



Apicidin, Histone Deacetylase Inhibitor에 의한 Human Promyelocytic U937 세포고사

정은현^{1,2} · 박찬희¹ · 임창인¹ · 이황희² · 송훈섭¹ · 염성섭¹ · 정은배¹ · 이병곤¹ · 김영훈¹ · 박래길¹

¹원광대학교 의과대학 미생물학 교실 및 전정와우기관 연구센터

²전남대학교 생물학과 분자세포생리학교실

Apicidin-Mediated Apoptosis Signaling in Human Promyelocytic Leukemia U937 Cells

Eun-Hynu Jung^{1,2}, Channy Park¹, Chang-In Lim¹, Hwanghee Blaise Lee², Hoon-Seob Song¹, Seong-Seob Yeom¹, Eun-Bae Jung¹, Byeong-Gon Lee¹, Young-Hoon Kim¹ and Raekil Park¹

¹Department of Microbiology & VestibuloCochlear Research Center,
Wonkwang University School of Medicine, Iksan, Jeonbuk 570-749 Korea

²Department of Molecular Cell Physiology, Chonnam National University School of Biology,
Gwangju 500-757, Korea

Received July 7, 2003; Accepted July 28, 2003

ABSTRACT. Apicidin, a histone-deacetylase inhibitor, has been successfully used to inhibit the growth of cancer cells. In this study, the apoptotic potential and mechanistic insights of apicidin were investigated in human myeloid leukemia U937 cells. Treatment of U937 cells with apicidin resulted in a decrease of cell viability with apoptotic characteristics, including chromatin condensation and ladder-pattern fragmentation of genomic DNA. Apicidin converted the procaspase-3 protease to catalytically active effector protease, resulting in subsequent cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) and inhibitor of caspase-activated deoxyribonuclease (ICAD). In addition, apicidin induced the activation of caspase-9 protease and the cytosolic release of mitochondrial cytochrome c with mitochondrial membrane potential transition. Moreover, apicidin transiently increased the expression of Fas and Fas ligand proteins. Taken together, the results suggest that apicidin induces apoptosis of U937 cells through activation of intrinsic caspase cascades and Fas/FasL system with mitochondrial dysfunction.

Keywords: Apicidin, U937, Apoptosis.

서 론

히스톤(histone)의 아세틸화에 의한 염색체 구조 변화는 여러 유전자의 발현조절에 대단히 중요하다. 세포 내에서 히스톤의 아미노 말단에 존재하는 4개 리신 잔기(lysine residue)의 양전하는 아세틸화에 의하여 중화되거나, 탈아세틸화(deacetylation)로 다시 전하를 가지는 가역반응이 존재하는데, 이러한 반응을 조절하는 histone

acetyltransferase(HAT)와 histone deacetylase(HDAC)는 여러 유전자의 발현조절 기전에 관여한다(Csordas, 1990; Grunstein, 1997). 히스톤 아세틸화에 의한 유전자 발현 조절은 질병 관련 여러 유전자의 활성과 연관되어 있으며, 특히 HDAC는 저산소증 및 세포의 종양화 등의 환경조건에서 발현이 증가하여 세포 증식 억제인자의 발현을 억제하여 세포의 증식을 촉진하는 세포의 성장과 분화에 중요 조절 인자로 인식되고 있다(Wolffe, 1996). 또한, HDAC 저해제는 세포의 증식과 혈관 신생을 억제하는 효과(Kwon 등, 1998)와 암세포 세포고사의 유도함이 보고되어 있다(Glick 등, 1999; Hoshikawa 등, 1994).
진균의 대사산물인 apicidin, [cyclo(N-O-methyl-L-

Correspondence to: Raekil Park, Department of Microbiology & VestibuloCochlear Research Center, Wonkwang University School of Medicine, 344-2 Shinyong-dong, Iksan, Jeonbuk 570-749 Korea
E-mail: rkpark@wonkwang.ac.kr

tryptophanyl-L-isoleucinyl-D-pipecilinyll-L-2-amino-8-oxodecanoyl))은 HDAC 저해제로 알려져 있다. Apicidin은 새로운 cyclic tetrapeptide로 다양한 암 세포주의 증식을 억제하며(Han 등, 2000; Kwon 등, 2002), 또한 프로토조아(protozoa)에 대한 항균 기능도 알려져 있다(Darkin-Rattray 등, 1996). Apicidin의 세포독성 작용에 대한 정확한 기전은 분명하지 않으나, 아세틸화된 히스톤 H4의 축적 그리고 세포 형태와 세포주기에 중요한 역할을 하는 유전자의 선택적 발현을 통해 세포성장을 억제하여 세포고사를 유도할 수 있는 가능성들이 제시되고 있다.

