

Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서
미토콘드리아 의존성 Caspase Cascades
활성 증가 기전을 통한 Apicidin에 의한
STI571 유도 세포고사의 증가

연세대학교 대학원
의 학 과
김 진 석

Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서
미토콘드리아 의존성 Caspase Cascades
활성 증가 기전을 통한 Apicidin에 의한
STI571 유도 세포고사의 증가

지도 민 유 홍 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2003년 12월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
김 진 석

김진석의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

심사위원 _____인

연세대학교 대학원

2003년 12월 일

감사의 글

본 논문이 완성되도록 아낌없는 배려와 용기를 북돋아주신 민유홍 교수님께 진심으로 감사드리며, 각별한 조언을 아끼지 않으신 고윤웅 교수님, 양우익 교수님, 유철주 교수님, 허만욱 교수님께 고개 숙여 감사를 드립니다. 항상 세심한 지도를 해주신 한지숙 교수님, 이승태 교수님과 정준원 선생님, 맹호영 선생님, 안중배 선생님을 비롯한 많은 일산병원의 선생님들께도 감사를 드립니다. 그리고, 실험실에서 많은 도움을 주신 김지연, 정희경, 엄주인 선생님께도 감사드립니다. 아울러 보이지 않게 끊임없이 격려해주신 아버님과 두 동생 내외들과 여러 친구들, 특히 늘 우리 내외를 위해 기도해 주시는 장인, 장모님과 형님 내외분께 진심으로 감사드립니다. 그리고 논문을 쓸 수 있도록 건강을 허락하신 하나님께 마지막으로 감사드립니다. 이 논문을 먼 곳에 계신 어머니와 항상 곁에서 따뜻한 후원을 보내준 사랑하는 아내 지원이와 아들 재원에게 바칩니다.

저 자 씀

차 례

국문 요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 대상 세포	6
2. 시약	6
3. 방법	7
가. 실험 구성	7
나. Annexin-V 염색을 통한 세포고사 측정	7
다. DNA fragmentation 분석	7
라. 미토콘드리아 세포막 전위 측정	7
마. 히스톤 분리와 아세틸화된 히스톤 H4 면역측정	8
바. 미토콘드리아와 세포질 분획 준비	8
사. Western blot 분석	8
4. 통계 분석	9
III. 결 과	10
1. STI571과 apicidin이 K562 세포에서 미토콘드리아 손상과 세포고사에 미치는 영향	10
2. HL-60, U937, Jurkat 세포주와 만성 골수성 백혈병 환자의 백혈병 세포에서 STI571과 apicidin의 상호 작용	13
3. K562 세포에서 히스톤 아세틸화에 대한 STI571과 apicidin의 효과	14
4. K562 세포에서 Cytochrome C 분비와 Caspase Cascade 활성화에 대한 STI571과 apicidin의 효과	14
5. K562 세포에서 항세포고사 단백질의 표현에 대한 STI571과 apicidin의 효과	18
6. Bcr-Abl 단백질의 하향 조절에 대한 STI571과 apicidin의 효과	20

IV. 고 찰 22
V. 결 론 27
참고 문헌 28
영문 요약 34

그림 차례

Fig. 1. Apicidin potentiates STI571-induced apoptosis in K562 cells · 11	11
Fig. 2. Effect of STI571/apicidin in other leukemic cells ······ 13	13
Fig. 3. Effect of STI571/apicidin on the acetylation of histone H4 in K562 cells ······ 14	14
Fig. 4. Cytochrome C release and activation of caspase cascades after apicidin treatment ······ 15	15
Fig. 5. Cytochrome C release and activation of caspase cascades after STI571/apicidin treatment ······ 16	16
Fig. 6. STI571/apicidin-induced apoptosis: dependent on the activation of caspase cascades ······ 17	17
Fig. 7. Effect of STI571/apicidin on the expressions of anti-apoptotic proteins ······ 19	19
Fig. 8. Expressions of anti-apoptotic proteins dependent on the activation of caspase cascades ······ 20	20
Fig. 9. Effect of STI571/apicidin on the down-regulation of p210 Bcr-Abl protein ······ 21	21

국문요약

Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서 미토콘드리아 의존성 Caspase Cascades 활성 증가 기전을 통한 Apicidin에 의한 STI571 유도 세포고사의 증가

STI571은 Bcr-Abl 양성 세포의 세포고사 유도 물질로 잘 알려져 있는 tyrosine kinase 억제제로서 만성기의 만성 골수성 백혈병에서의 초기 임상 결과는 매우 고무적이었으나, STI571에 대한 내성 발현과 진행된 형태의 만성 골수성 백혈병에서의 제한적인 성적이 보고되고 있으며, 최근 이를 극복하기 위한 많은 시도가 진행되고 있다. Apicidin은 histone deacetylase 억제제의 하나로 여러 암세포주에서 광범위한 항증식 작용을 보이는 새로운 cyclic tetrapeptide이다. 저자는 Bcr-Abl 양성 세포주 (K562)와 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서 apicidin이 STI571 유도 세포고사를 강화시킬 수 있는지 알아보기로 하였다. K562 세포주에서 최소 독성 농도의 STI571을 단독으로 처리한 결과에 비하여 STI571과 apicidin을 동시에(STI571/apicidin) 48 시간 동안 처리한 결과 미토콘드리아 손상이 상당히 증가하였으며 (미토콘드리아 세포막 전위의 감소와 세포질로의 Cytochrome C 분비의 증가), caspase-3, -8, -9와 poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)의 분리의 증가와 함께 세포고사도 증가하였다. 만성 골수성 백혈병 급성기 환자의 백혈병 세포에서도 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 HL-60, U937, Jurkat과 같이 Bcr-Abl을 표현하지 않는 세포주에서는 이러한 결과를 얻을 수 없었다. Caspase-3 억제제인 DEVD-CHO는 매우 효과적으로 STI571/apicidin 유도 세포고사와 procaspase-3, -8, -9와 PARP의 분리를 억제하였다. STI571과 apicidin은 단독으로는 세포고사의 저항에 관여하는 단백질 XIAP 단백질의 농도에 영향을 주지 못하였으나, 48 시간 동안의 STI571/apicidin 동시 처리에 의해서는 거의 완전히 전체 길이의 XIAP 단백질이 소실되었고, caspase 의존적인 방식으로 29 kDa의 XIAP 분리 산물이 증가하였다. 그리고 STI571/apicidin 동시처리에 의하여 세포질로의 Smac/DIABLO 분비가 급격히 증가하였다. STI571이나 apicidin을 단독으로 24 시간이나 48 시간 동안 처리하였을 때는 Bcr-Abl 단백질의 농도에는 거의 변화가 없었으나, 48 시간 동안 동시

에 처리하였을 때는 caspase 의존적인 방식으로 Bcr-Abl 단백질의 농도가 현저히 감소하는 결과를 얻었다. 결론적으로 본 연구자는 미토콘드리아 의존성 caspase cascades 활성 증가, Bcr-Abl 단백질의 감소 그리고 XIAP 단백질의 현저한 감소를 통하여 apicidin이 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서 STI571 유도 세포고사를 증가시킴을 발견하였다. 본 결과는 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병의 치료 전략 설정에 있어서 apicidin과 STI571의 병합 투여에 대한 더 많은 연구가 필요함을 제시해 준다.

핵심되는 말: STI571, apicidin, histone deacetylase 억제제, Bcr-Abl, 백혈병

Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서 미토콘드리아 의존성 Caspase Cascades 활성 증가 기전을 통한 Apicidin에 의한 STI571 유도 세포고사의 증가

<지도 민 유 홍 교수>

연세대학교 대학원 의학과

김진석

I. 서론

Bcr-Abl 양성 만성 골수성 백혈병은 그 병인에 있어서 Bcr-Abl 융합 유전자에 의하여 생성된 tyrosine kinase의 조절 불능 상태가 주된 역할을 한다.¹⁻³ Bcr-Abl 양성 백혈병 세포들은 세포고사에 저항을 나타내며, 심지어 고용량의 항백혈병 약제에도 저항을 보인다.⁴⁻⁶ Bcr-Abl의 표현은 미토콘드리아의 투과성 전이와 세포질로의 Cytochrome C 분비를 차단함으로써 세포고사 실행자인 caspases의 활성을 억제하고, 결국 세포고사를 억제하게 된다.^{6,7}

이와 같이 Bcr-Abl tyrosine kinase의 역할은 잘 알려져 왔으며, Bcr-Abl tyrosine kinase를 선택적으로 억제하는 물질의 개발이 진행 되어왔다. 최근 Bcr-Abl, c-kit, 그리고 platelet-derived growth factor receptor kinases에 대한 억제제인 STI571에 대하여 상당한 관심이 집중되고 있다.^{8,9} In vitro 연구에서는 STI571은 micromolar 농도에서 Bcr-Abl 양성 백혈병 세포의 성장을 억제하는 효과를 보여주었는데,⁹ 종양세포가 STI571에 노출이 되면 백혈병 세포의 세포고사가 증가하는데,^{10,11} 이는 Bcr-Abl이 백혈병 세포 성장의 이득 뿐 아니라, 동시에 생존을 위해 필요하다는 것을 의미한다. 초기 임상 시험에서 STI571은 많은 조기의 만성 골수성 백혈병 환자에서 완전한 혈액학적 관해를 보였고, 일부에서는 완전한 세포 유전학적 관해를 보였다.^{12,13} 비록 만성 골수성 백혈병에서 STI571은 초기 임상 시험에서는 매우 고무적인 결과를 보여주었으나,^{12,13} 약제 내성의 발현과 진행한 형태의 만성 골수성 백혈병에서의 제한적인 성적이 보고되고 있으며, 따라서 최근 이를 극복하기 위한 많은 시도가 진행되고 있으며,¹³⁻¹⁷ STI571과 함께 Bcr-Abl 신호전달 체계와 그 하부 전달 체계에 해당하는 물질

을 억제하는 다른 약제를 병합하여 사용하는 전략의 개발로 이러한 저항을 극복하려는 시도가 촉구되고 있다.

몇몇 연구 기관에서는 STI571과 전통적인 세포 독성 물질들과의 병합 요법으로 Bcr-Abl 양성 백혈병 세포의 고사가 증가됨을 보고하였고,^{11,18-20} STI571과 mitogen-activated protein/extracellular signal regulated kinase kinase (MEK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) inhibitors,²¹ arsenic trioxide,²² cyclin-dependent kinase inhibitor flavopiridol,²³ tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand,²⁴ phosphatidylinositol-3 kinase inhibitor,²⁵ suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA),²⁶ 또는 geldanamycin²⁷과 같은 새로운 물질을 병합 투여 시 상승 작용이 보고되고 있다. 이러한 결과는 병합 사용된 물질이 Bcr-Abl 신호전달 체계를 추가적으로 억제함으로써 Bcr-Abl 양성 백혈병 세포의 STI571에 의한 세포고사 작용을 상승시킬 가능성을 높여 준다고 볼 수 있다.

