

IKK γ Facilitates the Activation of NF- κ B by Hepatitis C Virus Core Protein

Bo Yeong Kang¹, So Yeong Lee¹, Jin Ik Kim¹, Hye Jung Choi², Woo Hong Joo² and Dong Wan Kim^{1*}

¹Department of Biohealth Sciences, Changwon National University, Changwon, Korea

²Department of Biology and Chemistry, Changwon National University Changwon, Korea

Corresponding

Dong Wan Kim

Department of Biohealth Sciences,
Changwon National University,
Changwon, 51140, Korea.

Phone : +82-55-213-3482

Fax : +82-55-213-3480

E-mail : dwkim@changwon.ac.kr

Received : July 24, 2018

Revised : August 28, 2018

Accepted : September 06, 2018

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. HCV core protein has been shown to modulate various cellular signaling pathways including the nuclear factor κ B (NF- κ B) pathway which is associated with inflammation, cell proliferation and apoptosis. However, there have been conflicting reports about the effect of HCV core protein on NF- κ B pathway, and the mechanism by which the core protein affects NF- κ B activity remains unclear. In this study, the functional interaction of HCV core protein and I κ B kinase γ (IKK γ) was investigated using the expression plasmids of core and the components of IKK complex. The data revealed that HCV core protein activates NF- κ B. Also, HCV core protein up-regulated the phosphorylation and degradation of I κ B α . The activating effect of HCV core protein on NF- κ B was synergistically elevated by IKK γ . It was noticed that the N-terminal IKK β binding site, C-terminal leucine zipper, and zinc finger domains of IKK γ are not necessary for its synergistic effect. HCV core protein and IKK γ appeared to activate NF- κ B by up-regulating the IKK β activity resulting in the degradation of I κ B α . As expected, HCV core protein induced the expression of NF- κ B-targeted pro-inflammatory genes such as iNOS, IL-1 β and IL-6 in the transcription level. These results suggest that HCV core protein induces NF- κ B through the interaction with IKK γ and may play a critical role in the development of inflammation and related liver diseases.

Key Words: Hepatitis C virus, Core protein, NF- κ B, IKK γ , Inflammation

No potential conflict of interest relevant to this article was reported.

INTRODUCTION

Hepatitis C virus (HCV)는 Flaviviridae과에 속하는 바이러스로서 급성 간염의 15~20%를 차지하고 있으며, HCV 감염환자의 50~80%는 만성간염으로 진행되어 간경화(cirrhosis)와 간세포암(hepatocellular carcinoma)이 발생하는 것으로 알려져 있다 (1). HCV의 genome은 약 9,600 nucleotide의 양성가닥 RNA (positive-sense RNA)이며 약 3,000개의 아미노산으로 구성되어 있는 polyprotein을 생산한다. 이 polyprotein은 N-말단에서부터 core, E1, E2/P7의 구조단백질과 6개의 비구조단백질(NS2, 3, 4a, 4b, 5a, 5b)로 구성되어 있다 (2, 3). Core는 191개의 아미노산으로 된 21 kDa의 단백질로 capsid를 형성하는 기본 단위이며 감염세포에서 다양한 생물학적 성질을 나타내는 것으로 알려져 있다 (4, 5). 특히, core는 nuclear factor-kappa B (NF- κ B)의 활성화 경로에도 연관되어 있으며, Inhibitor of kappa B (I κ B) kinase β (IKK β)를 활성화시켜 NF- κ B를 활성화시킨다는 보고 (6)와 이러한 core의 NF- κ B 활성화 작용이 Fas와 tumor necrosis factor (TNF)- α 에 의한 apoptosis를 억제하는 결과를 가져온다는 보고도 있다 (7). 반면, core는 TNF receptor-1에 작용하여 apoptosis를 유도한다는 보고 (8)와 core가 NF- κ B를 억제하여 apoptosis를 유도한다는

Copyright © 2018 Journal of Bacteriology and Virology

©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/>).

상반된 보고도 있다 (9). 하지만 HCV의 core와 NF- κ B와의 연관성 및 apoptosis에 미치는 영향에 대해서는 정확한 결론이 내려지지 않고 있는 실정이다 (6, 10).

NF- κ B는 모든 유형의 세포에서 광범위하게 발현되는 유도성 전사인자로 세포 외부로부터 가해지는 TNF- α , lipopolysaccharide (LPS), irradiation, reactive oxygen species 등 다양한 자극에 대한 방어 작용과 면역세포의 활성화를 일으키며 세포의 증식 및 사멸, 염증반응 등과 관련된 다양한 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다 (11~13). NF- κ B는 유도자극이 없는 경우 I κ B에 결합되어 세포질 속에 머물러 있으나 세포를 TNF- α , LPS, Interleukin (IL)-1 β 등으로 자극하면 I κ B가 인산화 되고 I κ B의 분해가 일어나서 NF- κ B의 신호전달회로가 활성화된다 (12). I κ B는 I κ B kinase인 IKK α 와 IKK β 에 의해 serine 잔기가 인산화 되는데 인산화된 I κ B는 ubiquitination이 촉진되어 세포질 내의 26S proteasome에 의해 분해된다. 따라서 남은 NF- κ B는 자유로이 핵 안으로 이동하여 target DNA에 결합함으로써 전사를 촉진한다 (14~16). I κ B의 인산화는 IKK complex에 의해 일어나며 IKK complex (700~900 kDa)는 catalytic subunit인 IKK α (87 kDa), IKK β (85 kDa)와 효소활성은 없지만 NF- κ B 활성화에 필수적 조절 역할을 하는 IKK γ (48 kDa)를 포함한다. IKK γ 는 NF- κ B essential modulator (NEMO)라고도 불리는 것으로 kinase 활성을 가지지 않으며 IKK β 와 I κ B α 의 interaction을 증가시키고 IKK β 의 kinase 활성 증가 및 IKK complex 형성에 중요한 역할을 한다 (17, 18). 그러나 아직 IKK γ 가 다른 protein과 결합하는 부위와 결합하는 protein의 종류, N-말단과 C-말단을 포함한 부위별 기능, NF- κ B inducing kinase (NIK) 또는 mitogen activated protein kinase kinase kinase (MEKK)와 같은 NF- κ B의 upstream kinase와의 연관성 등에 대해서는 상세히 알려져 있지 않으며, 특히 HCV core에 의한 NF- κ B의 활성 변화에서 IKK γ 의 역할에 관해서는 아직 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 아직 명확하게 밝혀져 있지 않은 HCV core에 의한 NF- κ B의 활성 변화에서 IKK γ 의 역할을 IKK γ 의 deletion mutant와 IKK β 의 활성형 mutant인 IKK β -EE를 사용한 NF- κ B upstream kinase 기능 연구를 통해 규명하고자 하였다.

