography로 결과를 얻었다. 사용된 oligonucleotide probe는 IgG kappa chain 유전자의 5 flanking 부위의 NF- $\kappa$ B site (5 tcga-GTCGGGGACTTTCCTCTGA)를 사용하였고, 이에 대한 상보적 strand를 5쪽에 네 개 염기 overhang을 갖도록 고안하여 annealing한 후 [ $\alpha$ -P<sup>32</sup>] dCTP (Amersham, Arlington Heights, IL, USA)와 non-radioactive dA/T/GTPs, 그리고 Klenow DNA polymerase (New England Biolabs,

Beverly, MA, USA)를 이용하여 제조하였다. Cold competition과 항체 방향에 의해 supershift를 위해서는 250 pg (100 $\times$ )의 cold oligonucleotide probe와 NF- $\kappa$ B의 p65 subunit에 대한 rabbit polyclonal 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 radio-labeled probe와 반응시키기 5분 전에 먼저 반응시켰다.

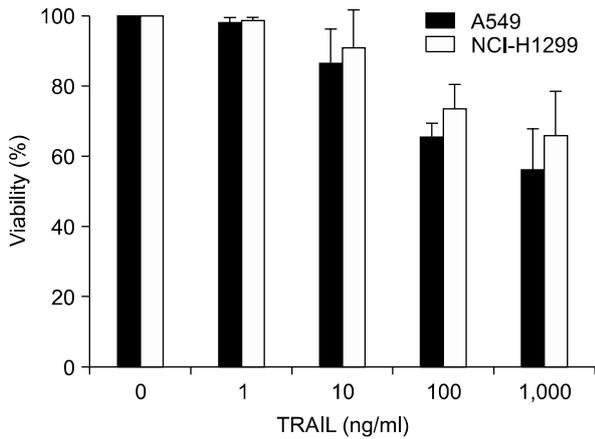
## 9. Western blot

A549와 NCI-H1299 세포주에서 TRAIL에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$  인산화와 퇴행(degradation)을 확인하기 위하여 I $\kappa$ B $\alpha$ 에 대한 western blot을 시행하였다. 각 세포주를 6개의 60 mm 배양접시에서 80~90% confluency가 되도록 배양한 후 TRAIL 100 ng/ml을 0, 30, 60, 120, 180, 240분 처치한 후 Trypsin/EDTA로 harvest하여 lysis 용액(1% SDS, 1 mM Sodim vanadate, 10 mM Tris-HCl, pH7.4)으로 whole cell lysate를 취득한 후 5분간 4°C 14,000 rpm에서 원심분리하여 단백추출을 얻는다. Bradford assay로 단백질 농도를 측정하고 3분간 가열하여 단백질 변형 시킨 후 SDS-PAGE로 전기영동하여 nitrocellulose에 이전한다. Blot을 blocking buffer (4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 incubation한 후 rabbit polyclonal I $\kappa$ B $\alpha$  항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20 등을 포함한 4% milk 용액에 1 : 1,000으로 희석하여 1시간동안 실온에서 incubation하고 10분씩 3회 세척한 후 horseradish peroxidase conjugate anti-rabbit IgG 1 : 5000 희석된 blocking buffer로 2차항체 반응을 1시간 거친 후 역시 3회 세척한 후 ECL (Amersham, Arlington Heights, IL, USA) 검출하였다.

## 결 과

### 1. 폐암세포주에서의 TRAIL 유도성 아포토시스

우선 본 실험에서 사용하기로 한 A549와 NCI-H1299 두 종류의 비소세포암 세포주에서 TRAIL에 의한 세포독성을 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 각 세포주에서 TRAIL을 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1,000 ng/ml 등의 용량으로 각각 농도를 증가하여 MTT assay로 cell viability를 측정한 결과, A549 세포주에서는 각각  $98.1 \pm 1.3$ ,  $86.4 \pm 9.8$ ,  $65.6 \pm 3.8$ ,  $56.2 \pm 11.5\%$ 의 viability를 보였고, NCI-H1299 세포주에서는 각각  $98.5 \pm 0.8$ ,  $90.8 \pm 10.8$ ,