염색질 (chromatin)에 있는 nucleosomes의 중심 단백질 히스톤의 아세틸화와 탈아세틸화는 유전자 발현의 조절에 있어 중요한 역할을 한다.²⁸ 전사적으로 활발한 유전자는 매우 아세틸화된 중심 히스톤과 연관이 있으며, 반대로 탈아세틸화된 히스톤은 전사 억제에 따른 유전자 발현 억제와 연관이 있다.^{29,30} 아세틸화된 상태의 히스톤은 histone acetyltransferases와 histone deacetylase (HDAC)의 활성화에 의하여 조절된다.^{31,32} HDAC 억제제에 의한 히스톤의 과아세틸화 유도는 항증식 활동과 종양적인 특성의 반전을 유발하며, 이러한 작용은 세포주기 조절, 증식, 그리고 세포고사의 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 유전자의 선택적인 전사 조절을 통해서 일어난다고 알려져 있다.^{26,32-38} 새로운 HDAC 억제제인 apicidin은 여러 암 세포주에 강력한 증식 억제작용을 가지고 있다.^{33,37} Apicidin은 HL-60 백혈병 세포에서도 세포고사를 유도할 수 있는 것으로 보고되고 있는데, 선택적인 Fas/Fas ligand의 유도로 인한 미토콘드리아에서의 Cytochrome C의 분비와 이에 의한 caspase-9와 caspase-3의 활성화를 통하여 세포고사를 유도하는 것으로 알려져 있다.³⁹ 선행 연구에서 apicidin은 Bcr-Abl 양성 사람 만성 골수성 백혈병 세포주인 K562에서 미토콘드리아 세포고사 경로의 활성화를 통하여 세포고사를 유도함을 알 수 있었고, 또한 Bcr-Abl 단백질의 하향 조절이 동반됨을 알 수 있었다.⁴⁰ 이러한 결과를 바탕으로 apicidin이 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서 STI571의 효과를 증대시킬 수 있을 것으로 생각된다.

이에 본 연구자는 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포주와 만성 골수성 백혈병 급성기 환자에서 얻은 백혈병 세포에서 미토콘드리아 손상과 세포고사를 유도함에 있어서 apicidin이 STI571의 세포고사에 대한 효과를 상승시키는지 분석하고자 하였다. HDAC 억제제인 apicidin과 tyrosine kinase 억제제인 STI571의 병합 사용이 새롭고 효과적인 항백혈병 치료 전략의 하나가 될 가능성을 검증하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 대상 세포

K562, HL-60, U937, Jurkat 사람 세포주를 사용하였고, 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 세포주는 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, HyClone Laboratories, Logan, UT, USA), 1% penicillin/streptomycin, sodium pyruvate, MEM essential vitamins, 2 mM L-glutamine (Life Technologies, Grand Island, NY, USA)를 포함한 RPMI-1640 (Life Technologies)에서 배양하였다. 3 명의 만성 골수성 백혈병 급성기 환자로부터 동의서를 얻은 뒤에 STI571을 사용하기 이전에 말초혈액에서 백혈병 세포를 얻어서 사용하였다. 말초 혈액은 Ficoll-Hypaque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) 농도 차이를 이용한 분리법으로 분리하였다. 세척을 한 뒤에 이들 세포들을 high gradient magnetic cell separation system/anti-CD3 monoclonal antibody (Miltenyi Biotech, Auburn, CA, USA)를 이용하여 제조사에서 제공한 방법에 의하여 T 세포 분리를 하였다. 형태학적으로 분리된 세포의 95% 이상이 백혈병 세포이었다. 실험에 사용한 세포주와 환자의 세포는 0.3% trypan blue 용액으로 염색한 뒤에 hemocytometer를 이용하여 활성도를 측정하였으며 활성도는 95% 이상이었다.

2. 시 약

STI571은 Novartis Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)에서 기증을 받아 사용하였고, 멸균 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma, St. Louis, MO, USA)에 10 mM 원액 (stock solution) 상태로 보관하였다. Apicidin (cyclo(N-O-methyl-L-tryptophanyl-L-isoleucinyl-D-pipecolinyl-L-2-amino-8-oxodecanoyl))은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. 멸균 DMSO에 원액 (1 mM)을 넣고 -80°C에서 3 개월이 넘지 않게 보관하였다. 배양시 마지막 DMSO 농도는 0.1%를 유지하였고, 이 농도는 세포에 독성은 없었다. Caspase-3 억제제인 DEVD-CHO (Calbiochem, San Diego, CA)는 DMSO에 녹였으며, -70°C에서 필요할 때 까지 보관하였다. 단백질 분석 재료는 Bio-Rad (Hercules, CA, USA)에서 구입하였다.

3. 방 법

가. 실험 구성

모든 실험을 위해서 로그 급수로 늘어나는 (logarithmically) 세포 성장을 보이는 세포를 (5×10^5 cells/ml) 10% FBS를 포함한 2 ml의 RPMI-1640이 들어있는 6 well plate의 각 well에 넣고, 24 또는 48 시간 동안 apicidin이 있거나 없는 상태에서 STI571에 노출시켰다. 5% CO₂와 95% 공기로 이루어진 습도가 있는 대기에 37°C를 유지하면서 세포 배양을 하였다. 배양 기간의 마지막에서는 세포들을 멸균 원심 분리관으로 옮기고 아래 기술한 분석을 위한 준비를 하였다. 각각의 실험은 3 회 반복하였다.

나. Annexin-V 염색을 통한 세포고사 측정

Annexin-V 분석은 제조회사 (PharMingen, San Diego, CA, USA)에서 제시한 방법에 의하여 시행하였다. 간단히 언급하면, 배양된 세포를 모아서 binding buffer로 세척한 뒤에 5 µL의 annexin-V-FITC을 포함한 100 µL의 binding buffer에 넣고 배양하였다. 핵은 propidium iodide (PI)로 대조 염색하였다. 세포고사가 된 세포의 비율은 FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

다. DNA fragmentation 분석

세포 침전물 (1×10^6 세포)을 실온에서 15 분간 200 µL의 lysis buffer (0.5% Triton X-100, 10 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl, pH 8.0)에 재 부유 하였으며, 16,000 g로 10 분간 원심분리 하였다. 그 다음에 phenol: chloroform (1:1)로 2 회 DNA를 추출하였으며, ethanol로 침전시키고 Tris/EDTA buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, and 1 mM EDTA)에 재부유하였다. DNA는 2% agarose gel 전기영동으로 분리하여 분석하였다.

라. 미토콘드리아 세포막 전위 측정

미토콘드리아 세포막 전위 (mitochondrial membrane potential, MMP)는 3,3-dihexyloxacarbocyanine iodide (DiOC6)를 사용하여 이전에 기술한 방법에 의하여

측정하였다.⁴¹ 각각의 조건은 1×10^6 세포를 37°C에서 40 nM DiOC6 (Calbiochem, San Diego, CA) 1 ml에 넣고 15 분간 배양하고, 그 다음에 FACSCalibur flow cytometer와 CellQuest software (Becton Dickinson, San Jose, CA)를 이용하여 분석하였다. MMP의 소실을 확인하는 대조 실험은 MMP를 파괴하는 분리 제제인 carbamoyl cyanide m-chlorophenylhydrazine (Sigma, St. Louis, MO) 5 μ M에 세포를 노출시켜서 시행하였다.

마. 히스톤 분리와 아세틸화된 히스톤 H4 면역 측정

기존에 알려진 방법을 사용하여¹⁴ 지정된 시간 동안 apicidin이나 STI571을 처리한 후에 K562 세포로부터 히스톤을 추출하였다. Laemmli sample buffer에 3 분간 재 부유하였다. 단백질을 (10 μ g)을 10% SDS-PAGE로 분리하였고, nitrocellulose로 옮긴 뒤 아세틸화된 히스톤 H4에 대한 항체와 enhanced chemiluminescence (ECL) detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 확인하였다.

바. 미토콘드리아와 세포질 분획 준비

세포들을 채취하여 4°C phosphate-buffered saline (PBS)으로 세척하였고, 세포 침전물을 250 mM의 sucrose와 proteinase 억제제를 포함하는 300 μ L의 buffer A (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM dithiothreitol)에 재부유하였다. 균질화 (homogenization)를 한 뒤에 깨지지 않은 세포, 큰 세포막의 조각, 핵을 4°C에서 1,000 g로 1 분간 원심 분리하여 제거하였다. 상층액은 4°C에서 10,000 g로 20 분간 원심분리 하였다. 미토콘드리아를 포함하는 세포 침전물은 50 μ L의 TNC buffer (10 mM Tris acetate, pH 8.0, 0.5% Nonidet-40, 5 mM CaCl₂)에 녹였다. 상층액은 50,000 g로 2 시간 더 원심분리 해서 세포질을 얻었고, Western blot 분석에 사용하였다.

사. Western blot 분석

세포에 약제를 처리한 뒤에 전체 세포 침전물 (3×10^6 cells/condition)을 PBS로 2회 세척하였고, 50 μ L의 PBS에 재 부유한 뒤에 200 μ L의 2 \times Laemmli buffer (1 \times = 30 mM Tris-base (pH 6.8), 2% SDS, 2.88 mM β -mercaptoethanol, and 10% glycerol)를 추가하여 녹이고 간단히 초음파 파괴 (sonication)를 하였다. 균

질화된 단백질은 Coomassie 단백질 분석 시약 (Pierce, Rockford, IL, USA)을 이용하여 정량화 하였다. 동량 (20 µg)의 단백질을 10 분간 끓이고 SDS-PAGE를 이용하여 분리한 뒤에 nitrocellulose위로 옮겼다. 단백질의 이동과 동량 부하를 확인하기 위하여 0.1% amido black으로 염색하였고, 5% acetic acid로 탈색하였다. 22°C의 PBS-Tween (PBS-T) (0.05%)과 5 % 우유에서 1 시간 동안 고정을 한 뒤에 적절히 희석된 항체를 넣고 22°C의 신선한 고정액에서 4 시간 동안 배양하였다. 사용된 항체 중 caspase-3, caspase-8, caspase-9에 대한 항체는 PharMingen (San Diego, CA)으로부터 구입하였고, cleaved caspase-3, Cytochrome C, Bax, phospho-Akt/PKB (Ser473), Mcl-1, X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP), second mitochondrial activators of caspases (Smac)/DIABLO, poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다. Bcl-xL와 Bcl-2에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서, 그리고 HDAC-1, c-Abl, α -tubulin과 acetyl-histone H4에 대한 항체는 Upstate Biotechnology Incorporated (Lake Placid, NY, USA)에서 구입하였다. PBS-T에서 5 분간 3 회 세척한 다음 1:2000으로 희석한 horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 넣고 22°C에서 1 시간 동안 배양하였다. PBS-T에서 4 회 세척을 한 다음, ECL detection system (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)을 이용하여 반응 단백질을 검출하였다. 각각의 실험은 3 회 반복하였으며, 대조군으로 α -tubulin을 사용하였다.

