

Hsp90의 저해제인 17-AAG의 처리에 따른 소 수정란의 배발달 및 세포사멸 양상

홍주희 · 민성훈 · 이에녹 · 손형훈 · 박흠대 · 구덕본[†]

대구대학교 공과대학 생명공학과

Hsp90 Inhibitor, 17-AAG, Affects Early Embryonic Development and Apoptosis of Bovine Embryos

Joo-Hee Hong, Sung-Hun Min, Enok Lee, Hyeong-Hoon Son, Humdai Park and Deog-Bon Koo[†]

Department of Biotechnology, College of Engineering, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

ABSTRACT

Heat shock protein 90 (Hsp90) is ATPase-directed molecular chaperon and affects survival of several cells. In our previous study, inhibitory effect of Hsp90 by inducing cell cycle arrest and apoptosis in the pig embryonic and primary cells was reported. However, its role during early bovine embryonic development is not sufficient. In this study, we traced the effects of Hsp90 inhibitor, 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), on early bovine embryonic development. We also investigated several indicators of developmental potential, including structural integrity, gene expression (apoptosis-related genes), and apoptosis, which are affected by 17-AAG. Bovine embryos were cultured in the CR1-aa medium with or without 17-AAG for 7 days. In result, significant differences in developmental potential were detected between the embryos that were cultured with or without 17-AAG (33.1±9.6 vs 21.7± 8.3%). The structural integrity of the blastocysts was examined by differential staining. Blastocysts from the dbcAMP- treated group had higher numbers of ICM, TE, and total cells than those from the untreated group. Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling (TUNEL) showed that the number of containing fragmented DNA at the blastocyst stage increased in the 17-AAG treated group compared with control (11.2 vs 3.9, respectively). Blastocysts that developed in the 17-AAG treated group had low structural integrity and high apoptotic nuclei than those of the untreated control, resulting in decrease the embryonic qualities of preimplantation bovine blastocysts. The mRNA expression of the pro-apoptotic gene (Bax) increased in 17-AAG treated group, whereas expression of the anti-apoptotic gene (Bcl-XL) decreased. In conclusion, Hsp90 also appears to play a direct role in bovine early embryo developmental competence including structural integrity of blastocysts. Also, these results indicate that Hsp90 is closely associated with apoptosis-related genes expression in developing bovine embryos.

(Key words : Hsp90, 17-AAG, Embryonic developmental, Apoptosis, Bovine embryo)

서론

Heat shock protein 90(Hsp90)은 90 kDa 크기를 가지며, 세포 내에 가장 많이 존재하는 샤페론 중 하나로 Src, VEGF와 같은 클라이언트 단백질들의 접힘과 안정화, 복합체 형성 등에 관여하고 있을 뿐만 아니라(Pearl 등, 2008) 전사 조절 인자들과 신호 전달 물질 등의 활성을 조절하여 세포의 성장, 분화, 생존에 연관되어 있다. Hsp-90은 암세포에서 정상세포보다 2~10배 더 높은 발현율을 나타내며, 암세포의 생존이나 성장에 중요한 역할을

가진다(Neckers, 2002). Hsp90의 억제제가 암유발 단백질들이 프로테오솜에서 분해되는 것을 유도하며, 암세포 증식과 침윤, 전이 등에 영향을 미쳐 암세포의 발달을 줄일 수 있다(Workman, 2004). 이전 연구에서 Hsp90의 활성 억제제가 암세포 발달을 저해한다는 보고(Taldone 등, 2008)가 있었으며, 이로 인해 효과적인 암 치료제로서 주목 받게 되었다. 그러나 포유동물 생식세포에서 Hsp90의 역할에 대한 연구는 상당히 미흡한 수준이다. 특히 소 수정란의 착상전 배 발달에 있어서 Hsp90 억제제 처리에 의한 다양한 변화 양상에 관한 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

* 논문은 경상북도 농수산기술개발과제, 교육과학기술부 한국연구재단의 기초연구사업(2011-0025698) 및 농촌진흥청 바이오그린21 사업(20070401034017)의 지원을 받아 수행된 연구임.