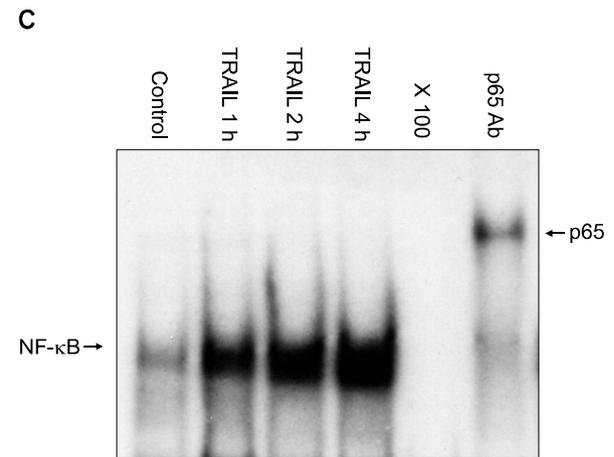
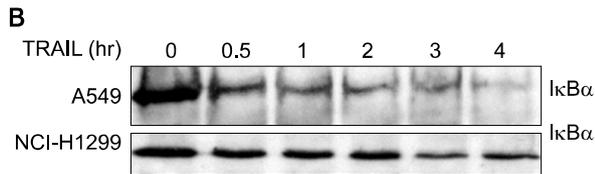
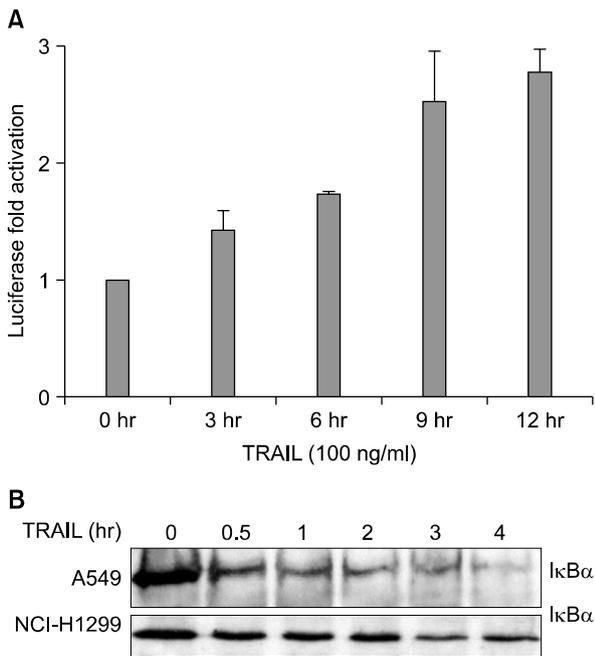


**Figure 2.** Dose-dependent TRAIL-induced cytotoxicity in A549 and NCI-H1299 lung cancer cells. Cells were incubated with TRAIL for 24 h followed by analysis of cell viability by an MTT assay. Values are mean of three experiments  $\pm$ SD.

73.6 $\pm$ 6.8, 65.8 $\pm$ 12.8%의 결과를 보였다(Figure 2). 이 결과로서 두 폐암세포주는 TRAIL 표준농도인 100 ng/ml에서 각각 약 30% 내외의 세포독성을 유도하며 농도를 10배로 증가시켜도 그 상승효과가 크지 않음을 관찰할 수 있어서 TRAIL에 민감한 세포주가 아님을 확인할 수 있었다.

## 2. 폐암세포주에서의 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화

본 연구에서 사용한 두 세포주에서 TRAIL에 대한 민감도가 30% 내외에 그친다는 사실은 역으로 TRAIL에 대한 내성 기전이 존재한다는 가설이 성립하고 그 중 가장 가능성이 있는 인자로서 TNF 유전자군의 일원이므로 NF- $\kappa$ B를 활성화시킬 것이라는 가설 하에 두세포주에서 TRAIL이 NF- $\kappa$ B를 활성화시키는지 luciferase reporter gene assay, I $\kappa$ B $\alpha$ 의 퇴화에 대한 western blot, electromo-



**Figure 3.** TRAIL induces NF- $\kappa$ B activation in A549 cells. (A) Luciferase assay: Stable A549 IgG  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B luciferase cells were treated with TRAIL (100 ng/ml) for different time points. Cells were harvested for luciferase assay. The fold luciferase activation was calculated relative to a normalized value of one given to control (untreated) cells. Data represent the mean luciferase value from triplicates in one experiment, which was used to calculate the mean+SD, from two experiments. (B) Western blot for I $\kappa$ B $\alpha$  degradation: A549 cells were treated with TRAIL (100 ng/ml) for various times and cellular proteins was harvested followed by loading of equal amounts of protein on an SDS-PAGE gel which was probed with an anti-I $\kappa$ B $\alpha$  antibody after transfer to nitrocellulose. (C) EMSA with supershift, A549 cells were treated with TRAIL (100 ng/ml) for various times and harvested for nuclear extraction. Electromobility shift assay was done with a radiolabeled IgG  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B probe. Equal amounts (7.5  $\mu$ g) of nuclear protein was loaded in each lane. In 5th lane, an 100x excess of unlabeled oligonucleotide was added 5 min before the addition of radiolabeled probe. In 6th lane, a rabbit polyclonal antibody p65 was added to the nuclear extract 10 min before the addition of radiolabeled probe.