4. 통계 분석

실험 조건간의 차이에 대한 의의를 측정하기 위하여 two-tailed Student t-test를 사용하였다. 상승작용에 대한 분석은 컴퓨터 프로그램 (Calculus; Biosoft, Ferguson, MO, USA)을 사용하여 median dose effect 분석법을 이용하였다.

III. 결 과

1. STI571과 apicidin이 K562 세포에서 미토콘드리아 손상과 세포고사에 미치는 영향

Apicidin이 STI571 유도 세포고사에 미치는 영향을 측정하기 위하여, K562 세포에 800 nM의 apicidin이 있거나 없는 상태에서 다양한 농도의 STI571을 넣고 48 시간 동안 노출시킨 후 세포고사 정도를 측정하였다. STI571 단독으로는 500 nM의 농도에서는 세포고사에 매우 적은 영향 (세포고사 4.4%)을 주는 반면에, STI571을 1 μ M 이상의 농도를 사용하면 약 20%에 이르는 세포고사를 유도하였다 (Figure 1A). 그러나 apicidin (800 nM)과 STI571을 동시에 사용한 경우에는 50 nM 이상의 STI571 농도에서 세포고사가 상당히 증가하였고, STI571의 농도를 500 nM 이상 사용한 경우 거의 100%에 이르는 세포고사를 관찰 할 수 있었다 (Figure 1A). K562 세포는 1.5 μ M 이상의 apicidin 농도에서 농도 의존적인 방식으로 세포고사가 증가하였으나, 1 μ M 이하의 apicidin 농도에서는 세포고사의 정도는 무시할 정도로 적었다 (1 μ M에서 4.6 %의 세포고사) (Figure 1B). 그러나 500 nM의 STI571과 동시에 사용한 경우에는 100 nM 이상의 apicidin 농도에서 세포고사가 상당히 증가하였고, apicidin의 농도를 500 nM 이상 사용한 경우 거의 100%에 이르는 세포고사를 관찰 할 수 있었다 (Figure 1B). K562 세포에 500 nM STI571과 800 nM apicidin을 노출시키고, 시간별로 분석해 보면 24 시간에서는 세포고사의 증가가 적었으나, 48 시간에서는 상당히 많은 세포고사가 관찰되었다 (90.2%) (Figure 1C). 미토콘드리아 세포막 전위 소실 ($\Delta\Psi_m$)을 측정하여 얻은 결과도 위에서 얻은 세포고사의 정도와 유사한 결과를 얻었다 (Figure 1D).

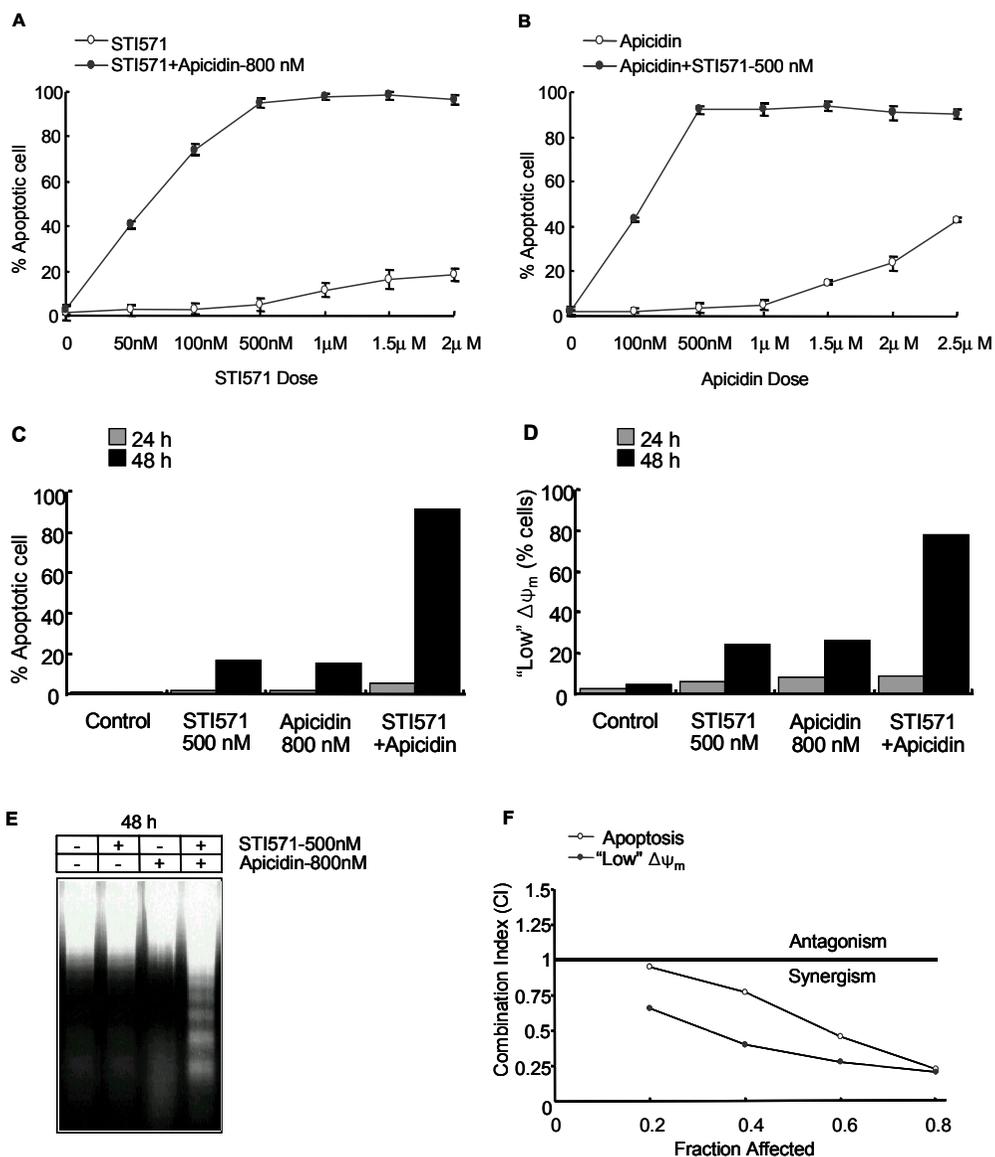


Fig. 1. Apicidin potentiates STI571-induced apoptosis in K562 cells. (A) Logarithmically growing K562 cells were exposed to the designated concentrations of STI571 for 48 h in the presence or absence of 800 nM of apicidin, after which the percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometric analysis, as described in Materials and Methods. (B) Cells were exposed to the designated concentrations of apicidin for 48 h in the presence or absence of 500 nM STI571, after which apoptosis was assessed.

(C) K562 cells were exposed to 500 nM STI571, 800 nM apicidin, or the combination for 24 h (□) or 48 h (■), after which the percentage of apoptotic cells was determined. (D) Cells were exposed to the drugs described in C, after which the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was assessed in DiOC6 treated specimens by flow cytometry, as described in Materials and Methods. In each case, values represent the means of three separate experiments performed in triplicate; bars, \pm SD. (E) K562 cells were exposed to 500 nM STI571 or 800 nM apicidin, or to both agents for 48 h, after which total genomic DNA was extracted and resolved on 2% agarose gel. Apoptotic DNA fragmentation was visualized by ethidium bromide staining and photographed under UV illumination. (F) K562 cells were exposed to varying concentrations of STI571 and apicidin at a constant ratio of 1:1.6 for 48 h, after which the percentage of apoptotic cells or loss of was determined as above. The combination index for each fraction affected was determined using a commercially available software program (Median Dose-Effect Analysis). Values $<$ 1.0 correspond to synergistic interactions.

DNA fragmentation 분석 결과 K562 세포에서 apicidin에 의하여 STI571 유도 DNA 손상이 심화되는 결과를 얻었다 (Figure 1E). K562 세포를 500 nM의 STI571이나 800 nM의 apicidin 단독으로 48 시간 동안 처리하면 DNA fragmentation의 정도는 거의 관찰되지 않았다. 그러나 두개의 약제에 동시에 노출을 시키면 DNA fragmentation의 정도는 급격히 증가하는 결과를 보였다 (Figure 1E). 이와 같이 특히 세포 독성이 적은 농도의 apicidin이 K562 세포에서 STI571 유도 미토콘드리아 손상과 세포고사를 현저히 증가 시켰고, 48 시간 동안 배양한 경우 잘 관찰할 수 있었다. Median Dose Effect 분석법으로 48 시간에 세포고사 정도와 미토콘드리아 세포막 전위 소실 정도를 가지고 STI571과 apicidin 사이의 상호작용의 특성을 분석한 결과 세포고사의 유도에 있어서는 지속적으로 combination index values가 1.0 미만으로 관찰되어서 이들 두 가지 약제의 상호작용이 매우 상승적으로 작용을 하고 있음을 알 수 있었다 (Figure 1F).

2. HL-60, U937, Jurkat 세포주와 만성 골수성 백혈병 환자의 백혈병 세포에서 STI571과 apicidin의 상호 작용

STI571과 apicidin의 상호작용을 K562 이외의 조혈 세포에서 관찰하였다 (Figure 2A-D). 800 nM의 apicidin 단독으로는 HL-60 세포주에서 상당한 독성을 보였고, apicidin에 500 nM의 STI571 첨가한 경우 apicidin의 독성을 증가시키지는 못하였다 (Figure 2A). HL-60 세포주의 결과와 비슷하게 Bcr-Abl을 표현하지 않는 다른 세포주 (U937, Jurkat)에서도 세포고사 유도에 있어서 STI571과 apicidin의 상승적인 상호작용은 관찰되지 않았다 (Figure 2B-C).

