

폐상피세포에서 Dexamethasone에 의한 NF- κ B Transactivation 억제기전에 관한 연구

단국대학교 의과대학 내과학교실, 생화학교실*

이계영, 김윤섭, 고미혜, 박재석, 지영구, 김건열, 곽상준*

= Abstract =

Inhibitory Mechanism on NF- κ B Transactivation by Dexamethasone in Pulmonary Epithelial Cells

Kye Young Lee, M.D., Yoon Seop Kim, M.D., Mi Hye Ko, M.D., Jae Seok Park, M.D.,
Young Koo Jee, M.D., Keun Youl Kim, M.D., Sahng-June Kwak M.D.*

Department of Internal Medicine and Department of Biochemistry,*

Dankook University Medical School, Chonan, Korea

Glucocorticoid receptor (GR) functions as a suppressor of inflammation by inhibiting the expression of many cytokine genes activated by NF- κ B. The goal of this study is to investigate the mechanism by which GR repress NF- κ B activation in lung epithelial cells. We used A549 and BEAS-2B lung epithelial cell lines. Using IgG κ -NF- κ B luciferase reporter gene construct, we found that dexamethasone significantly suppressed TNF- α -induced NF- κ B activation and the overexpression of GR showed dose-dependent reduction of TNF- α -induced NF- κ B activity in both cell lines. However, DNA binding of NF- κ B induced by TNF- α in electromobility shift assay was not inhibited by dexamethasone. Super shift assay with anti-p65 antibody demonstrated the existence of p65 in NF- κ B complex induced by TNF- α . Western blot showed that I κ B α degradation induced by TNF- α was not affected by dexamethasone and I κ B κ was not induced by dexamethasone, neither. To evaluate p65 specific transactivation, we adopted co-transfection study of Gal4-p65TA1 or TA2 fusion protein expression system together with 5xGal4-luciferase vector. Co-transfection of GR with Gal4-p65TA1 or TA2 re-

* 본 연구 논문은 1999년도 결핵 및 호흡기학회 학술연구비의 지원으로 이루어졌음.

Address for correspondence :

Kye Young, Lee, M.D.

Department of Internal Medicine, Dankook University Hospital

16-5, Anseo-dong, Chonan, Korea

Phone : 041-550-3916 Fax : 041-556-3256 E-mail : kyleemd@anse0.dankook.ac.kr

pressed luciferase activity profoundly to the level of 10-20% of p65TA1- or TA2-induced transcriptional activity. And this transrepression effect was abolished by co-transfection of CBP or SRC-1 expression vectors. These results suggest that GR-mediated transrepression of NF- κ B in lung epithelial cells is through competing for binding to limiting amounts of transcriptional coactivators, CBP or SRC-1. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 2000, 48 : 682-698)

Key words : NF-kappa B, Glucocorticoid receptor, 폐상피세포, transactivation, p65

서 론

부신피질호르몬(glucocorticoids)은 호흡기질환에서 가장 널리 사용되는 면역억제제(immunosuppressive agents)이자 항염증제(anti-inflammatory agents)로서 장기간 사용 시 빈번히 발생하는 전신 부작용에도 불구하고 현재 알려진 약제 중 임상적 효용성이 가장 큰 제제이다. 특히 최근 천식의 병태생리에 있어서 기도염증의 중요성이 부각됨에 따라 만성 천식 환자에서 부신피질호르몬 흡입제의 사용이 치료의 근간을 점하게 되면서 그 임상적 중요성이 배가되고 있는 실정이다¹⁾. 이러한 임상적 중요성에도 불구하고 부신피질호르몬의 작용기전에 대해서는 불과 수년 전까지만 해도 명확히 밝혀져 있지 않은 상황이었는데, 근자에 이르러 cytokines, chemokines, adhesion molecules 등의 다양한 염증매개물질 유전자들의 전사(transcription)에 부신피질호르몬이 영향을 미침으로써 그 약리작용을 나타내는 것으로 밝혀져 가고 있다²⁾.

부신피질호르몬은 자유롭게 세포막을 통과하여 molecular chaperone으로 작용하는 두 분자의 90 kDa heat shock protein (hsp90)와 한 분자의 59 kDa immunophilin protein 등에 의해 세포질내에 비활성 상태로 존재하는 glucocorticoid receptor (GR)에 결합하게 된다³⁾. GR은 여러 기능성 도메인을 갖는 steroid hormone receptor family에 속하는 수용체 단백질로서 ligand 결합과 동시에 단백질구조의 변화가 발생하여 hsp90가 해리되고 핵이동신호(nuclear localization signal)가 노출되어 활성화된 GR이 핵으

로 이동하여 전사적 조절에 참여하게 된다. 활성화된 GR은 이중체를 형성하여 부신피질호르몬에 반응하는 유전자의 5'-upstream promoter 부위의 glucocorticoid response elements (GRE)를 인식하여 DNA에 결합함으로써 전사를 유도하거나 억제하게 되는데 +GRE 공통 염기서열은 GGTACAnnnTGTTCT로 알려져 있고 전사억제를 유도하는 음성 nGRE은 보다 심한 염기서열의 변이를 보인다⁴⁾. GRE를 통한 이러한 직접적 방식의 전사조절은 부신피질호르몬이 갖는 항염증작용의 합목적성을 생각해 볼 때 +GRE를 갖는 항염증 유전자 (anti-inflammatory genes)의 전사 증가를 유도하거나 nGRE를 갖는 염증매개성 유전자의 전사 억제를 상정해 볼 수 있는데 nGRE는 pro-opiomelanocortin gene 등의 소수의 유전자에서만 확인이 되었을 뿐 실질적인 GRE 의존성 전사조절은 lipocortin-1, β -adrenoreceptor, Clara cell protein (CC10), IL-1 receptor antagonist, IL-10 등의 항염증성 유전자들의 전사를 증가 시킴으로써 이루어진다⁵⁾. NF- κ B 활성화를 조절하는 억제 단백질인 I κ B α 도 부신피질호르몬에 의해 그 전사와 합성이 증가되는 유전자이기는 하나 I κ B α 유전자에서 GRE 공통 염기서열이 발견된 바는 없다.

한편 이러한 염증억제성 유전자들의 전사증가 만으로는 부신피질호르몬의 광범위하고 강력한 항염증효과를 포괄적으로 설명할 수 없다. 실제로 부신피질호르몬은 TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-6, IL-11, GM-CSF 등의 cytokines과 IL-8, RANTES, MCP-1, MCP-3, MCP-4, MIP-1 α , eotaxin 등의 chemokines 유전자들의 전사를 억제하는 것으로 알려

져 있다. 그러나 이들 대부분의 cytokines 및 chemokines 유전자들의 promoter에는 전사억제물 초래하는 nGRE 공통 염기서열을 발견할 수 없어서 이는 GRE를 통한 직접적인 전사조절이 아니라, 염증을 유발하는 cytokines과 chemokines 유전자들의 전사조절에 관여하는 다른 전사인자들(transcriptional factors)과 GR이 상호작용 함으로써 초래되는 결과로 생각되어지고 있다. 실제로 GR은 구조적으로 leucine zipper를 갖고 있는데 이를 통해 다른 전사인자들과 결합하여 상호 작용하는 것으로 밝혀져 있으며 이러한 방식이 항염증반응을 나타내는데 주요 기전으로 작용하는 것으로 평가되고 있다^{2,6)}. GR과 상호작용하는 것으로 알려져 있는 전사인자들로는 NF- κ B, AP-1, CREB, OTF-1 그리고 STAT5등이 알려져 있다⁷⁾. 이 중에서 항염증작용과 관련되어 가장 주목 받는 것이 NF- κ B이다.

NF- κ B는 원래 B 세포에서 immunoglobulin kappa chain 유전자의 발현 조절에 관여하는 역할이 확인되면서 명명된 전사인자로서 p50 (NF κ B1)와 p65 (RelA)의 이형이중체 (heterodimer)가 표준형으로 되어 있으며 이 외에 p52 (NF κ B2), RelB, c-Rel등의 subunit이 존재하며 이들간의 여러 다양한 조합이 가능하다. NF- κ B는 면역 및 염증 유발에 관여하는 가장 중요한 전사인자로서 이러한 합목적성에 부합하기 위해 독특한 활성화기전을 갖고 있다. 즉 미리 합성되어 있는 NF- κ B가 세포질내에 I κ B라는 억제 단백질에 의해 억류되어 있다가 활성화 자극이 발생하면 I κ B가 인산화 (phosphorylation)되면서 ubiquitin-proteasome 경로에 의해 분해 (degradation)되는데 이와 동시에 p50-p65 이중체의 NF- κ B가 유리되어 핵으로 이동하여 κ B 특이적 염기서열 부위의 DNA에 결합함으로써 κ B 의존성 유전자들의 전사를 유도하는 것으로 밝혀져 있다. NF- κ B를 활성화 시키는 자극으로는 TNF- α , IL-1 β , PMA, reactive oxygen metabolite등이 대표적이며 IL-2, IL-6, IL-8, iNOS, GM-CSF, COX-2등 면역 및 염증 반응에 관여하는 대부분의 유전자들이 NF- κ B에 의해 활성화되는 것으로 알려져 있다. 그리고 이들 유전

자의 대부분이 부신피질호르몬에 의해 억제되므로 NF- κ B의 활성화 억제가 항염증효과를 유발하는 가장 중요한 기전으로 여겨지고 있다.