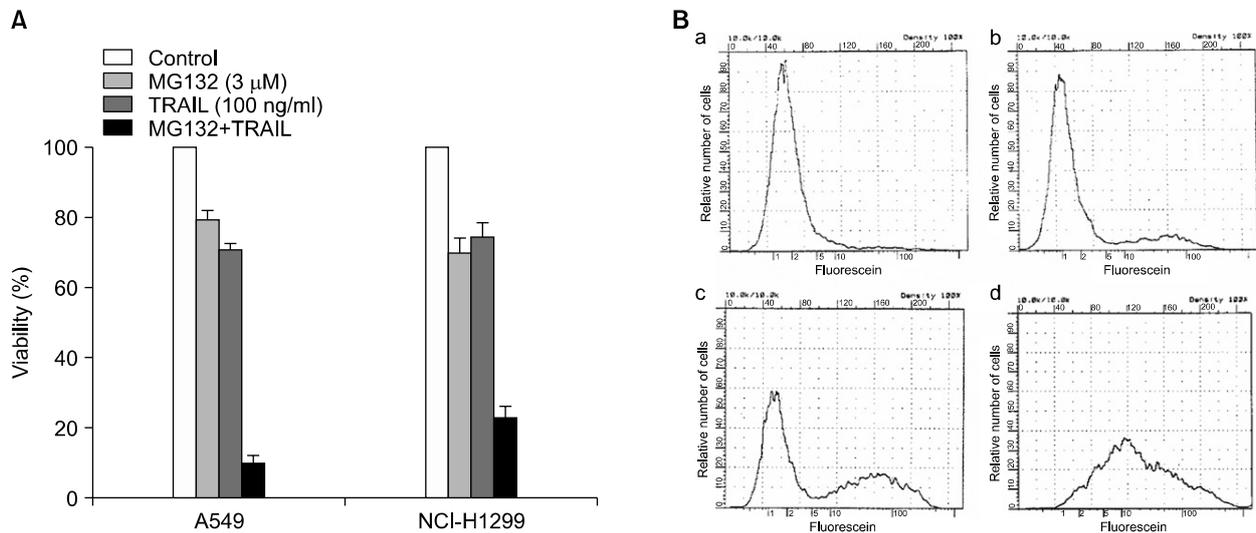
bility shift assay를 이용하여 확인하였다.

1) Luciferase reporter gene assay에 의한 전사활성: A549 IgG  $\kappa$ B-luc 세포주에서 TRAIL 100 ng/ml의 농도로 각각 3, 6, 9, 12시간 처치한 후 harvest하여 luciferase assay를 시행하였다. 그 결과 각각 1.4, 1.7, 2.5, 2.7배의 NF- $\kappa$ B 전사활성의 증가가 있었는데 이는 TNF에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화보다는 상대적으로 약하고 늦게 나타나지만 뚜렷하고 의미있는 NF- $\kappa$ B 활성화가 일어남을 확인할 수 있었다(Figure 3A). NCI-H1299 세포주에서는 TRAIL 100 ng/ml 9시간 처치로 1.5배의 NF- $\kappa$ B 활성화가 일어남을 확인할 수 있었다.

2) Western blot에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$  퇴행: NF- $\kappa$ B가 활성화 되기 위해서는 세포질에서 NF- $\kappa$ B의 핵으로의 이동을 방해하는 억제 단백질인 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 인산화되고 뒤이어 퇴행되어야 하는데 이를 확인하기 위하여 western blot을 시행하였다. A549 세포주에서 TRAIL 처치 후 30분이면 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 퇴행되어 소실되기 시작하는데 이는 4시간까지 지속적으로 유지되고 있었다(Figure 3B). NCI-H1299 세포주에서는 A549 세포주에서 만큼은 아니지만 I $\kappa$ B $\alpha$  band가 현저히 감소함으로써 보아 유의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 퇴행이 발생함을 확인할 수 있었다(Figure 3B). 그러나 TNF에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 퇴행에 있어서는 I $\kappa$ B $\alpha$ 가 완전 퇴행된 후 1~2시

간 이후에 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 재등장이 있어 지속적인 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제하는 switch-off system이 존재하는 것으로 알려져 있으나 TRAIL에 의한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 퇴행에 있어서는 이러한 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 재등장현상이 관찰되지 않았다. 이는 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화가 TNF보다는 약하지만 보다 지속적이라는 reporter gene assay의 결과와 부합되는 소견이 아닌가라고 생각된다.

3) Electromobility shift assay에 의한 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합: I $\kappa$ B $\alpha$  인산화 및 분해에 이어 발생하는 과정이 NF- $\kappa$ B의 핵이동 및 DNA 결합인데 이를 확인하기 위하여 electromobility shift assay (EMSA)를 시행하였다. TRAIL 처치 각 1, 2, 4시간 시점에서 핵단백을 추출한 후 EMSA를 시행한 결과 시간 경과에 따라 NF- $\kappa$ B의 DNA 결합이 뚜렷히 증가함을 확인할 수 있었고 lane 5에서 보듯이 unlabelled oligonucleotide ( $\times 100$ , cold competition)에 의해 완전히 DNA 결합이 억제됨을 관찰하여 NF- $\kappa$ B에 특이적인 DNA 결합임을 확인할 수 있었으며 lane 6에서 보듯이 p65 항체에 의한 supershift가 분명히 관찰되어 이 NF- $\kappa$ B DNA 결합 복합체는 transactivation에 결정적 역할을 하는 p65를 포함하고 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 3C).



