

TRAIL 유도 세포사멸에 있어서 IFN- γ 에 의한 증가 기전 연구: IRF-1과의 관련성

박상열^{1*} · 설재원 · 이유진 · 강석진² · 김인식¹ · 강형섭¹ · 채준석¹ · 조중후¹

전북대학교 수의과대학, ¹생체안전성연구소, ²축산기술연구소

(게재승인: 2004년 4월 17일)

IRF-1-mediated IFN- γ enhancement of TRAIL-induced apoptosis

Sang-Youel Park^{1*}, Jae-Won Seol, You-Jin Lee, Seog-Jin Kang², In-shik Kim¹,
Hyung-sub Kang¹, Joon-seok Chae¹, and Jong-Hoo Cho¹

College of Veterinary Medicine, ¹Bio-Safety Research Institute,
Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

²National Livestock Research Institute, Cheonan 330-801, Korea

(Accepted: April 17, 2004)

Abstract : Tumor necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a member of the TNF family and potent inducer of apoptosis. TRAIL has been shown to effectively limit tumor growth *in vivo* without detectable cytotoxic side effects. Interferon (IFN)- γ often modulates the anti-cancer activities of TNF family members including TRAIL. We previously reported that IFN- γ enhanced TRAIL-induced Apoptosis in HeLa cells without the unknown mechanism. In this study, we investigated whether IRF-1 involves in IFN- γ -enhanced TRAIL-induced apoptosis. We exposed HeLa cells to IFN- γ for 12 hours and then treated with recombinant TRAIL protein. No apoptosis was induced in cells pretreated with IFN- γ , and TRAIL only induced 30% apoptosis after 3 hours treatment. In HeLa cells pretreated with IFN- γ , TRAIL induced cell death to more than 75% at 3 hours, showed that IFN- γ -pretreatment enhanced HeLa cell death to TRAIL-induced apoptosis. To investigate the functional role of IRF-1 in IFN- γ -enhanced TRAIL-induced apoptosis, IRF-1 was overexpressed by using an adenoviral vector AdIRF-1. IRF-1 overexpression increased apoptotic cell death and significantly enhanced apoptotic cell death induced by TRAIL when infected cells were treated with TRAIL. Our findings show that IFN- γ enhances TRAIL-induced apoptosis by IRF-1 in HeLa cells.

Key words : IFN- γ , TRAIL, IRF-1, HeLa

서 론

Apoptosis(세포사멸)란 세포자신에 의해 조절되어지며, 매우 능동적인 세포 죽음 과정의 하나로 알려져 있다. 또한 이 과정은 다양한 세포들로 이루어진 기관들의 신생과 퇴화 등 항상성을 유지하고 성장과 분화 등 발달과정에 있어서 매우 중요한 역할을 담당하는 것으로 잘 알려져 있다 [12]. TRAIL은 TNF-related apoptosis-

inducing ligand의 약어로서 Tumor Necrosis Factor (TNF) family 중에 type II transmembrane cytokine molecule로 분류되며, ligand-type의 세포사멸을 유도하는 단백질을 의미한다 [1, 7, 18, 30]. TRAIL은 세포 표면에 존재하는 TRAIL 관련 수용체들 즉, Death Receptor-4 (DR-4), Death Receptor-5 (DR-5), Decoy Receptor-1 (DcR-1) 그리고 Decoy Receptor-2 (DcR-2)와 결합함으로써 세포사멸 신호 전달계를 조절 및 활성화시켜, 세포사멸을 유도

이 논문은 2003년도 두뇌한국 21사업에 의하여 지원되었음
이 논문은 2002년도 전북대학교 지원 연구비에 의하여 연구되었음

*Corresponding author: Sang-Youel Park

College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea
[Tel: 82-63-270-3886, Fax: 82-63-270-3780, E-mail: sypark@chonbuk.ac.kr]

하는 것으로 알려져 있다. TRAIL은 특히 암세포에만 특이적으로 작용하여 세포사멸을 유도하는 것으로 보고되어 있으며, 정상세포에서는 아무런 독성이 없는 것으로 나타나, 새로운 종양 치료제로서 많은 연구가 진행중이다.