반면에 만성 골수성 백혈병 급성기 환자로부터 얻은 백혈병 세포는 K562 세포주보다 다소 STI571에 저항을 보이는 경향을 보였다 (Figure 2D). 그러나 500 nM의 STI571과 800 nM의 apicidin을 함께 처리한 결과 48 시간에 세포고사는 78%에서 관찰되어서 각각의 약제를 단독으로 사용하였을 때 보다 상당한 세포고사의 증가를 보였다 (Figure 2D). 미토콘드리아 세포막 전위 소실 ($\Delta\Psi_m$)을 측정하여 얻은 결과도 이와 비슷한 결과를 얻었다.

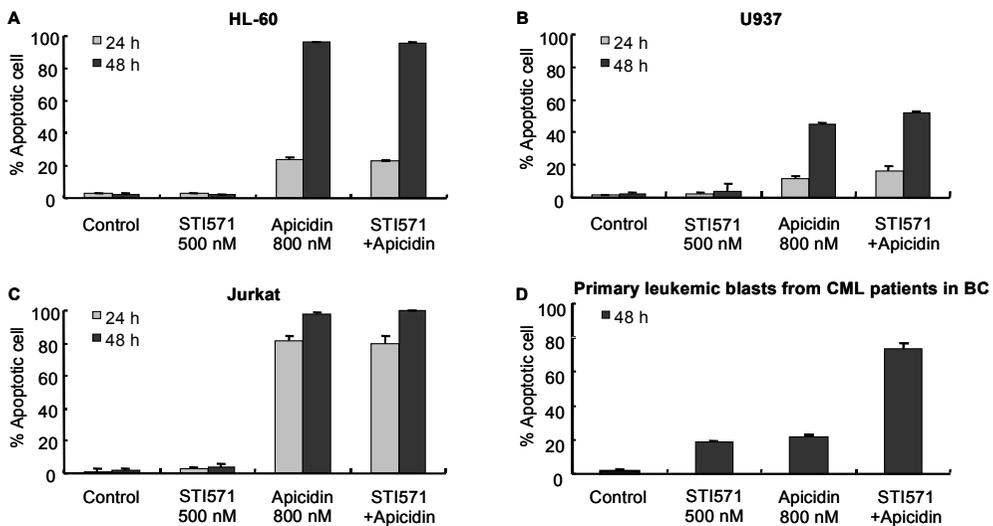


Fig. 2. Cells were exposed to 500 nM STI571 \pm 800 nM apicidin for 24 or 48 h, after which the percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometric analysis. (A) HL-60; (B) U937; (C) Jurkat; (D) Primary leukemic blasts obtained from patients with CML blast crisis (48 h). Values represent the means of three separate experiments performed in triplicate; bars, \pm SD.

3. K562 세포에서 히스톤 아세틸화에 대한 STI571과 apicidin의 효과

K562 세포에서 STI571의 유무에 따른 apicidin이 세포내 히스톤 H4의 아세틸화에 미치는 영향에 대하여 알아보았다. 800 nM의 apicidin 처리에 의하여 히스톤 H4의 아세틸화는 24 시간-48 시간 이후에 상당히 증가하였으나, apicidin은 HDAC-1의 양의 변화를 유도하지 않았다. (Figure 3A-B).

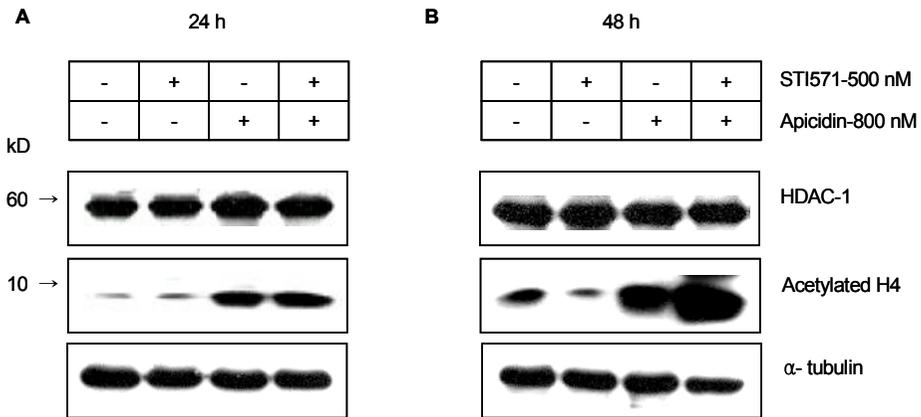


Fig. 3. Effect of STI571/apicidin on the acetylation of histone H4 in K562 cells. K562 cells were exposed to 500 nM STI571 or 800 nM apicidin, or to both agents for 24 (A) or 48 (B) h, after which the histone fractions were isolated, as described in Materials and Methods. Proteins (10 μ g) were separated by 10% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with antibody against acetylated histone H4. In addition, the HDAC expression level in the cell lysate was examined by Western blot analysis using anti-HDAC-1 antibody.

4. K562 세포에서 Cytochrome C 분비와 Caspase Cascade 활성화에 대한 STI571과 apicidin의 효과

K562 세포주에서 STI571/apicidin 유도 세포고사에 있어 세포고사 경로를 Western blot 분석을 사용하여, 이 과정에서 관계있는 여러 단백질의 표현 변화를 측정하였다. 우선 K562 세포에서 2.5 μ M의 apicidin 단독 처리에 의한 Cytochrome C, Bax, 그리고 여러 caspase 단백질 표현의 시간에 따른 변화를 측

정하였다. 세포고사를 유도하는 2.5 μ M의 apicidin의 농도에서 시간 의존적으로 미토콘드리아에서 세포질로의 Cytochrome C의 분비가 일어났다. 세포질로의 Cytochrome C의 분비는 16 시간 이후에 현격히 증가하였고, 24 시간에 최고로 증가하였다. 이와 동반되어서 apicidin 처리 16 시간 이후에 미토콘드리아의 Cytochrome C는 감소하였다. 미토콘드리아에서의 Bax 단백질의 증가는 apicidin 처리 8 시간 이후부터 현저히 증가하였다. 또한 apicidin 24 시간 처리 이후에 caspase-3 분리에 비례하여 procaspase-3, -9, -8의 분리와 각각의 활성화된 분리 산물의 형성 및 분리된 PARP (89 kDa, 24 kDa)의 증가가 관찰되었다 (Figure 4).

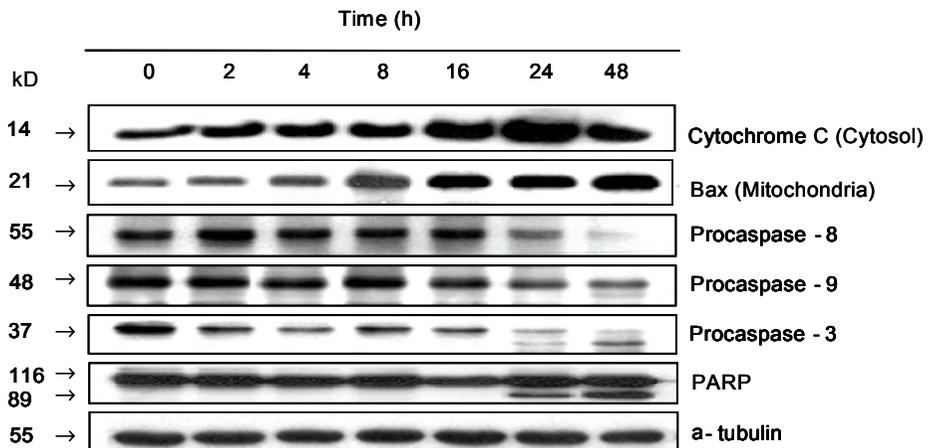


Fig. 4. The K562 cells were exposed to apicidin for the indicated times, after which the protein fractions were subjected to Western blot analysis and separated by SDS-PAGE. Each lane was loaded with 20 μ g of protein. The blots were probed with antibodies against Cytochrome C and Bax (first & second lanes). The cytosolic and mitochondrial fractions were prepared as described in Material and methods. The blots were also probed with antibodies against procaspase-8, -9, -3, and PARP (third to sixth lanes). After analysis, the blots were stripped and reprobed for α -tubulin to ensure an equal loading and protein transfer. The results of a representative study are shown; two additional experiments produced equivalent results.

이와는 반대로, 최소 독성 농도인 500 nM의 STI571이나 800 nM의 apicidin 단독으로는 24 시간 또는 48 시간 동안 노출하였을 때는 뚜렷한 세포질로의 Cytochrome C 분비나 미토콘드리아로의 Bax 전위 또는 caspase-9, -3, -8, 그리고 PARP의 분리가 관찰되지 않았다 (Figure 5A-B). 그러나 K562 세포에 48 시간 동안 500 nM의 STI571과 800 nM의 apicidin을 함께 처리하면, Cytochrome C 분비, Bax의 전위, 그리고 caspase-9, -3, -8과 PARP의 분리가 매우 두드러진 결과를 보이고 (Figure 5B), 그 결과는 시간대에 따른 세포고사의 결과와 일치하였다 (Figure 1C).

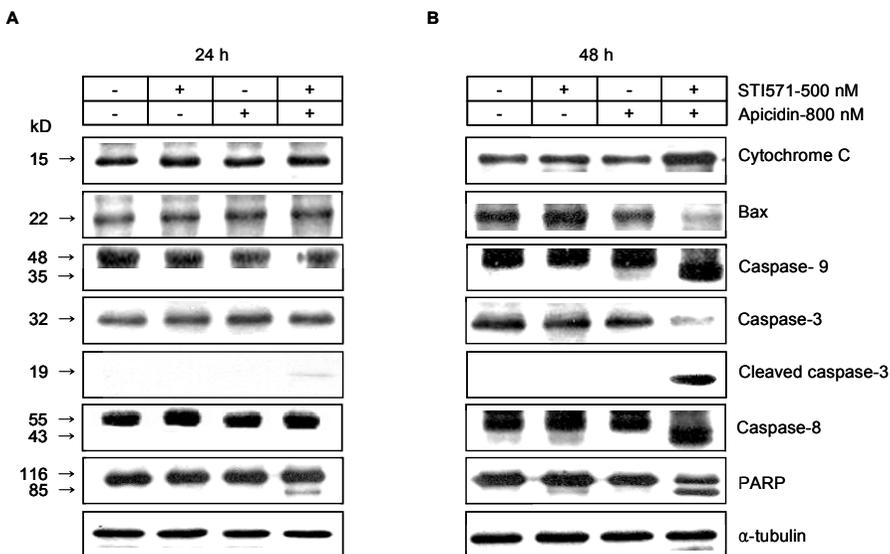


Fig. 5. K562 cells were exposed to 500 nM STI571 ± 800 nM apicidin for 24 (A) or 48 (B) h, after which the protein fractions were subjected to Western blot analysis. After separation on SDS-PAGE, blots were probed with antibodies against caspase-9, caspase-3, caspase-3 cleaved product, caspase-8, and PARP. Each lane was loaded with 20 µg of protein, and after analysis, blots were stripped and reprobed for α-tubulin to ensure equal loading and protein transfer. Alternatively, the cytosolic and mitochondrial fractions were obtained, as described in Materials and Methods, and the expressions of Cytochrome C and Bax protein probed, respectively. The results of a representative study are shown; two additional experiments produced equivalent results.