[†] Corresponding author : Phone: +82-53-850-6557, E-mail: dbkoo@daegu.ac.kr

Hsp90 억제제인 geldanamycin(GA)은 돌연변이 p53과 같은 세포 주기나 세포 사멸의 조절자와 수용체 혹은 비수용체 kinase, 세린/트레오닌 kinase를 포함하는 중요한 단백질들의 불안정화를 야기한다(Supko 등, 1995). 이러한 억제제와 유사한 구조를 가진 benzoquinone ansamycin 계열의 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin(17-AAG)가 치료 목적으로 처음으로 흑색종(melanoma)에 사용되었고(Solit와 Chiosis, 2008), Hsp90 억제 기능을 가진다고 보고되었다(Schulte와 Neckers, 1998). 이 물질은 Hsp90의 복합체의 ATP 결합 부위에 결합됨으로써 ATPase의 기능을 상실시켜 Hsp90의 활성을 억제하게 된다. 이러한 과정으로 인해 Hsp90이 억제되면 스트레스 상황에 놓였을 때 세포내의 단백질 접힘과 분해과정에 영향을 미치게 되어 결과적으로 세포사멸(apoptosis)을 유도한다(Burrows 등, 2004).

세포사멸은 질병으로 인한 손상에 의해 회복이 불가능한 세포나 불필요한 세포들을 스스로 파괴하는 작용을 말한다. 이러한 세포사멸은 여러 유전자들을 거치는 신호 전달 과정에 의해 일어나는데, 세포사멸 유전자인 Bax와 항세포사멸 유전자인 Bcl-XL이 대표적이다(Yang 등, 1997). Hsp90은 세포의 성장에 중요한 조절자 역할의 단백질들을 타겟으로 가진다. Hsp90 저해제는 Ras-Raf-1-Mek-ERK와 PI3K-Akt 경로를 불활성화 시켜 세포 주기의 G1-S기로 이행시키는 Cdk4와 Cyclin D1을 불활성화 시킨다. Hsp90 저해제는 Raf-1, Akt, Cdk4와 같은 kinase를 불활성화 시키며, Akt의 불활성화는 BAD(Bcl-XL/Bcl-1 연관 세포사멸 촉진유전자)의 인산화의 감소를 야기하고, 이것은 세포사멸 억제 단백질 Bcl-2와 Bcl-XL를 감소시켜 결국 cytochrome C의 방출로 세포사멸이 유도된다(Schulte 등, 1995; Datta 등, 1999; Basso 등, 2002). 이전 연구에서 돼지의 체외 수정란 배양시 17-AAG의 처리가 apoptosis를 유도한다는 보고가 있었다(Son 등, 2011).

기존의 보고에 따르면 Hsp90은 세포주의 생존에 결정적인 영향을 미치고, 특히 암세포주에서 세포 주기 중지 및 세포사멸을 유도하는 Hsp90의 억제 효과가 알려져 왔다(Senju 등, 2006). 그러나, 소 수정란에서의 Hsp90의 역할에 대한 연구는 전무한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 소 체외 수정란 배양시 Hsp90 저해제인 17-AAG의 첨가에 따른 배 발달 양상과 착상전 배반포 단계에서의 질적 수준 및 세포사멸 정도의 차이를 비교 조사하였으며, 또한 세포사멸 관련 유전자들의 발현 정도의 차이를 확인하였다.

재료 및 방법

배양액

본 논문에서 언급하지 않은 모든 시약은 Sigma Aldrich Korea(Yongin, Korea)에서 구입하였다. 난자 성숙 배양액은 TCM-199(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA)에 10% fetal bovine serum(FBS; Hyclon, Logan, UT, USA), 0.6 mM cysteine, 10 IU/ml pregnant mare's serum gonadotropin(PMSG), 10 ng/ml β -mercaptoethanol, 10 ng/ml EGF, 1 μ g/ml 17 β -estradiol, 10 IU/ml human cho-

ronic gonadotropin(hCG), gentamycin 25 μ g/ml를 첨가하여 사용하였다. 체외 수정배양액은 114 mM NaCl, 3.2 mM KCl, 0.4 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 2 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 25 mM NaHCO_3 , 10 mM sodium lactate로 구성된 Fert-TALP에 0.2 mM sodium pyruvate, 6 mg/ml BSA, 25 μ g/ml gentamycin과 25 μ g/ml heparin, 2 mM penicillamine, 0.1 mM hypotaurine, 0.05 mM epinephrine(PHE)를 첨가한 후 사용하였다. 수정란 체외 배양액은 수정 후 3일째까지는 0.3% BSA가 첨가된 CR1-aa를 사용하였고, 수정 후 4일째부터는 BSA 대신 10% FBS를 첨가하여 4일간 배양하였다.

