

K562 백혈병 세포주에서 histone deacetylase 억제제
apicidin의 미토콘드리아-의존성 caspase cascade
활성화를 통한 세포사멸의 유도

연세대학교 대학원

의과학과

정 소 영

K562 백혈병 세포주에서 histone deacetylase 억제제
apicidin의 미토콘드리아-의존성 caspase cascade
활성화를 통한 세포사멸의 유도

지도교수 민 유 홍

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2003년 6월 일

연세대학교 대학원
의과학과
정 소 영

정소영의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2003년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성하기까지 오랜 시간동안 많은 관심과 사랑으로 지도 해주신 민유홍 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 바쁘신 가운데에도 야김없는 조언을 해주시고, 자세한 검토를 해주신 이민걸 교수님, 박전한 교수님, 양우익 교수님, 유철주 교수님께 감사드립니다. 또한 많은 시간을 낼 수 있도록 배려해 주신 분당차병원 오도연 교수님께도 감사드립니다.

항상 곁에서 지켜 주시고 도와주신 부모님과 가족들에게 감사드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 시약 및 항체	6
2. 세포주 및 배양 조건	6
3. 세포사멸의 형태 평가	7
4. Annexin V 염색	7
5. 세포주기 분석	7
6. DNA fragmentation 분석	7
7. Histone 분리 및 아세틸화 histone H4의 면역검출	8
8. 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential)의 소실 측정	8
9. 미토콘드리아 및 세포질 분획의 준비	8
10. Western blot 분석	9
11. 역전사 중합효소연쇄 반응	9
III. 결과	10
1. Apicidin에 의한 K562 세포의 세포사멸 유도	10
2. Apicidin의 histone 아세틸화에 대한 효과	10
3. Apicidin의 미토콘드리아 막전위에 대한 효과	11
4. Apicidin이 Bax 전위 및 cytochrome c 유리에 미치는 영향	11
5. Apicidin에 의한 caspase-3, -8 및 -9의 활성화	15
6. Apicidin의 Fas 수용체 시스템에 대한 영향	16
7. Apicidin이 p210 Bcr-Abl 단백 발현에 미치는 영향	16
IV. 고찰	20
V. 결론	25
참고문헌	26
영문요약	32

그림 차례

Figure 1. Apicidin-induced apoptosis in K562 cells	12
Figure 2. Effect of apicidin on acetylation of histone H4 of K562 cells	13
Figure 3. Apicidin induced mitochondrial membrane permeabilization	14
Figure 4. Apicidin-induced processing of caspase-3, -8, -9 and PARP	17
Figure 5. Effect of caspase inhibitor on the apicidin-induced apoptosis and processing of caspases	18
Figure 6. Effect of apicidin on Fas-Fas ligand pathway of K562 cells	19
Figure 7. Effect of apicidin on Bcr-Abl protein and mRNA expression	19

국문요약

K562 백혈병 세포주에서 histone deacetylase 억제제 apicidin의 미토콘드리아-의존성 caspase cascade 활성화를 통한 세포사멸의 유도

Histone deacetylase 억제제인 apicidin은 새로운 cyclic tetrapeptide로서 다양한 종류의 암세포주에 대하여 강력한 증식억제 효과를 나타낸다. 이 연구의 목적은 apicidin이 세포사멸에 저항성을 지닌 Bcr-Abl 단백을 발현하는 사람의 백혈병 세포주인 K562 세포의 세포사멸을 유도할 수 있는지를 알아보고, 세포사멸을 유발한다면 어떤 기전에 의하는지 규명하는 것이다.

K562 세포를 다양한 농도의 apicidin으로 2-72시간동안 반응시킨 후, 세포사멸의 정도, histone 아세틸화, 미토콘드리아 손상, caspase의 활성화 및 Bcr-Abl 단백질의 발현 정도 등을 측정하였다. Apicidin은 K562 세포에서 시간- 및 농도-의존적으로 세포사멸을 유도하고, histone H4의 아세틸화를 증가시켰다. 세포사멸의 유도는 세포사멸에서 나타나는 전형적인 핵의 형태 변화, DNA 분절화로 확인하였으며, 세포사멸 전에 미토콘드리아로부터 cytochrome c가 유리되고, 미토콘드리아 막전위의 소실이 발생하였다. Apicidin은 caspase-3, -8 및 -9의 활성화를 유도하였으며, 이들 caspase의 활성화는 poly(ADP-ribose) polymerase의 분해와 동반되었다. Caspase-3 억제제인 DEVD-CHO로 전처리 후, apicidin에 의한 세포사멸 및 procaspase-3의 분해가 완전히 억제되었으며, caspase-9 억제제인 LEHD-fmk로 전처리 후 apicidin에 의한 procaspase-3 및 -8의 분해가 억제되었다. Apicidin 처리 후 K562 세포에서의 Fas 및 Fas ligand의 발현 정도는 변화하지 않았으며, Fas-blocking NOK-1 단클론 항체로 전처리 하여도 apicidin에 의한 세포사멸과 procaspase-3의 분해를 억제하지 못하였다. K562 세포의 Bcr-Abl 단백질 발현이 apicidin 처리 후 현저히 감소되었으며, 역전사 증합효소연쇄반응 검사상 Bcr-Abl mRNA 발현도 현저히 감소된 것이 관찰되었다.

결론적으로, 위와 같은 결과들을 종합해 볼 때, apicidin에 의한 K562 세

포의 세포사멸은 미토콘드리아- 의존성 caspase cascade 활성화에 의한다는 것을 알 수 있었다. Apicidin이 세포사멸에 저항성인 Bcr-Abl을 발현하는 백혈병세포의 세포사멸을 효과적으로 유도하므로, 백혈병 치료 약제로서의 가능성을 제시하는 바이다.

핵심되는 말: Apicidin, Histone deacetylase inhibitor, Apoptosis, Bcr-Abl, K562 leukemia cell line

K562 백혈병 세포주에서 histone deacetylase 억제제 apicidin의 미토콘드리아 - 의존성 caspase cascade 활성화를 통한 세포사멸의 유도

<지도교수 민 유 홍>

연세대학교 대학원 의과학과
정 소 영

I. 서 론

염색질의 nucleosome core에 존재하는 histone은 아세틸화 및 탈아세틸화를 통해 유전자 발현의 조절에 중요한 역할을 한다¹. 전사가 활성화되어 있는 유전자들은 고도로 아세틸화되어 있는 core histone과 연관되어 있으며, 반면에 histone 탈아세틸화는 유전자 발현 억제와 연관되어 있다^{2,3}. Histone의 아세틸화의 정도는 histone acetyltransferase 및 histone deacetylase (HDAC)라는 두 가지 효소 군의 활성에 의해 조절된다^{4,5}. 이 두 가지 효소의 조절장애가 암유전자, 종양억제 유전자 등 다양한 유전자의 발현 양상을 변화시켜 암의 발생에서 원인적인 역할을 하는 것으로 생각되고 있다^{6,7}.

일부 백혈병에서, 특히 급성 전골수성 백혈병에서 HDAC 복합체에 의한 유전자 발현 억제가 백혈병 발생의 중요한 기전임이 밝혀진 바 있다⁸. 급성 전골수성 백혈병에서 발견되는 promyelocytic leukemia-retinoic acid receptor a (PML-RARa) 혹은 promyelocytic leukemia zinc finger-retinoic acid receptor a (PLZF-RARa) 융합단백은 nuclear co-repressor-HDAC 복합체를 동원하여 histone을 탈아세틸화 시키고 전사를 억제하여 골수구계 세포의 성숙을 정지시킨다^{8,9}. 다른 아형의 급성 골수성 백혈병에서도 비정상적인 HDAC과 연관된 전사억제가 병인적인 역할을 하고 있다는 것이 보고되

고 있다. t(8;21) 염색체 전위를 동반한 급성 골수성 백혈병 M2 아형에서 발견되는 AML-ETO 융합단백은 HDAC을 전사억제복합체에 끌어들여 강력한 전사억제를 유발한다^{10,11}. 최근 수 년간, 구조적으로 다양한 HDAC 억제제가, 세포핵에 아세틸화 histone을 축적시키며, 배양된 세포나 동물 모델에서 종양세포의 성장정지, 분화, 세포사멸을 유도한다는 것이 계속적으로 보고되고 있다¹¹⁻¹⁶. 이제까지의 연구결과들을 보면 HDAC 억제제가 histone의 과아세틸화를 유도하는 것이 세포주기나 세포형태에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자들의 전사를 선택적으로 활성화시킴으로써 증식을 억제하고, 종양 형질을 반전시킬 수 있는 것으로 생각되고 있다^{5-7,14,17}.

HDAC 억제제의 효과 및 임상치료에의 적용 가능성이 급성 골수성 백혈병에서도 보고된 바 있다¹⁸⁻²⁰. HDAC 억제제 치료로 ETO-매개 전사억제를 제거함으로써 AML-ETO 유전자 전위를 가진 백혈병 세포의 분화를 유도할 수 있었으며¹¹, HDAC 억제제인 sodium phenylbutyrate를 all *trans*-retinoic acid(ATRA)에 반응하지 않는 급성 전골수성 백혈병 환자에 투여하여 완전관해를 유도한 예가 보고되기도 하였다²⁰. HDAC 억제제의 급성 전골수성 백혈병에서의 항백혈병 효과는 ATRA 효과와 유사하게, 주로 백혈병 세포의 분화를 유도함으로써 나타난다고 생각되고 있다^{21,22}. 그러나, 최근 연구에서 t(15;17) 염색체 전위를 보이는 급성 전골수성 백혈병에서 HDAC 억제제가 caspase-의존성 세포사멸을 일으키며 daxx를 감소시킨다는 것이 보고되었다²³. 림프아구나 골수단구성 백혈병 세포에서도 HDAC 억제제 투여로 세포사멸이 관찰되었으며^{24,25}, 이러한 결과들은 백혈병을 치료하는데 있어서 HDAC 억제제를 이용할 수 있다는 가능성을 열어주었다.

K562 세포주는 p210 Bcr-Abl 융합단백을 발현하는 만성 골수성 백혈병 세포주로서, 이전의 연구들에서 이 세포주가 자극의 종류에 관계없이 세포사멸에 특히 저항성을 가지고 있다는 것이 알려져 있다^{26,27}. 새로 개발된 tyrosine kinase 억제제인 STI571은 시험관 내에서 Bcr-Abl 양성인 백혈병 세포의 증식을 억제하며²⁸, 만성 골수성 백혈병 초기 단계에서 매우 효과적인 치료 성적을 보여주고 있다²⁹. 그러나, 만성 골수성 백혈병 환자

에서 STI571 치료 중 이에 대한 내성이 발생한다는 것이 발견되어^{30,31}, 또 다른 치료적인 접근 방법을 필요로 하게 되었다.