500 nM의 STI571과 800 nM의 apicidin에 48 시간 동안 노출된 세포에 caspase-3 억제제인 DEVD-CHO (100 μ M)를 투여하여 세포고사를 관찰하였다. DEVD-CHO는 매우 효과적으로 STI571/apicidin 유도 세포고사를 감소시켰고 (Figure 6A), 비록 그 정도는 적지만 미토콘드리아 세포막 전위 소실 ($\Delta\Psi_m$)을 측정된 결과도 비슷한 결과를 보였다 (Figure 6B). 또한 DEVD-CHO의 전 처치는 STI571/apicidin에 의하여 유도되는 procaspase-9, -3, -8과 PARP의 분리를 억제하였는데 (Figure 6C), 이러한 결과는 STI571과 apicidin에 의한 세포고사의 과정이 caspase cascades 활성화에 의존적이라는 것을 의미한다고 할 수 있다.

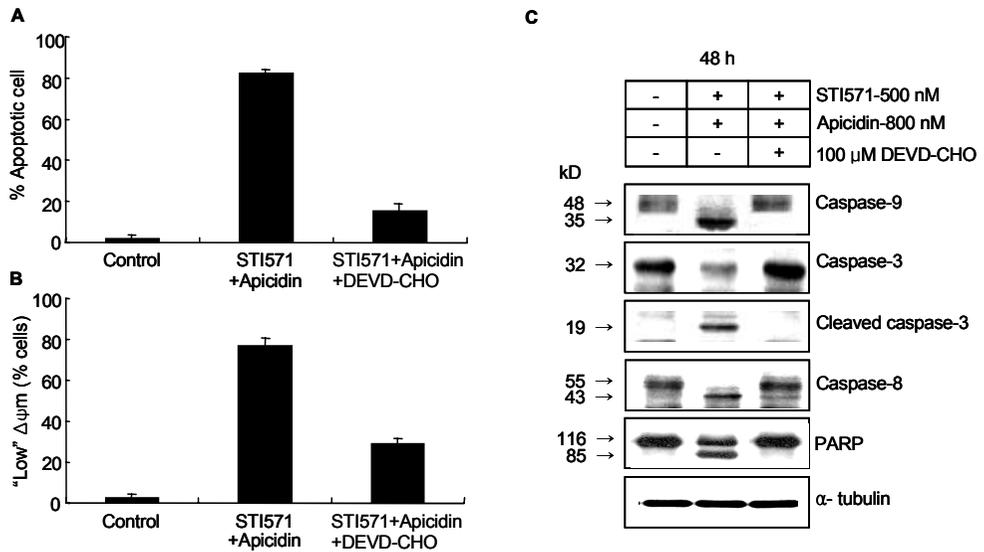


Fig. 6. (A) K562 cells were exposed to 500 nM STI571 plus 800 nM apicidin for 48 h in the presence or absence of the caspase-3 inhibitor DEVD-CHO (100 μ M), after which the percentage of apoptotic cells was determined by flow cytometry. (B) Cells were treated as above, after which the loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) was assessed in DiOC6-treated specimens by flow cytometric analysis, as described. In each case, values represent the means of three separate experiments performed in triplicate; bars, \pm SD. (C) Cells were treated as above, after which proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with antibodies against caspase-9, caspase-3, caspase-3 cleaved product, caspase-8, and PARP. The results of a representative study are shown; two additional experiments yielded similar results.

5. K562 세포에서 항 세포고사 단백질의 표현에 대한 STI571과 apicidin의 효과

Western blot 분석을 이용하여 apicidin이 항 세포고사 단백질의 표현에 미치는 영향을 조사하였으며, STI571과 연관된 작용에 대한 효과를 확인하였다. 24 시간이나 48 시간 동안 최소 독성 농도인 500 nM의 STI571이나 800 nM의 apicidin을 각각 넣은 경우 항 세포고사 단백질인 Bcl-xL이나 Bcl-2의 표현에는 영향이 없었다(Figure 7A-B). 비록 apicidin이 Mcl-1 단백질의 농도를 조금 증가시켰으나, STI571의 추가로 이러한 apicidin 유도 Mcl-1 단백질의 상승 조절은 소실되었다(Figure 7A-B). STI571이나 apicidin 단독 사용으로는 Ser473 Akt/PKB의 인산화에 영향을 주지 못하였다. 그러나 K562 세포에 24~48 시간 동안 STI571과 apicidin을 함께 넣으면, 상당한 Ser473 Akt/PKB 단백질 인산화의 감소를 관찰할 수 있었다(Figure 7A-B). STI571이나 apicidin을 단독으로 사용한 경우 XIAP 단백질의 표현에 매우 적은 영향을 보였다. 흥미롭게도 48 시간 동안 STI571과 apicidin을 함께 처리한 경우 거의 완전한 전체 길이의 XIAP 단백질의 소실을 관찰할 수 있었고, 여기에 상응하는 분리된 XIAP 단백질 산물인 29 kDa 크기의 polypeptide 증가를 관찰하였다(Figure 7B). K562 세포를 24 시간 동안 STI571이 있거나 없는 상태에서 apicidin으로 처리하면 세포질로 Smac/DIABLO의 분비를 유도하였고(Figure 7A-B), 48 시간 동안 STI571과 apicidin을 함께 처리하면 상당한 Smac/DIABLO의 증가를 유도하였다(Figure 7B).

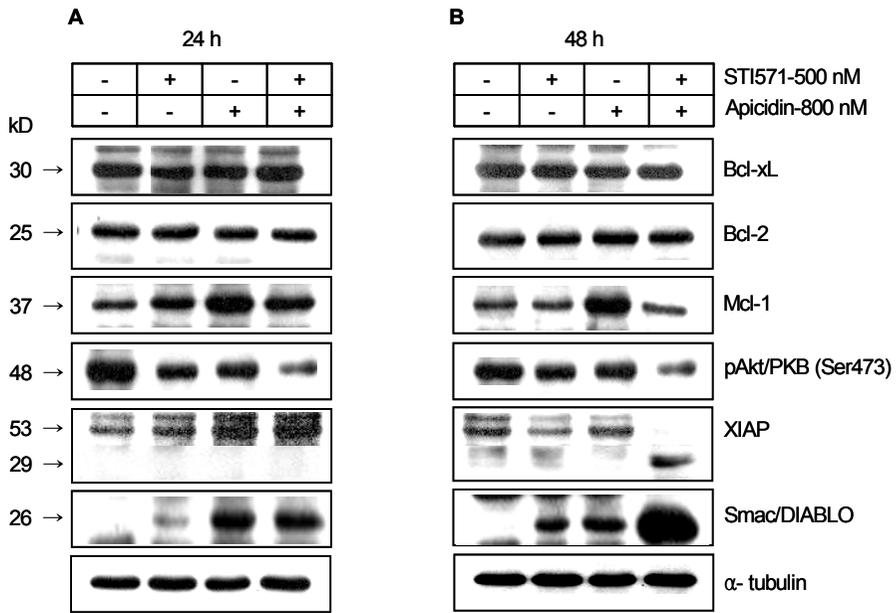


Fig. 7. K562 cells were exposed to 500 nM STI571 \pm 800 nM apicidin for 24 (A) or 48 (B) h, after which the protein fractions were subjected to Western blot analysis. After separation on SDS-PAGE, blots were probed with antibodies against Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, Ser473 phospho-Akt/PKB, XIAP, and Smac/DIABLO. Each lane was loaded with 20 μ g of protein, and after analysis, blots were stripped and reprobed for α -tubulin to ensure equal loading and protein transfer. The results of a representative study are shown; two additional experiments produced equivalent results.

세포고사에 관여하는 caspases가 여러 신호전달 단백질의 분리를 유도할 수 있다는 점을 고려하여 caspase-3 억제제인 DEVD-CHO에 노출된 STI571/ apicidin 처리 세포에서도 항 세포고사 단백질에 대한 동일한 실험을 시행하였다. Figure 8에서 보여준 바와 같이 Bcl-xL과 Bcl-2의 표현은 DEVD-CHO 처리에 의하여 영향을 받지 않았다. 그러나 XIAP 단백질의 분리나 세포질로의 Smac/DIABLO 분비 증가는 DEVD-CHO에 의하여 소실되었으며, 이러한 결과는 크게 이들 단백질의 활성이 caspase와 연관성이 있음을 반영한다.

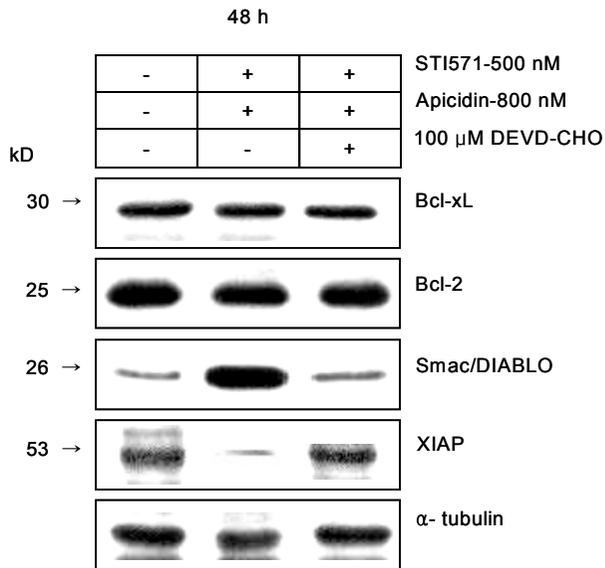


Fig. 8. K562 cells were exposed to 500 nM STI571 + 800 nM apicidin for 48 h in the presence or absence of DEVD-CHO (100 μ M), after which proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with antibodies against Bcl-xL, Bcl-2, Smac/DIABLO, and XIAP. Each lane was loaded with 20 μ g of protein, and after analysis, blots were stripped and reprobed with antibody directed against α -tubulin to ensure equal loading and transfer. The results of a representative study are shown; two additional experiments yielded equivalent results.