MATERIALS AND METHODS

Cell Culture 및 transfection

원숭이의 신장세포인 COS-7 세포와 마우스 macrophage인 RAW264.7 세포는 fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL Co, Grand Island, NY, USA)이 10% 함유된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL Co.)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 농도가 유지되는 incubator에서 배양하였다. 세포에 plasmid DNA를 도입하기 위해 FuGENE HD (Roche, Basel, Switzerland)를 사용한 lipofection 방법을 사용하였으며 sample 당 10~20 μ g의 DNA를 serum free DMEM과 FuGENE HD의 혼합액에 섞고 실온에서 20분간 반응시킨 후 70~80%의 밀도로 배양된 recipient cell에 적당하고 배양하였다. Transfection에 사용한 발현 plasmid는 pCMV5 발현벡터에 myc이 결합된 사람의 wild type NIK의 유전자가 cloning된 것과, pCMV5 발현벡터에 haemagglutinin (HA)이 결합된 사람의 wild type IKK β 또는 사람의 IKK β 의 활성형 mutant인 IKK β -EE 유전자가 cloning된 것과, pCMV5 발현벡터에 myc이 결합된 mouse의 wild type IKK γ 또는 mutant IKK γ 유전자가 cloning된 것을 사용하였다. HCV core의 발현 plasmid는 pSR α 발현벡터에 HCV의 core 발현영역의 cDNA를 cloning한 것을 사용하였다.

Luciferase assay

Luciferase assay는 Nano-Glo Luciferase Assay Kit (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하였다. Nano-Glo substrate를 Nano-Glo buffer에 100배 희석하여 사용하였으며 cell lysate는 96-well plate에 20 μ l씩 분주하여 사용하였다. Luciferase activity는 Centro LB960 luminometer (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)와 MikroWin2000 (Mikrotek Laborsysteme GmbH, Overath, Germany) 소프트웨어를 사용하여 측정하였다.

Western blotting

단백질 분석을 위한 세포추출물(whole cell extract)은 세포를 Phosphate buffered saline (PBS)로 두 번 세척 후 harvest 하고 4°C에서 1,500 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거한 후, Total lysis buffer (20 mM hepes (pH 7.9), 25% glycerol, 450 mM NaCl, 0.4 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 1% NP-40)로 suspension 하여 ice에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 4°C에서 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하였다 (18, 19). 세포질추출물(cytoplasmic extract)은

세포를 PBS로 두 번 세척 후 harvest 하고, buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9), 1 mM EDTA, 10 mM KCl, 1 mM DTT)로 suspension 후 ice에서 15분 동안 반응시켰다. 이 후 25G needle을 장착한 1 ml 주사기를 이용해 20번 stroke 하여 세포막을 파괴시키고, 4°C에서 14,000 rpm으로 15분 동안 원심분리하여 상등액을 수거하였다 (18, 19).

Western blotting은 시료 단백질을 10% Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel에서 전기 영동한 후 gel 상의 단백질을 실온에서 90 V로 2시간 동안 nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Science, Munich, Germany)에 electrotransfer 한 뒤 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 TBS-T (20 mM Tris-HCl (pH 7.6), 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20) 용액으로 1시간 동안 실온에서 blocking 하였다. Membrane을 1차 항체와 실온에서 2시간 반응시키고 TBS-T 용액으로 3번 세척한 후 peroxidase-conjugated 2차 항체로 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 반응시킨 membrane을 TBS-T 용액으로 3번 세척한 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham Corp. Arlington Heights, IL, USA)로 발광시킨 후 Amersham Imager 600 (GE Healthcare)을 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. Membrane의 strip은 stripping buffer (6.25 mM Tris-HCl (pH 6.7), 2% SDS, 100 mM 2-mercaptoethanol)에 membrane을 넣고 50°C에서 30분간 처리한 뒤 TBS-T 용액으로 10분씩 3회 세척하였다. 실험에 사용한 anti-HCV core monoclonal (C7-50), anti-I κ B α polyclonal (C-21), anti-actin polyclonal (I-19), anti-HA monoclonal (F-7), anti-cMyc monoclonal (9E10) antibody는 Santa Cruz Bio Technology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 사용하였고, anti-STAT3 polyclonal (#9139), anti-p-STAT3 polyclonal (#9145), anti-p38 monoclonal (#8690), anti-p-p38 monoclonal (#4511) antibody는 Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA) 제품을 제조사의 사용법에 따라 사용하였다. 2차 항체는 Horseradish peroxidase가 결합된 anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG (Bethyl Laboratories, Inc., Montgomery, TX, USA)를 사용하였다.