세포고사(apoptosis)는 다세포 생물의 정상적인 기관 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 계획된 세포의 죽음(programmed cell death)으로써 빠른 세포 탈수현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질내의 칼슘 농도의 증가, 염색체의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성이 동반된다(Cohen, 1993). 세포고사 신호전달계는 Fas와 TNF 같은 세포막 단백질을 통한 신호전달계와 미토콘드리아를 통한 신호전달계로 구분된다. 세포막 단백질을 통한 신호전달계는 Fas와 같은 세포막 수용체가 caspase-8 protease의 활성화를 유도하면(Hu 등, 1997), 활성화된 caspase-8 protease는 Bid 단백질을 절단하며 절단된 Bid(truncated Bid: t-Bid)가 미토콘드리아로 이동하여 미토콘드리아 막 전위차를 변화시켜서 cytochrome c 방출과 이로 인한 caspase-9 protease의 활성화를 유도한다(Li 등, 1997). 미토콘드리아에서 세포질로 방출되어지는 cytochrome c는 apoptotic protease activation factor-1(Apaf-1)과 결합하여 procaspase-9 protease를 활성화 형태로 전환시키고, 이 효소는 하부의 caspase-3 protease를 활성화하여 세포고사가 유도된다고 알려져 있다(Cryns와 Yuan, 1998; Zou 등, 1999).

최근 apicidin에 의한 세포고사 기전에 관한 보고가 있으나, 세포고사의 신호전달 경로 및 기전에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 apicidin에 의한 U937 백혈구 암세포의 세포고사 기전 및 신호전달 경로를 연구하였다.

재료 및 방법

재료

세포주: 사람 전골수성 백혈구 세포주인 U937은 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입, 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

시약 및 기기: RPMI1640, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) 제품을 사용하였다. Methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT), biconchonic acid(BCA), Hoechst 33342, dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sigma사(St. Louis, MI, USA)에서, JC-1은 Molecular probe사(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. Genomic DNA isolation kit는 Promega사(Madison, WI, USA)제품을 사용하였으며, caspase-3 protease의 기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methyl-coumarin(AMC) 및 caspase-9 protease의 기질인 Ac-LEHD-7-amino-4-trifluorometer(AFC)는 Calbiochem 사(San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다. Caspase-3 protease, poly(ADP-ribose) polymerase(PARP), Fas 및 FasL 등에 대한 항체는 Santa Cruz사(Santa Cruz, CA, USA)제품을 사용하였다. Apicidin은 BioVision사(Mountain View, CA, USA)에서 구입하였다.

방법

U937 세포주 배양 및 시약처리: U937는 CO₂ 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 apicidin을 처리한 뒤 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다. Apicidin은 1 mg/ml로 DMSO에 녹여 -70°C에 보관하였으며, RPMI 1640 배지에 희석하여 사용하였다.

세포 생존율 측정: 세포 생존율은 MTT 분석법으로 측정하였다. CO₂ 세포배양기 안에서 세포 배양판(24-well plate)에 1 ml씩 분주하여 3시간 이상 안정화된 세포(1×10⁵ cells/ml)는 각각의 실험조건에 따라 처리한 후에 배양액 부피의 1/10 MTT 용액(1 µg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응하였다. SDS(10%)가 포함된 0.01 N HCl 용액을 100 µl/well 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음, 96 well용 분광광도계(THERMO max, U.S.A)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

DNA 추출 및 전기영동: DNA 분절현상을 조사하기 위해 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit(Promega Co.)를 이용하였다. DNA 10 µg을 1.5% agarose gel에서 전기영동을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV 등을 이용하여 DNA 분절을 관찰하였다.

Hoechst를 이용한 핵 염색: Apicidin을 처리한 U937 세포(1×10⁶)는 포집하여 냉 phosphate-buffered saline

(PBS, pH 7.4)로 세척한 후 cytospin(Shandon Southern Products Ltd., England)으로 600 rpm, 3분간 회전 분사하여 슬라이드 글라스에 부착시켰다. 슬라이드 글라스에 부착된 세포는 4% formaldehyde 용액으로 고정, PBS로 세척하여 10 μ M Hoechst 33342로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)을 이용하여 DNA의 분절현상을 관찰하였다.

