

Dithiolo-thione 계열 유도체 SWU-20009의 Akt 활성 저해 효과

고종희 · 연승우[#] · 이홍섭 · 김태용 · 노동윤* · 신경순* · 홍순광** · 강상순***

일동제약주식회사 중앙연구소, *서울여자대학교 화학과, **명지대학교 생물학과, ***충북대학교 과학교육과

(Received February 9, 2004; Revised March 15, 2004)

Inhibitory Effects of Dithiolo-thione Derivative SWU-20009 on Akt Activity

Jong Hee Ko, Seung Woo Yeon[#], Hong Sub Lee, Tae Yong Kim, Dong Youn Noh*,
Kyong Soon Shin*, Soon Kwang Hong** and Sang Sun Kang***

ILDONG Research Laboratories, ILDONG Pharmaceutical Co. Ltd., 260-5, Eonnam-Ri, Kuseong-Eup, Yongin, Kyongki-Do 449-910, Korea

*Department of Chemistry, Seoul Women's University, 126 Kongnung-Dong, Nowon-gu, Seoul 139-774, Korea

**Department of Biological Science, Myongji University, San 38-2 Nam-Dong, Yongin, Kyunggi-Do 449-728, Korea

***Department of Science Education, Chungbuk National University,

San 48 Gaeshin-Dong Heungduk-gu, Cheongju, Chungbuk-Do 361-763 Korea

Abstract — Akt (or Protein Kinase B; PKB) is a serine/threonine kinase and is activated by phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway. Recent evidence indicates that the abnormal activities or expression of Akt is closely associated with cancer, diabetes and neuro-degenerative diseases. These findings mean that Akt is likely to be a new therapeutic target for the treatment of disease. Here, we screened the effects of dithiolo-dithione derivatives such as SWU-20004, SWU-20009 and SWU-20025 on Akt activities. Among these compounds, only SWU-20009 (2-Thioxo-[1,3]dithiolo[4,5-β][1,4]dithiine-5,6-dicarboxylic acid dimethyl ester) inhibited the growth of KATOIII cell at micromolar range of concentration. Further investigation also revealed that SWU-20009 inhibited cellular Akt activity and induced apoptotic cell death.

Keywords □ Akt, PKB, kinase, inhibitor, cancer

Akt 또는 protein kinase B(PKB)는 serine/threonine protein kinase^{1,2)}로 mouse T-cell lymphoma에서 viral oncogene(v-Akt)으로 처음 발견되었다. Akt(PKB)의 isoform으로는 Akt1 (PKBα), Akt2(PKBβ) 및 Akt3(PKBγ) 등 3 종이 밝혀졌고 모두 세포의 성장 및 생존에 중요한 역할을 한다는 것이 확인되고 있다. Akt는 주로 phosphoinositide 3-kinase(PI3K) 의존적으로 세포막에서 인산화 및 활성화되어 많은 세포 내 신호 전달과정을 조절한다. 세포 성장과 관련된 growth factor 또는 인슐린 등의 자극은 이들의 수용체를 활성화시키고 이는 PI3K의 활성화를 일으켜 phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate(PI(3,4,5)P₃)의 형성을 촉진시킨다. Akt는 pleckstrin homology(PH) domain을 통하여 PI(3,4,5)P₃과 결합하여 세포막으로 이동하고 여기서 PDK1 및 PDK2에 의해 308번 threonine과 473번 serine이 인산화되어 protein kinase 활성을 갖게 된 후 다시 세포내의 여러 곳으

로 이동하여 세포 분열, 분화, 세포 사멸, 당 및 지방 대사, 유전자 발현, 단백질 합성 등에 필요한 중요한 단백질들을 인산화하여 이들의 생리적인 기능을 조절한다.³⁾ 이처럼 세포의 성장 및 생존에 필수적인 역할을 하는 Akt 활성의 이상 증가 또는 소실은 암, 당뇨 및 뇌 질환 등 여러 질병과 밀접하게 관련되어 있다. Akt의 높은 활성은 유방암, 췌장암, 전립선암 등의 많은 암세포에서 발견되었다. 이는 Akt 자체의 돌연변이나 PTEN(phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten) 등 활성을 조절하는 기구들의 이상으로 인하여 일어나는 현상으로 Akt의 활성이 암세포의 성장을 촉진^{4,5)}할 뿐 아니라 apoptosis에도 저항성을 갖게 하는 등 암 발생의 주요 인자들 중 하나로써 인정되고 있다.^{6,7)} 또한 발암과정에서와는 대조적으로 당뇨 및 퇴행성 신경 질환 등에서 Akt 활성의 감소가 확인되고 있어 Akt가 이들 질병의 유발에도 관련되어 있을 것으로 추정되고 있다. 이처럼 Akt는 질병 치료의 신규 표적으로 인식되어지고 있으며 Akt 활성이나 발현에 영향을 미치는 인자들에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다. 이와 더불어 직접 Akt 활성을 조절하는 물질에 대한 연구도 최근 시도되고 있으나 아직 치료제로서 개발