RT-PCR

세포를 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 용액으로 total RNA를 분리한 후 Accupower Roketscript cycle RT premix (Bioneer Corp., Daejeon, Korea)을 이용하여 cDNA를 합성하였다. PCR을 위한 primer는 iNOS: 5'-GGAGCAGGTGGAAGACTATTT-3' (sense), 5'-GGGAGGAGAGGAGAGAGATTTA-3' (antisense); IL-1 β : 5'-GTGTGTGACGTTCCCATAGA-3' (sense), 5'-TTAGAAACAGTCCAGCCCATAC-3' (antisense); IL-6: 5'-GATAAGCTGGAGTCACAGAAGG-3' (sense), 5'-GAAACCATCTGGCTAGGTAACA-3' (antisense); GAPDH: 5'-AACAGCAACTCCCACTCTTC-3' (sense), 5'-TGGGTGCAGCGAACTTTAT-3' (antisense)를 사용하였으며, PCR 반응은 94°C에서 3분간 pre-denature하고, 94°C에서 30초 denature, 60°C에서 1분 annealing, 72°C에서 1분 extension 반응을 30 cycle 진행한 후, 72°C에서 10분간 post-extension을 실시하였다. PCR의 결과는 2.5% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다.

Statistical analysis

실험은 3회 반복하였고, 평균(mean) \pm 표준편차(SD)로 나타내었다. Student's *t*-test를 이용하여 통계적으로 분석하였으며, *p*값이 0.05 이하이면 유의성이 있다고 판단하였다.

RESULTS

HCV의 core 단백질에 의한 NF- κ B의 활성화 변화

NF- κ B의 활성화에 대한 HCV core의 영향을 검토하기 위해 pNL- κ B-RE reporter plasmid (Promega, code N1111)와 IKK β , NIK, IKK γ 의 발현 plasmid 및 HCV core 발현 plasmid를 COS-7 세포에 co-transfection하고 45시간 후 세포를 수거하여 luciferase assay를 실시하였다. pNL- κ B-RE는 5개의 NF- κ B 결합부위를 가진 luciferase assay reporter plasmid이다. 실험 결과 Fig. 1A에 나타난 바와 같이 IKK β 만 발현되었을 경우(Fig. 1A, lane 3)에는 NF- κ B가 활성화되지 않았지만 NF- κ B의 활성화 kinase인 NIK의 co-transfection에 의해 NF- κ B의 활성이 증가하였으며(Fig. 1A, lane 4), 여기에 HCV core를 발현시켰을 때 NF- κ B의 활성은 더욱 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1A, lane 5). 또한 IKK γ 를 co-transfection 시켰을 때에도 NF- κ B의 활성은 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1A, lane 6). 이 결과로부터 core와 IKK γ 는 각각 NIK에 의한 NF- κ B의 활성화를 유의적인 수준으로 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 특히, core와 IKK γ 를 동시에 발현시켰을 경우에는 각각에 의한 NF- κ B의 활성 증가보다 2.5배 이상 활성이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1A, lane 7). 이 결과는 core에 의한 NF- κ B의 활성화가 IKK γ 를 경유하거나 IKK γ 와 상호협력적으로 일어남을 나타내는 것으로 해석된다. 한편, NF- κ B의 활성화는 세포질 내 NF- κ B의 저해제인 I κ B α 가 인산화된 후 ubiquitination을 거쳐 분해된 후 활성화됨이 알려져 있어 I κ B α 의 인산화와 분해가 NF- κ B의 활성화에

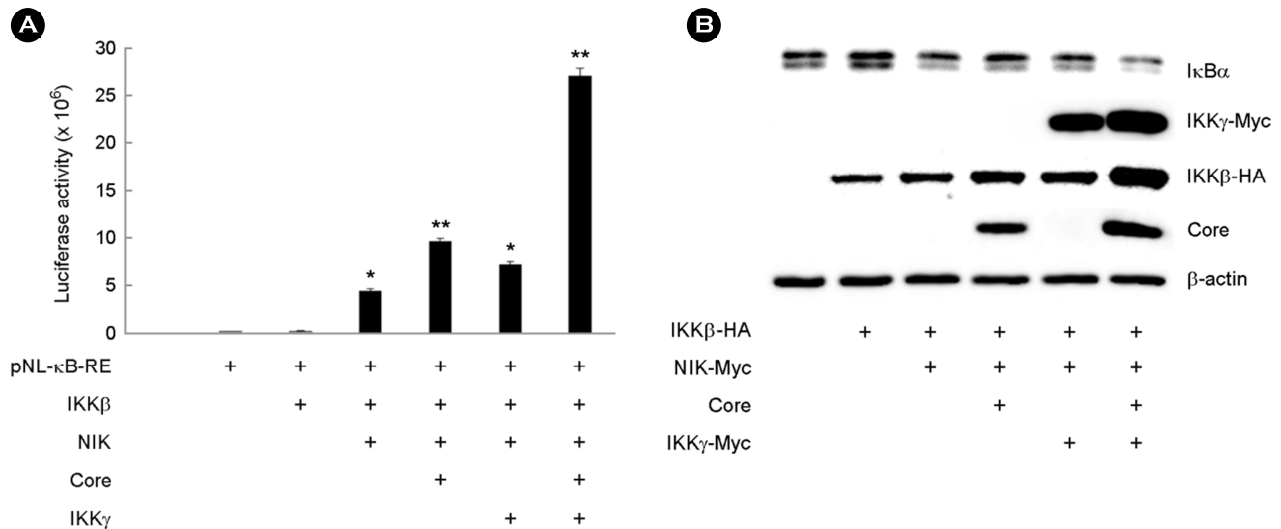


Figure 1. Activation of NF-κB by HCV core and IKKγ. (A) COS-7 cells were co-transfected with pNL-κB-RE reporter and each expression plasmid of IKKβ, NIK, HCV core, or IKKγ. Luciferase assays were performed 45 hr after transfection. (mean ± SD, n=3, **p*<0.05, ***p*<0.001). (B) COS-7 cells were co-transfected with indicated expression plasmids. Cells were harvested at 45 hr post-transfection and the cytoplasmic extracts were analyzed by Western blotting.