Caspase계 cysteine protease 활성도 측정: Apicidin을 처리한 U937 세포는 냉 파쇄완충용액(1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)으로 15분 파쇄하고 13,000 rpm으로 15분 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액은 BCA kit를 이용하여 단백질을 정량한 후, 분석 완충용액(100 mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 1.0% CHAPS, 2 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)에 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 반응시켰다. Caspase-3 protease의 효소적 활성은 형광기질인 Ac-DEVD-AMC를 50 μ M 사용하였으며, 이 기질의 proteolytic cleavage에 의하여 생성된 형광의 세기를 형광 분광광도계(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA, U.S.A.)로 측정하여 caspase protease의 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 380/460 nm(excitation/emission)를 사용하였다. caspase-9 protease 활성은 기질로 Ac-LEHD-AFC을 50 μ M 사용하였으며, 이때의 파장은 400/505 nm이었다.

Western blot assay: Apicidin을 처리한 U937 세포는 포집, 냉 PBS로 2회 세척한 후 파쇄용액(50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)과 4°C에서 30분 파쇄하였다. 원심 분리(13,000 rpm, 20분)하여 얻은 세포 파쇄액의 단백질은 BCA kit를 이용하여 정량하였다. 세포 파쇄액(단백질 200 μ g)은 동량의 2× sample buffer와 혼합하여 100°C에서 3분간 가열한 후, 12.5% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 실온에서 semi-dry 방법으로 단위 면적 당 0.8 mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시킨 후에 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응하였다. Anti-caspase-3 protease, anti-PARP, anti-ICAD 및 anti-cytochrome c에 대한 항체는 0.05%(v/v)의 tween-20이 함유된 Tris-buffered saline에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. Anti-PARP, anti-ICAD 및 anti-Fas는 이차항체인 anti-

rabbit IgG conjugated HRP 항체와 상온에서 1시간 반응시키고, anti-caspase-3 protease는 이차항체인 anti-mouse IgG conjugated HRP 항체와 상온에서 1시간 반응시킨 후, enhanced chemiluminescence(ECL) kit (Amersham, England)를 이용하여 필름에 노출시켰다.

미토콘드리아 막전위차 측정: 미토콘드리아 막전위(transmembrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 JC-1 염색을 시행하였다. 세포를 PBS로 2회 세척한 후 10 μ g/ml JC-1이 포함된 RPMI 1640 배지에 희석하여 CO₂ 세포배양기에 20분 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하고 cytospin으로 600 rpm, 3분 회전 분사하여 슬라이드 글라스에 부착시켰다. 슬라이드 글라스에 부착된 세포는 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

통계 처리: 표시된 결과는 4번 이상의 독립적인 실험 결과이며, 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하였으며, $p < 0.05$ 이하를 통계적 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

Apicidin에 의한 U937 세포독성 및 핵의 분절현상

U937 세포의 생존율에 대한 apicidin의 효과는 MTT 방법으로 조사하였다. U937 세포의 생존율은 다양한 농도의 apicidin 처리시, 농도의존적인 세포죽음이 관찰되었으며(미발표성적), 이때 apicidin(1 μ g/ml)은 처리시간에 비례하여 세포 생존율의 현저한 감소를 유도하였으며, 처리 24시간 후에 40%, 36시간 후에 50% 그리고 48시간 후에는 60% 이상 감소하였다(Fig. 1A).

Apicidin에 의한 세포 생존율의 감소가 세포고사 기전에 의하여 매개될 가능성이 제시되었기 때문에(Han 등, 2000; Kwon 등, 2002), 세포고사 현상의 형태학적 특징의 하나인 핵산의 분절현상을 관찰하기 위하여 agarose gel electrophoresis를 시행하였다(Fig. 1B). 다양한 농도의 apicidin을 36시간 처리한 U937 세포의 genomic DNA는 0.5 μ g/ml의 농도에서부터 사다리 모양의 핵산 분절이 관찰되었으며 처리 농도에 비례하여 더욱 현저한 증가를 나타냈다(Fig. 1B). 또한, apicidin에 의한 세포고사 현상의 형태학적 특징을 재확인하기 위하여 U937 세포의 DNA 분절을 Hoechst 염색으로 확인하였다. 정상 대조군 U937 세포핵은 타원형 온전한 형태의 균질한 형광 염색을 나타냈으나, apicidin(1 μ g/ml)을 24시간 처리한 실험군에서는 U937 세포의 핵이 여러 조각으로 분절된 형광 절편을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C). 이상의 결과에서 apicidin에 의한 U937 세포독성은 세포고사 기전에 의하여 매개됨을 확인할 수 있었다.