부신피질호르몬이 NF- κ B를 억제하는 기전으로 처음에는 억제단백질인 I κ B α 의 전사유도에 의해 이루어진다고 알려졌으나^{8,9)} 이는 T 세포와 단핵구 등 면역 세포와 HeLa 세포와 같은 특정세포에서만 작용하는 것으로 되어 있으며 이후에 혈관내피세포를 대상으로 한 연구에서는 부신피질호르몬에 의한 NF- κ B 억제가 I κ B α 유도와 관련이 없다고 밝히고 있다¹⁰⁾. 실제로 면역세포를 제외한 대부분의 세포들에서는 위에서 언급한 GR과 NF- κ B간의 단백질-단백질 상호작용에 의해 NF- κ B 활성화 억제가 유도된다고 보고되고 있다^{11,12)}.

폐장의 상피세포가 단순히 거주세포로서 염증세포들의 공격에 대한 장벽의 기능만을 담당하는 것이 아니라 능동적으로 염증반응에 참여한다는 사실은 이미 잘 알려진 사실이다. 폐상피세포는 TNF- α , IL-1 β , IL-6등 염증 매개성 cytokines은 물론 IL-8, RANTES등의 chemokines 그리고 prostaglandin E2, endothelin과 같은 염증매개물질들을 분비하며 염증반응에 참여함은 물론 GM-CSF등을 분비하여 염증세포를 동원 함으로써 염증반응을 증폭시키는 기능을 담당하기도 한다¹³⁾. 뿐만 아니라 폐상피세포는 ICAM-1과 같은 유착분자들을 표현하여 염증세포들의 유착과 이동에도 중요한 역할을 담당하기도 한다. 따라서 면역세포에서와 마찬가지로 부신피질호르몬의 폐상피세포에서의 염증억제효과는 임상적으로 매우 중요한 의미를 내포하고 있으며 상피세포들이 차지하는 표면적의 크기와 기관지천식에서 흡입제 사용의 빈도와 중요성에 비추어 볼 때 폐상피세포에서 부신피질호르몬에 의한 항염증 기전을 연구하는 것은 매우 뜻 있는 일이라 생각되며 그 중에서도 염증반응의 핵심이 되는 NF- κ B 활성화의 억제기전을 밝히는 것은 부신피질호르몬제가 갖는 가장 큰 문제점인 전신 부작용을 개선하고 보다 선택적으로 작용하는 약물의 개발에 중요한 기초자료를 제공하는 효과를 가져올 것이라 생각된다.

폐상피세포를 대상으로 한 부신피질호르몬의 NF- κ B 활성억제의 분자적 기전을 연구한 논문은 그리 많지 않은 실정으로 I κ B α 전사유도와 전사인자들 간의 상호작용 두 가지 기전 모두가 관여한다는 보고와¹⁴⁾ I κ B α 경로는 관련이 없이 단백질간의 상호작용에 의해 NF- κ B 활성이 억제된다는 보고가¹⁵⁾ 있을 뿐 그 구체적인 분자적 기전에 대한 명확한 해답은 아직 얻지 못하고 있다. 이에 본 연구자는 폐포상피세포주인 A549 세포주와 기도상피세포주인 BEAS-2B세포주를 대상으로 TNF- α 에 의한 NF- κ B 활성유도에 부신피질호르몬의 대표적 합성유도체인 dexamethasone이 어떠한 영향을 미치는지, 그리고 그 활성화된 수용체인 GR이 NF- κ B transactivation을 어떻게 억제하는가에 대한 분자적 기전의 해답을 얻음으로써 전신부작용은 개선하고 폐장에 특이적인 항염증효과를 갖는 새로운 부신피질호르몬제의 유도체를 개발하기 위한 기초 자료로 활용하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

연구 방법

1. 세포주 및 시약

A549 (Type II pneumocyte) 세포주와 BEAS-2B (transformed bronchial epithelial cell)를 RPMI 1640 (supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 U/ml streptomycin) 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. TNF- α 는 R&D System (Minneapolis, MN)에서 구입하였고 dexamethasone과 PMA는 Sigma(St. Louis, MO)사에서 구입하였다.

2. Plasmids 및 유전자 주입

NF- κ B 의존성 전사활성을 평가하기 위하여 luciferase reporter gene assay를 이용하였다. 이를 위해 NF- κ B 의존성 유전자 중 전형인 IgG κ chain 유전자의 NF- κ B binding site인 IgG κ -NF- κ B site (se-

quence 5'-GGGGACTTTC-3') oligonucleotide가 minimal IL-8 promoter (position -67 to +44)의 상류 (upstream)에 위치하도록 구축된 IgG κ -NF- κ B luciferase reporter gene construct를 이용하였고 이는 미국 스탠포드대학의 Dr. Peter Kao로부터 제공받았다¹⁶⁻¹⁸⁾ (Fig. 1). NF- κ B 의존성 luciferase 발현여부의 특이성을 확인하기 위하여 NF- κ B 결합 부위가 결손된 min-IL-8-luciferase construct를 대조 plasmid로 이용하였고 lipofectamin-plus (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)를 이용하여 일시적 유전자 주입과 TNF- α 와 PMA 자극에 대한 luciferase assay로 NF- κ B 특이적 전사활성을 확인하였다. 안정적으로 IgG κ -NF- κ B luciferase 유전자를 발현하는 A549 세포주와 BEAS-2B 세포주를 획득하기 위하여 Lipofectamine-plus (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD)를 이용하여 유전자 주입을 시행한 후 G418 400-600 μ g/ml 농도하에서 배양하여 내성 세포클론을 얻었다.

NF- κ B p65의 transactivation 연구를 위해서는 p65 특이적 전사활성을 반영하는 Gal4-p65 fusion protein expression vector를 이용하였다. p65의 transactivation기능은 C-종말부위 (아미노산 286-551)에 존재하며 여러 연구에서 p65의 transactivating domain과 yeast 전사인자 Gal4 DNA-binding domain을 결합합성 하면 Gal4 binding sites를 갖는 reporter gene을 활성화시키는 것으로 보고하고 있다^{19, 20)}. p65 transactivating domain은 TA1 (아미노산 521-551)과 TA2 (아미노산 286-521)로 구성되어 있는데 TA1은 통상적 활성을 보이거나 TA2는 활성에 PMA 자극을 필요로 한다. Gal4, Gal4-p65TA1, Gal4-p65TA2 발현 vector와 5xGal4-luciferase reporter gene construct는 미국 Stanford 대학 Dr. Glenn D Rosen으로부터 제공받았다.