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 031-287-1700 (팩스) 031-287-1800
(E-mail) swyeon@ildong.com

되어진 사례는 없고 대부분 동물실험 단계에 있다.

본 연구도 Akt 활성 조절 물질을 개발하고자 수행되어진 결과로서 한국화학물은행의 5만여 종의 화합물들을 탐색하여 확보한 Akt 활성 저해 물질들의 저해 활성도, 저해 유형 및 세포 생존에 미치는 영향 등을 조사하였다.

실험방법

실험재료

Phospho-specific glycogen synthase kinase-3(GSK-3) α/β (Ser21/9) antibody, GSK3 fusion protein, Akt1/PKB protein kinase, PARP antibody는 New England BioLabs Inc. (Beverly, MA)에서 구입하였고 나머지 시약은 Sigma사(St. Louis, USA)에서 구입하였다. KATOIII와 HepG2는 한국 세포주 은행에서 분양 받았다.

세포 배양

KATOIII와 HepG2는 10% Fetal bovine serum(FBS, HighClone)을 함유한 Dulbecco's modified minimal essential medium(DMEM, HighClone) 배양액을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며 0.25% trypsin과 0.02% EDTA를 이용하여 계대 배양하였다.

형광 기질을 사용한 Akt 활성 조절물질의 검색

Akt 활성 저해 효과를 보이는 물질의 검색은 Kwon 등⁸⁾의 방법을 일부 변형하여 사용하였다. SWU-20004, SWU-20009와 SWU-20025는 100% dimethyl sulfoxide(DMSO)에 적절한 농도로 용해하여 사용하였다. Akt 효소원으로는 KATOIII 위암 세포주의 추출물을 사용하였고 기질은 Akt에 의해 인산화 되는 346번 serine을 포함하는 Insulin Receptor Substrate 2(IRS-2)의 ³³⁹VRRSRTDSL³⁴⁸ 펩티드의 N-말단에 fluorescein isothiocyanate(FITC)가 결합된 형광 펩티드를 사용하였다. 세포 추출물은 다음과 같은 방법으로 확보하였다. KATOIII 위암 세포주를 100 mm cell culture dish에 80% 이상의 밀도로 충분히 배양한 다음 배지를 제거하고 1× protease inhibitor cocktail과 phosphatase inhibitor인 Na₃VO₄가 1 mM로 첨가된 lysis buffer (1% Triton X-100, 10% glycerol, 137 mM NaCl, 20 mM Tris, pH 7.5, 20 mM NaF) 200 μ l를 첨가하여 scraper를 사용하여 세포를 Eppendorf tube에 옮겼다. 충분히 vortex 후 얼음 위에 30분 동안 방치 한 다음 12,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 회수한 상층액을 Akt 효소원으로 사용하였다. 전체 반응액은 20 μ l 부피로 하였으며 먼저 5 μ l(약 10 μ g) 세포 추출액, 2 μ l 10× reaction buffer(200 mM HEPES, pH 7.2, 143 mM MgCl₂, 10% Triton X-100, 10 mM DTT, 100 mM EDTA),

2 μ l 시료 및 멸균 증류수를 섞어 10분 동안 37°C서 방치 한 다음 1 μ l 형광 펩티드(200 μ g/ml)와 200 μ M ATP 3 μ l를 첨가하여 37°C서 30분 동안 반응시켰다. 반응액을 70°C에서 5분 동안 heat inactivation 후 0.8% agarose gel에서 전기 영동하여 UV 하에서 형광 기질의 인산화 정도를 측정하였다. 시료의 부피는 전체 반응액의 1/10을 넘지 않도록 조절하였다.