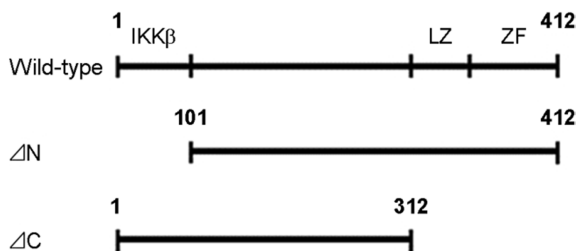


Figure 2. The structure of wild-type and N- terminal, C-terminal deletion mutants of mouse IKKγ. IKKβ binding domain at N-terminal and leucine zipper domain (LZ), zinc finger domain (ZF) at C-terminal are shown. The numbers indicate the number of amino acids.

필요함이 알려져 있다 (11, 13, 17). 그러므로 core와 IKKγ에 의한 NF-κB의 활성화가 IκBα의 인산화와 분해의 증가에 의한 것인지 검토하기 위해 COS-7 세포에 IKKβ, NIK, IKKγ의 발현 plasmid 및 core의 발현 plasmid를 co-transfection하고 45시간 후에 세포를 수거하여 Western blotting을 통해 세포내 IκBα의 인산화 및 분해 정도를 확인하였다. Fig. 1B에 나타난 바와 같이 IKKβ와 NIK이 함께 발현되었을 때 IKKβ가 활성화 되어 IκBα가 인산화 및 분해됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1B, lane 3). 또한 core와 IKKγ가 동시에 발현되었을 때에는 IκBα의 인산화 및 분해가 증가됨을 확인하였다(Fig. 1B, lane 6). 이 결과로부터 HCV core가 IKKγ와 상호작용하여 IκBα를 분해시킴으로써 NF-κB를 활성화시킨다는 것을 알 수 있었다.

HCV의 core 단백질에 의한 NF-κB의 활성화에서 IKKγ의 작용기전

HCV의 core에 의한 NF-κB의 활성화는 IKKγ에 의해 증가됨을 앞선 결과에서 알 수 있었다. HCV core에 의한 NF-κB의 활성화 과정에서 IKKγ의 작용기전을 검토하기 위하여 mouse IKKγ의 N-말단의 IKKβ 결합부위인 100개의 아미노산이 결손된 ΔN과 C-말단의 Leucine Zipper (LZ) 부위와 Zinc Finger (ZF) 부위를 포함하는 100개의 아미노산이 결손된 ΔC mutant를 사용하였다 (19) (Fig. 2). C-말단의 LZ와 ZF는 IKKγ들의 결합을 유도하며 고분자 복합체 형성에 필요한 부위이다 (20). pNL-κB-RE reporter plasmid와 IKKβ, NIK, HCV core, IKKγ-ΔN, IKKγ-ΔC의 발현 plasmid를 COS-7 세포에 co-transfection 시킨 후 NF-κB의 활성을 검토하였다. Fig. 3에 제시된 바와 같이 NIK