GR 발현 vector와 전사 협동활성인자(transcriptional coactivator)인 CREB-binding protein (CBP)와 steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) 발현 vector는 (각각 pCMV/GR, pRc/RSV-

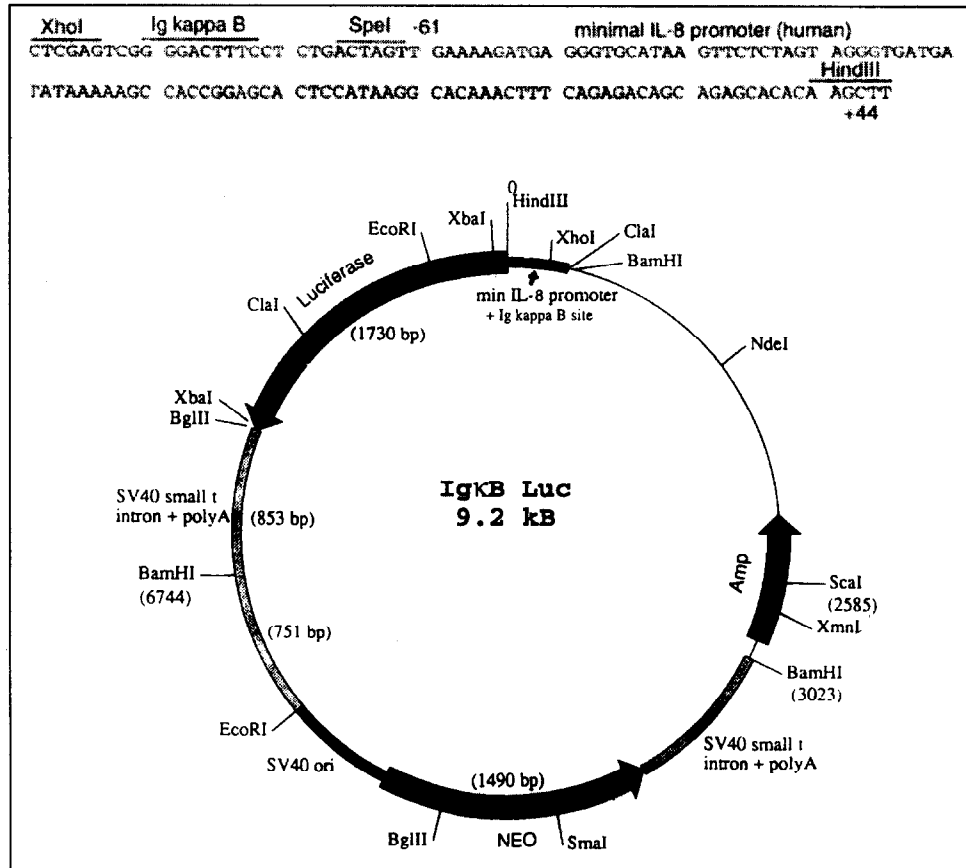


Fig. 1. The Schematic diagram of IgG κ -NF- κ B-luciferase reporter gene construct.

mCBP, pcDNA3-hSRC-1A) 전남대학교 이재운 박사로부터 제공받았다.

3. Luciferase Assay

해당 세포주를 실험 계획에 따라 24 well 배양용기에 배양한 후 정해진 시점에 배양액을 제거하고 PBS로 1회 세척한 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 harvest한 후 섭씨 4도에서 10분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 세포 단백질을 얻었다. TNF- α (10 ng/ml)와 PMA (100 ng/ml)에 의해서는 6시간 자극 후 단백질을 수확하

였다. Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 단백 농도를 측정한 후 20 μ g의 단백질을 luciferase assay mix [25 mM glycylglycine, 15 mM MgSO₄, 1 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 5 mM ATP and 1 mM D-luciferin (Pharmingen International)]에 첨가한 후 TD-20/20 Luminometer (Turner Design, Sunnyvale, CA) 20초간 luminescence를 3회 반복 측정하였다.

4. Electromobility shift assay (EMSA)

각 세포주를 100 mm dish에서 80-90%의 confl-

uency되게 배양한 후 (1) 무처리 (2) dexamethasone $1\mu\text{M}$ 13시간 (3) TNF- α (10 ng/ml) 1시간 (4) dexamethasone 전처리 후 TNF- α 1시간으로 각각 처리한 후 Trypsin/EDTA로 harvest 하였다. $100\mu\text{l}$ Buffer A (10 mM HEPES (pH 7.9), 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.2 % NP-40 with protease inhibitors)를 첨가한 후 25 gauge 주사바늘로 5-6회 통과시켜 세포막을 파괴시키고 섭씨 4도에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 세포핵 pellet을 얻은 후, $100\mu\text{l}$ Buffer C (20 mM HEPES (pH 7.9), 25% glycerol, 0.42 M NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA plus protease inhibitors)를 첨가하여 핵막을 파괴시키고 4℃에서 30분간 stirring하였다. 4℃에서 15분간 14,000 rpm으로 원심분리하여 chromatin을 pellet시켜 핵추출(nuclear extraction) 성분을 얻은 후 4℃에서 Buffer D (20 mM HEPES (pH 7.9), 20% glycerol, 100 mM KCl, 0.2 mM EDTA with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and 1 mM dithiothreitol (DTT))로 6시간 투석하여 핵단백을 획득한 후 Bradford assay로 단백질 농도를 측정하였다.

EMSA는 추출된 핵단백 $7.5\mu\text{g}$ 을 $1\mu\text{g}$ 의 poly(dI-dC) : poly(dI : dC)와 2.5 pg의 [$^{32}\text{-}\alpha\text{P}$]-labeled oligonucleotide probe (1×10^5 cpm)이 포함된 $20\mu\text{l}$ 의 binding buffer (25 mM HEPES (pH 7.6), 0.1 mM EDTA, 10 % glycerol, 50 mM KCl, 0.05 mM DTT)에 첨가하여 4℃에서 30분간 반응시킨 후 $0.5\times$ Tris-Borate EDTA (pH 8.3) buffer에서 4% nondenaturing polyacrylamide gel을 전기영동하여 단백질-DNA 복합체를 분리하여 autoradiography로 결과를 얻었다. 사용된 oligonucleotide probe는 IgG kappa chain 유전자의 5 flanking 부위의 NF- κ B site (5 tcgaGTCGGG-GACTTTCCTCTGA)를 사용하였고 이에 대한 상보적 strand를 5 쪽에 네개의 염기 overhang을 갖도록 고안하여 annealing한 후 [α - ^{32}P] dCTP (Amersham, Arlington Heights, IL)와 non-ra-

dioactive dA/T/GTPs, 그리고 Klenow DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA)를 이용하여 제조하였다. Cold competition을 위해서는 250 pg (100x)의 cold oligonucleotide probe를 radio-labeled probe와 반응시키기 5분전에 먼저 반응시켰다.

Cold competition과 항체 방해에 의한 super shift를 위해서는 250 pg (100x)의 cold oligonucleotide probe와 NF- κ B의 p65 subunit에 대한 rabbit polyclonal 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 radio-labeled probe와 반응시키기 5분전에 먼저 반응시켰다.

5. Western blot

A549세포주에서 TNF- α 에 의한 I κ B α 의 분해에 dexamethasone이 미치는 영향을 평가하기 위하여 Western blot을 시행하였다. 각 세포주를 6개의 60 mm 배양접시에서 80-90%의 confluency가 되도록 배양한 후 TNF- α 10 ng/ml의 농도로 각각 0, 3, 10, 30, 60, 90분 처리한 후 Trypsin/EDTA로 harvest하여 lysis 용액 (1% SDS, 1 mM sodium vanadate, 10 mM Tris-HCl pH 7.4)으로 whole cell lysate를 획득한 후 5분간 4℃ 14,000 rpm에서 원심분리하여 단백질추출을 얻는다. Bradford assay로 단백질농도를 측정하고 3분간 가열하여 denaturation시킨 후 SDS-PAGE로 (12% gel) 전기영동하여 nitrocellulose에 transfer한다. Blot을 blocking buffer (4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 incubation한 후 rabbit polyclonal I κ B α 항체 (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA)를 4% milk, 1% BSA, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20 등을 포함한 4% milk 용액에 1 : 1000 희석하여 1시간동안 실온에서 incubation 하고 10분씩 3회 세척한 후 horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG 1 : 5000 희석된 blocking buffer로 2차항체 반응을 1시간 거

친 후 역시 3회 세척한 후 ECL(Amersham, Arlington Heights, IL) 검출하였다.