체외성숙, 수정 및 배양

도축장에서 회수한 소의 난소를 75 μ g/ml potassium penicillin G가 첨가된 생리식염수에 넣어 25~30 $^{\circ}$ C 온도의 상태로 실험실로 운반한다. 실험실로 운반된 난소는 멸균된 37 $^{\circ}$ C의 생리식염수로 3번 이상 세척한 뒤, 난포의 직경이 3~6 mm 정도 되는 것을 18 게이지 주사바늘이 부착된 주사기로 흡입한 후 실체 현미경 하에서 회수하였다. 회수한 난포란은 Tyrode's lactate(TL)-Hepes 용액으로 3회 세척한 뒤 체외성숙 배양액으로 3회 이상 세척하였다. 체외성숙배양액 50 μ l 소적에 10개의 난포란을 넣어 38.5 $^{\circ}$ C 온도와 5% CO_2 조건하에서 24시간 동안 배양하였다. 체외성숙된 난포란은 수정용 배양액에 3번 세척 후 수정용 배양액 소적(44 μ l)에 10개씩 옮겨두고 동결된 소의 정자를 2×10^6 /ml의 최종 농도로 맞추어 25 μ g/ml heparin과 PHE를 함께 첨가한 후 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 조건하에서 22시간 동안 수정을 유도하였다. 체외수정이 완료된 수정란은 난구세포를 제거한 후 3 mg/ml BSA가 첨가된 CR1-aa 배양액에 세척하였으며, 체외 배양용 용액 50 μ l 소적에 10개씩 옮겨 38.5 $^{\circ}$ C, 5% CO_2 조건하에서 48시간 배양하였다. 이후 수정란의 난할율을 확인한 후, 10% FBS가 첨가된 CR1-aa 용액에 96시간 추가 배양을 실시한 후 배반포 형성을 조사하였다. 17-AAG 처리는 체외배양 전체 과정 동안 처리하였다.

배반포에서 이중 형광 염색

체외 수정 후 7일째 배반포의 inner cell mass(ICM)와 trophoctoderm(TE) 세포의 수를 이중형광염색을 통해 확인하였다(Machaty 등, 1998). 먼저 배반포의 투명대를 0.5% protease 용액에서 1분간 처리하여 제거하였다. 투명대가 제거된 배반포를 1 mg/ml polyvinylpyrrolidone(PVA)가 포함된 TL-Hepes에서 세척 후 1:5로 희석된 rabbit anti-pig whole serum에 1시간 동안 처리하였다. 처리된 배반포는 TL-Hepes 용액으로 3회 세척 후 10 μ g/ml propidium iodide와 10 μ g/ml bisbenzimidazole 함유된 guinea pig complement를 배양액과 1:10으로 희석된 용액에 1시간 동안 처리하였다. 최종적으로 TL-Hepes 용액에 3회 정도 세척 후 배반포를 슬라이드 글라스에 올려 놓은 다음 커버 글라스를 덮고 형광현미경(Olympus, Japan)을 이용하여 UV 하에서 관찰하였다.

TUNEL(Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP Nick-end Labeling) 분석

In Situ Cell Death Detection Kit(Roche Diagnostics, Ma-

nnheim, Germany)를 이용하여 배반포에서 세포사멸된 핵 수를 조사하였다. 체외수정 후 7일째된 배반포를 0.1% PVA이 함유된 PBS에 3번 세척한 다음 4% paraformaldehyde가 함유된 PBS에서 상온에 1시간 고정하였다. 고정된 배반포의 세포막에 구멍을 내주는 과정으로 0.1% Triton X-100을 첨가한 PBS로 4°C에서 1시간 처리하였다. 암전 상태에서 배반포를 TUNEL reaction medium에 옮기고 38.5°C에서 1시간 동안 배양한 후 3회 세척 후 슬라이드 글라스에 옮긴 후 커버 글라스로 덮고 2 mg/ml DAPI 용액을 흘려 보낸다. 염색된 배반포를 형광현미경 (Olympus, Japan) 하에서 관찰하였다.