Interferon-gamma (인터페론 감마, IFN- γ)는 T 세포나 NK 세포로부터 분비되어지며, 바이러스의 복제 억제나 맥관 관련 세포들의 증식을 억제하는 등 다양한 기능을 가지고 있는 것으로 널리 알려져 있다 [8, 13, 14]. 또한 인터페론 감마는 Fas 등을 포함한 다양한 세포사멸유도 인자들에 대한 세포의 감수성을 증가시킴으로써, 인자들에 의한 세포사멸을 증강시키는 역할을 하는 것으로 보고되었다 [22]. 최근 연구자들의 보고 [2, 17, 19, 31]에 의하면, 인터페론 감마는 TNF나 TRAIL과 협력하여 종양세포에 대한 세포사멸능을 증가시키는 것으로 보고되어 종양 관련 연구자들의 관심이 고조되고 있으나, 그 명확한 기전은 아직까지 완전히 밝혀지지 않고 있는 실정이다.

한편, 전사조절인자, interferon regulatory factor (IRF)-1은 인터페론 감마에 대한 세포 신호 전달계에서 다양한 유전자의 전사를 조절하는 인자로서 잘 알려져 있으며, 종양 억제기능을 가지고 있는 것으로 최근의 연구들에 의해 밝혀지고 있다 [3-5, 23, 24, 32]. Tamura 등 [27, 28]의 연구에 의하면 T lymphocyte에서 DNA 손상에 의한 세포사멸에서는 IRF-1이 필요하며, 매우 의존적이라고 보고되었다.

따라서 본 연구자들은 이번 연구를 통하여 HeLa 세포에 대한 인터페론 감마의 세포사멸능의 증강을 확인하고, 그 기전과 IRF-1과의 관련성을 조사하고자 하였다. 특히, IRF-1 단백질을 과발현시킬 수 있는 adenovirus 벡터를 이용하여 인터페론 감마가 TRAIL 세포사멸 증강 효과와 같은 효과를 보이는지 조사하였다.

재료 및 방법

세포주 및 세포배양

본 실험에서 사용된 HeLa, CRE 그리고 293 세포주를 ATCC로부터 공급 받아 사용하였다. 세포의 성장 유지를 위해서 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ gentamicin과 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ penicillin-streptomycin이 포함된 항생제와 10%(V/V) fetal bovine serum이 첨가된 배지에 5% CO₂를 공급하면서 37°C로 배양시켰다.

세포의 생존능 측정

암세포의 생존능을 측정하기 위해서 세포를 12-well plate에 1.0×10^4 이 되게 각 well에 넣은 다음 5% CO₂,

37°C 상태에서 24시간 배양하였다. 12-well plate에서 증식한 세포에 IFN- γ (100 U/ml) (Roche, Germany)를 전처리하고 12시간 후에 재조합 TRAIL [20] 단백질을 처리한 다음 3시간 동안 더 배양하였다. 세포의 생존능 측정은 crystal violet 염색 방법 [16]에 의해 검사하였고, 세포의 형태를 현미경 하에서 관찰한 후 사진으로 촬영하였다. 세포의 생존능 측정방법은 세포를 30% ethanol과 3% formaldehyde가 들어 있는 0.5% crystal violet으로 실온에서 10분간 염색하고 흐르는 물에서 4회 세척한 후 건조시켰다. 건조된 후에 세포를 1% SDS 용액으로 용해시켜서 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western Blotting

발현 단백질을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다 [15, 21]. 실험목적에 맞게 처리된 세포를 scraper를 이용하여 모아, PBS로 세척한 후 모아진 세포에 세포용해액(25 mM HEPES, pH 7.4, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM DTT, and protease inhibitor mixture)을 넣어 부유시킨 후 얼음에 30분간 방치하고 초음파 분쇄하였다. 단백질의 분자량에 맞게 12~15% SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하고 nitrocellulose membrane에 transfer 하였다. Transfer된 membrane을 blocking, primary antibody, secondary antibody 순서로 각각 1시간 동안 배양한 후, super-signal kit (Pierce, USA)를 이용하여 검색하였다.

본 실험에 사용한 FADD, IAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bcl-XL 및 IRF-1(sc-497) 등의 antibody는 Santa Cruz (Santa Cruz, USA)에서 구입하였고, DR-4, DR-5는 Stressgen (Victoria, Canada)에서 구입하여 사용하였다.