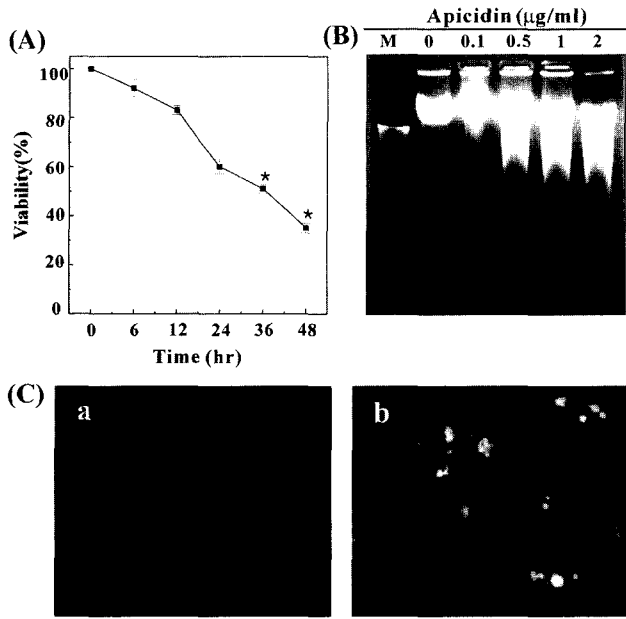


Fig. 1. Apicidin induced the death of U937 cells and nuclear fragmentation in a dose-dependent manner. A, Cells were treated with 1 µg/ml apicidin for various periods and then, the viability was determined by MTT assay. Data represent the mean±S.D. of quadruplicates. * indicate significant difference at $p < 0.05$ levels when compared with the control group. B, Cells were treated with various concentrations of apicidin for 36 hr and DNA fragmentation was determined by 1.5% agarose-gel electrophoresis. Extracted DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light. C, Cells were treated with 1 µg/ml apicidin for 24 hr, stained with Hoechst dye 33342, and observed under fluorescence microscope. (a), control cells. (b), apicidin-treated cells.

Apicidin에 의한 U937 세포 caspase-3 protease의 활성화

Apicidin에 의한 U937 세포독성이 세포고사의 특징적인 현상인 핵산 분절을 유도하였기 때문에 그 작용기전을 확인하기 위하여 caspase family cysteine protease의 활성을 조사하였다. U937 세포에 1 µg/ml apicidin을 48 시간 동안 처리하여 caspase-3 protease의 효소적 활성과 이 효소의 세포내 기질의 발현 정도를 Western blot assay로 확인하였다. Caspase-3 protease 활성은 apicidin 처리 6시간부터 증가하기 시작하여 24시간에 최고치(대조군에 비교하여 4배 이상)로 증가하였으며, 이후로 점차 감소하여 48시간 실험군은 정상 대조군 수준으로 복귀하였다(Fig. 2A).

또한 caspase-3 protease의 세포내 활성을 확인하기 위하여 procaspase-3 protease, PARP 및 ICAD의 발현을 Western blot 분석하였다. Apicidin 처리 24시간 이후부터 U937 세포의 35 kDa procaspase-3 protease는

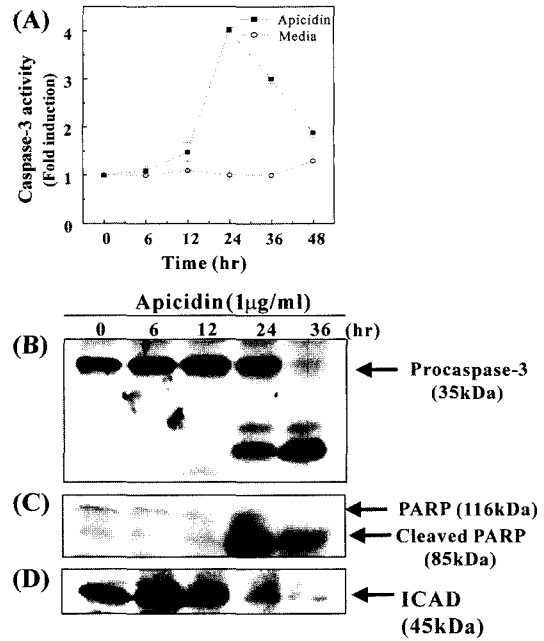


Fig. 2. Apicidin increased the catalytic activity of caspase-3 protease of U937 cells in a time-dependent manner. Cells were treated with 1 µg/ml apicidin for the indicated periods. A, Lysate was incubated with DEVD-AMC to measure the activity of caspase-3 protease. Data represent the mean±S.D. of quadruplicates with statistic significance difference at $p < 0.05$. The equal amounts of protein from cell lysate were subjected on 12% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-procaspase-3 protease (B), anti-PARP (C), anti-ICAD (D) antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL.