6. Bcr-Abl 단백질의 하향 조절에 대한 STI571과 apicidin의 효과

24 시간 또는 48 시간 동안 K562 세포를 500 nM의 STI571과 800 nM의 apicidin을 함께 사용하여 처리한 효과가 Bcr-Abl 단백질 표현에 미치는 영향과의 연관성을 관찰하였다. 24 시간 또는 48 시간 동안 STI571이나 apicidin 모두 단독 사용으로는 Bcr-Abl 단백질 표현에 거의 영향을 주지 못하였다 (Figure 9A-B). 그러나 K562 세포에 48 시간 동안 STI571과 apicidin을 함께 처리하여 현저한 Bcr-Abl 단백질의 감소 결과를 보였다. 더욱이 이러한 STI571/apicidin 처리된 K562 세포에서의 Bcr-Abl 단백질의 하향 조절은 DEVD-CHO 전처치에 의하여 소실되었고, 이러한 결과는 크게 Bcr-Abl 단백질의 발현 수준의 변화가 caspase와 연관성이 있음을 반영한다 (Figure 9C).

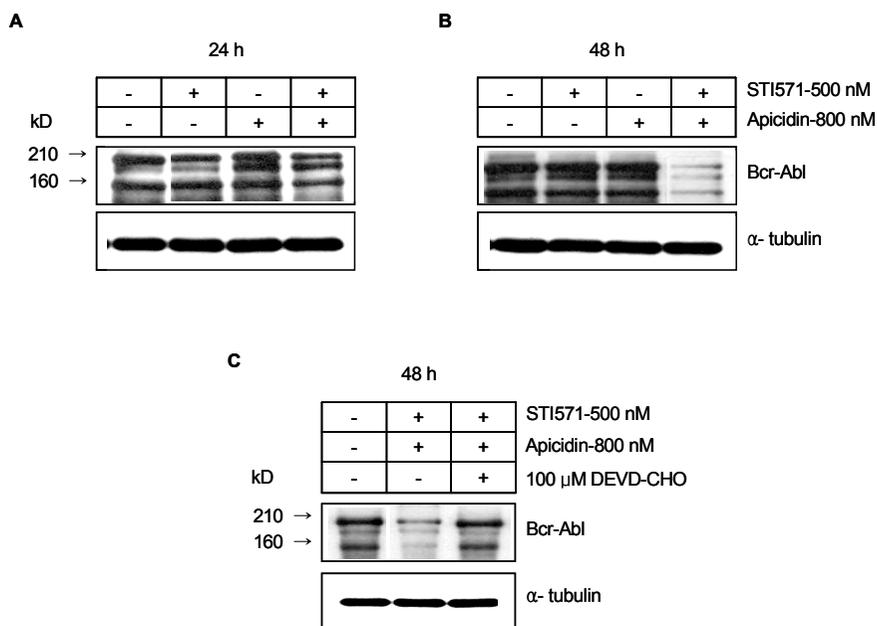


Fig. 9. Effect of STI571/apicidin on Bcr-Abl protein expression. K562 cells were exposed to 500 nM STI571 or 800 nM apicidin, or to both agents for 24 (**A**) or 48 (**B**) h, after proteins were extracted, and subjected to Western blot analysis to monitor the expression of Bcr-Abl protein using antibody against c-Abl. (**C**) Cells were exposed to 500 nM STI571 + 800 nM apicidin for 48 h in the presence or absence of DEVD-CHO (100 μM), after which proteins were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose, and probed with antibodies against c-Abl. Each lane was loaded with 20 μg of protein; blots were subsequently stripped and reprobed for the expression of α-tubulin to ensure equivalent loading and transfer.

IV. 고 찰

본 연구에서는 HDAC 억제제인 apicidin이 STI571과 매우 상승적인 방법으로 작용하여 Bcr-Abl 양성 사람 골수성 백혈병 세포의 세포고사를 유도함을 보여 주었다. 비록 만성 골수성 백혈병에서 STI571의 초기 임상 결과는 매우 희망적이었으나,^{12,13} 약제 내성의 발현과 함께 더욱이 급성기의 환자에서 제한된 반응이 나타나면서 많은 도전에 직면해 있다. 현재 이러한 저항성 극복을 위한 전략의 하나로 Bcr-Abl 양성 백혈병 세포에 대하여 STI571과 다른 약제와의 병합요법이 다양하게 시도되고 있다.

본 연구에서 보여준 STI571과 apicidin의 상승적 세포고사 작용은 여러 측면에서 매우 두드러진 결과를 보여준다. 특히 Bcr-Abl 양성 백혈병 세포에서 세포독성이 적은 낮은 농도의 STI571과 apicidin의 병합 투여에도 높은 상승작용이 나타난 점과 이러한 상당한 세포고사의 증가에 대하여 가능성 있는 작용기전을 제시한 것은 매우 흥미로운 결과이다. 세포고사를 유도하는 농도의 apicidin 단독에 의한 Bcr-Abl 양성 K562 세포의 세포고사에 대한 실험 결과 2.5 μ M의 apicidin에 노출된 후 16 시간에 미토콘드리아의 활성화 (세포질로의 Cytochrome C의 분비와 Bax의 미토콘드리아 내로의 이동)가 관찰되었고, 이 이후에 caspase pathway의 활성화와 PARP의 분리가 나타남을 알 수 있었다. 미토콘드리아 세포막 전위의 파괴 정도는 Cytochrome C의 분비와 일치하였다. 이러한 결과로 볼 때 apicidin 단독에 의하여 Bcr-Abl 양성 K562 세포의 세포고사를 유도하는 기전은 Bcr-Abl 단백 농도의 감소를 동반한 미토콘드리아 활성화와 caspase pathway의 활성화로 설명할 수 있었다.

비록 HL-60 백혈병 세포에서는 apicidin이 선택적으로 Fas/Fas ligand의 유도과 미토콘드리아에서의 Cytochrome C의 분비, caspase-9와 -3의 활성화를 통하여 세포고사 유도를 한다고 알려져 있으나,³⁹ Bcr-Abl 양성 백혈병 세포에서 세포고사 유도에 있어서 STI571과 apicidin의 관계에 대해서는 알려진 바가 없다. 이전의 보고에 의하면 K562 세포에서 500 nM의 STI571에 48 시간 동안 노출이 되었을 때 약 20% 세포의 세포고사와 함께 caspase-9의 활성화, 세포질로의 Cytochrome C의 분비와 PARP의 분리가 증가한다고 하였다.¹¹ 본 연구에서는 미토콘드리아 세포막 전위의 파괴, 세포질에 Cytochrome C의 축적, caspase-9, -3, -8의 활성화와 PARP의 분리가 매우 낮은 독성 농도의 STI571 (\leq 500 nM)이나 apicidin (\leq 1 μ M)을 단독 사용한 경우에는 무시할 만한 정도였다. 그러

나 Bcr-Abl 양성 K562 세포와 만성 골수성 백혈병의 급성기 환자에서 얻은 백혈병 세포를 매우 낮은 독성 농도의 STI571과 apicidin을 함께 처리하였을 때 세포고사와 함께 미토콘드리아 세포막 전위의 파괴, 세포질의 Cytochrome C, caspase-9, -3, -8의 활성화와 PARP의 분리가 상당히 증가하였다. 이러한 결과는 HL-60, U937, Jurkat 세포들에서는 관찰되지 않았으며, 결론적으로 STI571/apicidin에 의한 세포고사의 상승적인 유도가 Bcr-Abl tyrosine kinase를 표현하는 백혈병 세포에서만 작용됨을 의미한다. K562 세포를 caspase-3 억제제인 DEVD-CHO로 전처리 한 경우 STI571/apicidin에 의한 세포고사가 강력하게 억제되었고, 미토콘드리아 세포막 전위의 파괴, caspase-9, -3, -8의 활성화의 진행과 PARP의 분리가 역시 억제되었다. 이러한 결과는 K562 세포에서 STI571/apicidin에 의한 세포고사가 미토콘드리아 의존성 caspase cascades 활성 증가 기전을 통하여 일어남을 의미한다.

K562 세포를 STI571/apicidin으로 처리하여 caspase-9와 -3의 활성화와 연관된 caspase-8의 분리를 유도한 것은 흥미로운 결과이다. Caspase-8의 활성화는 미토콘드리아 활성을 통한 procaspase-9의 활성을 통한 세포고사와 다른 경로에 관여하는 것으로 알려져 있었으나, 최근의 보고에서는 이러한 caspase-8의 활성화 역시 Cytochrome C 와 연관된 세포고사에 관여하는 것으로 보고되고 있고, caspase-3과 -8이 caspase-9를 포함하는 되먹임 증폭 고리에 참여하는 것을 알려져 있다.^{42,43} 다시 말하면 소위 "apoptosome"이라는 세포질의 c-Apaf (apoptotic protease activating factor)-1-caspase-9 복합체에 의하여 유도되는 caspase-3의 활성화는 caspase-8을 분리하고 활성화시킬 수 있다고 알려져 있으며,⁴⁴ 선행 연구에서 K562 세포에서 caspase-9 특이 억제제인 LEHD-fmk의 전처리에 의하여 apicidin에 의한 procaspase-3과 -8의 분리가 억제됨을 알 수 있었다.⁴⁰

이소성이거나 내인성 Bcr-Abl 표현이 미토콘드리아 투과성 이행과 Cytochrome C의 분비를 억제함으로써 caspase-3의 활성화와 세포고사를 억제하게 된다.⁷ STI571에 노출되면 tyrosine kinase의 활성을 감소시키거나 Bcr-Abl 수준은 감소시키지 못한다고 알려져 있다.¹¹ 본 연구에서도 매우 낮은 독성 농도의 500 nM의 STI571이나 800 nM의 apicidin을 단독 사용한 경우에는 Bcr-Abl 단백질의 수준이 감소하지 않았다. 그러나 K562 세포를 STI571/apicidin으로 처리한 결과 현저하게 Bcr-Abl 단백질의 수준이 감소되었다. 이러한 STI571에 의한 세포고사에 미치는 apicidin의 상승 효과는 Bcr-Abl 음성 백혈병 세포