RNA 합성과 Real-time Quantitative PCR

Dynabeads mRNA direct kit(DYNAL; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 제공된 방법에 따라 처리구 당 10개의 배반포로부터 RNA를 분리해낸 후 8 µl RNA, 50 ng/µl Random hexamer, 10 mM dNTP mix, 10XRT buffer, 25 mM MgCl₂, 0.1 M DTT, 40 U/µl RNase OUT, 200 U/µl superscript III RT가 포함된 총 20 µl의 혼합물에서 cDNA를 얻기 위해 65°C 5분, 50°C 5분, 85°C 5분 반응 후 4°C에 유지하였다. 이렇게 확보한 cDNA를 주형으로 PCR을 수행하였다. Real-time RT-PCR은 Stratagene MX 3000P QPCR System(San Diego, CA, USA)을 이용하였고 SYBR Green(Applied Biosystems, Foster city, CA, USA)에 합성한 cDNA 2 µl와 primer를 첨가하여 최종 양이 20 µl가 되도록 하였다. 실험에 사용된 primer들은 Table 1에 제시하였다. Real-time 증폭 프로그램은 다음과 같은 조건으로 수행하였다. 먼저 95°C에서 10분 동안 pre-incubation과정을 거친 후 95°C 40초 동안의 denaturation 후 60°C 40초 annealing을 거친 후 72°C 45초 동안 elongation의 과정을 45 사이클 반복하도록 조작하였다.

통계학적 분석

본 연구에서 수행된 각각의 실험은 적어도 3회 이상 반복하였다. 모든 퍼센트 데이터는 mean±SD로 나타내었으며, 배반포 발달율과 세포수, mRNA의 발현과 관련된 데이터는 one-way ANOVA와 Student's *t*-test를 이용하여 유의차를 검증하였다. *p*<0.05일 때 유의차를 인정하였다.

결과 및 고찰

Table 1. Real-time PCR of primer sequences for apoptosis analysis

Gene	Primer sequence	Annealing temperature (°C)	Product size (bp)
Bax	F- TCTGACGGCAACTTCAACTG R- TGGGTGTCCCAAAGTAGGAG	60	205
Bcl-XL	F - GGTATTGGTGAGTCGGATCG R- AGAACCACACCAGCCACAGT	60	195
β-actin	F- CTCITCCAGCCTTCCTTCCT R- GGCAGTGATCTCTTTCGC	60	178

17-AAG 처리에 따른 소 수정란의 체외 발달 및 배반포의 질적 수준 분석

Hsp90은 단백질의 접힘이나 합성과 같은 세포의 기능에서 중요한 역할을 수행한다. 암세포에서 Hsp90 저해제인 17-AAG의 처리는 정상적인 세포에서보다 선택적으로 높은 비율로 항암 효과를 나타낸다고 보고되었다(White-sell 등, 1992). 또한, 이전 연구에서 포유동물 생식세포 중 돼지의 체외 수정란 배양에서 17-AAG의 처리가 세포사멸을 유도한다고 보고되었으나(Son 등, 2011), 소의 체외 수정란에서의 효과는 확인된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 체외에서 생산된 수정란에서 17-AAG를 농도별로 처리했을 때의 배 발달과 배반포의 질적 수준을 확인하였다. 먼저 17-AAG 처리시 배 발달의 양상을 비교 조사하였다(Table 2). 대조군과 2 µM 및 4 µM 17-AAG 처리군 간 난할율은 유사한 것으로 나타났다. 그러나 배반포 발달율에 있어서는 대조군, 2 µM 및 4 µM 17-AAG 처리군에서 각각 33.1%, 21.7%, 14.2%로 유의적인 차이를 보여주었다(*p*<0.05). 이러한 결과를 통해 소의 체외수정란의 발달에 있어서 Hsp90의 저해제인 17-AAG의 처리가 착상전 배반포로의 발달을 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과에 따라 이후의 실험에서 사용된 17-AAG의 농도는 2 µM로 고정하여 사용하였다.