17 및 10 kDa으로 분절됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). Caspase-3 protease의 중요한 세포내 기질인 PARP 단백질은 116 kDa에서 85 kDa으로 분절되었으며, 또 다른 기질인 ICAD는 45 kDa이 분해되어 세포내 발현이 현저히 감소되어 있었다(Fig. 2C 및 D). 이상의 결과는 apicidin이 중요 세포고사 신호전달 분자인 caspase-3 protease의 활성을 통하여 U937 세포주의 세포고사를 유도하였다고 판단된다.

Apicidin에 의한 미토콘드리아 기능 변화와 caspase-9 protease의 활성화

Caspase cascades 세포고사 신호전달계에서 caspase-3 protease의 활성은 세포막 수용체인 Fas-L/Fas와 기능적으로 결합된 caspase-8 protease 혹은 미토콘드리아와 연관된 caspase-9 protease의 활성에 의하여 조절된다(Hu 등, 1997; Li 등 1997). 그래서, apicidin에 의한 U937 세포고사에서 미토콘드리아의 관여 여부를 확인하기 위하여 미토콘드리아 막전위차 변화(mitochondria

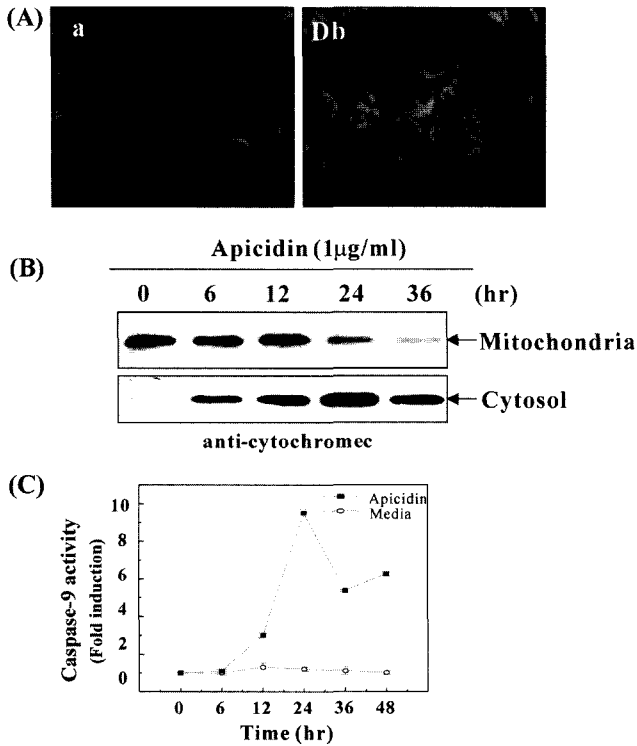


Fig. 3. Apicidin induced the activation of caspase-9 protease with mitochondrial dysfunction in U937 cells. Cells were treated with 1 µg/ml apicidin for 24 hr (A) or the indicated periods (B, C). A, Apicidin-treated cells were stained with 10 µg/ml of JC-1 (10×40) and visualized the mitochondrial membrane potential transition under fluorescent microscope. (a), control cells. (b), apicidin-treated cells. B, Lysate was fractionated into mitochondrial and cytosolic proteins which was subjected on 15% SDS-PAGE to probe cytochrome c. C, Lysate was incubated with DEVD-AMC to measure the activity of caspase-9 protease. Data represent the mean±S.D. of quadruplicates with statistic significance difference at $p < 0.05$.

membrane potential transition)를 확인하기 위하여 JC-1으로 세포내 미토콘드리아를 염색한 후 형광현미경을 이용하여 관찰하였다(Fig. 3A). 그 결과 정상 대조군 U937 세포의 미토콘드리아는 오렌지 형광이 세포질에 점상 형태(punctuated form)로 분포되었으나, apicidin(1 µg/ml)을 24시간 처리한 세포의 미토콘드리아는 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미만형(diffuse form)으로 산재하는 녹색 형광으로 관찰되었다.

미토콘드리아 막전위차 변화는 cytochrome c의 세포질 내로 방출을 유도하여 cytochrome c/Apaf-1/dATP와 함께 복합체인 apoptosome를 형성하여 caspase-9 protease의 활성화를 유도한다(Zou 등, 1999). 본 연구에서 apicidin에 의한 U937 세포의 미토콘드리아 막전위차 변화를 확인하였기 때문에 cytochrome c의 세포질 내로

이동을 Western blot으로 조사하였다(Fig. 3B). Apicidin (1 µg/ml) 처리는 U937 세포의 세포질 cytochrome c의 발현 양을 처리 시간에 비례하여 증가시켰으며 처리 후 24시간에 최고 발현을 나타냈다. 이러한 결과는 apicidin이 U937 세포 caspase-9 protease의 활성에 영향을 미칠 가능성을 의미하였기 때문에 이를 확인하기 U937 세포에 1 µg/ml apicidin을 48시간 동안 처리하여 caspase-9 protease의 효소적 활성을 조사하였다(Fig. 3C). Caspase-9 protease 활성은 apicidin 처리 6시간부터 증가하기 시작하여 24시간에 최고치(대조군에 비교하여 9.5배)로 증가하였으며, 이후로 점차 감소하였다. 이상의 결과에서 apicidin에 의한 U937 세포의 미토콘드리아 기능 변화는 caspase-9 protease의 활성화시켰으며, 활성화된 이 효소가 caspase-3 protease를 활성화를 유도하였다고 판단된다.