Apicidin은 새로운 HDAC 억제제로서 다양한 종류의 암세포주에 대하여 강력한 광범위 증식억제 효과를 가지고 있다^{14,24}. Apicidin은 p21^{WAF/Cip1}을 선택적으로 유도하여 사람의 암세포들의 성장을 정지시킨다고 보고되었고, 급성 전골수성 백혈병 세포주인 HL-60 세포주에서는 apicidin이 Fas/Fas ligand를 선택적으로 유도하고, 이에 따라 caspase-9과 caspase-3가 활성화되어 세포사멸을 유도할 수 있는 것으로 보고된 바 있다³².

만약 apicidin 투여가 Bcr-Abl 양성인 만성 골수성 백혈병 세포의 세포사멸을 유도할 수 있고, 그 세포사멸을 유도하는 기전을 이해할 수 있다면 Bcr-Abl 단백을 발현하는 만성 골수성 백혈병이나, 일부의 급성 림프구성 백혈병에서 새로운 치료적인 접근 방법의 개발이 가능할 것으로 기대된다. 이 연구는 apicidin이 K562 세포주에서 미토콘드리아-의존성 caspase cascade 활성화를 통해 세포사멸을 유도할 수 있음을 보여주었다. Apicidin이 세포사멸에 저항성인 Bcr-Abl 단백을 발현하는 백혈병 세포에서 효과적으로 세포사멸을 유도할 수 있으므로, 효과적인 백혈병 치료제로서의 가능성을 제시하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 시약 및 항체

Apicidin[cyclo(N-O-methyl-L-tryptophanyl-L-isoleucinyl-D-pipecolinyl-L-2-amino-8-oxodecanoyl)] (Calbiochem, San Diego, CA, USA)은 dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 용해시켜 1 mM 농도의 저장용액으로 만들어 -80°C 에 보관하여 3개월 이내에 사용하였다. 세포배양액에서 DMSO의 최종 농도는 세포에 독성이 없는 것으로 알려진 농도인 0.1% 미만으로 유지되도록 하였다. Caspase-3 억제제인 DEVD-CHO(Calbiochem)와 caspase-9 억제제인 LEHD-fmk(Calbiochem)는 DMSO에 용해시켜 사용시까지 -70°C 에 보관하였다. Fas-Fas ligand 상호작용을 방해하여 Fas 신호전달체계를 억제하는 NOK-1 단클론 항체 및 procaspase-3, procaspase-8, procaspase-9에 대한 항체는 PharMingen(San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 분해된 caspase-3, caspase-8, caspase-9과 cytochrome c, Fas ligand, Bax 및 poly(ADP-ribose) polymerase(PARP)에 대한 항체는 Cell Signaling Technology(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Bcl-XL, Bcl-2, c-Abl 및 Fas에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc.(Santa Cruz, CA, USA)에서 HDAC1, α -tubulin, acetyl-histone H4에 대한 항체는 Upstate Biotechnology Inc.(Lake Placid, NY, USA)에서 구입하였다.

2. 세포주 및 배양 조건

K562 세포주(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 10%(v/v)의 가열 비활성화 우태아혈청(HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 100 U/ml penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin 및 2 mM L-glutamine(Life Technologies, Grand Island, NY, USA)이 첨가된 RPMI-1640 배지(Life Technologies)에서 37°C , 5% CO_2 , 95% 공기 환경에서 배양하였다. 모든 실험에서 6-well plate에 10% 우태아혈청을 함유한 RPMI-1640 배지 3 ml를 넣고,

2×10^6 개의 증식하는 세포를 분주하여, apicidin을 첨가한 후 시간을 달리 하여 반응시켰다.

3. 세포사멸의 형태 평가

세포를 Ca^{2+} , Mg^{2+} 이 포함되지 않은 phosphate buffered saline(PBS)으로 2번 세척하여 cytospin slide를 만들고 hematoxylin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 세포의 수축, 핵의 응축, 핵의 분절 및 apoptotic body의 형성을 세포사멸에 합당한 형태로 판단하였다.

4. Annexin V 염색

세포들은 제조사의 지침서에 따라 fluorescein isothiocyanate(FITC)-conjugated Annexin V(Sigma-Aldrich)와 반응시킨 후 핵은 propidium iodide(PI) (Sigma-Aldrich)로 대조염색하여 유세포분석으로 세포사멸을 일으킨 세포의 백분율을 구하였다.

5. 세포주기 분석

세포를 PBS로 2번 세척하여 70% ethanol/PBS로 고정한 후, 0.1% saponin이 함유된 PBS에 용해된 0.5 mg/ml의 RNase(Sigma-Aldrich)로 처리하여 37 °C에서 30분간 반응시킨 후, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 PI로 4°C에서 30분간 염색하였다. 세포의 DNA content는 1×10^6 개의 세포를 FACSCalibur 유세포분석기(Beckton Dickinson, San Jose, CA, USA)와 CellQuest software(Beckton Dickinson)로 분석하였다.

6. DNA fragmentation 분석

세포 침전물(1×10^6 세포)을 500 μl 의 lysis buffer(0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 재부유시켜 실온에서 15분간 놓아

둔 후 16,000 g에서 10분간 원심분리하였다. Phenol:chloroform(1:1)으로 DNA를 두 번 추출하여 에탄올로 침전시킨 후, TE buffer(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1 mM EDTA)에 재부유시켰다. DNA를 1.5% agarose gel 전기영동을 시행하여 분석하였다.

7. Histone 분리 및 아세틸화 histone H4의 면역 검출

K562 세포를 apicidin으로 지정된 시간동안 반응시킨 후, 이전에 확립된 방법에 따라 histone을 분리하였다¹⁴. 검체를 Laemmli sample buffer에 3분간 재부유한 후 아세틸화 histone H4의 양을 결정하기 위하여 15% SDS-PAGE를 시행하였다.

8. 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential)의 소실 측정

세포를 지정된 시간 후에 수거하여, 1×10^6 개의 세포를 3,3-dihexyloxa-carbocyanine iodide(DiOC₆) (Calbiochem) 5 µg/ml과 37°C에서 15분간 반응시킨 후 FACSCalibur 유세포분석기에서 분석하였다. 미토콘드리아 막전위의 소실을 의미하는 DiOC₆를 낮게 나타내는 세포의 백분율을 이전에 보고된 방법대로 측정하였다³³.

9. 미토콘드리아 및 세포질 분획의 준비

K562 세포를 수거하여 ice-cold PBS로 세척 후, 세포 침전물을 glucose 250 mM과 proteinase inhibitor cocktail(1 mg/ml aprotinin, 10 mg/ml leupeptin, 1 mM β-glycerophosphate 및 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride)이 포함된 300 µl의 buffer A(20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol)에 재부유시켰다. 균질화 시킨 후에 깨지지 않은 세포, 큰 세포막 조각 및 핵은 1,000 g로 4°C에서 1분간 원심분리하여 제거한 후, 상청액은 10,000 g로 4°C에서 20분간 원심분리하였다. 미

토콘드리아를 포함하는 침전물 분획은 50 μ l의 TNC buffer(10 mM Tris acetate, pH 8.0, 0.5% Nonidet-40, 5 mM CaCl_2)에 용해시켰다. 상청액은 50,000 g에서 2시간동안 원심분리하여 세포질 분획을 얻었다. 3×10^6 개의 세포로부터 얻은 세포질과 미토콘드리아 분획에서 동량의 단백질을 취하여 12% SDS-PAGE를 시행하고, 바로 Western blot 분석을 시행하였다.

10. Western blot 분석

K562 세포의 세포 추출물은 protease inhibitor cocktail이 첨가된 cold RIPA buffer(50 mM Tris, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0.4% sodium cacodylate, 150 mM NaCl)에 세포를 용해시켜 만들었다. 세포 잔해들을 제거하기 위해 원심분리한 후, 상청액을 환원조건하에서 SDS-PAGE를 시행하였다. 단백질양은 Coomassie protein assay reagent(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다. 전기영동 후 단백질은 통상적인 방법으로 nitrocellulose membrane(Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 blotting 하였다. Blot membrane은 1% Tween-20을 첨가한 1% bovine serum albumin/ PBS에 실온에서 1시간동안 처리하여 차단하였고, 각기 해당되는 일차 항체 및 2차 항체로 반응시켰다. ECL chemiluminescence detection system(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)과 ECL film을 사용하여 nitrocellulose blots에 있는 특정 단백을 표시하였다.

11. 역전사 중합효소연쇄 반응

Apicidin 처리한 세포를 RNeasy mini kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 세포의 전체 RNA를 분리하였다. 각 시점에서 동일한 양의 RNA에서 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 2단계 nested PCR 반응을 3세트의 primer를 사용하여 시행하였다. 1차 RT-PCR에 사용한 primer 세트는 B1 5'-GAAGTGTTTCAGAAGCTTCTCC-3'; B3 5'-ACCATCGTGGGCGTCCGCAAGA-3'; A3 5'-TGATTATAGCCTAAGACCCGGA-3이었고,

nested PCR에 사용된 primer 세트는 A4 5'-ATCTCCACTGGCCACAAAATCATAACA-3'; B2 5'-TGGAGCTGCAGATGCTGACCAACTCG-3'; B4 5'-AGATCTGGCCCAACGATGGCGAGGGC-3'이었다. 전기영동을 시행하고 ethidium bromide 염색으로 PCR 산물을 표시하였다.