In vitro Akt 활성 측정

반응액의 전체 부피는 30 μ l로 하였다. Akt1/PKB protein kinase(10 unit/ μ l) 1 μ l, 10× reaction buffer(200 mM HEPES, 143 mM MgCl₂, 10 mM EDTA) 3 μ l, 20 mM DTT 3 μ l 및 멸균 증류수 17.5 μ l를 혼합한 후 100% DMSO에 용해시킨 SWU-20009 1.5 μ l를 첨가하여 37°C에서 10분간 방치 후 2 mM ATP 3 μ l와 GSK3 fusion protein(1 mg/ml) 1 μ l를 섞어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 70°C에서 5분간 처리하여 반응을 정지시켰다. 반응액을 12% SDS-PAGE gel에서 분리한 후 PVDF membrane으로 transfer했다. 5% skim milk로 10분간 blocking을 하고 phospho-GSK3 α/β antibody(1 : 1,000)로 Western blot을 시행하였다.

ATP 경쟁 저해제 여부 확인 시험도 다양한 농도의 ATP를 처리한 것을 제외하고는 위와 같은 방법으로 진행하였다. Western blot을 한 후 나타난 band의 intensity를 TINA 2.0(Raytest Isotopen messgeraete GmbH, Straubhardt, Germany)을 이용하여 정량화 하였고 각 값을 처리 ATP 농도와 대응하여 Lineweaver-Burk plot에 적용하여 SWU-20009가 ATP 경쟁 저해제 여부를 조사하였다.

세포 독성도 측정(MTT assay)

시료는 적절한 농도로 100% DMSO에 용해시켜 사용하였으며 시료 처리 농도와 관계없이 DMSO의 처리 부피가 배지 부피의 1%가 넘지 않도록 하였다. 각 화합물의 세포 성장에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT assay를 시행하였다. 96-well plate에 KATOIII 1×10⁴ cells/90 μ l/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후 배지로 희석한 SWU-20009를 각 well에 10 μ l씩 첨가하여 3일 동안 배양 후 MTT assay로 세포 독성을 측정하였다. PBS에 5 mg/ml 농도로 용해시킨 MTT 용액을 각 well에 15 μ l씩 처리하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시키고 각 well당 lysis buffer(0.01 N HCl, 10% SDS) 100 μ l를 가하여 세포 및 형성된 formazan이 완전히 용해되도록 24시간 동안 37°C에서 방치 후 570/652 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 독성을 평가하였다.

세포 내 GSK-3 인산화 측정

6-well plate에 KATOIII을 5×10⁶ cells/well 분주하고 100%

DMSO에 녹인 SWU-20009를 전체 부피의 1%가 되도록 농도별로 30분간 처리한 후 protease inhibitor cocktail과 phosphatase inhibitor인 Na_3VO_4 가 첨가된 lysis buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 180 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100)로 단백질을 추출하였다. BCA 정량 방법을 이용하여 정량한 단백질 50 μg 을 12% SDS-PAGE gel에서 분리했다. PVDF membrane으로 transfer한 후 5% skim milk로 10 분간 blocking한 뒤, phospho-GSK3 α/β antibody(1 : 1,000)로 Western blot을 시행하였다.

Apoptosis 유도 여부 확인

6-well plate에 1×10^6 /well KATOIII 세포와 2×10^6 /well HepG2 세포를 각기 분주한 후 37°C, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 100% DMSO에 녹인 SWU-20009를 전체 부피의 1%가 되도록 농도별로 처리하였다. 24시간 동안 배양한 후 세포 내 GSK3 인산화 측정 시와 같은 방법으로 단백질 추출 및 정량 후 HepG2는 70 μg , KATOIII는 40 μg 을 10% SDS-PAGE gel에서 분리하였다. PVDF membrane으로 transfer에 이어 5% skim milk로 10분간 blocking한 뒤, PARP antibody(1 : 1,000)를 사용하여 Western blot을 시행하였다.