Apicidin에 의한 U937 세포 Fas 수용체와 FasL 단백질 발현 증가

세포막 단백질을 통한 세포고사 기전에서 TNF family에 속하는 Fas는 그 리간드인 FasL와 결합하여 caspase-8 protease를 활성화시킨다(Fulda 등, 1997). 그래서 본 연구에서도 apicidin에 의한 U937 세포의 고사현상이 Fas/FasL 수용체계를 통하여 매개되는지를 확인하기 위하여 이들 단백질의 발현을 Western blot 분석으로 조사하였다. U937 세포에서 Fas 단백질의 발현은 apicidin(1 µg/ml)은 처리시간에 의존적으로 증가하여 처리 6시간에 나타나기 시작하여 36시간 후에도 관찰할 수 있었다(Fig.

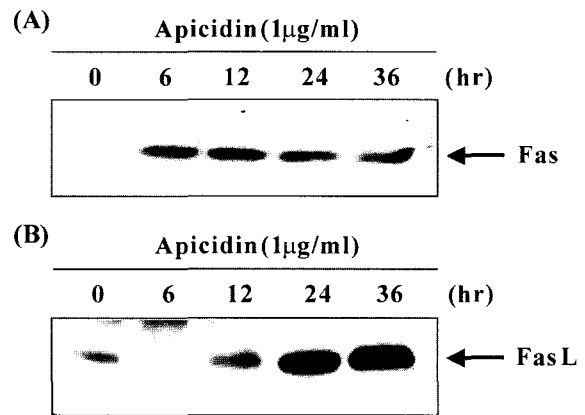


Fig. 4. Apicidin increased the expression of Fas and FasL proteins in U937 cells. Cells were treated with 1 µg/ml apicidin for various periods. The equal amounts of protein from lysate were subjected on 12% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-Fas (A) and anti-FasL (B) antibodies. The immunoreactive signals were visualized by ECL.

4A). 또한 apicidin은 FasL 발현을 유도하여 24시간 및 36시간 실험군에서 최대로 확인되었다(Fig. 4B). 그러나 U937 세포에서 apicidin이 Fas/FasL 하방에 위치하는 caspase-8 protease의 효소적 활성화에 대한 영향은 관찰할 수 없었다(미발표 성적). 이상의 결과는 apicidin에 의한 U937 세포고사가 Fas/FasL 신호전달계를 경유할 가능성을 제시하고 있다.

고 찰

진핵세포 DNA는 히스톤 octamer(H2A, H2B, H3, H4)인 염기성 단백질에 2회 감겨 있으면서 좁은 핵내 공간에 압축, 저장되어 있다. 압축된 DNA의 유전정보를 활용하기 위하여 세포는 염색체 구조를 변형, 조절할 수 있는 기전이 있으리라 예상되어 왔다. 최근에, nucleosome 구조를 변형하여 전사인자와 DNA와의 접근성을 증가시키는 chromatin remodeling factor와 히스톤의 아세틸화 상태를 조절하는 histone acetyltransferases(HAT) 및 histone deacetylases(HDAC)가 중요한 유전자 발현 조절인자로 밝혀졌다(Csordas, 1990; Grunstein, 1997).

히스톤의 아세틸화를 통한 chromatin구조 변화는 질병 관련 특정 유전자 발현조절에 깊은 연관이 있으며, 실제로 HAT 활성을 가지는 전사 활성보조인자인 CREB(cAMP-response element binding protein)는 안면기형, 심장 질환 및 악성종양의 유발 및 Rubinstein-Taybi증후군 등의 원인 유전자로 알려져 있다(Petrij 등, 1995). 세포 증식의 촉진 기능이 있는 HDAC은 유전자 발현 억제인자로서의 역할을 이해하는데 중요한 연구대상일 뿐만 아니라, 새로운 항암제 개발의 표적분자로서도 매우 중요하다. HDAC 저해제인 sodium n-butyrate, trapoxin B, trichostatin A(TSA), depudecin, FR901288, oxamflatin, 및 MS-27-257 등은 히스톤의 아세틸화를 유도하여, 세포의 증식을 억제하는 항암 활성을 나타낸다고 알려져 있다(Glick 등, 1999; Han 등, 2000; Hoshikawa, 1994; Kwon 등, 1998). 현재 동물실험에서 뛰어난 항암 활성을 나타내는 HDAC 저해제, FR901288과 MS-275는 미국 국립암연구소(NCI)에서 임상실험이 진행중이다.