결 과

1. NF- κ B에 특이적인 전사활성을 평가할 수 있는 안정된 A549 및 BEAS-2B IgG κ NF- κ B luciferase (이하 A549 및 BEAS-2B IgG κ B-luc) 세포주 획득

폐상피세포에서의 외부자극에 의한 NF- κ B 활성의 변화를 평가하기 위하여 A549 및 BEAS-2B 폐상피세포에 상기한 IgG κ -NF- κ B luciferase construct를 lipofectamine-plus (Gibco-BRL) 방법으로 유전자주입을 시행한 후 G418 400-600 μ g/ml의 조건하에서 선택배양하여 후 내성 clone을 pooling하여 A549 및 BEAS-2B IgG κ B-luc 세포주를 획득하였다. NF- κ B 특이성을 확인하기 위하여 IgG κ -NF- κ B site가 없고 minimal IL-8 promoter만 존재하는 control vector로 하여 같은 방법으로 A549 및 BEAS-2B minimal IL-8 luciferase (이하 A549 min-IL-8-luc)를 획득하여 대조세포주로 사용하였다. 상기에서 획득한 세포주의 NF- κ B 의존성 lucif-

erase 발현여부의 적정성을 확인하기 위하여 A549 IgG κ B-luc 세포주와 대조세포주인 A549 min-IL-8-luc 세포주를 대표적인 NF- κ B 자극물질인 TNF- α (10 ng/ml)와 PMA (20 ng/ml)로 6시간 자극한 후 luciferase assay를 시행하였다. 그 결과 A549 IgG κ B-luc 세포주에서는 TNF- α 자극에 의해서 4.5 ± 0.6 배, PMA 자극에 의해서 5.8 ± 0.7 배의 luciferase 활성 증가를 보인 반면 대조세포주인 A549 min-IL-8-luc 세포주에서는 TNF- α 자극에 의해 1.2 ± 0.1 배, PMA 자극에 의해서는 1.3 ± 0.1 배의 증가를 보였고, BEAS-2B IgG κ B-luc 세포주에서는 TNF- α 자극에 의해서 4.5 ± 0.6 배, PMA 자극에 의해서 5.8 ± 0.7 배의 luciferase 활성 증가를 보인 반면 대조세포주인 BEAS-2B min-IL-8-luc 세포주에서는 TNF- α 자극에 의해 1.2 ± 0.1 배, PMA 자극에 의해서는 1.3 ± 0.1 배의 증가를 보여 IgG κ -NF- κ B에 특이적인 전사활성 여부를 평가할 수 있는 안정된 세포주를 획득하였음을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

2. TNF- α 자극에 의한 NF- κ B luciferase 활성 증가에 대한 dexamethasone의 억제 효과

폐상피세포에서 TNF- α 자극에 의한 NF- κ B 의존

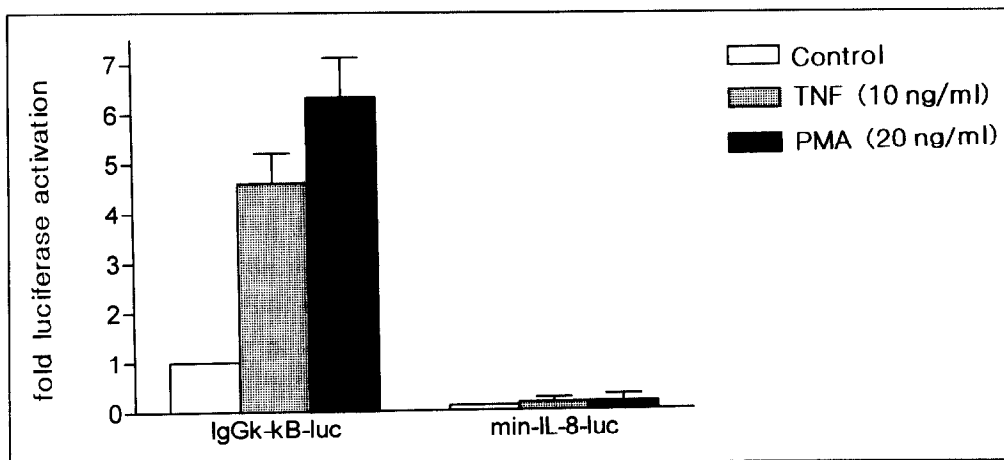


Fig. 2. Stable A549-IgG κ -NF- κ B-luc cell line shows specific NF- κ B-dependent transcriptional activation induced by TNF- α and PMA.

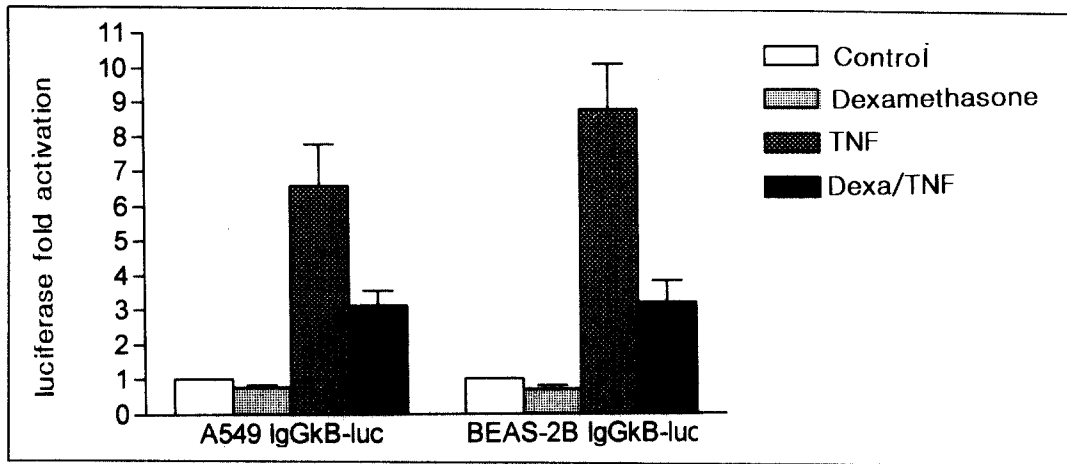


Fig. 3. Dexamethasone inhibits TNF- α -induced NF- κ B activation in A549 and BEAS-2B lung epithelial cells. A549 and BEAS-2B cells which stably expressed an IgG κ -NF- κ B-luciferase reporter gene construct were pretreated with dexamethasone 1 μ M for 12 hr followed by the addition of TNF- α 10 ng/ml for 6 hour. The cells were then harvested for analysis of luciferase activity. Data presented are representative of at least three independent experiments.

성 전사활성에 대한 dexamethasone의 억제 효과를 관찰하기 위하여 A549 IgG κ B-luc 세포주를 Dexamethasone 1 mM (Sigma)로 전처리한 후 TNF- α (10 ng/ml) 6시간 자극하여 상기의 바와 같이 luciferase assay를 시행하였다. 그 결과 Dexamethasone 전처리에 의해 TNF- α 자극에 의한 NF- κ B luciferase 활성을 A549 IgG κ B-luc 세포주와 BEAS-2B IgG κ B-luc 세포주 모두에서 40% 수준으로 억제시키는 결과를 보여서 이미 알려진 바와 같이 폐상피세포에서 TNF- α 자극에 의한 NF- κ B 의존성 전사활성에 대한 dexamethasone의 억제 효과를 관찰할 수 있었다.(Fig. 3). Dexamethasone 단독으로는 NF- κ B의 기저 활성을 약 20% 정도 억제하는 결과를 보였다.

3. GR 유도성 NF- κ B-의존성 전사활성 억제 효과

Dexamethasone에 의한 TNF- α 유도성 NF- κ B 활성 억제가 GR에 의한 결과임을 확인하기 위하여 양 세포주에서 모두 GR을 과발현시킨 후 TNF- α 로 자

극하였다. 그 결과 GR 발현 vector의 DNA 양을 0.2, 0.4, 0.6 μ g 으로 점진적으로 증가함에 따라 비례하여 뚜렷한 TNF- α 자극에 의한 NF- κ B 활성억제를 확인할 수 있었다. 이러한 효과는 A549 및 BEAS-2B 두 세포주 모두에서 공통 유사한 결과를 나타내었다(Fig. 4).

4. Dexamethasone이 I κ B α 경로에 의한 NF- κ B 활성화에 미치는 영향

NF- κ B 활성화에 있어서 가장 중요한 과정이 억제 단백질인 I κ B α 에서 해방되는 것이다. 여기에는 I κ B α 의 합성을 유도하여 지속적으로 NF- κ B의 유리를 방해하는 방법과 I κ B α 의 인산화와 분해를 방해하여 NF- κ B 활성을 억제하는 두 가지 방법이 알려져 있는데 T-세포와 단핵구 등과 같은 면역세포에서는 전자의 방법이 잘 밝혀져 있으며⁸⁾ 후자의 경우는 salicylic acid에 의한 NF- κ B 활성 억제 기전으로 잘 알려져 있다²¹⁾. 따라서 dexamethasone이 폐상피세포에서 NF- κ B 전사활성을 억제하는 기전을 밝히기 위하여