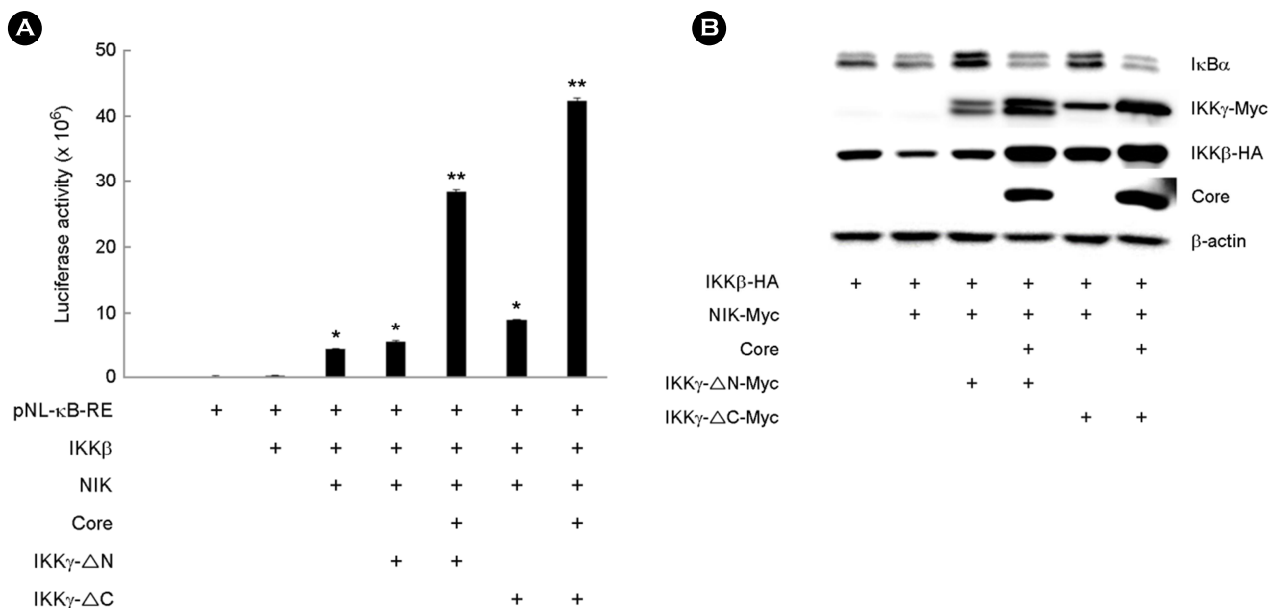


Figure 3. Activation of NF- κ B by HCV core and IKK γ mutants. (A) COS-7 cells were co-transfected with pNL- κ B-RE reporter and each expression plasmid of IKK β , NIK, HCV core or IKK γ mutant. Luciferase assay was performed at 45 hr post-transfection. (mean \pm SD, $n=3$, $*p<0.05$, $**p<0.001$). (B) COS-7 cells were co-transfected with expression plasmids as indicated. Cells were harvested at 45 hr post-transfection and the cytoplasmic extracts were analyzed by western blotting.

은 NF- κ B를 활성화 시켰고(Fig. 3A, lane 4) IKK γ - Δ N과 Δ C도 각각 NF- κ B의 활성을 유의적으로 증가시켰다(Fig. 3A, lane 5, 7). 또한 IKK γ - Δ N과 Δ C는 모두 HCV core에 의한 NF- κ B의 활성화를 더욱 증가시켜 wild type의 효과와 거의 동일하게 나타났다 (Fig. 3, lane 6, 8). 이 결과로부터 IKK γ 의 N말단에 의한 IKK γ 와 IKK β 의 결합 및 C-말단에 의한 IKK γ 의 고분자 형성은 core의 NF- κ B 활성화 작용에 관여하지 않음을 알 수 있었다. 아울러 HCV core와 IKK γ - Δ N과 Δ C에 의한 NF- κ B의 활성화가 I κ B α 의 인산화 및 분해의 증가에 의한 것인지 검토하기 위해 IKK β , NIK, HCV core, IKK γ - Δ N, Δ C의 발현 plasmid를 COS-7 세포에 co-transfection 하고 Western blotting을 수행하였다. Fig. 3B에 제시된 바와 같이 IKK γ - Δ N, IKK γ - Δ C는 모두 HCV core와 함께 co-transfection 되었을 때 I κ B α 의 분해를 현저하게 증가시켰다(Fig. 3B, lane 4, 6). 결과적으로 IKK γ - Δ N, Δ C는 wild type IKK γ 와 동일하게 HCV core와 상호작용하여 I κ B α 의 인산화 및 분해를 촉진함으로써 NF- κ B의 활성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었으며, Fig. 3B의 2번째 panel에 제시된 바와 같이, IKK γ 의 Δ N은 C-말단의 인산화 부위를 포함하므로 인산화된 것과 인산화 되지 않은 것으로 표현되는 2개의 band로 검출되었고, Δ C는 C-말단의 인산화 부위가 제거되어 단일 band로 검출되어 정상적으로 발현되었음을 알 수 있었다.

IKK β 의 mutant를 이용한 HCV core 및 IKK γ 의 작용기전 검토

HCV core와 IKK γ 에 의한 NF- κ B의 활성화가 NIK에 의한 활성화에 특이적으로 작용하는 것인지 알아보기 위해 IKK β 의 활성화형 mutant인 IKK β -EE를 이용하여 HCV core와 IKK γ 가 NF- κ B의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지 검토하였다. IKK β -EE는 IKK β 의 activation loop의 Ser177과 Ser181 부위를 glutamate로 치환시켜 NIK, MEKK 등 upstream kinase가 없어도 항상 활성화된 상태를 나타내는 IKK β 의 변이형이다 (21). COS-7 세포에 IKK β , IKK β -EE, HCV core, IKK γ 발현 plasmid와 pNL- κ B-RE report plasmid를 co-transfection 시킨 후 45시간 후에 세포를 수거하여 NF- κ B 활성화에 미치는 HCV core와 IKK γ 의 영향을 검토한 결과, Fig. 4A에 제시된 바와 같이 IKK β -EE는 NIK이 없어도 NF- κ B를 활성화시킴을 알 수 있었고(Fig. 4A, lane 4), Fig. 1A의 NIK에 의한 활성화의 경우와 마찬가지로 HCV core와 IKK γ 는 각각 IKK β -EE에 의한 NF- κ B의 활성화를 증가시켰고(Fig. 4A, lane 5, 6), HCV core와 IKK γ 를 동시에 발현시켰을 때 NF- κ B의 활성은 가장 크게 증가되었다(Fig. 4A, lane 7). 이 결과로부터 HCV core와 IKK γ 에 의한 NF- κ B 활성 증가는 NIK에 의한 NF- κ B의 활성화에만 특이적으로 작용하는 것이 아니라 IKK β 를 경유하는 NF- κ B의 활성화 경로 모두에 작용할 가능성이 높다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 IKK γ 의 deletion mutant인 IKK γ - Δ N과 Δ C에서도 동일하게 나타났으며(Fig. 4B), 이는 HCV core와 IKK γ 가 NIK 등의 upstream kinase에 작용하는 것이 아니라 IKK β 의 활성을 증가시킴으로써 IKK complex를 활성화하여 NF- κ B를 활성화시킨다는 것을 알 수 있었다.