실험 결과 및 고찰

형광 펩티드를 이용한 Akt 활성 조절물질 검색

KATOIII 세포주 추출액 및 IRS-2에서 유도된 FITC-³³⁹VRRSRTDSL³⁴⁸ 형광 펩티드를 기질로 이용하여 Akt 활성 조절 물질을 검색하였다(Fig. 1B). 한국화학물은행의 약 50,000여종의 화합물들 중 형광 펩티드의 인산화를 억제하는 5,6-Di-pyridin-2-yl-[1,3]dithiolo[4,5- β][1,4]dithiine-2-thione(SWU-20004), 2-Thioxo-[1,3]dithiolo[4,5- β][1,4]dithiine-5,6-dicarboxylic acid dimethyl ester(SWU-20009) 및 5-Pyridin-4-yl-5,6-dihydro-[1,3]dithiolo[4,5- β][1,4]dithiine-2-one(SWU-20025) (Fig. 1A) 3종의 화합물을 선별하였다. 각 화합물을 50 μM 로 처리 결과 SWU-20025가 형광 펩티드의 인산화를 가장 많이 억제하였고 다음으로 SWU-20009이었다. SWU-20004는 형광 펩티드의 인산화 억제 효과가 적은 것으로 나타났다.

세포 독성 시험

Akt는 직·간접적으로 세포의 생존과 관련된 Bad, caspase, Forkhead(FH) family transcription factor 등의 기능을 조절하여 apoptosis를 억제하는 역할을 하므로 저해제의 처리나 발현 억제로 인한 Akt 활성의 소실은 세포 사멸을 유도하는 것으로⁹⁾ 알려져 있다. 따라서 형광 기질의 인산화를 억제하는 3종의 화합물들이 세포 성장에 영향을 미치는 지를 조사하고자 위암 세포주인 KATOIII에 이들을 처리하였다. SWU-20004 및 SWU-20025는

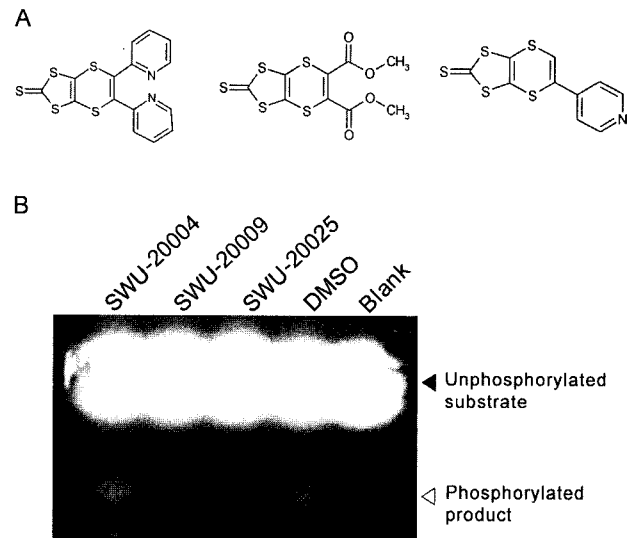


Fig. 1 – Inhibitory effects of SWU-20004, SWU-20009 and SWU-20025 on the phosphorylation of the FITC-conjugated IRS-2 oligopeptide. A. The chemical structures B. The SWU-20004, SWU-20009 and SWU-20025 inhibited the phosphorylation of the FITC-conjugated oligopeptide when treated with the concentration of 50 μM , respectively, compared with the treatment of 10% DMSO. The phosphorylated product (\triangleleft) and unphosphorylated substrate (\blacktriangleleft) are marked.

최고 처리농도인 100 μM 에서도 세포 사멸을 유도하지 않은 반면 SWU-20009는 25 μM 부터 세포 사멸을 일으키는 것(Fig. 2)을 현미경 검경 및 MTT assay로 확인 할 수 있었다. 또한 SWU-

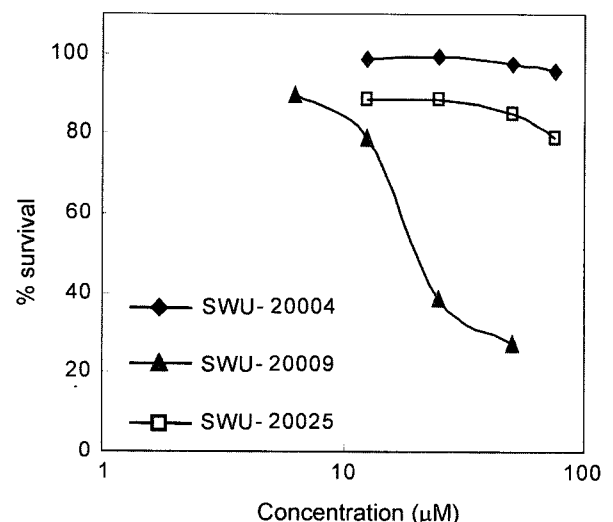


Fig. 2 – Effects of SWU-20004, SWU-20009, SWU-20025 on KATOIII cells growth. Cell survival was assessed by MTT assay. Results are expressed as percent cell survival relative to the survival of DMSO-treated cells. Each symbol represents the mean value of three identical wells from a representative single experiment (n=3).