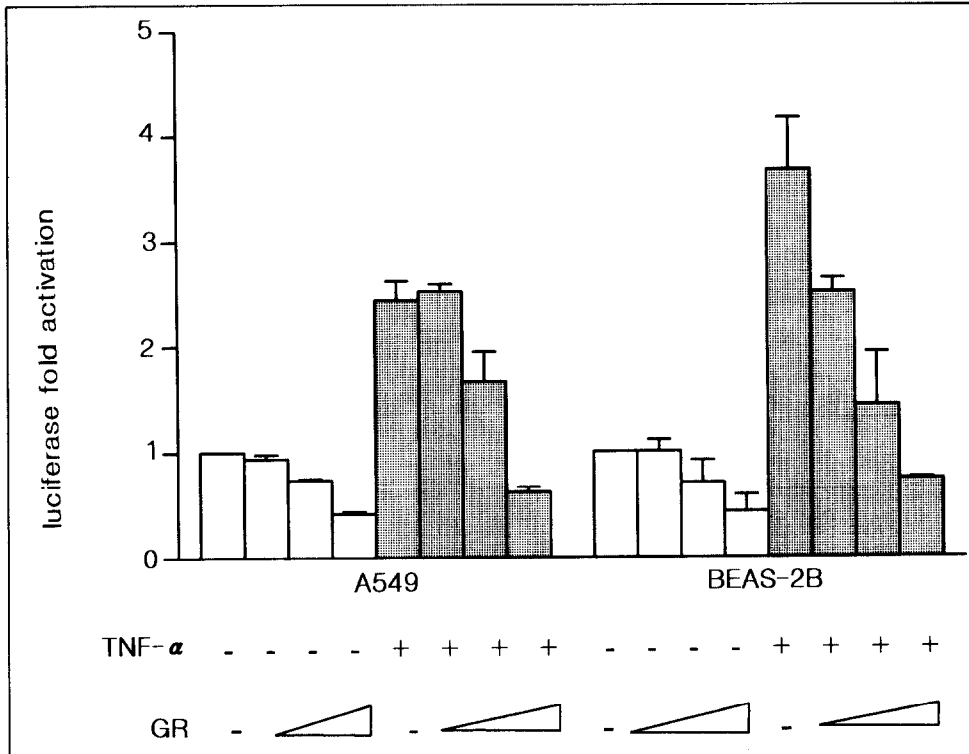


Fig. 4. GR mediates dexamethasone-induced inhibition of NF- κ B activation by TNF- α . A549 and BEAS-2B IgG κ -NF- κ B-luc cells were transiently transfected with increasing amounts of pCMV/GR, 0.2, 0.4, and 0.6 μ g respectively. Total transfected DNA amount was adjusted by empty pCMV vector. After 24 hour of transfection, cells were treated with or without TNF- α 10 ng/ml followed by harvest for luciferase. Data presented are representative of at least three independent experiments.

우선 dexamethasone이 I κ B α 합성을 유도하는지를 Western blot으로 확인하여 보았다. 하지만 Fig. 5. 에서와 같이 A549 세포주에서 I κ B α 는 dexamethasone에 의해 유도되지 않는 결과를 보였다. 뿐만 아니라 dexamethasone은 TNF- α 에 의한 I κ B α 의 분해에 전혀 영향을 미치지 못하였다(Fig. 6). TNF- α 자극시 I κ B α 는 매우 신속히(3분 이내) 분해되기 시작하여 30분이면 거의 사라졌다가 60분이면 I κ B α 가 재등장하게 되는데 이는 I κ B α 가 NF- κ B 활성화에 의해 전사유도 되기 때문이며 이는 NF- κ B의 지속적인 활성화를 방지하는 자동조절 장치의 하나이다. 이러한

I κ B α 의 분해에 dexamethasone은 전혀 영향을 미치지 못하므로 다음 단계로 핵이동이 이어 발생하는 NF- κ B와 DNA 결합에 dexamethasone이 미치는 영향을 EMSA로 확인하였다.

5. Dexamethasone이 TNF- α 자극에 의한 NF- κ B의 핵이동과 DNA 결합에 미치는 영향

TNF- α (10 ng/ml) 1시간 자극으로 뚜렷한 NF- κ B 복합체가 유도됨을 확인할 수 있었으며(lane 2 in Fig. 7) cold competition으로 완전 차단되는 것

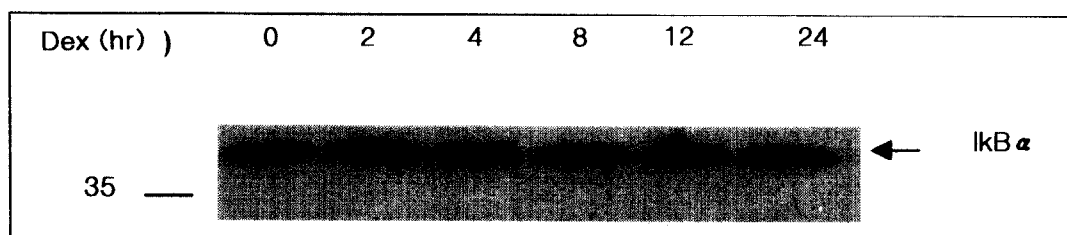


Fig. 5. Dexamethasone does not induce IκBα synthesis. A549 cells were treated with dexamethasone 1 μ M and harvested at different time points indicated above for Western blot analysis with a polyclonal IκBα antibody.

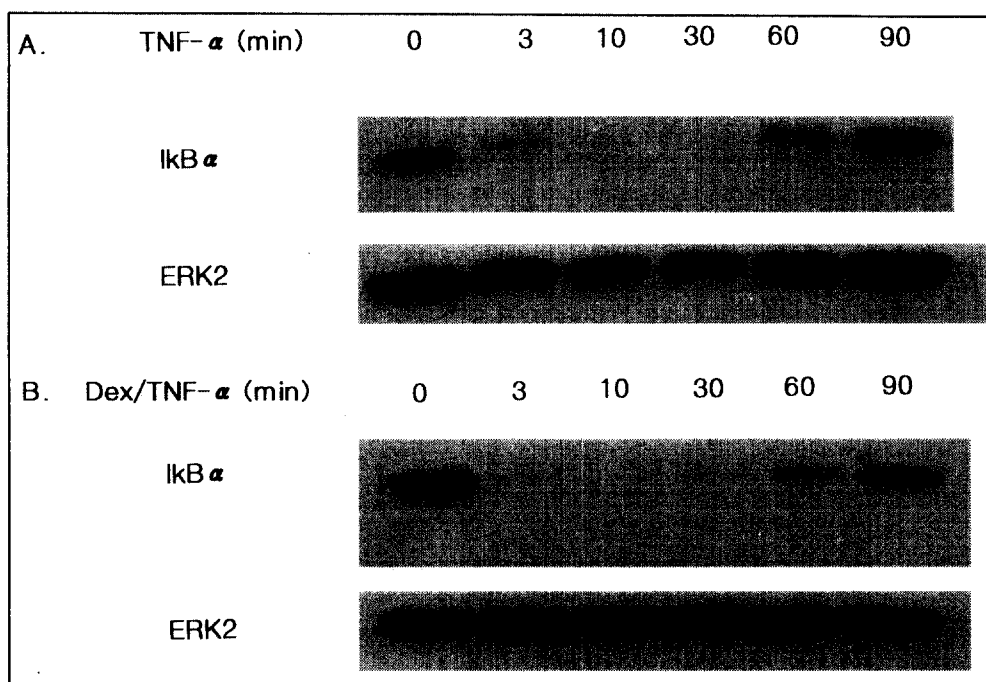


Fig. 6. Dexamethasone does not affect TNF- α -induced IκBα degradation. (A) A549 cells were treated with or without TNF- α 10 ng/ml and harvested at 0, 3, 10, 30, 60, and 90 min for Western blot analysis with a polyclonal IκB antibody. (B) The same experiment with (A) was done after 12 hour pretreatment with dexamethasone 1 μ M.

으로서 (lane 4) NF- κ B에 특이적인 band임을 확인하였다. p65 항체를 이용한 super shift(lane 3)가 관찰되어 NF- κ B 중에서 transactivation에 중요한 기능을 담당하는 p65가 이 NF- κ B 복합체에 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 dexamethasone은 이러한 NF- κ B와 DNA 결합에 전혀 영향을

미치지 않았다. (lane 6) 이렇게 dexamethasone이 NF- κ B 전사활성은 억제하지만 DNA결합을 방해하지 못 한다는 것은 dexamethasone에 의한 NF- κ B 전사활성 억제는 DNA 결합 이후에 발생함을 시사하는 것으로서 다음 과정으로 p65에 의한 transactivation에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하여 보았다.