III. 결 과

1. Apicidin에 의한 K562 세포의 세포사멸 유도

Apicidin이 K562 세포에서 세포사멸을 유도하는지를 알아보기 위하여, apicidin 농도를 0.1-20 μ M로 달리하여 시간별로 처리한 후 Annexin V/PI 염색으로 세포사멸을 측정된 결과, apicidin은 농도 - 및 시간 - 의존적으로 K562 세포의 세포사멸을 유도함을 확인하였다(Fig. 1A). 사멸된 세포들의 형태 변화를 알아보기 위하여 hematoxylin 염색을 시행하였다. Apicidin으로 처리한 세포들은 세포의 수축, 핵의 응축, 핵의 분절 및 apoptotic body의 형성 같은 전형적인 세포사멸의 소견을 나타내었다(Fig. 1B). DNA 분절 분석은 세포의 DNA가 작은 크기의 DNA 분절로의 분해가 증가되어 ladder-ring appearance를 보여주었다(Fig. 1C). 이러한 소견들은 세포사멸에서 나타나는 전형적인 결과들로, apicidin은 K562 세포의 세포사멸을 효과적으로 유도할 수 있음을 확인하였다. 세포사멸을 세포주기 분석으로 측정해 보았을 때에도 비슷한 결과를 보여주었다. 2.5 μ M 농도의 apicidin에 24시간까지 노출시켜도 K562 세포의 세포주기 분포에는 영향이 없었으나, 48- 72시간 동안 노출시킨 후 세포주기가 Sub-G1에 있는 세포의 분획이 시간- 의존적으로 점차 증가하였다(Fig. 1D).

2. Apicidin의 histone 아세틸화에 대한 효과

K562 세포의 세포사멸과 histone 아세틸화의 상관관계를 알아보기 위하여 apicidin이 세포 내 아세틸화 histone H4에 미치는 영향을 분석하였다.

K562 세포를 다양한 농도의 apicidin으로 처리 후 핵에서 histone을 추출하여 Western blot 분석을 시행하였다. Fig. 2A의 결과에 나타난 대로 histone H4의 아세틸화 정도는 농도-의존적으로 증가하였으며, 2.5 μ M 농도의 apicidin에서 최대량을 나타내었고, 그 이상 농도를 높여도 아세틸화 histone H4의 양이 더 이상 증가하지는 않았다. Apicidin은 HDAC1 양에는 변화를 일으키지 않았으므로(Fig. 2A), histone 아세틸화에 대한 효과는 HDAC 발현 정도의 변화에 의한 것은 아니라는 것을 알 수 있었으며, 2.5 μ M apicidin으로 처리 후 histone H4 아세틸화가 시간-의존적으로 증가하였다(Fig. 2B). 이러한 결과들로부터 apicidin의 histone 아세틸화에 대한 시험관내 효과는 apicidin의 세포사멸에 대한 효과와 밀접하게 연관되어 있으리라 추측할 수 있다.

3. Apicidin의 미토콘드리아 막전위에 대한 효과

세포사멸의 초기 과정에서 관찰되는 미토콘드리아 막전위의 소실을 apicidin 처리 후에 측정하여보았다. K562 세포를 apicidin 처리 후에 막전위-감수성 염료인 DiOC₆의 미토콘드리아 섭취율을 측정하였다. K562 세포를 2.5 μ M의 apicidin으로 처리 후 미토콘드리아 막전위가 소실된 세포는 8시간에 25.2%, 24시간에 43.5% 이었다(Fig. 3A). 이러한 결과는 K562 세포에서 apicidin이 세포사멸을 유도하는 기전은 미토콘드리아를 통해서 작용한다는 것을 나타내고 있다.

4. Apicidin이 Bax 전위 및 cytochrome c 유리에 미치는 영향

Apicidin이 Bax 전위 및 cytochrome c 유리에 미치는 영향을 조사하였다. Apicidin 처리 후 미토콘드리아 내 Bax 양이 시간-의존적으로 증가함이 관찰되었다. 그러나, 세포질의 Bax 단백질의 양은 apicidin 처리 후 24 시간까지는 변화가 없었고, 48시간 이후에 유의하게 감소하는 것으로 관찰되었다(Fig. 3B).

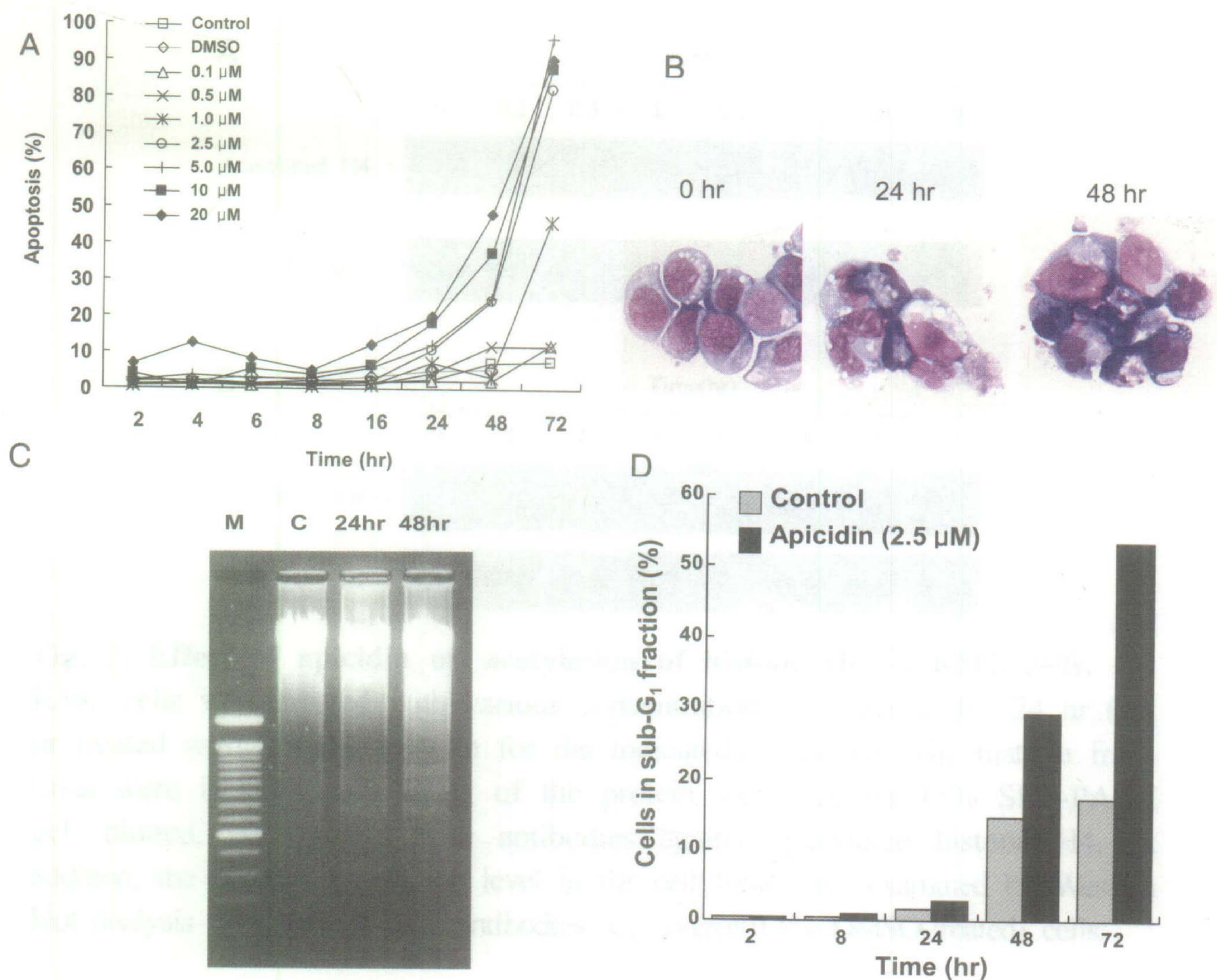


Fig. 1. Apicidin-induced apoptosis in K562 cells. (A) Proliferating K562 cells (2×10^6 /well) were treated with different concentrations of apicidin for the indicated times, which were then stained with Annexin V/PI and analyzed by flow cytometry. The data is expressed as a mean value of the percentage of apoptotic cells of three independent experiments performed in duplicate. (B) The morphologic appearance of apicidin-treated K562 cells. The cells were treated with 2.5 μ M apicidin for the indicated times, stained with hematoxylin, and then examined by a light microscope (X 400). (C) Agarose gel electrophoresis of DNA extracted from the K562 cells treated with 2.5 μ M apicidin for the indicated times. After extraction, the total genomic DNA was separated on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide, and photographed under UV illumination. Lane M, DNA marker. (D) At the indicated time points after treatment with 2.5 μ M apicidin, the cells were harvested and fixed in 70% ethanol. After staining with PI, the apoptotic DNA content was analyzed by flow cytometry. The number of apoptotic cells in the sub-G₁ fraction is expressed as a percentage of the total number of cells.