최근 HDAC 저해제로 알려진 apicidin에 의한 세포고사 기전에 관한 보고가 있으나(Han 등, 2000; Kwon 등, 2002), 그 정확한 세포고사의 신호전달 경로 및 기전에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 apicidin에 의한 세포고사 기전 및 신호전달 경로를 조사하기 위하여 백혈병 세포주, U937 세포에서 생존율, caspase protease 활성화도, 미토콘드리아 기능, 그리고 Fas와 FasL 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 apicidin은

U937 세포에서 시간 의존적으로 세포 생존율을 감소시켰으며, 세포고사의 특징인 전형적인 사다리 모양의 DNA 분절, 염색사 응축 및 핵 분절이 관찰되었다.

Caspase family cysteine protease는 염증반응 및 세포고사 유도에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서, 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화된다(Alnemri, 1997). Caspase-3 protease는 caspase cascade의 최하방에 위치하며, 여러 세포고사 신호경로가 공통으로 경유하는 중요한 효소이다. 활성화된 caspase-3 protease는 PARP, DNA-dependent protein kinase(DNA-PK), actin, fodrin, lamin, 및 ICAD 등의 세포내 기질을 절단하는 효소로서, 이들 기질의 손상은 결과적으로 세포핵의 분절을 야기한다(Kaufmann 등, 1993). PARP는 caspase-3 protease의 직접적인 기질로서 caspase 활성화의 척도가 되고 있으며, ICAD는 CAD와 결합하여 chaperone을 형성하면서 caspase의 활성화에 의한 DNase의 활성을 억제하는데 세포고사 초기에 활성화된 caspase protease가 ICAD를 1차적으로 분절시켜 CAD가 자유롭게 핵으로 이동하여 chromosomal DNA를 분해할 수 있다(Enari 등, 1998; Sakahira 등, 1998). 본 연구에서 apicidin은 U937 세포의 caspase-3 protease의 효소적 활성을 증가시켜 세포 내 기질인 PARP와 ICAD의 분절을 초래하였다.

세포고사의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 미토콘드리아에 대한 최근 보고에 의하면 미토콘드리아의 기능 조절은 세포질로 방출되는 cytochrome c와 같이 caspase activators, 막전위차의 변화 그리고 Bcl-2 family 단백질 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(Desagher와 Martinou, 2000; Green과 Reed, 1998). 특히 미토콘드리아에서 세포질로 방출되어지는 cytochrome c는 Bcl-2 family 단백질에 의해 조절되어지는데, 세포질 cytochrome c는 Apaf-1, dATP와 결합하며, caspase-1 protease, caspase-2 protease, caspase-9 protease 그리고 caspase-8 protease의 caspase recruitment domain(CARD)과의 결합을 통해 활성화되어 caspase-3 protease의 활성화를 유도한다. Apicidin에 의한 U937 세포고사 현상에서도 미토콘드리아의 변화를 관찰할 수 있었다. Apicidin은 미토콘드리아의 막전위차 변화와 세포질내로의 cytochrome c의 방출을 유도하였다. 이는 apicidin이 미토콘드리아를 경유한 세포고사 신호를 caspase-9 protease에 전달하였으리라 추정되었으며, 실제로 본 연구에서 caspase-9 protease의 효소적 활성이 apicidin에 의해 현저히 증가하였다.

세포고사 신호전달 경로 중의 하나인 death receptor 수용체는 TNF/nerve growth factor(NGF) receptor family

군에 포함되며 수용체의 세포질 도메인(cytoplasmic domain)에 존재하는 death domain(DD)를 통해 세포고사 신호를 전달한다. 현재 TNF receptor-1, CD95(Fas/APO-1) 및 TRAIL 1/2와 같은 death receptor가 알려져 있다 (Ashkenazi와 Dixit, 1998; Schulze-Osthoff, 1998). 이들 수용체는 리간드와 결합한 수용체 다중화 형태로 활성화되어 세포질에 존재하는 adaptor 단백질과 결합하게 된다. 이들 adaptor 단백질은 caspase protease 같은 다양한 세포사멸 신호전달 체계를 활성화시키는 것으로 알려져 있다(Fulda 등, 1997). 본 연구에서 apicidin은 U937 세포고사에서 Fas와 FasL의 발현을 증가시켰지만 Fas/FasL 수용체와 연결된 caspase-8 protein의 활성화는 확인할 수 없었다.