Adenoviral vector

아데노바이러스의 증식과 숙주세포의 면역 관련 부위인 E1 유전자 부위와 E3 유전자 부위를 제거시킨 AdIRF-1은 Hardy 등 [6]의 방법에 준하여 Cre-lox 재조합을 통하여 만들어졌다. 요약하면, CMV promoter로 시작해서 SV40 polyA signal로 끝나는 IRF-1이나 enhanced green fluorescence protein (EGFP)를 만드는 cDNA에 pAdlox-IRF-1이나 pAdlox-EGFP를 만들기 위해 shuttle vector인 pAdlox를 삽입하였다. 재조합된 adenovirus는 적절하게 조각된 pAdlox-IRF-1이나 pAdlox-EGFP와 Cre recombinase의 발현에 의해 Ad packing cell line인 CRE8의 ψ 5 helper virus DNA를 cotransfection 하여 제작하였다. 재조합된 adenovirus는 293 세포주에서 증식시켰고, cesium chloride를 이용한 밀도 구배 원심분리에 의해 분리하여 정제하였다.

Adenoviral Infection

HeLa 세포를 6~12 well plate에 분주한 다음날 adenovirus를 감염시켰다. Adenovirus 감염은 원하는 multiplicity of infection (MOI 0-40)에 맞게 free Opti-MEM I (Gibco, USA) 배지에 혼합하여 세포에 4시간 동안 처리하였다. 감염 시킨 세포를 PBS로 3회 씻어 주고 다시 FBS가 첨가된 F-12K 배지에서 배양하였다. 감염된 HeLa 세포를 3시간동안 TRAIL을 처리한 후 crystal violet 염색 방법 [17]으로 세포 생존능 검사를 실시하였다. 세포의 형태는 현미경 하에서 검사하면서 촬영하였다. AdIRF-1을 처리한 세포에서 IRF-1 단백질의 발현은 Western blotting을 이용하여 조사하였다.

결과 및 고찰

IFN- γ increased TRAIL activity for HeLa cell apoptosis

인터페론 감마는 T 세포나 NK 세포로부터 분비되어지며, 바이러스의 복제 억제나 맥관 관련 세포들의 증식을 억제하는 등 다양한 기능을 가지고 있다 [8-11]. 인터페론 감마에 의한 TRAIL 유도 세포사멸 증강작용을 확인하기 위한 첫번째 실험을 실시하였다. HeLa 세포에 인터페론 감마를 100 U/ml의 농도로 12시간 동안 전처리 한 후, 일반적인 TRAIL 적용 농도인 100 ng/ml의 농도로 처리하여 다시 3시간 동안 배양하여 세포 생존능을 측정하였다(Fig. 1A, B). 인터페론 감마를 처리한 세포에서는 세포 사멸에 대해 아무런 영향을 미치지 않아 생존능 검사에서도 대조군과 아무런 차이를 보이지 않았다. 그러나 TRAIL을 단독으로 처리한 세포에서는 약 80%의 세포 생존능을 보였으며, 인터페론 감마를 전처리하고 TRAIL을 처리한 세포에서는 60%의 생존능을 가지는 것으로 측정되었다. 본 실험을 통하여 HeLa 세포에서 인터페론 감마에 의해 TRAIL 유도 세포사멸이 2배 이상 증가되었음을 알 수 있었다.

IFN- γ stimulated IRF-1 protein expression in HeLa cell

인터페론 감마의 TRAIL 활성 증가에 있어서 IRF-1의 역할에 대해 조사하기 위하여 인터페론 감마와 TRAIL을 처리한 후 IRF-1 단백질의 발현 정도를 조사하였다. 배양된 HeLa 세포에 인터페론 감마(100 U/ml)를 12시간 전처리하고, TRAIL(100 ng/ml)을 1시간 처리한 후 HeLa 세포에서의 IRF-1 단백질 변화상을 Western blotting을 실시하여 조사하였다(Fig. 2). Fig. 2에서와 같이 인터페론 감마를 처리한 HeLa 세포에서 IRF-1의 발현량은 인터페론 감마를 처리하지 않은 세포에서 보다 현저한