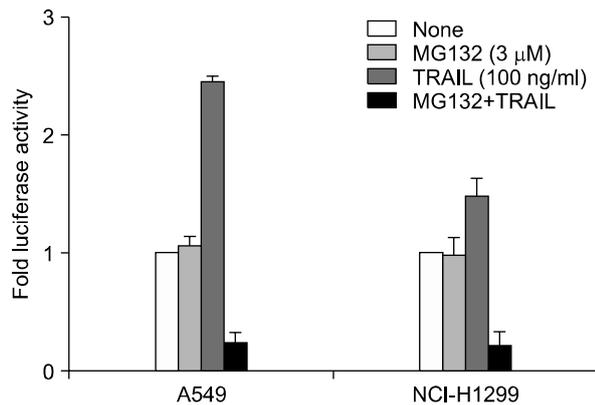
**Figure 4.** (A) MG132 sensitizes A549 and NCI-H1299 cells to TRAIL-induced cytotoxicity. MG132 (3  $\mu$ M) was pretreated 1 h before the addition of TRAIL (100 ng/ml) and after 24 h incubation cell viability test by an MTT assay was done. Values are mean of three experiments  $\pm$  SD. (B) Annexin V assay shows the sensitization effect of MG132 to TRAIL-induced apoptosis in A549 cells. Treatment schedule was the same with Figure 3A, and cells were harvested and followed by the analysis of apoptosis by FACS scan. (a: control, b: MG132 3  $\mu$ M, c: TRAIL 100 ng/ml, d: MG132 1 hr pre-treatment + TRAIL).

### 3. MG132에 의한 폐암세포주의 TRAIL 유도성 아포프토시스에 대한 감작효과

TRAIL이 아포프토시스를 억제하는 역할을 한다고 알려진 전사인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화함을 확인한 후 이를 억제하면 TRAIL에 의한 아포프토시스를 항진시킬 수 있을까 하는 가설을 확인하기 위하여 proteasome 억제제로 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 분해를 방해함으로써 NF- $\kappa$ B 활성화를 억제한다고 알려진 MG132 전처치로 TRAIL에 의한 아포프토시스 항진 여부를 MTT assay와 Annexin V assay를 통하여 확인하여 보았다.

1) MTT assay: MG132 자체도 3  $\mu$ M의 농도에서 양 세포주 모두에서 20~30%의 세포독성이 관찰되었다. TRAIL 단독 투여로 양 세포주 모두에서 약 30%의 세포독성이 관찰되었으나 MG132 전처치 후 TRAIL을 투여하면 양 세포주 모두에서 80% 이상의 세포독성이 관찰되어 MG132가 TRAIL에 대한 감작효과가 있음을 확인할 수 있었다 (Figure 4A).

2) Annexin V assay: 두 폐암세포주에서 관찰되는 TRAIL과 MG132의 감작 세포독성 효과가 아포프토시스라는 것을 확인하기 위하여 아포프토시스 초기에 세포막에서 발생하는 phosphatidylserine의 외전을 검색하는 Annexin V assay를 A549 세포주에서 시행하였다. 그 결과 MG132 단



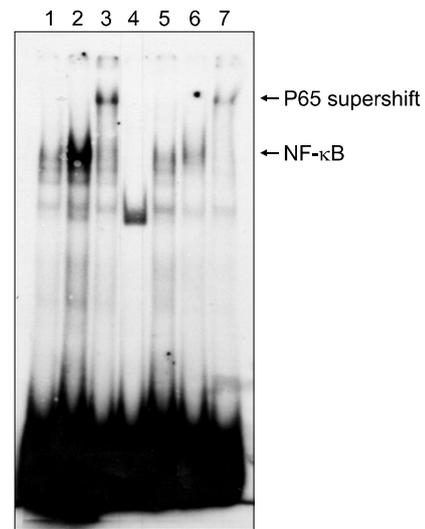
**Figure 5.** MG132 inhibits TRAIL-induced NF- $\kappa$ B transcriptional activity in A549 and NCI-H1299 cells. A549 and NCI-H1299 cells which stably expressed an IgG  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B luciferase reporter gene construct were pre-treated with MG132 (3  $\mu$ M) for 1 h followed by the addition of TRAIL (100 ng/ml) for 24 h. The cells were then harvested for analysis of luciferase activity. Values are mean of three experiments  $\pm$  SD.

독으로는 17.8%, TRAIL 단독 투여로 41.4%, 그리고 MG132 전처치 후 TRAIL 처치로 77.7%의 Annexin V 양성세포가 확인되어 아포프토시스에 의한 세포독성임을 확인할 수 있었다(Figure 4B).

### 4. MG132의 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화의 억제

MG132에 의한 TRAIL세포독성에 대한 감작 효과가 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성을 억제함에 기인한다는 것을 확인하기 위하여 luciferase assay와 EMSA를 시행하였다.

1) Luciferase reporter gene assay: A549 IgG  $\kappa$ B-luc 세포주에서 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성은  $2.45 \pm 0.05$ 배 증가하였으나 MG132 전처치로 기저 수준의  $0.24 \pm 0.08$ 배로 현저한 저하가 관찰되었고, NCI-H1299 IgG  $\kappa$ B-luc 세포주에서도 TRAIL에 의해서는  $1.47 \pm 0.16$ 배가 증가하



**Figure 6.** MG132 inhibits TRAIL-induced DNA binding of NF- $\kappa$ B in A549 cells and supershift assay shows NF- $\kappa$ B complex containing p65. A549 cells were treated with TRAIL (100 ng/ml) for various times and harvested for nuclear extraction. Electromobility shift assay was done with a radiolabeled IgG  $\kappa$ -NF- $\kappa$ B probe. Equal amounts (7.5  $\mu$ g) of nuclear protein was loaded in each lane. In 4th lane, an 100x excess of unlabeled oligonucleotide was added 5 min before the addition of radiolabeled probe. In 3rd and 7th lanes, a rabbit polyclonal antibody p65 was added to the nuclear extract 10 min before the addition of radiolabeled probe (lane 1: control, lane 2: TRAIL 100 ng/ml for 2 hr, lane 3: TRAIL+p65 Ab, lane 4: TRAIL +x100 (cold competition), lane 5: MG132 3  $\mu$ M, lane 6: MG132+TRAIL, lane 7: MG132+TRAIL+p65 Ab).