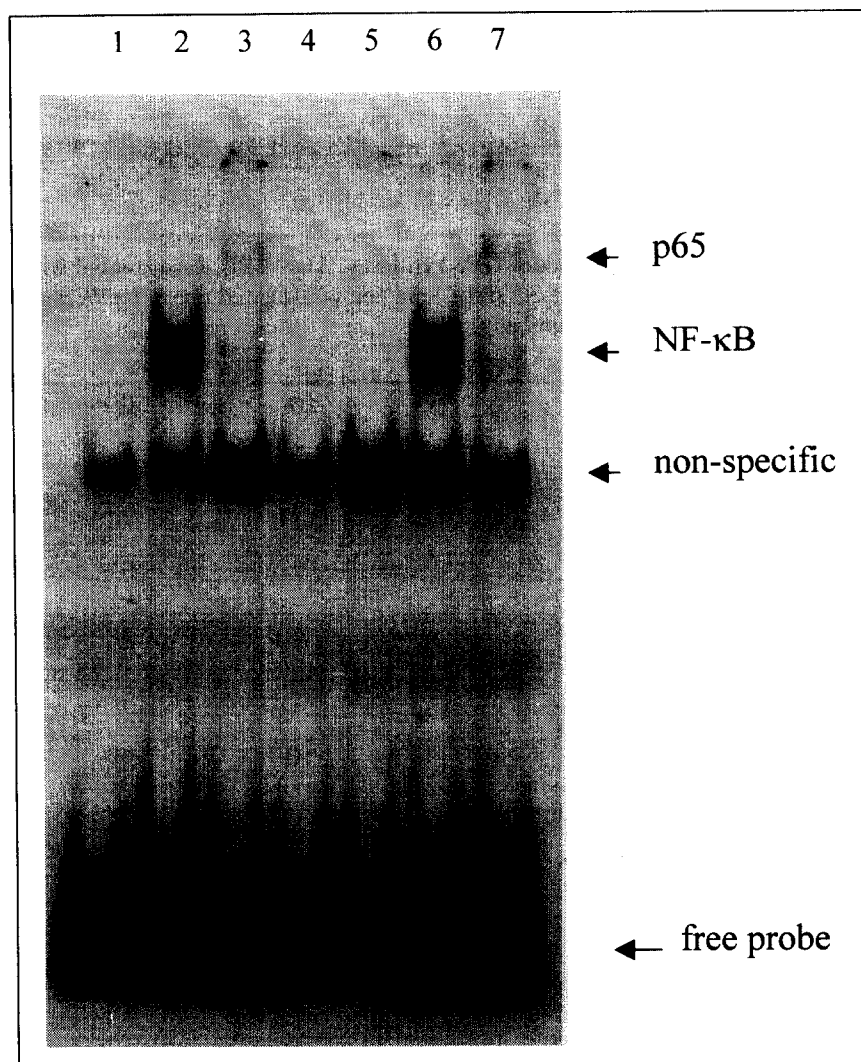


Fig. 7. Dexamethasone does not inhibit TNF- α -mediated induction of NF- κ B DNA binding. Nuclear extracts were prepared and analyzed in an electromobility shift assay (A549 cells) in A549 cells with a radiolabeled IgG κ -NF- κ B probe. Equal amounts of (7.5 μ g) of nuclear protein was loaded in each lane. In lane 3 and 7 a rabbit polyclonal antibody of p65 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) was added to the nuclear extract 5 min prior to the addition of radiolabeled probe. In lane 4, a 100 X excess of unlabeled IgG κ oligonucleotide was added 5 min prior to the addition of radiolabeled probe. (lane 1. Control ; lane 2. TNF- α ; lane 3. TNF- α /p65 Ab ; lane 4. x100 cold competition ; lane 5. Dexamethasone ; lane 6. Dexamethasone/TNF- α ; lane 7. Dexamethasone/TNF- α /p65 Ab)

6. GR에 의한 p65 transactivation 억제

이상과 같이 전사인자의 DNA 결합과 transactivation이 일치하지 않는 것은 전사인자가 DNA 결합 도메인 (DNA binding domain)과 transactivation 도메인의 이중 조절 (bimodular) 기능이 존재하기 때문이다. 즉 전사인자가 특이적 염기서열의 DNA에 결합하더라도 RNA polymerase II를 중심으로 한 기초 전사 기구(basal transcriptional machinery)가 전사를 시작하기 위해서는 transactivation 도메인이 활성화되어야 하는데 dexamethasone이 이러한 transactivation을 억제할 것이라는 가정을 세워보았다. 현재 p65에 의한 transactivation을 연구하는 방법으로는 효모 전사인자인 Gal4의 DNA-binding domain과 p65의 transactivating domain의 fusion 단백을 encoding하는 plasmid와 Gal4-binding site를 갖는 luciferase re-

porter plasmid를 동시에 유전자주입 (co-transfect)하여 luciferase assay로 transactivation 억제를 증명하는 방법이 가장 많이 사용되고 있고 본 연구에서도 이 시스템을 이용하였다. p65 transactivating domain은 TA1 (아미노산 521-551)과 TA2 (아미노산 286-521)로 구성되어 있는데 TA1은 통상적 활성을 보이나 TA2는 활성에 PMA 자극을 필요로 한다. Gal4, Gal4-p65TA1 혹은 Gal4-p65TA2 발현 plasmid를 5xGal4-luciferase reporter gene (Gal4-결합부위가 5회 반복되어 있고 luciferase 유전자와 fusion되어 있음)와 함께 유전자주입하면 수십 배의 전사활성도의 증가가 관찰된다. 반면 GR을 DNA 양을 증가하면서 동시에 유전자주입하면 DNA양에 따라 비례하여 p65의 transactivation이 TA1 및 TA2 모두 현저히 감소함을 확인하였다(Fig. 8). 이 경우 dexamethasone 단독으로는 p65 transactivation에 영향을 미치지 못하였는

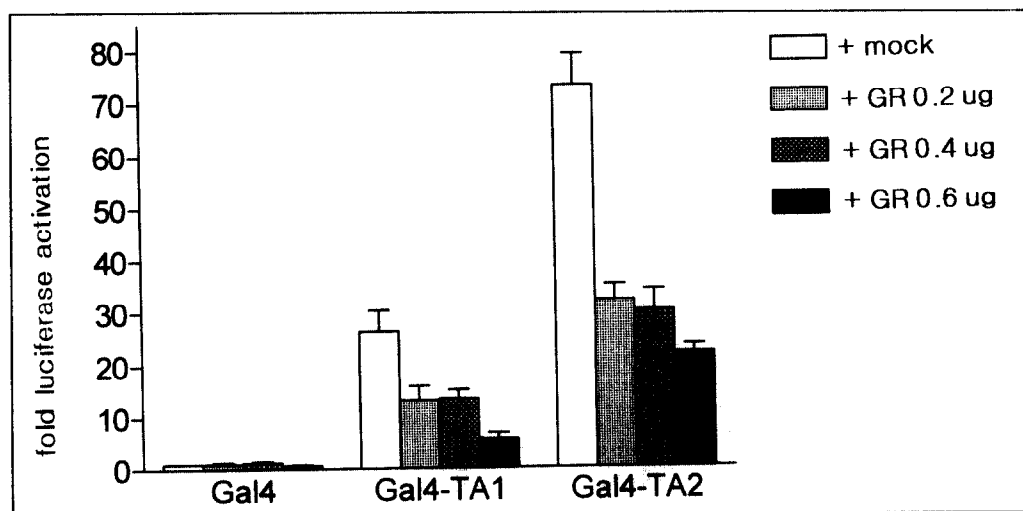


Fig. 8. Overexpression of GR inhibits p65 transactivation. A vector encoding a fusion protein between the DNA binding domain of Gal4 and either the TA1 (Gal4-TA1) or TA2 (Gal4-TA2) activation domains of p65 or Gal4 was cotransfected with increasing amounts of pCMV (0.2, 0.4, and 0.6 μ g) and a 5x Gal4-luciferase reporter gene construct into A549 cells. After 48 hr cells were harvested for analysis of luciferase activity using equal amounts of protein. Data presented are representative of at least three independent transfections.