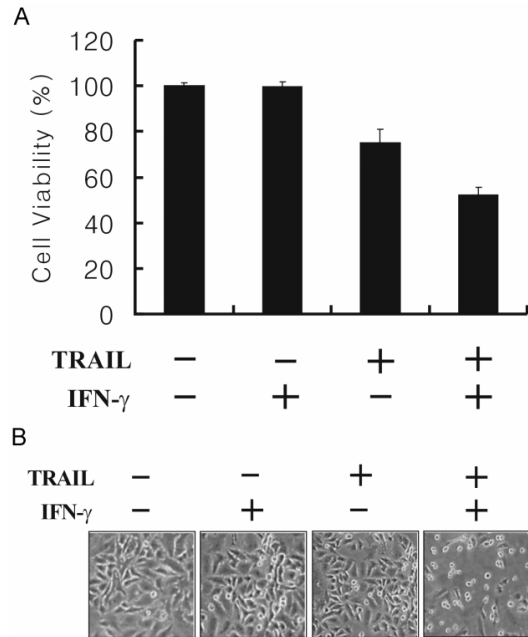


Fig. 1. Effect of IFN- γ on TRAIL-induced apoptosis. (A) HeLa cells plated in 12-well were pretreated with IFN- γ (100 U/ml) for 12 hours, and then coincubated with or without recombinant TRAIL protein (100 ng/ml) for additional 3 hours. Cell viability was determined by crystal violet staining method. Viability of control cells was set at 100%, and viability relative to the control was presented. The experiments were performed at triplicate, at least twice. The bar indicates standard error. (B) Cell morphology under the conditions as described in (A) was photographed ($\times 200$).

증가를 확인할 수 있었으며, TRAIL에 의한 IRF-1의 발현량의 변화는 보여주지 않았다. 본 실험의 결과 인터페론 감마에 의한 TRAIL의 세포사멸 증강 기전에 있어서 IRF-1 단백질이 중요한 역할을 하는 것으로 판단되었다. 또한 DR-4, DR-5, FADD, IAP-1, IAP-2, Bcl-2, Bcl-XL 등, TRAIL에 의한 세포사멸에 직접 관련되어 TRAIL의 세포사멸 활성을 조절하는 단백질들의 발현량 변화를 조사하였으나 IRF-1을 제외하고는 인터페론 감마를 처리한 세포와 처리하지 않은 세포 사이에 유의성 있는 변화를 관찰하지 못하였다 (Data not shown).

따라서 인터페론 감마에 의한 TRAIL의 세포 사멸 증강 기전에 IRF-1 단백질이 주요 조절자로서 역할을 하는 것으로 보여진다.

Overexpression of IRF-1 protein by Adenoviral Vectors

IRF-1에 의한 항암 효과들과 관련된 연구 결과 [24-28,

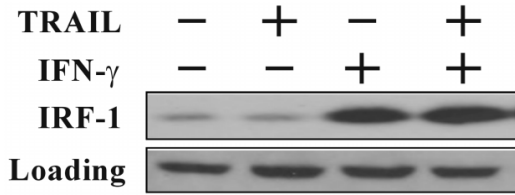


Fig. 2. Expression of IRF-1 protein. HeLa cells were pretreated with IFN- γ (100 U/ml) for 12 hours, and then coincubated with or without recombinant TRAIL protein (100 ng/ml) for 1 hour. Whole cell lysates were prepared as described in experimental procedures and subjected to Western blotting analysis.

32]들이 발표되어지고 있다. Tanaka 등 [27, 28]은 전사 조절인자인 IRF-1이 *c-myc*이나 *fosB*에 의한 세포의 형질전환을 억제한다고 보고하였으며, DNA 손상에 대한 반응으로 활성화 되는 p53 단백질과 종양 억제인자로서 IRF-1과의 협력작용에 대해 보고하여, IRF-1에 대한 항암 치료제로서의 가능성을 보여주었다 [3, 5, 24, 26, 29].