17-AAG 처리에 의한 소 수정란의 배반포로의 발달율과 더불어 배반포의 구조적인 양상(ICM과 TE의 세포수)을 비교 분석하였다. 대조군과 17-AAG 처리군의 배반포를 대상으로 이중형광 염색을 실시하여 ICM과 TE의 세포 수를 확인하였다(Table 3). 소의 체외수정란에서 17-AAG를 처리하여 발달한 배반포에서 ICM, TE 및 전체 세포수를 비교 조사한 결과, 대조군과 처리군 사이에서 배

Table 2. Effect of 17-AAG treatment on the development rate of bovine embryos *in vitro*

Group	No. of oocytes examined	No. of embryos cleaved (%)	No. of blastocysts (%)
Control	136	93 (68.4±12.9)	45 (33.1±9.6) ^a
17-AAG (2 µM)	129	92 (71.3±13.5)	28 (21.7±8.3) ^b
17-AAG (4 µM)	134	89 (66.4±9.0)	19 (14.2±6.7) ^c

Experiments were repeated four times. Data are the mean±SD. Values with different superscript letters within a column differ significantly (*p*<0.05).

Table 3. Effect of 17-AAG on the structural integrity of blastocysts derived from IVF bovine embryos

Group	No. of embryos cultured	No. of nuclei		
		ICM	TE	Total
Control	20	26.1±5.4 ^a	114.6±11.8 ^a	140.7±13.8 ^a
17-AAG (2 μM)	20	17.2±5.6 ^b	72.0±10.7 ^b	89.2±13.5 ^b

Experiments were repeated three times. Data are the mean±SD. Values with different superscript letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

반포의 세포 수에 상당한 유의차가 나타남을 확인할 수 있었다(ICM: 26.1±5.4 vs 17.2±5.6; TE: 114.6±11.8 vs 72.0±10.7; total: 140.7±13.8 vs 89.2±13.5; $p<0.05$). 이러한 결과를 통해 17-AAG의 처리가 소 수정란의 배반포로의 배 발생 능력을 감소시키고 더불어 배반포의 질적 수준도 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이러한 결과는 Hsp90이 소 생식세포의 초기 발생에 중요한 인자로 역할을 한다는 것을 제시하며, 구체적으로 배반포로의 발생과 이들 배반포의 질적 수준에 직접적으로 영향을 미친다는 것을 제시한다.

소 배반포에서 세포사멸 양상과 관련 유전자의 발현에 있어서 17-AAG의 효과

세포사멸(self-direct apoptosis)은 특징적으로 단일세포에 영향을 끼치는 유전적인 메커니즘을 바탕으로 하며, 세포사멸을 유도하는 이유로는 환경적인 스트레스인 혹은 염색체의 비정상성 등이 있다(Edwards, 1998). 포유동물 배반포 내의 세포사멸의 증가는 수정란이 발달하는데 적합하지 않은 체외의 발달 환경을 확인하는 중요한 표지 인자 역할을 한다(Betts와 King, 2001). 따라서 특정 물질의 처리에 따른 세포사멸 양상의 확인은 기본적으로 필요하다고 할 수 있다. 본 실험에서 17-AAG의 처리가 소 배반포의 세포 수에 영향을 미쳐 질적 수준을 감소시킨다는 것이 확인되었다. 배반포의 세포 수 감소에 따라 세포사멸의 양상에서도 변화를 나타내는지 TUNEL 분석을 통해 대조군과 17-AAG 처리군의 DNA fragmentation을 확인하였다(Fig. 1, Table 4). 그 결과, 대조군에 비해 17-AAG를 처리한 배반포에서 TUNEL 양성 반응의 핵이 현저히 증가함을 확인할 수 있었다(3.9±2.1 vs 11.2±2.8, $p<0.05$). 세포사멸 핵 수의 증가는 다른 포유동물의 배반포에서도 배의 질적 수준과 연관되어 있음이 보고되었다(Hao 등, 2004). 이와 같은 결과가 세포사멸 관련 유전자의 발현과 상관관계가 있는지를 구체적으로 확인하기 위하여 세포사멸 관련 유전자인 Bax와 Bcl-XL mRNA의 발현 수준을 Real-time RT-PCR을 통해 검증하였다. Bax는 세포사멸을 유도하는 유전자로써 이 유전자의 발현 증가는 세포사멸이 더 많이 일어난다는 것을 의미하며, Bcl-XL은 항 세포사멸 유전자로써 이 유전자의 발현 감소는 세포사멸에 의한 세포의 생존에 있어서 불리하게 작용한다고 할 수 있다. 대조군과 17-AAG 처리군의 Bax mRNA 발현을 비교하였을 때 17-AAG 처리군에서 유의적