데(data not shown) 이는 Gal4-p65 fusion protein expression system이 인위적이며 그 활성도가 매우 강력하기 때문이기 때문으로 생각되며 따라서 dexamethasone에 의해 활성화되는 GR을 동시에 유전자주입 하였다. GR 유전자주입과 dexamethasone 전처리와 동시에서행한 경우는 더욱 강력한 억제 효과가 나타났었다. (data not shown)

7. 전사활성 협동인자 CBP와 SRC-1 발현에 의해 소실되는 GR에 의한 p65 transactivation 억제 효과

이러한 GR에 의한 p65 transactivation 억제 효과는 어떻게 나타나는 것일까? 같은 전사인자인 GR과 NF- κ B 사이의 상호적인 대립성은 두 단백질 간의 물리적 상호작용에 의한 결과로 설명한다. 최근에 NF- κ B의 transactivation에는 CBP와 같은 전사활성 협

동인자 (transcriptional coactivator or nuclear integrator)와 같은 단백질이 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있다^{24, 25}. 또한 SRC-1과²⁶ 같은 coactivator도 NF- κ B의 전사활성에 중요한 역할을 한다고 밝혀져 있다. 따라서 위에서 확인된 GR 매개성 p65 transactivation의 억제가 CBP나 SRC-1과 같은 coactivator를 과발현 시켰을 때 그 억제 효과가 소실되는지를 확인하여 보았다(Fig. 9). 그 결과 CBP나 SRC-1를 유전자주입하면 GR에 의해 발생하는 p65 transactivation의 억제 효과를 상쇄하는 결과를 보여 GR에 의한 p65 transactivation 억제는 CBP나 SRC-1과 같은 핵내 전사조절 단백질에 의해 이루어짐을 확인할 수 있었다. 그리고 그 기전으로서는 p65와 GR 모두에서 transactivation에 필요한 CBP 혹은 SRC-1등의 양이 제한되어 있기 때문에 CBP 혹은 SRC-1의 결합 부위에 대해 p65와 GR이 경쟁적으로 결합하려 하기 때문이라고 생각된다.

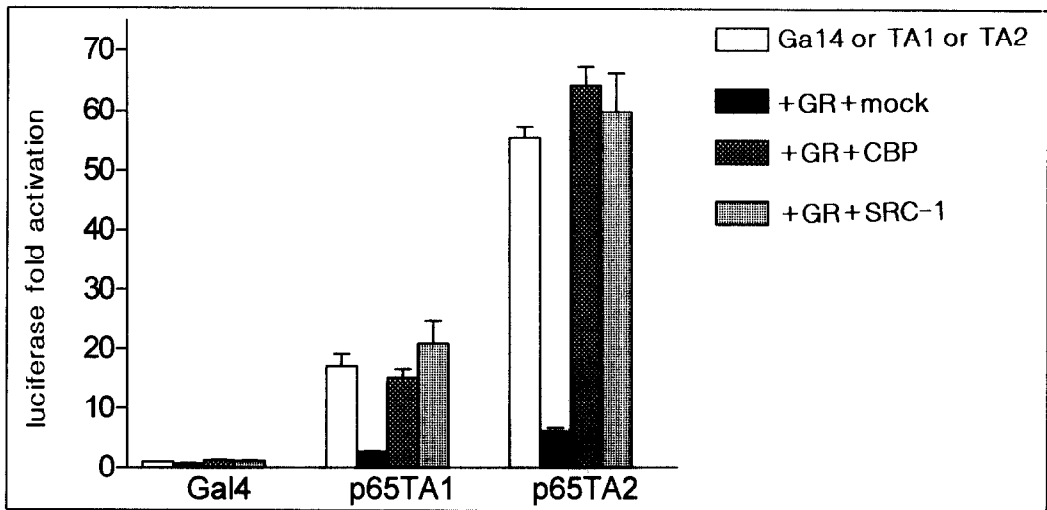


Fig. 9. CBP and SRC-1 rescues GR-mediated inhibition of p65 transactivation. A549 cells were transfected with Gal4, Gal4-TA1 or Gal4-TA2 vector and 5x Gal4-luciferase vector; CBP, SRC-1 or equivalent amount of empty expression vector were cotransfected as indicated. After 48 hr cells were harvested for analysis of luciferase activity using equal amounts of protein. Data presented are representative of at least three independent transfections.

고 안

GR과 NF- κ B가 각각 전사인자로서 작용하여 유도되는 생리학적 반응을 살펴보면 거의 상반되는 특성을 보이고 있다는 점을 발견할 수 있다. 즉 염증을 유발시키는 쪽으로 작용하는 NF- κ B와 염증을 억제시키는 GR 간에 상호 길항작용이 있다는 사실은 감염이나 스트레스등과 같은 외부 자극에 대한 항상성을 유지하는 합목적적 관점에서 볼 때 양대 축을 형성하는 매우 중요한 체계이다. 실제로 감염이나 스트레스등에 의해 NF- κ B가 활성화 됨과 동시에 시상하부-뇌하수체-부신 축 (HPA axis) 역시 활성화되어 부신피질 호르몬의 유리가 증가된다는 점에서 NF- κ B와 GR 간의 균형을 연구한다는 것은 매우 중요하며 이러한 점에서 본 연구에서 시행한 폐상피세포에서의 GR에 의한 NF- κ B 활성 억제 기전을 밝힌 것은 염증성 폐질환의 병태생리를 이해하고 동시에 새로운 치료적 목표를 찾는다는 점에서 그 중요성을 찾을 수 있으리라 생각된다.

A549와 BEAS-2B 세포주를 이용한 본 연구에서 dexamethasone은 폐상피세포에서 T-세포나 단핵구 등 면역세포와는 다른 기전으로 NF- κ B의 전사활성을 억제함으로써 항염증효과를 나타낸다는 사실을 확인하였다. 즉 폐상피세포에서는 NF- κ B 활성화경로의 전형인 I κ B 경로가 아닌 핵내에서의 p65 transactivation의 억제에 의한다는 사실을 확인하였으며 그 구체적 기전으로 CBP나 SRC-1과 같은 핵내의 전사 조절 협동인자 (coactivator)가 관여한다는 결론이다.

NF- κ B 활성화경로에 있어서 가장 중심이 되는 과정은 I κ B가 IKK α 혹은 IKK β 에 의해 인산화되고 뒤이어 ubiquitination과 proteasome에서 분해되어 핵으로 이동하는 것으로 알려져 있다. 그러나 본 연구결과에서와 같이 NF- κ B의 DNA 결합을 방해하지 않으면서 NF- κ B 전사활성을 억제하는 경우가 존재한다는 사실이 최근 알려지기 시작했으며 이는 DNA결합 이후에 발생하는 핵내 과정에 영향을 미침으로써 발생

한다는 것을 시사하는 소견이다^{7, 27)}. 이러한 핵내 과정에는 p65단백의 인산화가 관여되는 것으로 알려져 있다. NF- κ B의 경우 p50은 DNA 결합에 관여할 뿐 transactivation의 기능은 없는 것으로 알려져 있고 transactivation은 p65가 담당하는 것으로 밝혀져 있는데, 실제로 Zhong등은²²⁾ LPS에 의해 p65의 serine-276 부위에 인산화가 발생하여 p65-mediated transactivation이 발생한다고 보고하고 있고, Wang등도²³⁾ p65의 C-종말 부위의 serine 529 부위에 인산화가 발생하여 TNF- α 에 의한 NF- κ B transactivation이 유도됨을 확인한 바 있어 양자 모두에서 p65의 인산화가 핵이동이나 DNA 결합에는 아무런 영향을 미치지 못하면서 NF- κ B 전사활성을 증가시키는 것을 증명한 바 있다. 이러한 p65의 인산화는 GR에 의한 NF- κ B 억제기전의 하나가 목표가 될 수 있는데, p65의 인산화에 관여하는 kinase는 아직 확실히 밝혀지지 않은 상태이기에 GR이 p65의 인산화에 영향을 미치는지는 향후 연구되어야 될 과제라 생각된다. 다만 최근 I κ B를 인산화시키는 I κ B kinase (IKK)가 p65도 인산화 시킨다는 보고가 있어 IKK가 NF- κ B를 조절하는 두 가지 경로가 있다는 사실이 밝혀지긴 하였지만²⁸⁾, dexamethasone 혹은 GR이 IKK에 어떠한 영향을 미치는 지는 아직 보고된 바 없고 현재 이에 대한 연구를 진행 중이다. 또한 dexamethasone과 GR이 본 연구결과와 같이 I κ B α 의 인산화에는 전혀 영향을 끼치지 못하였다는 점으로 보아 IKK에 의한 p65의 인산화에만 선택적으로 영향을 미치리라는 가설도 그리 단순한 논리만은 아닌 것 같다. 그 근거로서 IKK 복합체 중에서 각 세부단위별로 인산화 기질에 선택성이 있다는 가설이 제기되어 있지만²⁸⁾ GR 혹은 dexamethasone의 경우에도 적용이 되는지는 확인해 볼 필요가 있다고 생각된다.

p65 인산화 이외에 GR과 NF- κ B 간의 상호 억제 기전 중 최근 주목 받는 것이 본 연구에서 밝혀진 CBP 및 SRC-1 등과 같은 전사 협동활성인자이다 (transcriptional coactivators). 전사 협동활성인자