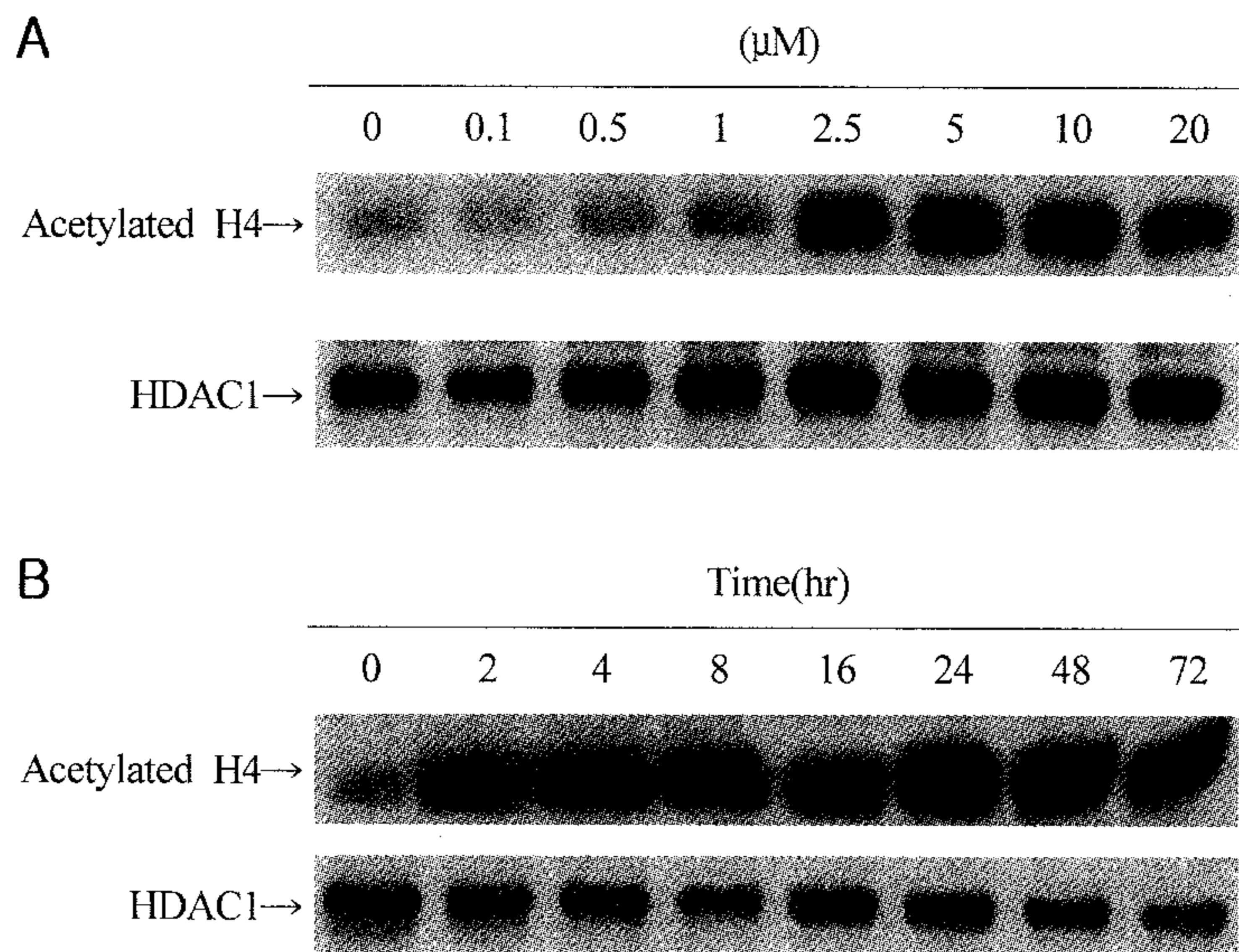


Fig. 2. Effect of apicidin on acetylation of histone H4 of K562 cells. K562 cells were treated with various concentrations of apicidin for 24 hr (**A**) or treated with 2.5 μM apicidin for the indicated times (**B**). The histone fractions were isolated, and 10 μg of the protein were run on 15% SDS-PAGE gel, blotted, and probed with antibodies against acetylated histone H4. In addition, the HDAC1 expression level in the cell lysate was examined by Western blot analysis with anti-HDAC1 antibodies. C, control(0.1% DMSO-treated) cells.

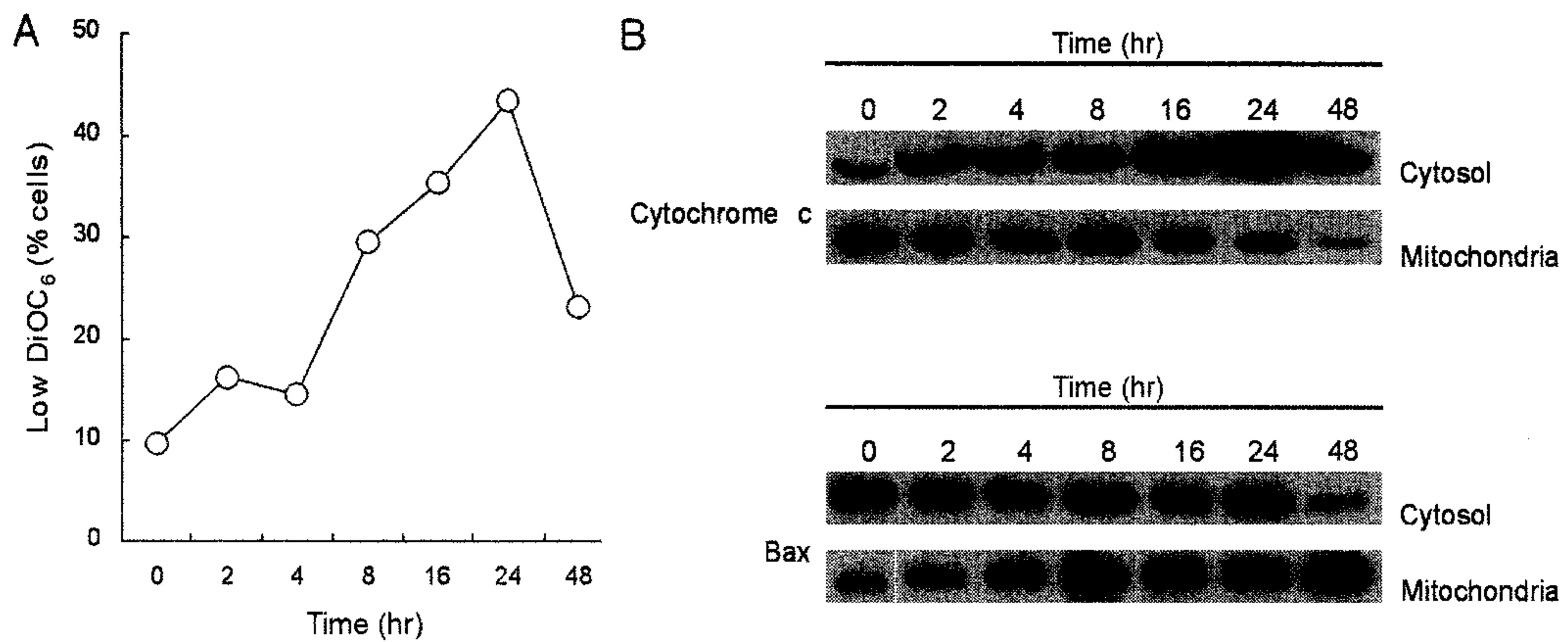


Fig. 3. Apicidin induced mitochondrial membrane permeabilization. (A) K562 cells were treated with 2.5 μ M apicidin for the indicated times and analyzed by flow cytometry after being stained with DiOC₆. Values are expressed as the mean percentage of cells exhibiting low mitochondrial membrane potential, reflected by reduced levels of DiOC₆ uptake. **(B)** Effect of apicidin on Bax and cytochrome c translocation. The cells were treated with 2.5 μ M of apicidin for the indicated times. Equal amounts of protein from the cytosolic and mitochondrial fractions of 3×10^6 cells were analyzed by western blotting with antibodies against Bax and cytochrome c, respectively.

또한 apicidin에 노출 후 cytochrome-c가 시간-의존적으로 세포질 내로 유리되는 것이 관찰되었다(Fig. 3B). Apicidin 투여 후 초기 2시간 후부터 cytochrome c의 세포질 내 농도가 증가하기 시작하는데, 미토콘드리아 분획 내의 cytochrome c는 apicidin 투여 후 48시간 이후 현저히 감소하였다.

5. Apicidin에 의한 caspase-3, -8 및 -9의 활성화

Apicidin에 의해 유도된 세포사멸에 대한 기전을 이해하기 위하여 여러 caspase 반응과정에 대하여 연구하였다. K562 세포를 2.5 μ M의 apicidin으로 2-72시간동안 반응시키자, procaspase-3가 활성인 19 kDa의 분해 산물을 생성하였으며, apicidin-유도 세포사멸 동안 effector caspase-3가 활성화된다는 것을 보여주었다(Fig. 4). Caspase-3의 시간-의존적인 활성화는 PARP가 89 kDa의 C-말단 분절로 분해되는 것을 측정하여서도 확인할 수 있었으며(Fig. 4), PARP 분해량은 세포가 apicidin에 노출된 후 48시간 이후에 유의하게 증가하였다. Apicidin에 의해 caspase-3가 활성화되는 기전을 이해하기 위하여, apicidin이 procaspase-8 및 -9의 분해에 어떠한 영향을 미치는지 실험하였다. Western blots을 시행하여 각각 해당 항체들로 반응시켰을 때, apicidin 처치가 procaspase-8을 특징적인 10 kDa의 활성형으로 분해시키는 것이 관찰되었으며(Fig. 4), 이러한 분해산물은 apicidin 투여 후 48시간 후에 관찰되었다. Procaspase-8의 분해는 procaspase-3의 분해와 같은 시간에 발생하였다. procaspase-9은 시간-의존적인 양상으로 35 kDa의 분해산물로 분해되었으며(Fig. 4), procaspase-9 단백질 분해의 동역학은 procaspase-3 및 -8의 단백질 분해 동역학과 잘 들어맞았다. Apicidin-유도 세포사멸 과정에 caspase-3가 연관된다는 것을 다시 확인하기 위하여 caspase-3 억제제인 DEVD-CHO가 apicidin에 의해 유도되는 세포사멸에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. K562 세포를 50 μ M의 DEVD-CHO로 2시간 동안 전처리 한 후, apicidin에 의한 PARP 및 procaspase-3의 분해가 완전히 억제되었으며, 세포사멸이 유의하게 감소하였다(Fig. 5A). 이러한 결과들은 apicidin-유도 세포사멸 과정에 caspase-3의 활성화가 필요하다는 것

을 보여주고 있다. Caspase-9 억제제인 LEHD-fmk가 apicidin에 의해 유도되는 caspase-3 및 -8의 활성화에 미치는 영향을 평가하기 위하여, K562 세포를 50 μ M의 LEHD-fmk로 2시간동안 전처치를 하여 procaspase-9, -8, 및 -3의 분해가 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 5B).

6. Apicidin의 Fas 수용체 시스템에 대한 영향

Fig. 6A의 결과처럼 K562 세포를 apicidin으로 처리한 후 Fas 수용체 및 Fas ligand 발현 수준은 변화가 없었다. 또한, Fas-blocking NOK-1 단클론 항체를 0.6 μ g/ml 농도로 2시간동안 전처치하여도, apicidin에 의한 세포사멸을 억제하지 못하였으며, caspase-3 분해도 억제하지 못하였다(Fig. 6B).

7. Apicidin 이 p210 Bcr-Abl 단백 발현에 미치는 영향

Apicidin이 세포사멸을 억제하는 Bcr-Abl을 발현하는 K562 세포에서 세포사멸을 유도하였으므로, apicidin에 의해 유도된 세포사멸 과정 중 Bcr-Abl 단백질의 양에 변화가 있는지를 검사하였다. Bcr-Abl 단백질의 발현은 apicidin 처리 16시간 후에 현저하게 감소되었으며(Fig. 7A), RT-PCR 결과 Bcr-Abl mRNA 발현도 감소되었음이 확인되어(Fig. 7B), apicidin에 의한 Bcr-Abl 단백질량의 변화는 Bcr-Abl 단백질의 분해에 의한 것이 아니라는 것을 알 수 있었다.