였으나 MG132 전처치로 기저 수준의  $0.21 \pm 0.12$  강력한 억제 효과가 관찰되었다(Figure 5).

2) **Electromobility shift assay:** 이러한 MG132의 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성 억제 효과가 NF- $\kappa$ B의 핵이동에 뒤이은 DNA 결합의 억제 효과에 의한 것임을 확인하기 위하여 MG132 전처치 후 EMSA를 시행하였다. 이미 확인한 바와 같이 TRAIL 처치에 의한 NF- $\kappa$ B DNA 결합과 p65 항체에 의한 supershift가 MG132 전처치로 완전 억제됨을 확인할 수 있었다(Figure 6). 이의 효과는 두 세포주 모두에서 확인하였다.

## 고 찰

TNF가족군의 cytokines와 수용체들의 작용이 면역계를 포함하여 체내 항상성을 유지하는 데 중심적인 역할을 한다는 사실 외에 계획된 세포사인 아포프토시스를 유도한다고 알려지면서 주목받고 있다. TNF가족군의 DIL (death inducing ligand)와 그의 수용체인 DR (death receptor)를 통한 아포프토시스 유도는 중앙 연구에서 큰 비중을 차지하고 있으며 많은 가능성을 시사하고 있다. 특히 그 중에서 TNF가족군의 EST (expressed sequence tag) database를 이용하여 새로이 cloning된 TRAIL이 가지는 장점은, 첫째로 항암 치료나 방사선 치료와는 달리 DR이 p53과는 독립적으로 아포프토시스를 유도한다는 점이며 이는 전체 중앙의 50% 이상에서 p53의 변이가 관찰되기 때문이다. 둘째는 TNF가 NF- $\kappa$ B를 활성화하여 염증성 cytokines를 유도하여 패혈성 쇼크와 같은 부작용을 보이고 FasL이 간독성을 보이는 반면에 TRAIL은 독성 부작용을 보이지 않으며<sup>11</sup>, 비교적 안전하리라고 생각되며, 셋째는 TRAIL이 뇌와 간, 고환을 제외한 거의 전 조직에서 발현된다는 점이다<sup>2,3</sup>. TRAIL이 많은 인체 조직에서 발현되어 있으며 중앙세포에서는 세포 독성을 보이지만 정상 세포에서는 독성을 보이지 않는다는 결과에서 초기의 생각은 TRAIL 수용체가 분포에서 제한이 되거나 특정한 환경에서만 아포프토시스를 유도할 것이라고 추론하였지만 이는 곧이어 TRAIL의 수용체가 알려지면서 decoy 수용체의 존재로서 설명하게 되었다<sup>4</sup>. TRAIL의 수용체로서 DR4/ TRAIL-R1, DR5/ TRAIL-R2, DcR1/TRAIL-R3, DcR2/ TRAIL-R4 및 osteoprotegerin이 발견되었으며 이 중에서 DR4와 DR5는 세포 내에 death domain을 가지고 있으며 FADD와는 다른 경로로 아포프토시스를 유도하지만 DcR1과 DcR2는 dominant negative fashion의 decoy re-

ceptor로서 아포프토시스로부터 세포를 보호하는 작용을 하는 것으로 알려져 있다<sup>2,4</sup>. 골농도를 증가시키는 작용을 하는 TNF수용체족인 osteoprotegerin이 TRAIL 유도성 아포프토시스를 억제한다는 보고와 그렇지 않다는 보고가 있다.

세포독성을 보이는 DR4와 DR5는 대부분의 정상조직과 많은 중앙세포에 발현되어 있으며, 아포프토시스로부터 세포를 보호하는 decoy 수용체로서 DcR1과 DcR2는 많은 정상 조직에서 발현되는 반면에 중앙세포에서는 거의 발현을 보이지 않는다. 이는 TRAIL에 의하여 정상세포는 보호되며 많은 중앙세포가 세포사로 진행되는 실험적 현상을 설명하여 준다. 그러나 TRAIL에 의하여도 중앙세포에서 상대적인 내성을 보이고 있으며 이의 기전은 아직 명확치 않으나 한 가지 설명으로 TRAIL이 정상세포와 중앙세포에서 세포사뿐만 아니라 세포 생존과 증식과 같은 다른 중요한 기능을 할 것이라고 추정하고 있다<sup>12</sup>. 이것은 TRAIL도 anti-apoptosis로 작용하는 기전이 decoy 수용체 이외에 존재할 것으로 생각되어지며 그 대상으로 전사인자인 NF- $\kappa$ B 활성화와의 관련을 보고하고 있다. DR4와 DR5가 과발현되면 NF- $\kappa$ B를 활성화하지만 TRAIL 자체는 이 반응이 TNF에 비하여 약하고<sup>13,14</sup> DcR2의 과발현으로 NF- $\kappa$ B가 활성화된다는 보고<sup>15</sup>와 활성화하지 않는다는 보고<sup>16</sup>가 있다.