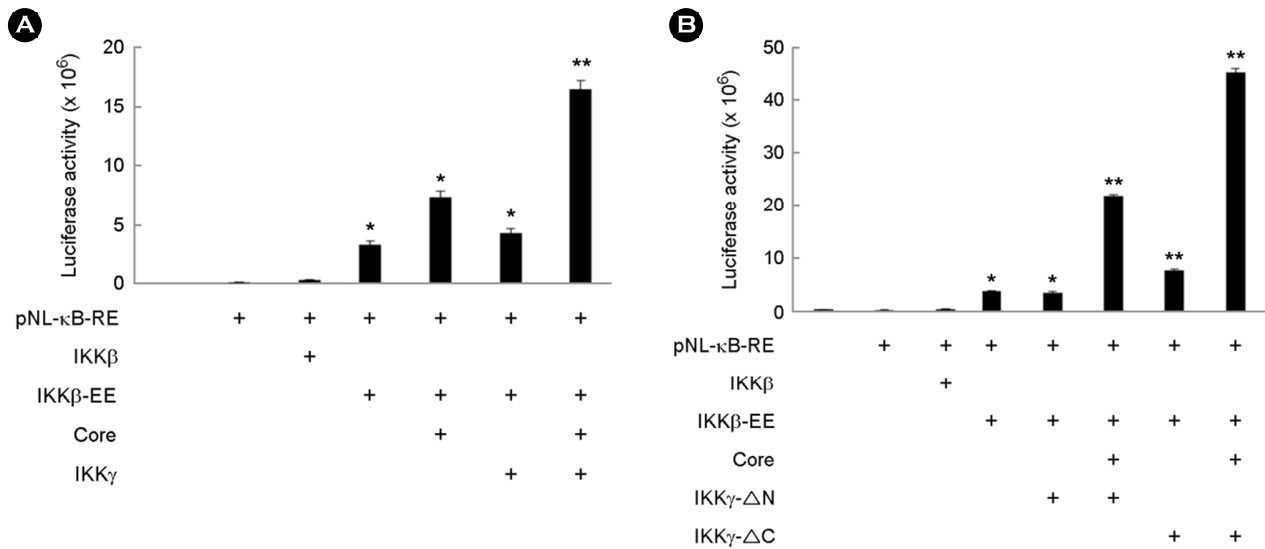


Figure 4. Effect of HCV core and IKK γ on the activation of NF- κ B. COS-7 cells were co-transfected with pNL- κ B-RE reporter and each expression plasmid of IKK β , IKK β -EE, HCV core, wild-type IKK γ , IKK γ - Δ N, or Δ C. Luciferase assay was performed at 45 hr post-transfection (mean \pm SD, n=3, * p <0.05, ** p <0.001).

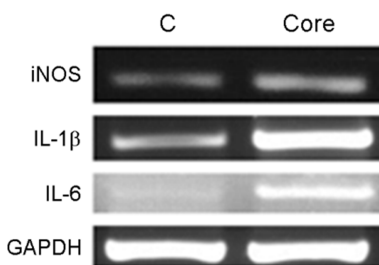


Figure 5. Effect of HCV core on the expression of inflammatory mediators. Raw 264.7 cells were transfected with empty vector (C) or HCV core-expression plasmid (core). Cells were harvested at 45 hr post-transfection and analyzed by RT-PCR. GAPDH was used as the internal control.

HCV core 단백질에 의한 염증유발인자의 발현 증가

NF- κ B는 염증을 유발하는 단백질의 발현을 증가시키는 대표적인 전사인자이다 (22). HCV의 core가 실제로 NF- κ B에 의해 생산되는 염증유발인자의 발현을 증가시키는지 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 HCV core를 transfection한 후 대표적인 NF- κ B의 target gene인 iNOS, IL-1 β , IL-6의 발현을 RT-PCR로 알아보았다. Fig. 5에 제시된 바와 같이 HCV core 발현 plasmid를 transfection한 세포에서는 iNOS, IL-1 β , IL-6 모두 mRNA level에서 발현이 증가되었음을 확인하였다. 이러한 결과로부터 HCV의 core가 NF- κ B 활성화를 통해 염증유발인자의 발현을 증가시켜 염증 발생의 원인으로 작용함을 알 수 있었다. IL-6는 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)를 활성화시키며, STAT3의 활성화는 간세포암 발생의 중요한 요인 중의 하나로 알려져 있으므로 (23) HCV core가 STAT3를 활성화시키는 작용을 하는지 검토하였다. HCV core의 발현 plasmid를 RAW264.7 세포에 transfection 한 후 STAT3의 인산화를 검토한 결과 Fig. 6A에 제시된 바와 같이 core 단백질의 발현에 의해 STAT3의 인산화가 증가하여 core가 STAT3를 활성화시킴을 알 수 있었다. 이 결과는 HCV core 단백질이 HCV에 의한 간세포암 발생의 원인으로 작용할 수 있음을 의미한다고 볼 수 있다. 한편, 생체 내 많은 신호전달회로는 상호 연관성(cross-talk)을 가지고 있으며 염증을 일으키는 pro-inflammatory pathway 중 하나인 p38 MAPK 회로는 NF- κ B와 상호작용하여 염증유발을 가중시키는 것으로 알려져 있다 (24). 그러므로 HCV core가 p38의 활성화에 관여하는지 검토하기 위해 Raw264.7 세포에 core 발현 plasmid를 transfection 한 후 p38의 인산화를 검토한 결과 Fig. 6B에 제시된 바와 같이 core의 발현은