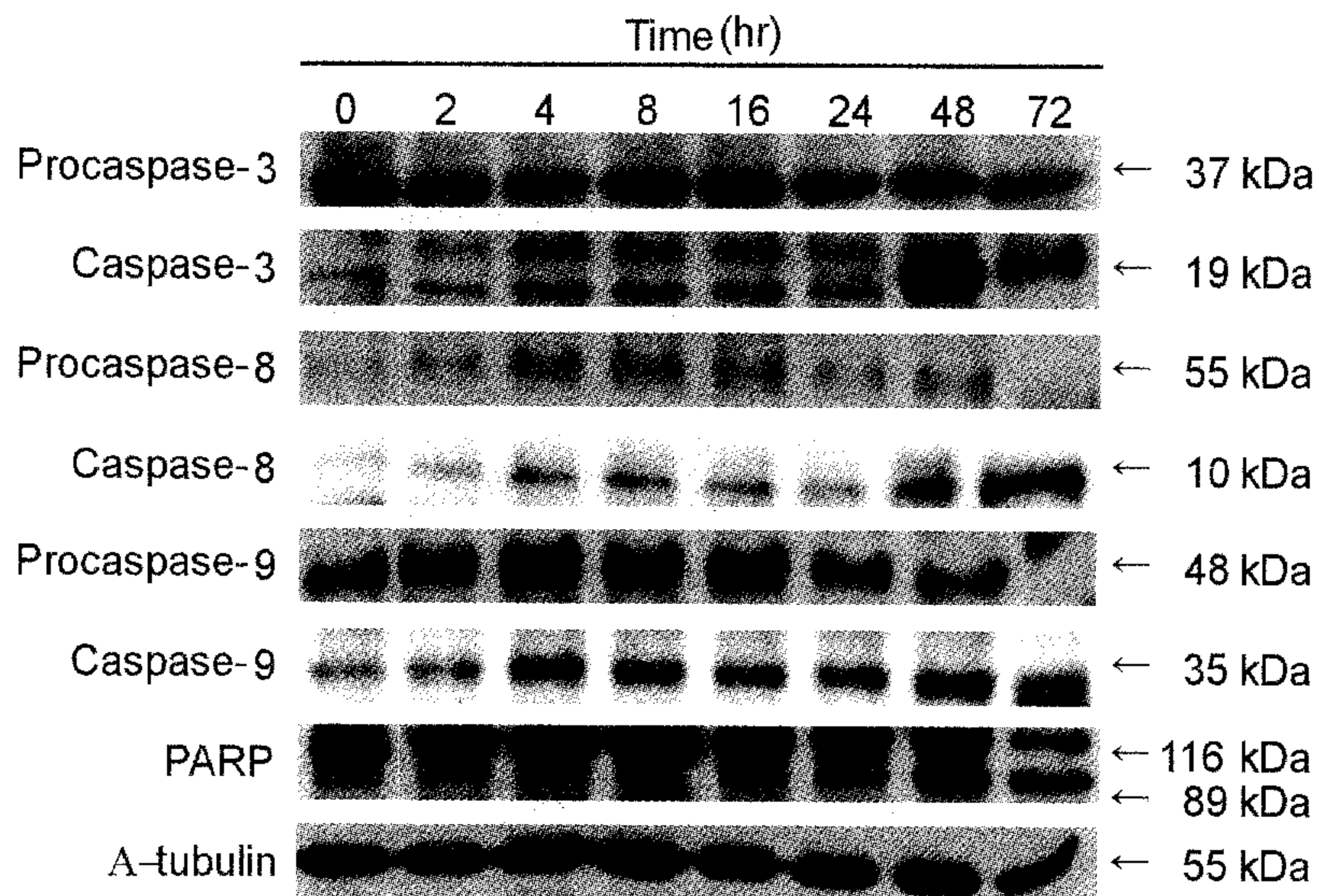


Fig. 4. Apicidin-induced processing of caspase-3, -8, -9 and PARP.

After treatment of K562 cells with 2.5 μ M apicidin for the indicated times, the processing of procaspase-3, -8, -9, and PARP were examined by Western blot analysis using the corresponding antibodies. Representative Western blots indicate the time-dependent cleavage of procaspase-3 to the active 19 kDa cleaved product, and the cleavage of procaspase-8 to its characteristic 10 kDa active form. Procaspase-9 was cleaved to generate a 35 kDa fragment. The molecular masses of the intact PARP and the PARP cleavage fragments are 116 and 89 kDa, respectively.

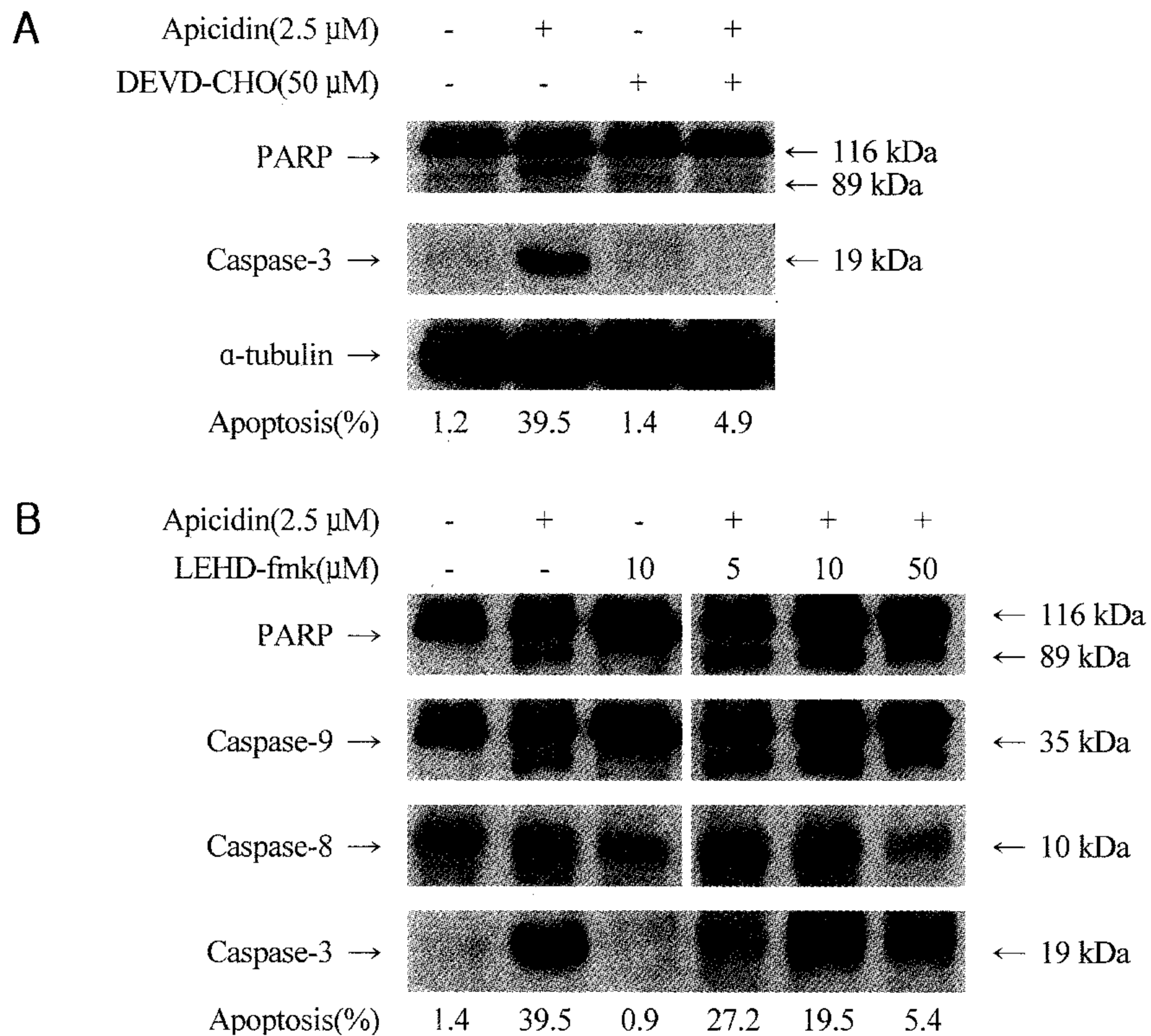


Fig. 5. Effect of caspase inhibitor on the apicidin-induced apoptosis and processing of caspases. (A) K562 cells were incubated with 50 μ M caspase-3 inhibitor DEVD-CHO for 2 hr and then treated with 2.5 μ M apicidin for 48 hr. PARP and procaspase-3 cleavage were examined by Western blot analysis. Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry after annexin V/PI staining. The mean value of the percentage of apoptotic cells was shown in the bottom line. (B) K562 cells were pretreated with 50 μ M of caspase-9 inhibitor LEHD-fmk for 2 hr, followed by 2.5 μ M apicidin treatment for further 48 hr. The cleavage of procaspase-3, -8 and -9 were examined by Western blot analysis using the corresponding antibodies.