이상의 결과를 종합하면 apicidin은 U937 세포의 미토콘드리아를 경유하는 intrinsic caspase cascade의 활성화와 Fas/FasL 수용체계를 통하여 세포고사를 유도하였음을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지원 "나노기술기반의 차세대 사업화 핵심요소기술개발" 사업(00014876)의 지원을 받아 수행하였다.

참고문헌

- Alnemri, E.S. (1997): Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases, *J. Cell Biochem.*, **64**, 33-42.
- Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. (1998): Death receptors: signaling and modulation, *Science*, **281**, 1305-1308.
- Cohen, J.J. (1993): Apoptosis, *Immunol Today*, **14**, 126-130.
- Cryns, V. and Yuan, J. (1998): Proteases to die for, *Genes Dev.*, **12**, 1551-1570.
- Csordas, A. (1990): On the biological role of histone acetylation, *Biochem. J.*, **265**, 23-38.
- Darkin-Ratray, S.J., Gurnett, A.M., Myers, R.W., Dulski, P.M., Crumley, T.M., Allocco, J.J., Cannova, C., Meinke, P.T., Colletti, S.L. and Bednarek, M.A. (1996): Apicidin: a novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 13143-13147.
- Desagher, S. and Martinou, J.C. (2000): Mitochondria as the central control point of apoptosis, *Trends Cell Biol.*, **10**, 369-377.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A. and Nagata, S. (1998): A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD, *Nature*, **391**, 43-50.
- Fulda, S., Sieverts, H., Friesen, C., Herr, I. and Debatin, K.M. (1997): The CD95 (APO-1/Fas) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells, *Cancer Res.*, **57**, 3823-3829.
- Glick, R.D., Swendeman, S.L., Coffey, D.C., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Richon, V.M. and La Quaglia, M.P. (1999): Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma, *Cancer Res.*, **59**, 4392-4399.
- Green, D.R. and Reed, J.C. (1998): Mitochondria and apoptosis, *Science*, **281**, 1309-1312.
- Grunstein, M. (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription, *Nature*, **389**, 349-352.
- Han, J.W., Ahn, S.H., Park, S.H., Wang, S.Y., Bae, G.U., Seo, D.W., Kwon, H.K., Hong, S., Lee, H.Y., Lee, Y.W. and Lee, H.W. (2000): Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21^{WAF1/CIP1} and gelsolin, *Cancer Res.*, **60**, 6068-6074.
- Hoshikawa, Y., Kwon, H.J., Yoshida, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1994): Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines, *Exp. Cell Res.*, **214**, 189-197.
- Hu, S., Vincenz, C., Ni, J., Gentz, R. and Dixit, V.M. (1997): I-FLICE, a novel inhibitor of tumor necrosis factor receptor-1- and CD-95-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.*, **272**, 17255-17257.
- Kaufmann, S.H., Desnoyers, S., Ottaviano, Y., Davidson, N.E. and Poirier, G.G. (1993): Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis, *Cancer Res.*, **53**, 3976-3985.
- Kwon, H.J., Owa, T., Hassig, C.A., Shimada, J. and Schreiber, S.L. (1998): Depudecin induces morphological reversion of transformed fibroblasts via the inhibition of histone deacetylase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 3356-3361.
- Kwon, S.H., Ahn, S.H., Kim, Y.K., Bae, G.U., Yoon, J.W., Hong, S., Lee, H.Y., Lee, Y.W., Lee, H.W. and Han, J.W. (2002): Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells, *J. Biol. Chem.*, **277**, 2073-2080.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S. and Wang, X. (1997): Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade, *Cell*, **91**, 479-489.
- Petrij, F., Giles, R.H., Dauwerse, H.G., Saris, J.J., Hennekam, R.C., Masuno, M., Tommerup, N., van Ommen, G.J., Goodman, R.H. and Peters, D.J. (1995): Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP, *Nature*, **376**, 348-51.
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998): Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis, *Nature*, **391**, 96-99.
- Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. and Peter, M.E. (1998): Apoptosis signaling by death receptors, *Eur. J. Biochem.*, **254**, 439-59.
- Wolffe, A.P. (1996): Histone deacetylase: a regulator of transcription, *Science*, **272**, 371-372.
- Zou, H., Li, Y., Liu, X. and Wang, X. (1999): An APAF-1 : Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9, *J. Biol. Chem.*, **274**, 11549-11556.