주에서는 관찰되지 않았으며, 이것은 STI571 유도 미토콘드리아 손상과 이어진 caspase cascades의 활성화에 apicidin이 상승효과를 보이는 것이 직접적으로 Bcr-Abl 단백질의 감소와 연관이 있을 것으로 판단된다. 최근에 HDAC 억제제인 SAHA가 K562 세포에서 Bcr-Abl 단백질의 수준을 하향 조절한다고 보고되었다.²⁶ 이것은 Bcr-Abl의 자가-tyrosine 인산화의 감소와 연관이 있다고 보고하였다.²⁶ 세포고사에 관여하는 caspase가 다양한 신호 전달 단백질의 분리를 유도할 수 있다는 점에 중점을 두고, caspase-3 억제제인 DEVD-CHO를 사용하여 STI571/apicidin 처리 세포에서 같은 실험을 시행 하였다. 본 연구에서 STI571/apicidin 처리 세포에서 하향 조절된 Bcr-Abl 단백질이 DEVD-CHO에 의하여 근본적으로 회복됨을 보여 주었고, 이러한 결과는 Bcr-Abl 단백질의 감소가 대부분 활성화된 caspase와 연관이 있음을 반영한다. Apicidin이 과아세틸화된 H4를 증가시켰다는 점을 고려해 보면, 그 기전은 확실하지 않지만 caspase-3과 연관된 Bcr-Abl 단백질의 표현 감소를 증가시키기 위하여 HDAC 억제제가 적어도 부분적으로는 STI571의 능력을 증가시킬 수 있다고 주장할 수 있다. 비록 STI571/apicidin에 의한 Bcr-Abl 단백질 표현의 감소가 caspase-3 억제제에 민감하였으나, proteasome의 분쇄가 역시 이 과정에 관여했을 가능성을 배제할 수는 없다. 그 기전이 무엇이든지, 본 실험의 결과는 apicidin과 낮은 농도의 STI571을 함께 처리하는 것이 미토콘드리아 의존성 caspase cascades의 활성을 통하여 Bcr-Abl 단백질의 표현이 감소되는 증폭 고리를 활성화시킬 가능성을 높여 준다.

Bcr-Abl 물질 자체 이외에 Bcr-Abl 하부 신호전달 체계에 있는 여러 물질이 Bcr-Abl 양성 세포의 생존을 증가시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.⁴⁵⁻⁴⁷ 적어도 부분적으로는 STI571/apicidin이 이들 추정되는 전구 생존 단백질 표현의 하향 조절을 통하여 작용할 가능성이 있다. Bcr-Abl에 의한 백혈병으로의 전환은 세포고사를 억제하는 Akt/PKB kinase 활동도의 증가가 관여한다고 알려져 있다.⁴⁷ Fang 등은 STI571이 Akt/PKB kinase의 활동도를 억제하는 것으로 보고하였다.¹¹ 본 연구에서는 최소 독성 농도의 STI571은 Ser473 Akt/PKB 인산화의 정도에는 영향을 주지 않았다. 그러나 24 시간에서 48 시간 동안 K562세포에 STI571과 apicidin을 동시에 처리하면 비록 그 정도는 많지 않지만, 현저한 Ser473 Akt/PKB 단백질의 인산화가 감소하였다. K562 세포를 200-500 nM의 STI571에 48 시간 동안 노출시켜도 세포내 항 세포고사 단백질인 Bcl-2는 변화하지 않으나,¹¹ Bcl-xL은 감소하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 STI571에 apicidin의 첨가가 Bcl-2와 Bcl-xL에 영향을 주지 않았고, 이러한 결과는 Bcl-2와

Bcl-xL 단백질이 STI571/apicidin 유도 세포고사에 있어 중요한 역할을 하는 단백질이 아닌 것으로 판단할 수 있을 것이다. 비록 apicidin 단독 처리에 의해서는 Mcl-1 단백질의 표현이 조금 증가하였으나, apicidin에 STI571을 첨가하여 apicidin에 의하여 상향 조절된 Mcl-1 단백질이 다시 감소되었다. STI571/apicidin 처리 세포에서 Mcl-1 단백질의 표현 정도가 STI571 단독 처리 세포에서와 차이가 없었으므로, Mcl-1 단백질은 STI571/apicidin에 의한 상승적인 세포고사 유도에는 작용하지 않을 것으로 생각된다.

XIAP는 세포고사 억제물질에 속하는 중요한 단백질이다. XIAP는 caspase-3, -7, -8, 그리고 9의 활성을 억제한다.^{48,49} XIAP가 없으면 caspases의 활성은 매우 증가한다. 또한 STI571은 XIAP와 c-IAP를 하향 조절한다고 알려져 있다.¹¹ 본 연구에서는 K562 세포에서 XIAP가 최소 독성 농도의 STI571이나 apicidin 단독 처리에 의해서는 변화되지 않음을 알 수 있었다. 그러나 K562 세포에 STI571과 apicidin을 함께 처리한 경우에는 전체 길이의 XIAP 단백질이 거의 완전히 소실되는 결과를 보였다. 전체 길이의 XIAP 단백질의 감소는 분리된 절편에 해당하는 29 kDa의 단백질이 나타나는 것과 연관이 있는데, 이것은 caspase 활성화 동안에 XIAP 단백질의 분리된 절편이 형성됨을 의미한다.⁵⁰ XIAP 단백질의 분리는 항 세포고사 단백질들의 제거에 대한 추가적인 기전을 대표할 수 있으며, 이러한 XIAP 단백질의 분리가 caspase 활성화와 세포고사의 유도를 이끌어 낸다고 볼 수 있다. 그러므로 STI571에 의한 세포고사가 apicidin에 의하여 강화되는 것은 전체 길이의 XIAP 단백질의 소실과 XIAP 단백질의 분리된 절편의 증가와 연관이 있을 가능성이 있다. XIAP 단백질의 분리는 caspase-의존적,⁵⁰ 또는 caspase-비의존적⁵¹이라고 알려져 있다. 본 연구에서는 STI571/apicidin 처리 세포에서 전체 길이의 XIAP 단백질의 소실이 DEVD-CHO 처리에 의하여 회복되는 점은 주로 caspase와 연관된 XIAP 단백질의 분리를 반영한다. 비록 STI571/apicidin에 의한 XIAP 단백질의 표현 감소가 caspase-3 억제제에 민감하였으나, proteasome의 분리가 역시 이 과정에 관여했을 가능성을 배제할 수 없다. 최근에는 XIAP를 포함하는 몇몇 IAP 단백질들은 세포고사 하는 흥선 세포들에서 proteasome-의존적 방법으로 분리된다고 알려져 있다.⁵² 또한 XIAP는 ubiquitin ligase (E3)의 활동도를 가지고 있고, *in vitro*와 배양된 세포들에서 자기 자신의 ubiquitination을 촉진시킨다고 알려져 있다.⁵² 그 기전이 무엇이든지, 본 실험의 결과는 apicidin과 낮은 농도의 STI571을 함께 처리하는 것이 전체 길이의 XIAP 단백질을 상당한 정도로 감소시키고, K562 세포를 세포고사의 유도에 민감하게 만들 가능

성을 높여 준다.

Smac/DIABLO는 XIAP와 c-IAP를 포함하는 IAPs에 의한 caspases 억제를 완화시키기 위하여 세포고사 동안에 미토콘드리아에서 분비되는 단백질이다.^{53,54} K562 세포에 24 시간 동안 STI571이 있거나 없는 상태에서 apicidin을 처리하면 세포질로 Smac/DIABLO의 분비가 유도된다. 그러나 K562 세포에 STI571과 apicidin을 함께 처리한 경우에 세포질로의 Smac/DIABLO의 분비가 현격히 증가하였다. Smac/DIABLO 분비가 활성화된 caspases를 필요로 하기 때문에,⁵⁵ STI571/apicidin에 의한 caspase cascades의 활성화는 K562 세포에서 Smac/DIABLO의 분비를 증가시킬 수 있었을 것이다. 사실, 본 실험에서도 caspase-3 억제제 존재 하에 Smac/DIABLO의 분비가 억제됨을 알 수 있었다. 전체 길이의 XIAP 단백질의 소실을 동반한 Smac/DIABLO의 분비 증가는 부분적으로는 STI571과 apicidin을 함께 처리하여 유도된 세포고사를 증가시키는데 기여할 수 있는 것으로 판단된다.

종합적으로 본 연구에서는 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서 apicidin이 STI571 유도 세포고사를 강화시키는데, 그 기전은 미토콘드리아 의존성 caspase cascade의 활성화 증가와 Bcr-Abl 단백질의 하향 조절, 그리고 항 세포고사 단백질인 XIAP의 감소로 생각할 수 있다. 이러한 결과는 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병의 치료 전략 설정에 있어서 apicidin과 STI571의 병합 투여에 대한 더 많은 연구가 필요함을 제시해 준다.

V. 결 론

본 연구에서는 Bcr-Abl 양성 세포주 (K562)와 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에 histone deacetylase 억제제의 하나인 apicidin과 tyrosine kinase 억제제인 STI571을 최소 독성 농도로 병합 사용하여 상승적인 세포고사를 유도하였고, 그 기전에 대한 연구로 다음과 같은 결과를 얻었다.

1) K562 세포주에서 STI571과 apicidin을 동시에 48 시간 동안 처리한 결과 미토콘드리아 손상이 상당히 증가하였고, caspase-3, -8, -9의 활성화와 PARP의 분리가 증가하였고, 세포고사도 증가하였다.

2) 만성 골수성 백혈병 급성기 환자의 백혈병 세포에서도 비슷한 결과를 얻을 수 있었다. 그러나 HL-60, U937, Jurkat과 같이 Bcr-Abl을 표현하지 않는 세포주에서는 이러한 결과를 얻을 수 없었다.

3) Caspase-3 억제제인 DEVD-CHO는 매우 효과적으로 STI571/apicidin 유도 세포고사와 procaspase-3, -8, -9의 활성화와 PARP의 분리를 억제하였다.

4) STI571과 apicidin은 단독으로는 세포고사의 저항에 관여하는 단백질인 XIAP 단백질의 농도에 영향을 주지 못하였으나, 48 시간 동안의 STI571/apicidin 동시 처리한 경우는 거의 완전히 전체 길이의 XIAP 단백질이 소실되었고, caspase 의존적인 방식으로 29 kDa의 XIAP 분리 산물이 증가하였다.

5) STI571/apicidin 동시처리에 의하여 세포질로의 Smac/DIABLO 분비가 급격히 증가하였다.

6) STI571이나 apicidin을 단독으로 24 시간이나 48 시간 동안 처리하였을 때는 Bcr-Abl 단백질의 농도에는 거의 변화가 없었으나, 48 시간 동안 동시에 처리하였을 때는 caspase 의존적인 방식으로 Bcr-Abl 단백질의 농도가 매우 감소하였다.