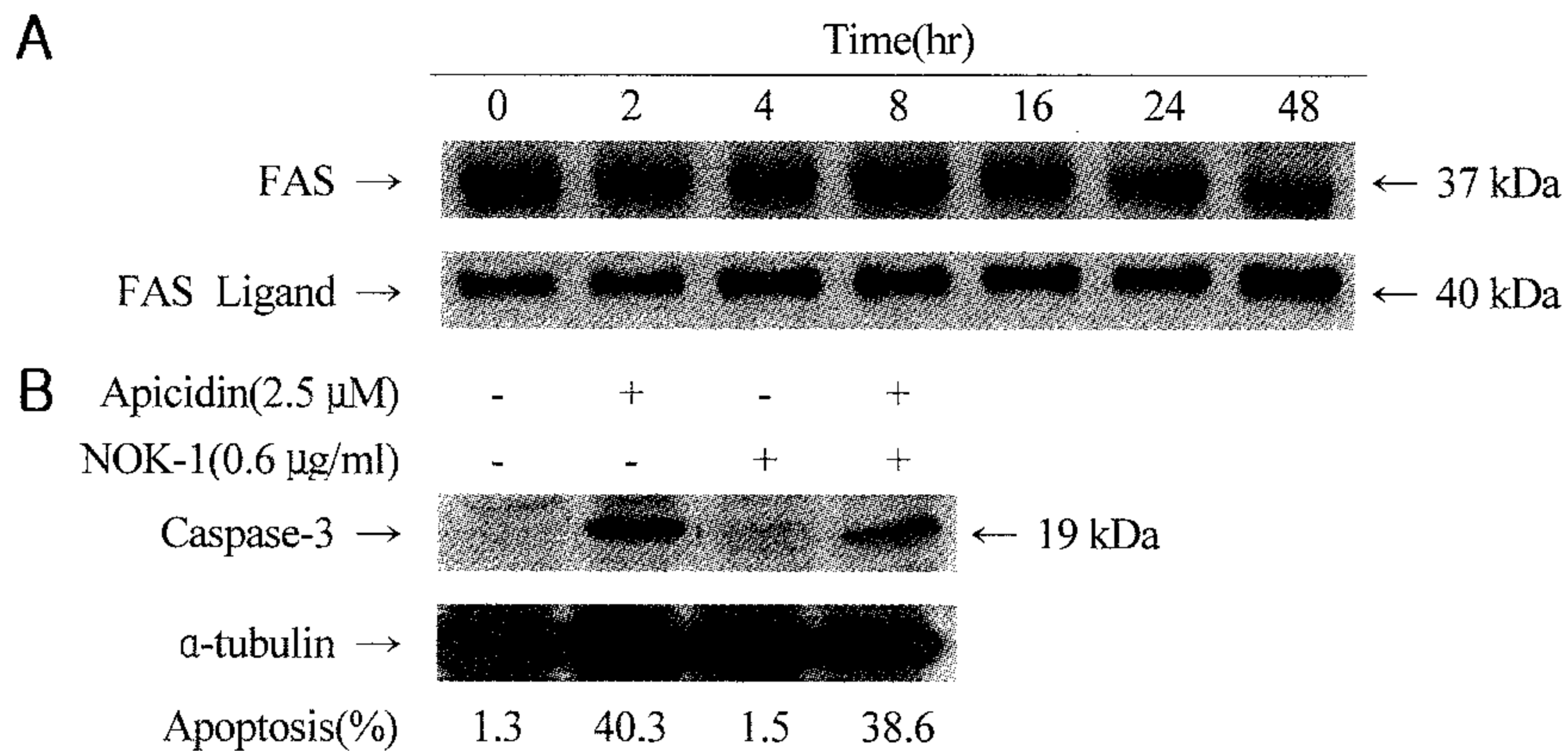


Fig. 6. Effect of apicidin on Fas-Fas ligand pathway of K562 cells. (A)

After treating the K562 cells with 2.5 μM apicidin for the indicated times, the expression of Fas and the Fas ligand were examined by Western blot analysis using the appropriate antibodies. **(B)** The cells were pretreated with 0.6 μg/ml anti-Fas blocking NOK-1 antibodies for 2 hr, followed by a treatment with 2.5 μM apicidin for a further 48 hr. Cleavage of procaspase-3 was examined by Western blot analysis. Apoptotic cells were analyzed by flow cytometry after annexin V/PI staining. The mean value of the percentage of apoptotic cells was shown in the bottom line.

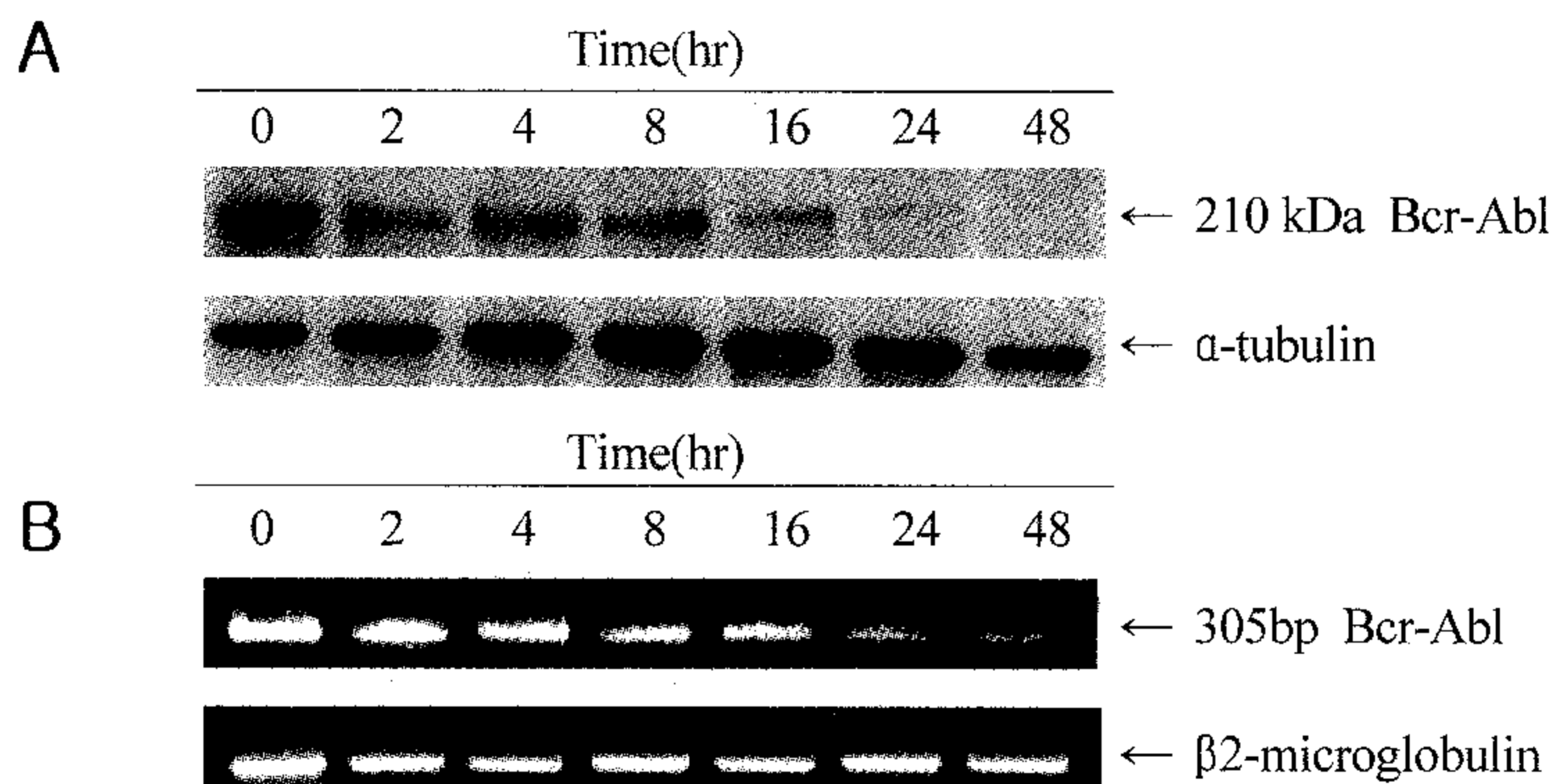


Fig. 7. Effect of apicidin on Bcr-Abl protein and mRNA expression. (A)

After treating the K562 cells with 2.5 μM apicidin for the indicated times, the expression of the p210 Bcr-Abl protein was examined by Western blot analysis using anti-c-Abl antibody. **(B)** The Bcr-Abl mRNA expression level was simultaneously determined by RT-PCR as described in Materials and Methods.

IV. 고 찰

이 연구는 apicidin이 Bcr-Abl을 발현하는 사람의 K562 백혈병 세포주에서 시간- 및 농도-의존적으로 세포사멸을 유도함을 보여주었다. K562 세포를 apicidin으로 처리한 후 생존하는 세포의 수가 감소되고, DNA 분절화의 정도가 증가되었으며, 세포사멸에서 관찰되는 전형적인 형태 변화가 유발되었고, 이러한 현상들은 과아세틸화된 histone H4의 점진적인 축적에 수반하여 발생하였다. Histone H4 아세틸화의 정도는 시간- 및 농도-의존적으로 증가하였으며, apicidin으로 처리하지 않았을 때는 아세틸화 histone H4가 거의 관찰되지 않았다. 이러한 효과는 apicidin이 HDAC1의 양에는 아무런 영향을 미치지 못하였으므로, HDAC 발현 정도의 변화에 의한 것은 아닌 것으로 생각된다. 결과들을 종합해 보면, apicidin의 histone 아세틸화에 대한 효과는 apicidin의 세포사멸에 대한 효과와 밀접하게 연관되어 있으리라 추측할 수 있다.

이 연구에서, apicidin에 의한 세포사멸은 Bax의 미토콘드리아로부터의 전위와 더불어 미토콘드리아에서의 cytochrome c의 유리, 미토콘드리아 막전위의 소실이 먼저 나타난 후 발생하는 것으로 밝혀졌으며, apicidin 처리는 caspase-3, -8 및 -9의 활성화를 유도하였다. K562 세포는 effector caspase-3의 활성화를 통해 세포사멸이 유도되었으며, PARP 분해가 동반되어 관찰되었다. 세포를 caspase 억제제인 DEVD-CHO로 전처리하여, apicidin에 의해 유도되는 세포사멸, PARP 분해 및 procaspase 분해가 완전히 억제됨을 관찰하였다. 따라서, 이러한 결과들로부터 apicidin에 의해 유도되는 세포사멸 과정에는 caspase-3의 활성화가 필요하다는 것을 알 수 있었다.