본 연구자들은 IRF-1의 과발현 방법을 응용하여 IRF-1과 TRAIL과의 관련성을 정립하고자 하였다. 먼저 IRF-1 단백질을 과발현 시킬 수 있는 벡터를 adenovirus에 삽입하였으며, 대조군으로서 EGFP 발현 벡터를 삽입한 AdEGFP와 AdIRF-1을 HeLa 세포에 감염시켜 세포 생존능 검사를 실시하였다. 그 결과 AdIRF-1 처리군에서는 MOI의 변화에 매우 의존적인 세포사멸 효과를 보였으며, 대조군인 AdEGFP 처리군에서는 유의성 있는 변화를 볼 수 없었다(Fig. 3A). 즉, AdIRF-1을 5, 10, 20, 40 MOI 별로 처리하였을 때, 각각 5%, 12%, 18%, 25%의 세포사멸 효과를 보여주었다. 그러나 최대 AdEGFP 처리군인 40 MOI에서는 순수 대조군에 비해 유의성 있는 세포사멸의 변화도 보여주지 않았다. 또한 AdIRF-1의 TRAIL에 대한 효과를 검증하기 위해 AdIRF-1을 처리한 세포에 다시 TRAIL을 처리하여 생존능 검사를 실시하였다(Fig. 3A). TRAIL을 단독으로 처리한 세포와 AdEGFP를 처리한 세포에서는 약 20% 정도의 세포사멸이 일어났으나, TRAIL과 AdIRF-1을 복합 처리한 세포에서는 AdIRF-1의 MOI에 매우 의존적으로 세포사멸이 일어났음을 확인할 수 있었다. AdIRF-1 최대 처리 MOI인 40 MOI에서는 AdIRF-1 단독 처리시 25%였던 세포사멸이 TRAIL과의 복합처리에서는 52%로 2배 이상의 세포사멸을 보였다(Fig. 3A). AdIRF-1에 의한 IRF-1 단백질의 발현은 Western blotting을 이용하여 확인하였다(Fig. 3B). 그 결과 AdIRF-1을 5, 10, 20, 40 MOI 별로 처리한 세포에서 IRF-1 단백질은 MOI 의존적으로 과발현이 일어났음을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 종합

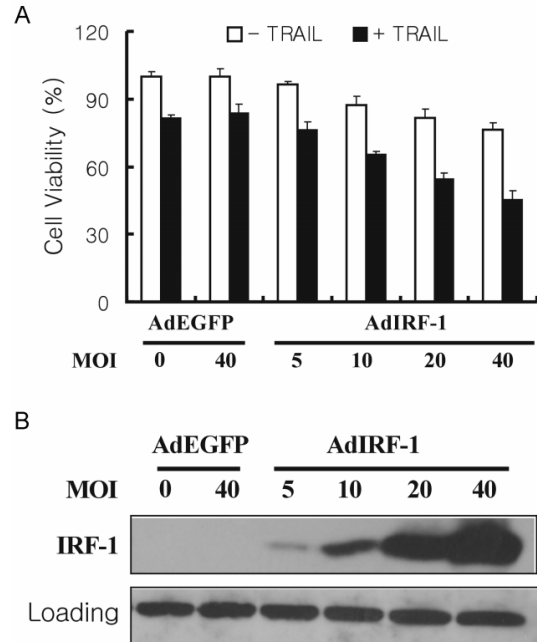


Fig. 3. Effect of IRF-1 overexpression on TRAIL-induced apoptosis. (A) HeLa cells were infected with AdEGFP or AdIRF-1 for 4 hours, washed, and further cultured. 24 hours later, recombinant TRAIL protein (100 ng/ml) was added to culture medium and incubated for 3 hours. Cell viability was determined by crystal violet staining method. Viability of control cells was set at 100%, and viability relative to the control was presented. The experiments were performed at triplicate, at least twice. The bar indicates standard error. (B) HeLa cells were infected with AdEGFP or AdIRF-1 for 4 hours, washed, and further cultured. 24 hours later, whole cell lysates were prepared and subjected to Western blotting analysis for IRF-1 expression. The loading indicates a nonspecific protein band that was used to ensure equal protein loading.

하면, HeLa 세포에서 IRF-1 단백질 발현 증가는 IRF-1에 의한 직접적인 세포사멸을 증가시켰을 뿐만 아니라, TRAIL에 의한 세포사멸에 조절자로서 작용하여 TRAIL에 의한 세포사멸을 현저하게 증가시켰다. 이는 Suk 등 [23]이 보고한 인터페론 감마와 TNF- α 에 의한 항진작용에 IRF-1 경로가 주요 역할을 한다는 연구 결과와도 일치하는 내용이다.