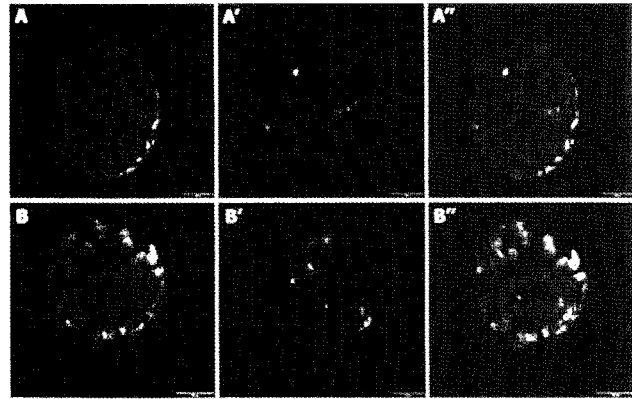


Fig. 1. Apoptosis image scanning of bovine blastocysts *in vitro*. A, B) The chromatin content is stained by DAPI (blue), A', B') fragmented DNA is labeled by the TUNEL reaction (green), and A'', B'') colocalization with DAPI appears sky-blue. Scale bars = 100 μm.

Table 4. Effect of 17-AAG on apoptosis in IVF bovine blastocysts

Group	No. of blastocysts	Apoptosis (nuclei)	
		DAPI	TUNEL
Control	20	128.3±11.3 ^a	3.9±2.1 ^a
17-AAG (2 μM)	17	96.4±9.9 ^b	11.2±2.8 ^b

Experiments were repeated three times. Data are the mean±SD. Values with different superscript letters within a column differ significantly ($p<0.05$).

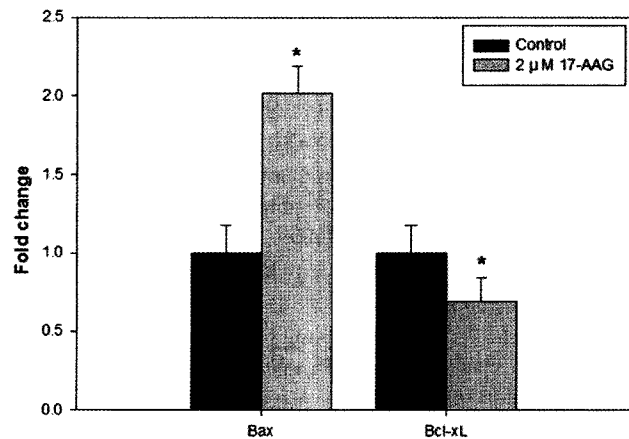


Fig. 2. Relative mRNA expression levels of Bax and Bcl-XL during the blastocyst stage determined using real-time RT-PCR. The experiment was repeated four times, with β -actin was used as an internal standard. Data are the mean±SD. * $p<0.05$ compared with control.

으로 높은 발현을 보여주었으나, 반면 Bcl-XL mRNA는 대조군에 비해 17-AAG 처리군에서 유의적으로 낮은 발현을 확인할 수 있었다(Fig. 2, $p<0.05$). 이러한 결과는 17-AAG의 처리가 배반포의 질적 감소를 야기함을 의미

하며, 이는 소 수정란의 체외배양시 Hsp90의 억제로 인해 세포사멸 관련 유전자들의 발현에 영향을 미쳐 결국 배반포의 세포사멸 감수성을 증가시킨다는 것을 제시한다.