세포사멸을 유도하기 위한 caspase 활성화에는 두 가지 경로가 있다는 것이 알려져 있다. 첫 번째 경로는 Fas같은 death receptor에서 시작된다³⁴. Fas ligand가 Fas death receptor에 결합을 하게 되면 연결(adaptor) 분자인 FADD가 수용체 부위로 동원되어 procaspase-8의 결합 및 단백분해가 일어나게 되고, 활성 caspase-8이 생성된다³⁵⁻³⁷. 활성화된 caspase-8은 effector caspase(caspase-3, -6 및 -7)를 활성화시킨다^{34,38,39}. 두 번째 경로에서는 다

양한 세포사멸을 유도할 수 있는 신호들이 미토콘드리아 수준에서 수렴되어, cytochrome c를 세포질 내로 유리시키게 된다. Cytochrome c는 세포질 내에서 Apaf-1, dATP, procaspase-9과 복합체(apoptosome)를 형성하여, caspase-9을 활성화시키고, 아래 단계에 있는 caspase cascade를 활성화시켜, 결국 세포사멸을 집행하는 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸을 초래한다³⁸⁻⁴³. 이 연구에서 apicidin 처리 K562 세포에서 cytochrome c가 시간-의존적으로 세포질 내로 유리되는 것이 관찰되었으며, 미토콘드리아 막전위의 소실도 관찰되었다. Apicidin 처리 2시간 후부터 세포질 내에 cytochrome c의 증가가 관찰되었는데, 이는 cytochrome c 유리가 caspase 활성화에 앞서서 일어나는 signaling cascade의 초기 현상이라는 것을 나타낸다. 결론적으로, apicidin에 의한 K562 세포의 세포사멸에서 미토콘드리아가 핵심적인 역할을 하고 있다는 것을 알 수 있다. Caspase-2, -3, -6, -7, -8 및 -10은 무세포 세포추출물(cell-free extracts)에서 cytochrome c에 반응하여 분해된다는 것이 보고된 바 있다^{44,45}. Caspase-3는 caspases-2, -6, -8 및 -10의 활성화에 필요하며, 또한 caspase-9과 연관된 되먹임(feedback) 증폭회로에도 참여하고 있다. 이 연구에서는 apicidin 처리 후에, cytochrome c 유리에 이어 procaspase-3과 -8의 분해가 동시에 일어난다는 것을 보여주었다. Apicidin에 의한 procaspase-3와 -8 분해가 같은 시간에 일어난다는 것은, 이 두 가지 caspase가 어떠한 동일한 선행 사건, 즉, procaspase-9의 활성화에 의해 활성화된다고 하는 설명에 잘 들어맞는다. 실제로, caspase-9 억제제인 LEHD-fmk로 전처치를 하면 procaspase-3와 -8의 분해가 현저하게 억제되는 것이 관찰되었다. 그러므로, caspase-3와 -8은 apicidin 처치에 의해 유도된 미토콘드리아 경로를 통해 활성화된다고 생각되었다.

Apicidin 처치 후 K562 세포에서 Fas 수용체와 Fas ligand의 발현 정도는 변화가 없었으며, K562 세포를 NOK-1 anti-Fas blocking antibody로 전처치하여도 apicidin에 의해 유도되는 세포사멸과 procaspase-3의 분해를 억제할 수 없다는 것이 관찰되었다. 이러한 결과들과 apicidin이 기능적인 Fas system을 발현하지 않는 K562 세포에서 현저한 세포사멸을 유발한다는 사실을 종합해 볼 때, apicidin에 의해 유도되는 세포사멸은 Fas death

receptor로 매개되는 신호와는 무관하다는 결론을 얻을 수 있었다.

앞서 기술한 대로 apicidin 투여 후 세포질 내의 cytochrome c가 시간-의존적으로 증가하였다. 그런데, 미토콘드리아 분획 내의 cytochrome c의 양은 apicidin 처리 후 48시간까지는 큰 변화가 없다가, 갑자기 현저히 감소되는 소견을 나타내었다. 이러한 결과는 아마도 비록 미토콘드리아 외막이 투과되어 cytochrome c의 통과가 가능하여졌지만, 내막은 apicidin 처리 후 48시간까지 완전하게 남아있기 때문일 가능성이 있다. 미토콘드리아 내에 cytochrome c가 남아있는 것은 아마도, apicidin 처리 후 초기에 미토콘드리아 막전위의 감소가 비교적 적은 것과 서로 연관되어 있을 가능성이 있다. 세포사멸을 유도할 수 있는 자극들이 가해지면, Bax가 세포질에서 미토콘드리아로 전위되는 것이 cytochrome c를 미토콘드리아로부터 유리시키고, 미토콘드리아 막전위의 소실을 유발하는데 있어서 핵심적인 단계라는 것이 알려져 있다^{46,47}. 이 연구에서도 K562 세포를 apicidin으로 처리 후 예상대로 미토콘드리아내의 Bax가 시간-의존적으로 점차 증가하는 것이 관찰되었다. 또한 결과에 표시하지는 않았지만, K562 세포에는 p53 단백질의 발현이 없다는 것이 이번 연구에서도 확인되었다. 이 결과들로 K562 세포에서 apicidin에 의해 유도된 Bax의 전위가 p53과 관계가 없다는 것을 알 수 있었다. 예상과 달리, 세포질 내 Bax 단백질량은 apicidin 처리 24시간까지 큰 변화가 없었으며, 48시간 이후에 세포질 내 Bax의 양이 현저히 감소되는 것으로 나타났다. Apicidin 처리 후 세포질 내 Bax 및 미토콘드리아 내의 cytochrome c가 남아있는 현상이 Bcr-Abl 단백질에 의한 것이 아닌지 하는 생각을 해볼 수 있다. Bcr-Abl 과발현은 세포가 세포사멸을 유발할 수 있는 다양한 자극에 노출되었을 때 세포질 내 Bax⁴⁸과 미토콘드리아 cytochrome c⁴⁹의 조기 전위를 억제하고, 미토콘드리아 막전위의 감소와 caspase 활성화를 억제한다는⁴⁸ 사실이 보고된 바 있다. K562 세포주는 대부분의 세포독성 약제들에 비교적 고도의 내성을 보이는데, 이는 아마도 Bcr-Abl 발현과 p53 단백질의 결핍이 공존하기 때문인 것으로 생각되고 있다^{26,49-51}. K562 세포의 항암제-유도 세포사멸에 대한 저항성은 G2/M기에 세포주기를 정지시켜⁴⁹, 미토콘드리아 막전위의 감소

및 cytochrome c 유리를 억제함으로써, 이후의 caspase 활성화와 세포사멸을 방지하는 것으로 알려져 있다^{50,52,53}. 윗 단계에서의 차단 외에도, K562세포는 cytochrome-c에 의한 caspase-9과 -3의 활성화에도 저항성이 있음이 보고된 바 있다^{54,55}. 비록 apicidin이 K562 세포의 세포사멸을 효과적으로 유도하기는 하였으나, apicidin 처치 후 초기에 미토콘드리아에서의 cytochrome c 전위와 세포질에서의 Bax 전위가 억제되는 것으로 보이는 현상이 관찰되었으며, 세포질 내 cytochrome c 증가와 비교할 때 caspase-3, -8 및 -9의 활성화는 지연되어 발생하는 것으로 나타났다. 이 연구에서 Bcr-Abl 단백질 발현이 apicidin 처치 후 16시간 이후에 현저히 감소하는 것으로 나타났다. 결과에 표시하지는 않았으나 caspase가 Bcr-Abl 단백질의 감소와 연관이 있는 지 알아보기 위하여 apicidin 처리 전에 DEVD-CHO를 첨가하였으나, DEVD-CHO는 Bcr-Abl 단백질의 감소를 억제하지 못하였다. 이러한 결과들은 apicidin에 의한 Bcr-Abl 단백질량의 감소가 apicidin-유도 세포사멸 동안의 Bcr-Abl 단백질 분해에 의한 것이 아니라는 사실을 보여준다. 관찰된 apicidin의 Bcr-Abl 단백질에 대한 효과가 전사 후의 modification에 의한 것인지 전사억제에 의한 것인지 더 확실히 하기 위하여 Bcr-Abl mRNA 발현을 측정하였으며, RT-PCR 결과는 Bcr-Abl mRNA 발현도 apicidin 처리 후에 감소하였음을 보여주었다. 이 같은 결과들은 apicidin 처리 후 나타나는 Bcr-Abl 단백질의 감소가 전사 억제에 의한다는 것을 시사한다. Bax와 cytochrome c 분포의 변화, caspase의 활성화, histone H4의 아세틸화 증가와 같은 현상들이 Bcr-Abl 단백질량의 저하와 시간적으로 잘 일치하여 나타난다는 사실은 K562 세포에서의 apicidin-유도 세포사멸과 HDAC 억제가 Bcr-Abl 감소와 밀접하게 연관되어 있음을 제시하고 있다. 그러나, apicidin은 Bcr-Abl을 발현하지 않는 다른 백혈병 세포주들에서도 세포사멸을 유도할 수 있으므로¹⁴, apicidin이 Bcr-Abl을 변동시키는 효과만으로도 세포사멸을 유발하는데 충분한지 아닌지는 확실하지 않다. Anti-sense oligonucleotide를 이용한 이전의 실험 결과들은 Bcr-Abl 발현의 억제만으로는 세포사멸을 유도할 수 있는 자극이 있더라도 세포사멸을 시작시키는데 불충분하다는 것을 보여주었다²⁶.

Apicidin이 protease나 endonuclease같은 세포사멸을 촉진하는 조절인자들의 발현이나 활성화에 영향을 미칠 수 있는지는 확실하지 않다. Apicidin-유도 세포사멸에서 미토콘드리아보다 선행되는 신호들을 밝혀내기 위해서는 보다 많은 연구가 필요하다. Bcr-Abl에 의해 매개되는 세포사멸에 대한 저항성은 Bcl-XL up-regulation과 연관된다는 보고가 있으며⁵³, Bcl-2 protein family의 antiapoptotic member들은 미토콘드리아에서 cytochrome c 유리를 억제한다⁴². 그러나, K562 세포에서 apicidin 투여 후 Bcl-2나 Bcl-XL 단백질에 유의한 변화는 관찰되지 않았다.

요약하면, 이 연구의 결과들은 apicidin이 K562 세포에서 미토콘드리아를 통한 caspase 활성화를 통해 효과적으로 세포사멸을 유도한다는 것을 보여주었다. 또한 apicidin 투여 후 p210 Bcr-Abl 단백질이 현저하게 감소한다는 것을 보여주었다. 사람의 백혈병 세포주인 K562 세포를 이용한 이 실험적인 연구는 apicidin이 약제-내성 만성 골수성 백혈병 등에서 치료약제로서 사용할 수 있는 가능성이 높음을 보여주었다.

V. 결 론

Apicidin은 새로운 HDAC 억제제로서 다양한 종류의 암세포주에 대하여 강력한 증식억제 효과를 가지고 있다. 이 연구의 목적은 apicidin이 Bcr-Abl을 발현하는 사람의 백혈병 세포주인 K562 세포의 세포사멸을 유도할 수 있는지를 알아보고, 세포사멸을 유발한다면 어떤 기전에 의하는지 규명하는 것이다. Apicidin은 세포사멸에 저항성인 Bcr-Abl을 발현하는 K562 세포에서 미토콘드리아-의존성 caspase cascade 활성화를 통하여 효과적으로 세포사멸을 유도함을 알 수 있었다. Apicidin은 세포사멸에 저항성인 Bcr-Abl을 발현하는 백혈병 세포의 세포사멸을 효과적으로 유도하므로, 향후 백혈병 치료제로서의 가능성을 확인하였다.