본 연구 결과를 요약하자면, HeLa 세포에서 인터페론 감마는 TRAIL 유도 세포사멸을 현저하게 증가시켰으며, 인터페론 감마를 처리한 세포에서 전사조절인자인 IRF-1 단백질의 현저한 증가를 확인하였다. IRF-1 단백질의 역할을 직접 확인하기 위하여, HeLa 세포에 IRF-

1 단백질을 과발현 시켰으며, 다시 TRAIL을 처리하였다. 그 결과 인터페론 감마를 처리하였을 때와 유사하게 TRAIL 유도 세포사멸이 현저하게 증가되었음을 확인하였다. 이러한 연구 결과는 인터페론 감마에 의한 TRAIL의 세포사멸 증가에 대한 IRF-1의 깊은 관련성을 제시하였으며, 향후 IRF-1에 의한 항암 치료제의 개발에 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 IRF-1 단백질을 이용한 유전자 치료 분야와 IRF-1 단백질과 TRAIL을 이용한 복합치료의 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Cha, S. S., Kim, M. S., Choi, Y. H., Sung, B. J., Shin, N. K., Shin, H. C., Sung, Y. C. and Oh, B. H. 2.8 A resolution crystal structure of human TRAIL, a cytokine with selective antitumor activity. *Immunity*. 1999, **11**, 253-261.
2. Fish, S. M., Proujansky, R. and Reenstra, W. W. Synergistic effects of interferon gamma and tumour necrosis factor alpha on T84 cell function. *Gut*. 1999, **45**, 191-198.
3. Fujita, T., Kimura, Y., Miyamoto, M., Barsoumian, E. L. and Taniguchi, T. Induction of endogenous IFN-alpha and IFN-beta genes by a regulatory transcription factor, IRF-1. *Nature*. 1989, **337**, 270-272.
4. Fujita, T., Sakakibara, J., Sudo, Y., Miyamoto, M., Kimura, Y. and Taniguchi, T. Evidence for a nuclear factor(s), IRF-1, mediating induction and silencing properties to human IFN-beta gene regulatory elements. *EMBO J*. 1988, **7**, 3397-3405.
5. Harada, H., Kitagawa, M., Tanaka, N., Yamamoto, H., Harada, K., Ishihara, M. and Taniguchi, T. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science*. 1993, **259**, 971-974.
6. Hardy, S., Kitamura, M., Harris-Stansil, T., Dai, Y. and Phipps, M. L. Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination. *J. Virol*. 1997, **71**, 1842-1849.
7. Hymowitz, S. G., Christinger, H. W., Fuh, G., Ultsch, M., O'Connell, M., Kelley, R. F., Ashkenazi, A. and de Vos, A. M. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Mol. Cell*. 1999, **4**, 563-571.
8. Kakimi, K., Guidotti, L. G., Kozuka, Y. and Chisari, F. V. Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J. Exp. Med.* 2000, **192**, 921-930.
9. Kim, K. B., Choi, Y. H., Kim, I. K., Chung, C. W., Kim, B. J., Park, Y. M. and Jung, Y. K. Potentiation of Fas- and TRAIL-mediated apoptosis by IFN-gamma in A549 lung epithelial cells: enhancement of caspase-8 expression through IFN-response element. *Cytokine*. 2002, **20**, 283-288.
10. Kirkwood, J. M. and Ernstoff, M. S. Role of interferons in the therapy of melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 1990, **95**, 180S-184S.
11. Kirkwood, J. M., Ernstoff, M. S., Trautman, T., Hebert, G., Nishida, Y., Davis, C. A., Balzer, J., Reich, S., Schindler, J. and Rudnick, S. A. In vivo biological response to recombinant interferon-gamma during a phase I dose-response trial in patients with metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1990, **8**, 1070-1082.
12. Nagata, S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997, **88**, 355-365.
13. Nunokawa, Y. and Tanaka, S. Interferon-gamma inhibits proliferation of rat vascular smooth muscle cells by nitric oxide generation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992, **188**, 409-415.
14. Orange, J. S., Wolf, S. F. and Biron, C. A. Effects of IL-12 on the response and susceptibility to experimental viral infections. *J. Immunol.* 1994, **152**, 1253-1264.
15. Park, S. Y. and Seol, D. W. Regulation of Akt by EGF-R inhibitors, a possible mechanism of EGF-R inhibitor-enhanced TRAIL-induced apoptosis. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 2002, **295**, 515-518.
16. Park, S. Y., Billiar, T. R. and Seol, D. W. Hypoxia Inhibition of Apoptosis Induced by Tumor Necrosis Factor- Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, **291**, 150-153.
17. Park, S. Y., Billiar, T. R. and Seol, D. W. IFN- γ Inhibition of TRAIL-Induced IAP-2 Upregulation, a Possible Mechanism of IFN- γ -Enhanced TRAIL-Induced Apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, **291**, 233-236.
18. Pitti, R. M., Marsters, S. A., Ruppert, S., Donahue, C. J., Moore, A. and Ashkenazi, A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J. Biol. Chem.* 1996, **271**, 12687-12690.
19. Sasagawa, T., Hlaing, M. and Akaike, T. Synergistic