본 연구는 TRAIL이 보이는 아포프토시스 효과를 2종류의 폐암세포주에서 보고자 하였고, wild-type p53를 지니는 A549 폐암세포주와 p53 null인 NCI-H1299 폐암세포주에서 TRAIL의 처치로서 각각 약 30%의 아포프토시스를 보여 상대적인 내성을 보이고 있으며, TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성화가 각각 2.45, 1.47배 증가함을 확인하였다. 또한 proteasome 억제제인 MG132 처치로서 NF- $\kappa$ B의 활성이 현저하게 억제되며 따라서 MG132의 전처치로서 TRAIL의 아포프토시스가 강화됨을 확인하였다. 세포의 종류에 따라서 TRAIL에 대한 민감도가 차이를 보이며 그의 기전을 설명하기는 쉽지 않지만 기존 NF- $\kappa$ B활성의 차이가 작용하리라고 추측한다. 이 연구의 의의는, 첫째로 TRAIL에 의한 아포프토시스가 wild-type p53인 A549 세포와 p53 null인 NCI-H1299세포에서 약 30% 정도의 세포사를 보여 p53의 존재 여부와 큰 관련이 없음을 확인한 것이고, 둘째로 TRAIL도 아포프토시스에 내성을 보이는 기전으로 TNF- $\alpha$ 와 마찬가지로 NF- $\kappa$ B의 활성화를 유발한다는 가설을 폐암세포주를 대상으로 확인한 것이며, 셋째로 NF- $\kappa$ B의 활성 억제를 통하여 TRAIL에 의한 아포프

토시스 감작 효과가 뚜렷함을 확인한 것이라고 할 수 있겠다. TARIL이 DR을 통하여 p53과는 독립적으로 내인성 아포프토시스 장치를 점화하여 아포프토시스를 일으키지만 p53가 DR5의 발현을 유도한다는 보고가 있다<sup>17</sup>. 이는 TRAIL과 p53와의 관련성에 대한 향후 밝혀져야 하는 과제이며 p53 knockout이나 transfection을 이용한 연구가 필요하다고 생각된다.

NF- $\kappa$ B가 전사인자로서 DNA와 결합하여 염증성 cytokines, interferons, 성장인자, cell adhesion molecules 등의 유전자 발현을 조절한다는 사실 이외에 아포프토시스 조절에 중요한 역할을 한다는 것은 p65 (Rel A)가 결핍된 쥐가 전격적 간세포 아포프토시스로 발생과정에서 죽는다는 사실에 근거하고 있으며<sup>18</sup>, TNF- $\alpha$ 와 항암치료에 의한 아포프토시스로부터 세포를 보호한다는 것은 잘 알려진 사실이다<sup>18-20</sup>. TRAIL에 의한 아포프토시스도 연구된 세포주의 50%에서만 감수성을 보이고 본 연구에서도 두 폐암세포주에서 상대적인 내성을 보이고 있다. TRAIL로부터 정상세포가 보호되는 기전으로 decoy 수용체에 대한 역할이 강조되고 상대적인 장점으로 부각되어 왔지만 Griffith 등<sup>21</sup>은 사람 melanoma 세포주에서 TRAIL 수용체에 대한 monoclonal 항체를 이용한 분석으로 decoy 수용체와 감수성과는 큰 관련이 없다고 보고하고 있다. 그러나 연구되는 세포에 따라 TRAIL 감수성의 차이를 보이므로 폐암 세포에서도 수용체의 발현 여부와 역할에 대하여 보완적인 연구가 필요하겠다. TRAIL에 의해서도 NF- $\kappa$ B가 활성화가 이루어지지만 TNF- $\alpha$ 보다는 약하고 시간적으로 늦으며 I $\kappa$ B $\alpha$ 인산화에 있어서 rebound가 없다는 차이가 있으며 이는 본 연구에서도 일치하는 결과이다. TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화의 차이는 TRAIL signaling이 아직 밝혀져 있지 않아서 설명할 수 없지만 향후 그 기전연구는 필요하리라 생각된다.

NF- $\kappa$ B의 활성화가 아포프토시스로부터 세포를 보호하는데 이는 NF- $\kappa$ B의 활성 억제로서 아포프토시스를 감작하는 효과를 기대할 수 있다. NF- $\kappa$ B의 억제제로서 glucocorticoids<sup>22</sup>, 항산화제<sup>23</sup>, Cu<sup>2+</sup><sup>24</sup>, alkylating agents 등과 proteasome 억제제가 알려져 있지만<sup>25</sup> 모두가 NF- $\kappa$ B에 specific한 억제제는 아니다. Delic 등<sup>26</sup>은 proteasome 억제제인 lactacystin이 apoptosis를 유발하여 항암제와 방사선에 내성이 있는 CLL 임파구에서 TNF- $\alpha$ 에 의한 apoptosis를 감작시킨다고 보고하였고, Fiedler 등<sup>27</sup>은 proteasome 억제제인 MG132가 A549 세포에서 TNF- $\alpha$  유도성 NF- $\kappa$ B 활성화와 IL-8의 방출을 억제한다고 하였으