참고문헌

1. Khochbin S, Verdell A, Lemercier C, Seigneurin-Berny D. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* 2001;11:162-166.
2. Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 1997;89:325-328.
3. Wolffe AP. Transcriptional control. Sinful repression. *Nature* 1997;387:16-17.
4. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998;12:599-606.
5. Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:40-48.
6. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 2000;184:1-16.
7. Vigushin DM, Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer drugs* 2002;13:1-13.
8. Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WJ Jr, Evans RM. Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998;391:811-814.
9. Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Ciocce M, et al. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature* 1998;391:815-818.
10. Wang J, Hoshino T, Redner RL, Kajigaya S, Liu JM. ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10860-10865.
11. Wang J, Saunthararajah Y, Redner RL, Liu JM. Inhibitors of histone deacetylase relieve ETO-mediated repression and induce differentiation of

- AML-ETO1 leukemia cells. *Cancer Res* 1999;59:2766-2769.
12. Medina V, Edmonds B, Young GP, James R, Appleton S, Zalewski PD. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res* 1998;57:3697-3707.
 13. Mandal M, Adam L, Kumar R. Redistribution of activated caspase-3 to the nucleus during butyric acid-induced apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:775-780.
 14. Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, et al. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, inhibits proliferation of tumor cells via induction of p21WAF1/Cip1 and gelsolin. *Cancer Res* 2000;60:6068-6074.
 15. Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, et al. Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *J Biol Chem* 2000;275:20436-20443.
 16. Boyes J, Byfield P, Nakatani Y, Ogryzko V. Regulation of activity of the transcription factor GATA-1 by acetylation. *Nature* 1998;396:594-598.
 17. Marks PA, Richon VM, Rifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1210-1216.
 18. Fenrick R, Hiebert SW. Role of histone deacetylase in acute leukemia. *J Cell Biochem Suppl* 1998;30-31:194-202.
 19. Ferrara FF, Fazi F, Bianchini A, Padula F, Gelmetti V, Minucci S, et al. Histone deacetylase-targeted treatment restores retinoic acid signaling and differentiation in acute myeloid leukemia. *Cancer Res* 2000;61:2-7.
 20. Warrell RP, He LZ, Richon V, Calleja E, Pandolfi PP. Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1621-1625.

21. Taimi M, Chen ZX, Breitman TR. Potentiation of retinoic acid-induced differentiation of human acute promyelocytic leukemia NB4 cells by butyric acid, tributyrin, and hexamethylene bisacetamide. *Oncol Res* 1998;10:75-84.
22. Kitamura K, Hoshi S, Koike M, Kiyoi H, Saito H, Naoe T. Histone deacetylase inhibitor but not arsenic trioxide differentiates acute promyelocytic leukemia cells with t(11;17) in combination with all-trans retinoic acid. *Br J Haematol* 2000;108:696-702.
23. Amin HM, Saeed S, Alkan S. Histone deacetylase inhibitors induce caspase-dependent apoptosis and downregulation of daxx in acute promyelocytic leukaemia with t(15;17). *Br J Haematol* 2001;115:287-297.
24. Bernhard D, Skvortsov S, Tinhofer I, Hubl H, Greil R, Csordas A, et al. Inhibition of histone deacetylase activity enhances Fas receptor-mediated apoptosis in leukemia lymphoblasts. *Cell Death Differ* 2001;8:1014-1021.
25. Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD, Richon VM, et al. Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid(SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-Jun, and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene* 1999;18:7016-7025.
26. McGahon A, Bissonnette R, Schmitt M, Cotter KM, Green DR, Cotter TG. BCR-ABL maintains resistance of chronic myelogenous leukemia cells to apoptotic cell death. *Blood* 1994;3:1179-1187.
27. Ray S, Bullock G, Nunez G, Tang C, Ibrado AM, Huang Y, et al. Enforced expression of Bcl-XS induces differentiation and sensitizes chronic myelogenous leukemia-blast crisis K562 cells to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-mediated differentiation and apoptosis. *Cell Growth Differ* 1996;7:1617-1623.
28. Dan S, Naito M, Tsuruo T. Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhi-

- bitor of BCR-ABL tyrosine kinase, CGP57148. *Cell Death Differ* 1998;5:710-715.
29. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med* 2001;344:1031-1037.
 30. Gorre ME, Mohammed M, Ellwood K, Hsu N, Paquette R, Rao PN, et al. Clinical resistance to STI-571 cancer therapy caused by BCR-ABL gene mutation or amplification. *Science* 2001;293:876-880.
 31. le Coutre P, Tassi E, Varella-Garcia M, Barni R, Mologni L, Cabrita G, et al. Induction of resistance to the Abelson inhibitor STI571 in human leukemic cells through gene amplification. *Blood* 2000;95:1758-1766.
 32. Kwon SH, Ahn SH, Kim YK, Bae GU, Yoon JW, Hong S, et al. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces apoptosis and Fas/Fas ligand expression in human acute promyelocytic leukemia cells. *J Biol Chem* 2002;277:2073-2080.
 33. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, et al. The permeability transition pore complex: A target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1988;187:1261-1271.
 34. Nagata, S. Apoptosis by death receptor. *Cell* 1997;88:355-365.
 35. Scaffidi C, Fulda S, Srinivasan A, Friesen C, Li F, Tomaselli KJ, et al. Two CD95(APO-1/Fas) signaling pathways. *EMBO J* 1998;17:1675-1687.
 36. Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I, Germer M, Pawlita M, Krammer PH, et al. Cytotoxicity-dependent APO-1(Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex(DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995;14:5579-5588.
 37. Boldin MP, Goncharov TM, Goltsev YV, Wallach D. Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 1996;85:803-815.

38. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1999;15:269-290.
39. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: Structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem* 1999;68:383-424.
40. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-489.
41. Liu X, Kim CN, Yang J, Jemmerson R, Wang X. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: Requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996;86:147-157.
42. Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132.
43. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* 2000;256:42-49.
44. Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: Hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999;144:281-292.
45. Tang D, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:9303-9307.
46. Goping IS, Gross A, Lavoie JN, Nguyen M, Jemmerson R, Roth K, et al. Regulated targeting of BAX to mitochondria. *J Cell Biol* 1998;143:207-215.
47. Gross A, Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis.

- EMBO J 1998;17:3878-3885.
48. Keeshan K, Cotter TG, McKenna SL. High Bcr-Abl expression prevents the translocation of Bax and Bad to the mitochondrion. *Leukemia* 2002; 16:1725-1734.
 49. Amarante-Mendes GP, Kim CN, Liu L, Huang Y, Perkins CL, Green DR, et al. Bcr-Abl exerts its antiapoptotic effect against diverse apoptotic stimuli through blockage of mitochondrial release of cytochrome C and activation of caspase-3. *Blood*; 1998;91:1700-1705.
 50. Martin DA, Siegel RM, Zheng L, Lenardo MJ. Membrane oligomerization and cleavage activates the caspase-8(FLICE/MACHalpha1) death signal. *J Biol Chem* 1998;273:4345-4349.
 51. Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S, et al. CGP57148B(STI-571) induces differentiation and apoptosis and sensitizes Bcr-Abl-positive human leukemia cells to apoptosis due to antileukemic drugs. *Blood* 2000;96:2246-2253.
 52. Dubrez L, Eymin B, Sordet O, Droin N, Turhan AG, Solary E. BCR-ABL delays apoptosis upstream of procaspase-3 activation. *Blood* 1998; 91:2415-2422.
 53. Amarante-Mendes GP, McGahon AJ, Nishioka WK, Afar DE, Witte ON, Green DR. Bcl-2-independent Bcr-Abl-mediated resistance to apoptosis: protection is correlated with up regulation of Bcl-xL. *Oncogene*; 1998; 16:1383-1390.
 54. Jia L, Macey MG, Yin Y, Newland AC, Kelsey SM. Subcellular distribution and redistribution of Bcl-2 family proteins in human leukemia cells undergoing apoptosis. *Blood* 1999;93:2353-2359.
 55. Jia L, Srinivasula SM, Liu FT, Newland AC, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES, et al. Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood* 2001;98: 414-421.

Abstract

Induction of apoptosis by apicidin, a histone deacetylase inhibitor, through activation of mitochondria-dependent caspase cascade in K562 leukemia cell line

So Young Chong

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor **Yoo Hong Min**)

Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, is a novel cyclic tetrapeptide that exhibits potent antiproliferative activity against various cancer cell lines. The aim of this study was to investigate the potential of apicidin to induce apoptosis in human Bcr-Abl-expressing K562 leukemia cells and to determine the apoptosis-inducing mechanism.

K562 leukemia cells were exposed to various concentrations of apicidin for 2-72 hr, after which the level of apoptosis, histone acetylation, mitochondrial damage, caspase activation, and Bcr-Abl protein expression were assessed.

Apicidin induced the apoptosis of K562 cells in a time- and dose-dependent manner. Induction of apoptosis was confirmed by the typical apoptotic nuclear changes and DNA fragmentation, which were preceded by the mitochondrial release of cytochrome c, and the disruption of the mitochondrial membrane potential. Apicidin induced an increase in the acetylation of histone H4 in a time- and dose-dependent manner. Apicidin-induced activation of caspase-3, -8, and -9 was accompanied by PARP degradation. Pretreatment with a caspase-3 inhibitor, DEVD-CHO, completely inhibited the apicidin-

induced apoptosis, and procaspase-3 cleavage. Pretreating the K562 cells with the caspase-9 inhibitor, LEHD-fmk, decreased the procaspase-3 and -8 cleavage induced by apicidin. The level of Fas and Fas ligand expression in the K562 cells were unchanged by apicidin. Preincubation with Fas-blocking NOK-1 monoclonal antibody did not interfere with the apicidin-induced apoptosis, and procaspase-3 cleavage. Bcr-Abl protein expression was notably decreased with apicidin treatment. RT-PCR demonstrated that the Bcr-Abl mRNA expression levels also notably decreased.

Taken together, these results suggest that the apoptosis in K562 cells induced by apicidin is based on the activation of a mitochondria-dependent caspase cascade. Since apicidin effectively induces the cell death of the apoptosis-resistant Bcr-Abl-expressing leukemia cells, its potential as a therapeutic agent should be further validated.

Key Words: Apicidin, Histone deacetylase inhibitor, Apoptosis, Bcr-Abl, K562 leukemia cell line