결론적으로 본 연구에서는 미토콘드리아 의존성 caspase cascades 활성 증가 기전과 Bcr-Abl 단백질의 하향 조절 그리고 XIAP 단백질의 현격한 감소를 통하여 apicidin이 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병 세포에서 STI571 유도 세포고사를 증가시킴을 보여 주었다. 이러한 결과는 Bcr-Abl 양성 사람 백혈병의 치료 전략 설정에 있어서 apicidin과 STI571 병합 투여에 대한 더 많은 연구가 필요함을 제시해 준다.

참고문헌

1. Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D. The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science* 1986;233:212-214.
2. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990;247:1079-1082.
3. Holyoake DT. Recent advances in the molecular and cellular biology of chronic myeloid leukaemia: Lessons to be learned from the laboratory. *Br J Haematol* 2001;113:11-23.
4. Bedi A, Barber JP, Bedi GC, el-Deiry WS, Sidransky D, Vala MS, et al. BCR-ABL-mediated inhibition of apoptosis with delay of G2/M transition after DNA damage: A mechanism of resistance to multiple anticancer agents. *Blood* 1995;86:1148-1158.
5. 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;83:1179-1187.
6. 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.
7. 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.
8. Deininger MW, Goldman JM, Lydon N, Melo JV. The tyrosine kinase inhibitor CGP57148B selectively inhibits the growth of BCR-ABL-positive cells. *Blood* 1997;90:3691-3698.
9. Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the

- growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2:561-566.
10. Dan S, Naito M, Tsuruo T. Selective induction of apoptosis in Philadelphia chromosome-positive chronic myelogenous leukemia cells by an inhibitor of BCR-ABL tyrosine kinase, CGP 57148. *Cell Death Differ* 1998;5:710-715.
 11. 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.
 12. 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.
 13. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344:1038-1042.
 14. Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, et al. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL(+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1641-1650.
 15. 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.
 16. Hochhaus A, Kreil S, Corbin A, La Rosee P, Lahaye T, Berger U, et al. Roots of clinical resistance to STI-571 cancer therapy. *Science* 2001;293:2163.
 17. Sawyers CL, Hochhaus A, Feldman E, Goldman JM, Miller CB, Ottmann OG, et al. Imatinib induces hematologic and cytogenetic responses in patients with chronic myelogenous leukemia in myeloid blast crisis: Results of a phase II study. *Blood* 2002;99:3530-3539.
 18. Thiesing JT, Ohno-Jones S, Kolibaba KS, Druker BJ. Efficacy of STI571,

- an abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against bcr-abl-positive cells. *Blood* 2000;96:3195-3199.
19. Topaly J, Zeller WJ, Fruehauf S. Synergistic activity of the new ABL-specific tyrosine kinase inhibitor STI571 and chemotherapeutic drugs on BCR-ABL-positive chronic myelogenous leukemia cells. *Leukemia* 2001; 15:342-347.
 20. Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Mano H, Sato Y, Honma Y, et al. In vitro cytotoxic effects of a tyrosine kinase inhibitor STI571 in combination with commonly used antileukemic agents. *Blood* 2001;97: 1999-2007.
 21. Yu C, Krystal G, Varticovski L, McKinstry R, Rahmani M, Dent P, et al. Pharmacologic mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase/mitogen-activated protein kinase inhibitors interact synergistically with STI571 to induce apoptosis in Bcr/Abl-expressing human leukemia cells. *Cancer Res* 2002;62:188-199.
 22. Porosnicu M, Nimmanapalli R, Nguyen D, Worthington E, Perkins C, Bhalla KN. Co-treatment with As2O3 enhances selective cytotoxic effects of STI-571 against Bcr-Abl-positive acute leukemia cells. *Leukemia* 2001;15:772-778.
 23. Yu C, Krystal G, Dent P, Grant S. Flavopiridol potentiates STI571-induced mitochondrial damage and apoptosis in BCR-ABL-positive human leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2002;8:2976-2984.
 24. Nimmanapalli R, Porosnicu M, Nguyen D, Worthington E, O'Bryan E, Perkins C, et al. Cotreatment with STI-571 enhances tumor necrosis factor alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL or apo-2L)-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:350-357.
 25. Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A, Skorski T. Phosphatidylinositol-3 kinase inhibitors enhance the anti-leukemia effect of STI571. *Oncogene* 2002;21:5868-5876.
 26. Nimmanapalli R, Fuino L, Stobaugh C, Richon V, Bhalla K. Cotreatment with the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid

- (SAHA) enhances imatinib-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human acute leukemia cells. *Blood* 2003;101:3236-3239.
27. Nimmanapalli R, O'Bryan E, Bhalla K. Geldanamycin and its analogue 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin lowers Bcr-Abl levels and induces apoptosis and differentiation of Bcr-Abl-positive human leukemic blasts. *Cancer Res* 2001;61:1799-1804.
 28. Khochbin S, Verdel A, Lemercier C, Seigneurin-Berny D. Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11:162-166.
 29. Pazin MJ, Kadonaga JT. What's up and down with histone deacetylation and transcription? *Cell* 1997;89:325-328.
 30. Wolffe AP. Transcriptional control. Sinful repression. *Nature* 1997;387:16-17.
 31. Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev* 1998;12:599-606.
 32. Kouzarides T. Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev* 1999;9:40-48.
 33. 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.
 34. Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol* 2000;184:1-16.
 35. Vigushin DM, Coombes RC. Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anticancer Drugs* 2002;13:1-13.
 36. Marks PA, Richon VM, Pifkind RA. Histone deacetylase inhibitors: Inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* 2000;92:1210-1216.
 37. 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 Diff* 2001;8:1014-1021.
 38. 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.
39. 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.
40. Cheong JW, Chong SY, Kim JY, Eom JI, Jeung HK, Maeng HY, et al. Induction of apoptosis by apicidin, a histone deacetylase inhibitor, via the activation of mitochondria-dependent caspase cascades in human Bcr-Abl-positive leukemia cells. *Clin Cancer Res* 2003;9:5018-5027.
41. 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* 1998;187:1261-1271.
42. 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.
43. Tang D, Lahti JM, Kidd VJ. Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase-3-dependent manner during staurosporin-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 2000;275:9303-9307.
44. Bossy-Wetzl E, Green DR. Caspases induce cytochrome c release from mitochondria by activating cytosolic factors. *J Biol Chem* 1999;274:17484-17490.
45. 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.
46. Reuther JY, Reuther GW, Cortez D, Pendergast AM, Baldwin AS Jr. A requirement for NF- κ B activation in Bcr-Abl-mediated transformation.

Genes Dev 1998;12:968-981.

47. Skorski T, Bellacosa A, Nieborowska-Skorska M, Majewski M, Martinez R, Choi JK, et al. Transformation of hematopoietic cells by BCR/ABL requires activation of a PI-3k/Akt-dependent pathway. *EMBO J* 1997;16: 6151-6161.
48. Deveraux QL, Roy N, Stennicke HR, Van Arsdale T, Zhou Q, Srinivasula SM, et al. IAPs block apoptotic events induced by caspase-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspases. *EMBO J* 1998;17: 2215-2223.
49. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* 1997;388:300-304.
50. Deveraux QL, Leo E, Stennicke HR, Welsh K, Salvesen GS, Reed JC. Cleavage of human inhibitor of apoptosis protein XIAP results in fragments with distinct specificities for caspases. *EMBO J* 1999;18:5242-5251.
51. Steinman RA, Johnson DE. p21WAF1 prevents down-modulation of the apoptotic inhibitor protein c-IAP1 and inhibits leukemic apoptosis. *Mol Med* 2000;6:736-749.
52. Yang Y, Fang S, Jensen JP, Weissman AM, Ashwell JD. Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* 2000;288:874-877.
53. Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 2000;102:33-42.
54. Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, et al. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* 2000;102:43-53.
55. Adrain C, Creagh EM, Martin SJ. Apoptosis-associated release of Smac/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2. *EMBO J* 2001;20:6627-6636.

Abstract

Apicidin Potentiates the STI571-Induced Apoptosis of Bcr-Abl-Positive Human Leukemia Cells by Enhancing the Activation of Mitochondria-Dependent Caspase Cascades

Jin Seok Kim

*Department of Medicine,
Graduate School, Yonsei University*

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

Although initial clinical trials in CML with STI571 were extremely encouraging, the development of drug resistance and the limited responsiveness of patients with blast crisis presented persistent challenges and needs for the development of new therapeutic strategies. Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, is a novel cyclic tetrapeptide with potent broad-spectrum antiproliferative activity against various cancer cell lines. I examined if apicidin potentiates the STI571-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human leukemia cells. In K562 cells, the coadministration of minimally toxic concentrations of STI571 and apicidin (STI571/apicidin) for 48 h resulted in a prominent increase in mitochondrial damage (e.g., diminished mitochondrial membrane potential and enhanced Cytochrome C release into the cytosol), the processing of caspase-3, -8, -9, and poly (ADP-ribose) polymerase (PARP), and the apoptosis. Similar interactions were observed in leukemic blasts obtained from patients with chronic myelogenous leukemia in blast crisis, but not in the leukemic cell lines that do not express Bcr-Abl (e.g., HL-60, U937, and Jurkat). The caspase-3 inhibitor DEVD-CHO was highly effective at abolishing the STI571/apicidin-induced apoptosis and the cleavage of procaspase-3, -8, and -9, and PARP. Neither STI571 nor apicidin alone affected the levels of XIAP protein. However, STI571/apicidin cotreatment for 48 h resulted in a near complete

loss of the full-length XIAP protein, and a corresponding increase in the levels of a 29 kDa XIAP cleavage product in a caspase-dependent manner. STI571/apicidin cotreatment markedly increased Smac/DIABLO release into the cytosol. The administration of STI571 or apicidin individually for 24 or 48 h resulted in little change in Bcr-Abl protein levels. However, the coadministration of these agents for 48 h resulted in marked declines in Bcr-Abl protein levels in a caspase-dependent manner. In summary, the data presented here indicate that apicidin potentiates the STI571-induced apoptosis of Bcr-Abl-positive human leukemia cells through the enhanced activation of the mitochondria-dependent caspase cascades, the downregulation of Bcr-Abl and a pronounced reduction in the level of XIAP. These findings generate a rationale for the further investigation of apicidin and STI571 as a potential therapeutic strategy in Bcr-Abl-positive human leukemias.

Key Words: STI571, apicidin, histone deacetylase inhibitor, Bcr-Abl, leukemia