며, Jeremias 등<sup>28</sup>은 MG132나 mutant I $\kappa$ B $\alpha$ 의 과발현으로 DIL과 doxorubicin에 의한 아포프토시스 내성을 줄일 수 있음을 보고하여 NF- $\kappa$ B의 억제가 항암치료에서 아포프토시스를 감작시키는 분자적 접근임을 제시하였다. I $\kappa$ B $\alpha$ 의 퇴행에 작용하는 proteasome의 억제제인 MG132의 전처치로 DIL에 의한 아포프토시스 감작 효과는 뚜렷하다. 본 연구에서도 대상으로 한 폐암세포에서 TRAIL 단독으로 30% 정도의 세포사를 보였지만 MG132의 전처치로 80% 이상의 세포사를 보여 상당히 고무적인 결과를 얻었다. TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B활성이 MG132의 전처치로 기저수준 이하로 억제되는 것에서 세포마다 기존 NF- $\kappa$ B활성이 차이가 있으며 그 차이가 내성과 관련 있지 않음이라고 추론할 수 있겠다. 그러나 MG132 자체가 세포독성을 보이고 있으며 MG132는 proteasome억제제로서 비정상적인 단백질 퇴행을 억제하며, MHC class I의 발현을 차단하고<sup>29</sup> 세포주기 단백질인 cyclin B를 증가시키는<sup>30</sup> 등의 광범위한 작용이 있어 NF- $\kappa$ B 활성 억제를 통한 아포프토시스 감작에서 in vivo 적용은 어려울 것이다. 따라서 NF- $\kappa$ B에 특이한 억제 방법을 찾는 것이 요구되며 I $\kappa$ B $\alpha$  suppressor의 연구가 그의 대안이 될 수 있다고 생각된다.

또한 TNF와 관련하여 NF- $\kappa$ B의 anti-apoptotic downstream 유전자로 cIAP1, cIAP2 등이 알려졌으며, caspase 8의 억제제인 FLIP (FLICE-inhibitory protein)과 XAIP (X-chromosome-linked apoptosis inhibitor protein), zink-finger protein A20 등이 연구되어지고 있다<sup>31,32</sup>. TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화도 inhibitor of apoptosis protein을 유도하는 지에 대한 연구와 더 나아가 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B 활성화의 생리적 기능이 무엇인가에 대한 연구, 즉 TNF처럼 염증매개성 cytokine으로의 작용이 있는 지에 대한 연구가 필요하다고 생각된다. 이것은 정상세포는 보호하고 종양에 선택적으로 작용할 수 있는 TRAIL의 장점을 극대화하고 단점을 극복하여 궁극적인 항암치료에서의 가능성을 제시하기 때문이다.

## 요 약

**연구배경:** 정상세포는 보호되고 종양세포에 독성을 보인다고 알려진 TNF유전자족으로 새로이 확인된 TRAIL이 폐암세포에서 보이는 아포프토시스 효과를 확인하고, 아포프토시스로부터 세포를 보호하는 전사인자 NF- $\kappa$ B가 TRAIL에 의하여 활성화 되는 정도를 평가하여 MG132의 NF- $\kappa$ B활성억제가 TRAIL 유도성 아포프토시스를 감작시

키를 확인하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

**방 법:** A549 (wt p53) 및 NCI-H1299 (null p53) 폐암세포주를 사용하였다. 세포독성 검사는 MTT assay를 이용하였고 아포프토시스는 Annexin V assay와 FACS 분석을 이용하였다. NF- $\kappa$ B 전사활성은 luciferase reporter gene assay를 이용하였고 I $\kappa$ B $\alpha$  분해는 western blot을 이용하였으며, TRAIL에 의해 활성화된 NF- $\kappa$ B와 DNA 결합은 electromobility shift assay와 anti-p65 antibody를 이용한 supershift assay로 확인하였다.

**결 과:** 1) TRAIL 100 ng/ml 농도에서 wild-type p53인 A549 폐암세포는 34.4%, p53 null인 NCI-H1299 폐암세포는 26.4%의 세포사를 관찰하였다. 2) Luciferase reporter gene assay로서 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성이 A549 IgG  $\kappa$ B-luc세포에서 2.45배 증가하고 NCI-H1299 IgG  $\kappa$ B-luc세포에서는 1.47배 증가함을 관찰하여 TRAIL에 의하여 NF- $\kappa$ B가 활성화됨을 확인하였다. 3) MG132의 전처치로 TRAIL에 의한 NF- $\kappa$ B의 활성이 A549 세포와 NCI-H1299 세포에서 각각 기저수준의 0.24, 0.21배로 강력히 억제되었다. 4) TRAIL단독으로 30% 전후의 세포독성이 MG132 전처치 후 TRAIL을 투여하면 두 세포주 모두에서 80% 이상의 세포독성이 관찰되어 MG132가 TRAIL유도성 아포프토시스에 감작효과가 있음을 확인하였다.

**결 론:** 이상의 결과로 TRAIL에 상대적인 내성을 보이는 폐암세포주에서 MG132가 NF- $\kappa$ B 활성억제로서 TRAIL유도성 아포프토시스를 강화시키는 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구는 향후 폐암치료에 있어서 TRAIL유도성 아포프토시스가 이용될 수 있는 가능성을 확인한 기초자료가 된다고 생각된다.