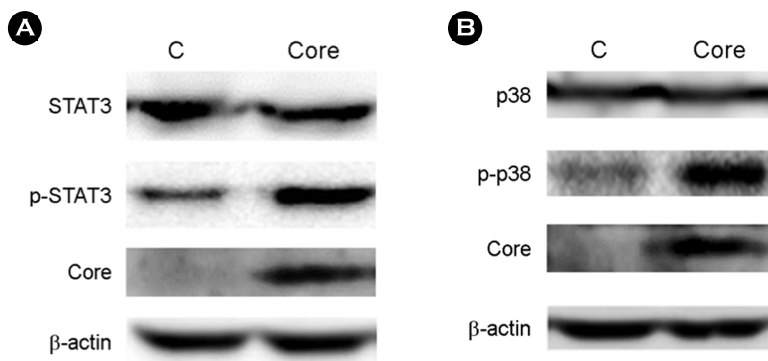


Figure 6. Effect of HCV core on the phosphorylation of signaling molecules in the proinflammatory pathway. Raw 264.7 cells were transfected with empty vector (C) or HCV core expression plasmid. The whole cell extracts were prepared at 45 hr post-transfection and analyzed by western blotting.

p38의 인산화를 증가시켜 p38을 활성화함을 알 수 있었다. 이 결과로부터 HCV core 단백질이 NF- κ B뿐 아니라 다양한 염증유발인자의 활성화에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

DISCUSSION

HCV는 간세포뿐 아니라 B-cell, T-cell, monocyte, macrophage 등 다양한 면역세포에서 증식하며 면역세포의 기능을 변화시킨다 (25, 26). HCV의 core 단백질은 감염세포에서 세포증식, 대사, 세포사멸에 영향을 미치며 간세포 암(hepatocellular carcinoma) 발생의 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다 (27~29). 그러나 아직 HCV core에 의한 숙주세포의 면역기능변화 및 발암에 관한 구체적인 기전은 알려져 있지 않다.

NF- κ B는 다양한 면역응답반응의 핵심전사인자로 알려져 있으며 다양한 pro-inflammatory cytokine의 분비가 NF- κ B의 활성화에 의해 일어난다 (30, 31). Pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 와 chemokine인 CCL2, CXCL8 등이 NF- κ B에 의해 발현되는 것으로 알려져 있다 (32). 또한 지속적인 NF- κ B의 활성화는 세포사멸을 억제하고 세포증식을 촉진하여 암을 유발하고 암 치료에 대한 내성을 일으키는 것으로 알려져 있다 (33, 34). 선행보고에 따르면 HCV의 core는 NF- κ B의 활성을 변화시키고, 이러한 core의 작용이 HCV 감염세포에서 염증을 유발하고 나아가 암을 일으킬 수 있다는 견해가 다수 제시되었다 (6~10). 그러나 아직 HCV core에 의한 NF- κ B의 활성조절 기전이 명확하게 제시되고 있지 않다.

이러한 관점에서 본 연구에서는 HCV core에 의한 NF- κ B의 활성조절 기전을 규명하고자 HCV core와 IKK γ 의 상호 연관성을 검토하였으며, HCV core는 IKK γ 를 경유하거나 IKK γ 와 상호협력적으로 NF- κ B를 활성화한다는 결론을 얻었다(Fig. 1, Fig. 3). 또한 core에 의한 NF- κ B의 활성화는 NF- κ B 신호전달 기전에서 NIK 등의 upstream kinase 활성화에 작용하는 것이 아니라 IKK β 의 활성을 증가시킴으로써 NF- κ B를 활성화한다는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). 또한 HCV core는 NF- κ B의 대표적인 target gene인 iNOS, IL-1 β , IL-6의 발현을 증가시켰으며(Fig. 5), 이러한 결과로부터 HCV의 core 단백질이 HCV 감염세포에서 염증을 유발하는 핵심단백질임을 확인할 수 있었다. 간암은 대표적인 염증성 암이며 HCV 감염환자의 약 60%가 만성간염으로 진행되고 그 중 20~30%에서 간암이 발생하는 것으로 볼 때, HCV core 단백질이 염증뿐 아니라 간암의 원인으로 작용할 가능성이 높음을 추측할 수 있다. 실제로 core 단백질은 간암 발생의 중요한 원인으로 알려져 있는 STAT3를 활성화시키는 것으로 본 연구에서 나타났으며(Fig. 6A) (23), NF- κ B에 의한 염증을 약화시키는 것으로 알려져 있는 p38 MAPK를 활성화시키는 것으로 나타나(Fig. 6B) (24) HCV의 만성 감염환자에서 core 단백질은 반복된 염증유발 뿐 아니라 발암 단백질의 활성을 촉진시켜 간암을 유발할 가능성이 있음을 알 수 있었다. 그러나 HCV core 단백질에 의한 발암의 기전규명은 아직 거의 알려져 있지 않기 때문에 core 단백질과 발암관련 신호전달회로와의 연관성 연구는 앞으로 진행되어야 할 중요 연구과제로 남아 있다.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by Changwon National University in 2017-2018.