는 전사인자와 기초전사기구 (basal transcriptional apparatus)를 연결해주는 교량 역할을 하는 단백질이다²⁹⁾. CREB-binding protein (CBP)와 p300는 중간 기능성 보존성이 잘 유지되어 있는 단백질로서 NF- κ B p65transactivation에 관여하는 coactivator로 잘 알려져 있으며^{22, 25)}, 이외에 핵 수용체, CREB, STATs, 그리고 AP-1 등 여러 전사인자들의 전사활성에 필요한 것으로 밝혀져 있다³⁰⁾. CBP 외에 NF- κ B 활성화와 관련이 있을 수 있는 coactivator로는 SRC-1를 들 수 있다. SRC-1은 CBP 및 p300과 복합체를 형성하고 있음이 이미 밝혀져 있기 때문에 NF- κ B p65 transactivation에 참여하는 CBP와 같이 NF- κ B p65 transactivation에 관여하리라는 가정하에 CBP와 함께 SRC-1을 시험하였다. 그 결과 GR에 의해 발생하는 p65 transactivation 억제를 CBP 혹은 SRC-1을 과발현 시킴으로써 p65 transactivation을 정상으로 복원시키는 결과를 얻었기에 이는 coactivator인 CBP와 SRC-1에 의한 NF- κ B p65 transactivation에 NF- κ B와 GR이 경쟁하는 것으로 설명할 수 있겠다. 다만 SRC-1은 NF- κ B 중 p50와만 반응하고 p65와는 결합하지 않는다는 보고가 있어²⁶⁾ GR에 의한 p65 transactivation 억제에 SRC-1이 관여하는 기전은 CBP가 작용하는 기전에 SRC-1이 결합함으로써 이루어지는 것이 아닌가 추측된다.

결론적으로 GR에 의한 폐상피세포에서의 NF- κ B p65 transactivation의 억제는 핵내 조절인자인 제한된 양의 CBP나 SRC-1 등에 대해 p65와 GR이 경쟁적으로 결합하려는 squelching 기전에 의해 발생하는 것으로 추론된다. 다만 향후 dexamethasone 혹은 GR이 p65의 인산화에 어떤 영향을 미치는지, 그리고 p65와 CBP 혹은 SRC-1과의 결합에 미치는 영향은 어떠한지 그리고 최근 관심의 초점이 되고 있는 CBP나 SRC-1 등의 histone acetyltransferase 활성 변화를 측정함으로써 chromatin remodeling에 미치는 영향을 연구하는 것이 필요하리라 생각된다.

참 고 문 헌

1. Barnes, P. J. 1995. Inhaled glucocorticoids for asthma. *N. Engl. J. Med.* 332:868-75.
2. Truss, M., M. Beato. 1993. Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine Rev.* 14:459-79.
3. Muller, M., R. Renkawitz. 1991. The glucocorticoid receptor. *Biochim. Biophys. Acta.* 1088:171-82.
4. Bamberger, C. M., H. M. Shuttle, G. P. Chrousos. 1996. Molecular determinants of glucocorticoid receptor function and tissue sensitivity to glucocorticoids. *Endocrine Rev.* 17:245-61.
5. Barnes, P. J. 1998. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin. Science* 94:557-72.
6. Pfahl, M. 1993 Nuclear receptor/AP-1 interactions. *Endocrine Rev.* 14:651-8.
7. Bosscher, K., D., M. L. Schmitz, W. V. Berghe, S. Plaisance, W. Fires, G. Haegeman. 1997. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:13504-13509
8. Auphan, N., J. A. Didonato, C. Rosette, A. Helmbert, M. Karin. 1995. Immunosuppression by glucocorticoids: Inhibition of NF- κ B activity through induction of I κ B synthesis. *Science.* 270: 283-86.
9. Scheinman, R. I., P. C. Cogswell, A. K. Lofquist, A. S. Baldwin Jr. 1995. Role of transcriptional activation of I κ B α in mediation of immunosuppression by glucocorticoids. *Science.* 270:283-86.
10. Brostjan, C., J. Anrather, V. Csizmadia, D. Stroka, M. Soarses, F. H. Bach H. Winkler. 1996.

- Glucocorticoid-mediated repression of NF- κ B activity in endothelial cells does not involve induction of I κ B α synthesis. *J. Biol. Chem.* 271:19612-6.
11. Ray, A., K. E. Prefontaine. 1994. Physical association and functional antagonism between the p65 subunit of transcriptional factor NF- κ B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.A.* 91:752-6.
12. Scheiman, R. I., A. Gualberto, C. M. Jewell, J. A. Cidlowski, A.S. Baldwin Jr. 1995. Characterization of mechanisms involved in transrepression of NF- κ B by activated glucocorticoid receptors. *Mol. Cell. Biol.* 15:943-53.
13. Levine, S. J. 1995. Bronchial Epithelial cell-cytokine interactions in airway inflammation. *J. Invest. Med.* 43:241-9.
14. Wissink, S., E. C. van Heerde, B. van der Burg, P. T. van der Saag. 1998. A dual mechanism mediates repression of NF- κ B activity by glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 12:355-63.
15. Newton, R., L. A. Hart, D. A. Stevens, M. Bergmann, L. E. Donnelly, I. M. Adcock, P. J. Barnes. 1998. Effect of dexamethasone on interleukin-1 β (IL-1 β)-induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) and κ B-dependent transcription in epithelial cells. *Eur. J. Biochem.* 254:81-89.
16. de Wet, J. R., K. V. Wood, M. DeLuca, D. R. Helinski, S. Subramani. 1987. Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 7:725-37.
17. Mukaida, N., S. Okamoto, Y. Ishikawa, K. Matsushima. 1994. Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J. Leukocyte Biol.* 56:554-8.
18. Cross, S. L., N. F. Halden, M. J. Lenardo, W. J. Leonard. 1989. Functionally distinct NF-kappa B binding sites in the immunoglobulin kappa and IL-2 receptor alpha chain genes. *Science.* 244:466-9.
19. Schmitz, M. L., S. dos Santos, P. A. Baeuerle. 1995. Transactivating domain 2 phosphorylation in intact cells. *J. Biol. Chem.* 270:15576-84.
20. Finco, T. S., J. K. Westwick, J. L. Norris, A. A. Beg, C. J. Der, A. S. Baldwin Jr. 1997. Oncogenic Ha-ras-induced signaling activates NF-kappaB transcriptional activity, which is required for cellular transformation. *J. Biol. Chem.* 272:24113-6.
21. Kopp E, Ghosh S. 1994. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science.* 265:956-9.
22. Zhong, H., R. Voll, S. Ghosh. 1998. Phosphorylation of NF- κ B p65 by PKA stimulates transcriptional activity by promoting a novel bivalent interaction with the coactivator CBP/p300. *Mol. Cell.* 1:661-71.
23. Wang, D., A. S. Baldwin Jr. 1998. Activation of nuclear factor-kappaB-dependent transcription by tumor necrosis factor-alpha is mediated through phosphorylation of RelA/p65 on serine 529. *J. Biol. Chem.* 273:29411-16.
24. Perkins, N. D., L. K. Felzien, J. C. Betts, K. Leung, D. H. Beach, G. J. Nabel. 1997. Regulation of NF-kappa B by cyclin-dependent kinases associated with the p300 coactivator. *Science.* 275:523-7.
25. Gerritsen, M. E., A. J. Williams, A. S. Neish, S. Moore, Y. Shi, T. Collins. 1997. CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivator of p65. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:2927-32.
26. Na, S-Y., S-K. Lee, S-J. Han, H-S. Choi, S-Y. Im, J. W. Lee. 1998. Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor-B-mediated transactivations. *J.*

- Biol. Chem. 273:10831-4
27. Lee, K. Y., W-t Chang, D. Qiu, P. N. Kao, and G. D. Rosén. 1999. PG490 (triptolide) cooperates with tumor necrosis factor- α to induce apoptosis in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 274:13451-5
28. Sakurai, H., H. Chiba, H. Miyoshi, T. Sugita, W. Toriumi. 1999. I κ B kinases phosphorylate NF- κ B p65 subunit on serine 536 in the transactivation domain. *J. Biol. Chem.* 274:30353-6
29. Horwitz, K. B., T. A. Jackson, D. L. Bain, J. K. Richer, G. S. Takimoto, L. Tung. 1996. *Mol. Endocrinol.* 10:1167-77
30. Lee, S-K., H-J. Kim, S-Y. Na, T. S. Kim, H-S. Choi, S-Y. Im, J. W. Lee. 1998. Steroid receptor coactivator-1 coactivating Activating Protein-1-mediated transactivations through interaction with c-Jun and c-Fos subunits. *J. Biol. Chem.* 273:16651-4
-