## 참 고 문 헌

- Lee KY, Lee JH, Kim SJ, Yoo KH. Immunohistochemical analysis for the expression of DR5 TRAIL receptor and p53 in non-small cell lung cancer. *Tuberc Respir Dis* 2008;64:278-84.
- Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, Din WS, Huang CP, Nicholl JK, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673-82.
- Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687-90.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:255-60.
- Lee KY, Park JS, Jee YK, Rosen GD. Triptolide sensitizes lung cancer cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis by inhibition of NF-kappaB activation. *Exp Mol Med* 2002;34:462-8.
- Chauhan D, Hideshima T, Anderson KC. Proteasome inhibition in multiple myeloma: therapeutic implication. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:465-76.
- Almond JB, Cohen GM. The proteasome: a novel target for cancer chemotherapy. *Leukemia* 2002;16:433-43.
- Fribley A, Zeng Q, Wang CY. Proteasome inhibitor PS-341 induces apoptosis through induction of endoplasmic reticulum stress-reactive oxygen species in head and neck squamous cell carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 2004;24:9695-704.
- Ishii Y, Waxman S, Germain D. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in cancer therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2007;7:359-65.
- Voortman J, Resende TP, Abou El Hassan MA, Giaccone G, Krutz FA. TRAIL therapy in non-small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor-mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib. *Mol Cancer Ther* 2007;6:2103-12.
- Walczak H, Degli-Esposti MA, Johnson RS, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, et al. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *EMBO J* 1997;16:5386-97.
- Golstein P. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* 1997;7:R750-3.
- Schneider P, Bodmer JL, Thome M, Hofmann K, Holler N, Tschopp J. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Lett* 1997;416:329-34.
- Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, et al. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 1997;277:818-21.
- Degli-Esposti MA, Smolak PJ, Walczak H, Waugh J, Huang CP, DuBose RF, et al. Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 1997;186:1165-70.
- Mongkolsapaya J, Cowper AE, Xu XN, Morris G, McMichael AJ, Bell JI, et al. Lymphocyte inhibitor of TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand): a new receptor protecting lymphocytes from the death ligand TRAIL. *J Immunol* 1998;160:3-6.
- Kastan M. On the TRAIL from p53 to apoptosis? *Nat Genet* 1997;17:130-1.
- Beg AA, Baltimore D. An essential role for NF- $\kappa$ B in

- preventing TNF- $\alpha$  induced cell death. *Science* 1996; 274:782-4.
19. Wang CY, Mayo MW, Baldwin AS Jr. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF- $\kappa$ B. *Science* 1996;274:784-7.
  20. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF- $\alpha$ -induced apoptosis by NF- $\kappa$ B. *Science* 1996;274:787-9.
  21. Griffith TS, Rauch CT, Smolak PJ, Waugh JY, Boiani N, Lynch DH, et al. Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies. *J Immunol* 1999;162: 2597-605.
  22. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmberg A, Karin M. Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF- $\kappa$ B activity through induction of I $\kappa$ B synthesis. *Science* 1995;270:286-90.
  23. Schreck R, Rieber P, Baeuerle PA. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of NF- $\kappa$ B transcription factor and HIV-1. *EMBO J* 1991;10:2247-58.
  24. Satake H, Suzuki K, Aoki T, Otsuka M, Sugiura Y, Yamamoto T, et al. Cupric ion blocks NF- $\kappa$ B activation through inhibiting the signal-induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$ . *Biochem Biophys Res Commun* 1995;216:568-73.
  25. Thanos D, Maniatis T. NF- $\kappa$ B: A lesson in family values. *Cell* 1995;80:529-32.
  26. Delic J, Masdehors P, Omura S, Cosset JM, Dumont J, Binet JL, et al. The proteasome inhibitor lactacystin induces apoptosis and sensitizes chemo and radio-resistant human chronic lymphocytic leukemia lymphocytes to TNF- $\alpha$  initiated apoptosis. *Br J Cancer* 1998;77:1103-7.
  27. Fiedler MA, Wernke-Dollries K, Stark JM. Inhibition of TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation and IL-8 release in A549 cells with proteasome inhibitor MG132. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;19:259-68.
  28. Jeremias I, Kupatt C, Baumann B, Herr I, Wirth T, Debatin KM. Inhibition of nuclear factor  $\kappa$ B activation attenuates apoptosis resistance in lymphoid cells. *Blood* 1998;91:4624-31.
  29. Michalek MT, Grant EP, Gramm C, Goldberg AL, Rock KL. A role for the ubiquitin-dependent proteolytic pathway in MHC class I-restricted antigen presentation. *Nature* 1993;363:552-4.
  30. Sherwood SW, Kung AL, Roitelman J, Simoni RD, Schimke RT. In vivo inhibition of cyclin B degradation and induction of cell-cycle arrest in mammalian cells by the neutral cysteine protease inhibitor N-acetyl-leucylleucylnorleucinal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3353-7.
  31. Rothe M, Pan MG, Henzel WJ, Ayres TM, Goeddel DV. The TNFR2-TRAF signaling complex contains two novel proteins related to baculoviral inhibitor of apoptosis proteins. *Cell* 1995;83:1243-52.
  32. Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW. Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF- $\kappa$ B control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:10057-62.