REFERENCES

- 1) Tanaka K, Hirohata T, Koga S, Sugimachi K, Kanematsu T, Ohryohji F, *et al.* Hepatitis C and hepatitis B in the etiology of hepatocellular carcinoma in the Japanese population. *Cancer Res* 1991;51:2842-7.
- 2) Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993;67:1385-95.
- 3) Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5547-51.
- 4) Mizushima H, Hijikata M, Tanji Y, Kimura K, Shimotohno K. Analysis of N-terminal processing of hepatitis C virus nonstructural protein 2. *J Virol* 1994;68:2731-4.
- 5) Shrivastava A, Manna SK, Ray R, Aggarwal BB. Ectopic expression of hepatitis C virus core protein differentially regulates nuclear transcription factors. *J Virol* 1998;72:9722-8.
- 6) Yoshida H, Kato N, Shiratori Y, Otsuka M, Maeda S, Kato J, *et al.* Hepatitis C virus core protein activates nuclear factor κ B-dependent signaling through tumor necrosis factor receptor-associated factor. *J Biol Chem* 2001;276:16399-405.
- 7) Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF- κ B activation. *J Virol* 1999;73:4713-20.
- 8) Zhu N, Ware CF, Lai MM. Hepatitis C virus core protein enhances FADD-mediated apoptosis and suppresses TRADD signaling of tumor necrosis factor receptor. *Virology* 2001;283:178-87.
- 9) Park J, Kang W, Ryu SW, Kim WI, Chang DY, Lee DH, *et al.* Hepatitis C virus infection enhances TNF α -induced cell death via suppression of NF- κ B. *Hepatology* 2012;56:831-40.
- 10) Ray RB, Meyer K, Ray R. Suppression of apoptotic cell death by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996;226:176-82.
- 11) Ghosh G, Wang VY, Huang DB, Fusco A. NF- κ B regulation: lessons from structures. *Immunol Rev* 2012;246:36-58.
- 12) Hayden MS, Ghosh S. Shared principles in NF- κ B signaling. *Cell* 2008;132:344-62.
- 13) Oeckinghaus A, Hayden MS, Ghosh S. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nat Immunol* 2011;12:695-708.
- 14) Ghosh S, Febin Prabhu Dass J. Non-canonical pathway network modelling and ubiquitination site prediction through homology modelling of NF- κ B. *Gene* 2016;581:48-56.
- 15) Hinz M, Arslan SC, Scheidereit C. It takes two to tango: I κ Bs, the multifunctional partners of NF- κ B. *Immunol Rev* 2012; 246:59-76.

- 16) Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res* 2011;21:103-15.
- 17) Mauro C, Pacifico F, Lavorgna A, Mellone S, Iannetti A, Acquaviva R, *et al.* ABIN-1 binds to NEMO/IKK γ and co-operates with A20 in inhibiting NF- κ B. *J Biol Chem* 2006;281:18482-8.
- 18) Yamamoto Y, Kim DW, Kwak YT, Parajapati S, Verma U, Gaynor RB. IKK γ /NEMO facilitates the recruitment of the I κ B proteins into the I κ B kinase complex. *J Biol Chem* 2001;276:36327-36.
- 19) Kwon WJ, Kim SH, Park YO, Cho M, Kang CD, Lee G, *et al.* IKK γ inhibits activation of NF- κ B by NIK. *Mol cells* 2004;18:200-6.
- 20) Li XH, Fang X, Gaynor RB. Role of Ikk γ /NEMO in assembly of the I κ B kinase complex. *J Biol Chem* 2001;276:4494-500.
- 21) Mercurio F, Zhu H, Murray BW, Shevchenko A, Bennett BL, Li J, *et al.* Ikk-1 and Ikk-2: Cytokine-activated I κ B kinase essential for NF- κ B activation. *Science* 1997;278:860-6.
- 22) Tang H, Chen H, Jia Y, Liu X, Han Z, Wang A, *et al.* Effect of inhibitors of endocytosis and NF- κ B signal pathway on folate-conjugated nanoparticle endocytosis by rat Kupffer cells. *Int J Nanomedicine* 2017;12:6937-47.
- 23) He G, Karin M. NF- κ B and STAT3 - key players in liver inflammation and cancer. *Cell Res* 2011;21:159-68.
- 24) Craig R, Larkin A, Mingo AM, Thuermer DJ, Andrews C, McDonough PM, *et al.* p38 MAPK and NF- κ B collaborate to induce interleukin-6 gene expression and release. *J Biol Chem* 2000;275:23814-24.
- 25) Bouffard P, Hayashi PH, Acevedo R, Levy N, Zeldis JB. Hepatitis C virus is detected in a monocyte/macrophage subpopulation of peripheral blood mononuclear cells of infected patients. *J Infect Dis* 1992;166:1276-80.
- 26) Heydtmann M, Adams DH. Chemokines in the immunopathogenesis of hepatitis C infection. *Hepatology* 2009;49:676-88.
- 27) Saito K, Meyer K, Warner R, Basu A, Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein inhibits tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis by a protective effect involving cellular FLICE inhibitory protein. *J virol* 2006;80:4372-9.
- 28) McLauchlan J. Properties of the hepatitis C virus core protein: a structural protein that modulates cellular processes. *J viral hepat* 2000;7:2-14.
- 29) Bühler S, Bartenschlager R. Promotion of hepatocellular carcinoma by hepatitis C virus. *Dig Dis* 2012;30:445-52.
- 30) Hayden MS, Ghosh S. NF- κ B in immunology. *Cell Res* 2011;21:223-44.
- 31) Xing Y, Wang X, Jameson SC, Hogquist KA. Late stage of T cell maturation in the thymus involve NF- κ B and tonic type I interferon signaling. *Nat Immunol* 2016;17:565-73.
- 32) Colotta F, Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A. Cancer-related inflammation, the seventh hallmark of cancer: Links to genetic instability. *Carcinogenesis* 2009;30:1073-81.
- 33) Bours V, Bentires-Alj M, Hellin AC, Viatour P, Robe P, Delhalle S, *et al.* Nuclear factor-kappa B, cancer, and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 60:1085-9.
- 34) Wu JT, Kral JG. The NF-kappaB/IkappaB signaling system: A molecular target in breast cancer therapy. *J Surg Res* 2005; 123:158-69.