- induction of apoptosis in murine hepatoma Hepa1-6 cells by IFN-gamma and TNF-alpha. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2000, **272**, 674-680.
20. **Seol, D. W. and Billiar, T. R.** Cysteine 230 modulates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand activity. *Cancer Res.* 2000, **60**, 3152-3154.
 21. **Seol, D. W., Li, J., Seol, M. H., Park, S. Y., Talanian, R. V. and Billiar, T. R.** Signaling events triggered by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): caspase-8 is required for TRAIL-induced apoptosis. *Cancer Res.* 2001, **61**, 1138-1143.
 22. **Shin, E. C., Shin, W. C., Choi, Y., Kim, H., Park, J. H. and Kim, S. J.** Effect of interferon-gamma on the susceptibility to Fas (CD95/APO-1)-mediated cell death in human hepatoma cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2001, **50**, 23-30.
 23. **Suk, K., Kim, S., Kim, Y. H., Kim, K. A., Chang, I., Yagita, H., Shong, M. and Lee, M. S.** IFN-gamma/TNF-alpha synergism as the final effector in autoimmune diabetes: a key role for STAT1/IFN regulatory factor-1 pathway in pancreatic beta cell death. *J. Immunol.* 2001, **166**, 4481-4489.
 24. **Tanaka, N., Ishihara, M. and Taniguchi, T.** Suppression of c-myc or fosB-induced cell transformation by the transcription factor IRF-1. *Cancer Lett.* 1994, **83**, 191-196.
 25. **Tanaka, N., Ishihara, M., Kitagawa, M., Harada, H., Kimura, T., Matsuyama, T., Lamphier, M. S., Aizawa, S., Mak, T. W. and Taniguchi, T.** Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1. *Cell.* 1994, **77**, 829-839.
 26. **Tanaka, N., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Nozawa, H., Matsuyama, T., Mak, T. W., Aizawa, S., Tokino, T., Oren, M. and Taniguchi, T.** Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature.* 1996, **382**, 816-818.
 27. **Tamura, T., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Tanaka, N., Oishi, I., Aizawa, S., Matsuyama, T., Mak, T. W., Taki, S. and Taniguchi, T.** An IRF-1-dependent pathway of DNA damage-induced apoptosis in mitogen-activated T lymphocytes. *Nature.* 1995, **376**, 596-599.
 28. **Tamura, T., Ishihara, M., Lamphier, M. S., Tanaka, N., Oishi, I., Aizawa, S., Matsuyama, T., Mak, T. W., Taki, S. and Taniguchi, T.** DNA damage-induced apoptosis and Ice gene induction in mitogenically activated T lymphocytes require IRF-1. *Leukemia.* 1997, **11 Suppl 3**, 439-440.
 29. **Taniguchi, T., Lamphier, M. S. and Tanaka, N.** IRF-1: the transcription factor linking the interferon response and oncogenesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1997, **1333**, M9-17.
 30. **Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., Sutherland, G. R., Smith, T. D., Rauch, C. and Smith, C. A.** Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995, **3**, 673-682.
 31. **Yang, X., Merchant, M. S., Romero, M. E., Tsokos, M., Wexler, L. H., Kontny, U., Mackall, C. L. and Thiele, C. J.** Induction of caspase 8 by interferon gamma renders some neuroblastoma (NB) cells sensitive to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) but reveals that a lack of membrane TR1/TR2 also contributes to TRAIL resistance in NB. *Cancer Res.* 2003, **63**, 1122-1129.
 32. **Zhou, Y., Wang, S., Gobl, A. and Oberg, K.** The interferon-alpha regulation of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 has therapeutic implications in carcinoid tumors. *Ann. Oncol.* 2000, **11**, 707-714.