결론

본 연구에서 돼지 수정란의 체외배양시 Hsp90 저해제인 17-AAG의 처리가 배반포 생성율에 영향을 미친다는 것을 확인하였으며, 배반포의 질적 수준의 지표가 되는 세포 수에 있어서도 차이점을 확인할 수 있었다. 또한, 17-AAG 처리로 인한 세포사멸의 정도가 증가함을 알 수 있었다. 또한, 세포사멸 유전자인 Bax와 항 세포사멸 유전자인 Bcl-XL의 mRNA 발현 양상에 있어서도, 17-AAG 처리에 따라 현저한 발현 차이를 확인할 수 있었다. 결론적으로 본 연구에서는 소 수정란의 체외 발달에서 Hsp90의 저해는 소 수정란의 정상적인 발달을 방해하고 질적 수준을 현저히 감소시킨다는 것을 제시하였다.

인용문헌

- Basso AD, Solit DB, Munster PN, Rosen N (2002): Ansamycin antibiotics inhibit Akt activation and cyclin D expression in breast cancer cells that overexpress HER2. *Oncogene* 21(8):1159-1166.
- Betts DH, King WA (2001): Genetic regulation of embryo death and senescence. *Theriogenology* 55(1):171-191.
- Burrows F, Zhang H, Kamal A (2004): Hsp90 activation and cell cycle regulation. *Cell Cycle* 3(12):1530-1536.
- Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999): Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* 13(22):2905-2927.
- Edwards MJ (1998): Apoptosis, the heat shock response, hyperthermia, birth defects, disease and cancer. Where are the common links? *Cell Stress Chaperones* 3(4):213-220.
- Hao Y, Lai L, Mao J, Im GS, Bonk A, Prather RS (2004): Apoptosis in parthenogenetic preimplantation porcine embryos. *Biol Reprod* 70(6):1644-1649.
- Machaty Z, Day BN, Prather RS (1998): Development of early porcine embryos *in vitro* and *in vivo*. *Biol Reprod* 59(2):451-455.
- Neckers L (2002): Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8(4 Suppl):S55-61.
- Pearl LH, Prodromou C, Workman P (2008): The Hsp90 molecular chaperone: an open and shut case for treatment. *Biochem J* 410(3):439-453.
- Schulte TW, Blagosklonny MV, Ingui C, Neckers L (1995): Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1-Ras association. *J Biol Chem* 270(41):24585-24588.
- Senju M, Sueoka N, Sato A, Iwanaga K, Sakao Y, Tomimitsu S, Tominaga M, Irie K, Hayashi S, Sueoka E (2006): Hsp90 inhibitors cause G2/M arrest associated with the reduction of Cdc25C and Cdc2 in lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 132:150-158.
- Solit DB, Chiosis G (2008): Development and application of Hsp90 inhibitors. *Drug Discov Today* 13(1-2):38-43.
- Son MJ, Park JM, Min SH, Hong JH, Park H, Koo DB (2011): Hsp90 inhibitor induces cell cycle arrest and apoptosis of early embryos and primary cells in pigs. *Reprod Dev Biol* 35(1):33-45.
- Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L (1995): Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol* 36(4):305-315.
- Taldone T, Gozman A, Maharaj R, Chiosis G (2008): Targeting Hsp90: small-molecule inhibitors and their clinical development. *Current Opinion in Pharmacology* 8(4):370-374.
- Whitesell L, Shifrin SD, Schwab G, Neckers LM (1992): Benzoquinonoid ansamycins possess selective tumoricidal activity unrelated to src kinase inhibition. *Cancer Res* 52(7):1721-1728.
- Workman P (2004): Combinatorial attack on multi-step oncogenesis by inhibiting the Hsp90 molecular chaperone. *Cancer Lett* 206(2):149-157.
- Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TL, Jones DP, Wang X (1997): Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 275(5303):1129-1132.

(접수일자: 2011. 8. 31 / 채택일자: 2011. 9. 7)