20009는 더 낮은 처리 농도에서 세포 성장도 억제하여 IC₅₀이 약 21.5 μM로 측정되었다. *In vitro*에서 Akt 저해 활성을 보인 SWU-20004 및 SWU-20025가 세포 독성을 보이지 않는 것은 이들의 용해도 문제도 일부 영향을 주었을 것이다. 즉 SWU-20009는 dithiolo-thione 모핵에 2개의 ester기가 있는 반면 SWU-20004 및 SWU-20025는 각각 2개 및 1개의 pyridine기를 보유하고 있으며 이들은 수용액에서 물보다는 분자 상호간의 친화력을 높여 결정 형성을 시키는 것으로 예상되어진다. 실제로 각 화합물을 KATOIII에 처리 시 SWU-20009는 처리 최고 농도인 100 μM에서도 결정 형성이 보이지 않은 반면 SWU-20004 및 SWU-20025는 10 μM 이하의 농도에서도 배지 내에서 결정 형성(data not shown)이 현미경으로 관찰되는 것으로 보아 용해도가 활성과 관련되어 있을 것이라는 것을 뒷받침하고 있다. 그러나 SWU-20004 및 SWU-20025도 Akt 활성을 저해하는 화합물로 탐색되었으므로 용해도 이외에도 구조적 특성에 따르는 흡수도와 물질의 안정성 또한 이들의 활성에 영향을 줄 것으로 사료된다.

Akt 활성 저해 효과

3종의 화합물들 중 KATOIII 세포의 성장을 억제한 SWU-20009는 KATOIII 세포 추출물과 짧은 길이의 형광 펩티드를 각각 Akt 효소원 및 기질로 사용하여 검색되어졌기 때문에 실제로 이 화합물이 Akt의 활성을 저해하는지 확인이 요구되어진다. 이를 위해 순수 분리된 활성형 Akt1과 Akt의 대표적인 기질인 glycogen synthase kinase 3(GSK-3)을 사용하여 SWU-20009가 Akt 활성에 미치는 영향을 조사하였다. Akt1 kinase 활성은 SWU-20009를 30분 동안 10 μM로 처리 시 무 처리 군에 비해

49.9%(Fig. 3A)의 활성을 보였고 심지어 1 μM로 처리한 경우에서도 51.3%의 낮은 활성을 보였다. 비록 SWU-20004 및 SWU-20025가 세포 독성을 보이지 않았지만 이들을 50 μM 농도로 처리 시 50% 이상 Akt1의 활성을 억제하는 것(data not shown)으로 보아 이들도 Akt의 활성을 억제하는 물질이라는 것을 알 수 있었다.

SWU-20009의 apoptosis 유도효과

3종의 화합물들 중 유일하게 세포 독성을 보인 SWU-20009가 apoptosis를 유도하는지를 조사하였다. 화합물의 apoptosis 유도 확인 시험에는 caspase-3 활성을 측정하는 방법들이 사용되어지고 있다. 대표적으로 사용되고 있는 것들 중 하나가 caspase-3의 기질들 중 하나인 DNA repair에 참여하는 Poly(ADP-ribose) Polymerase(PARP)가 caspase-3에 의해 절단되는지를 확인하는 시험이다. 본 연구에서도 이를 활용하여 SWU-20009를 간암 세포주인 HepG2 및 위암 세포주 KATOIII 2 종에 처리 시 세포의 형태 변화와 이에 동반하여 PARP 절단(Fig. 4A, B)이 일어나는지를 조사하였다. HepG2와 KATOIII 모두 50 μM에서 세포막 주위에 apoptotic body가 형성되면서 사멸하는 것이 관찰되었다(Fig. 4A). 이들 각각의 세포에서 단백질을 추출하여 PARP의 절단 상태를 확인 결과 HepG2는 25 μM에서부터 85 kDa의 절단된 PARP가 관찰되었고, KATOIII는 100 μM에서 PARP의 절단을 관찰 할 수 있었다. 따라서 예상한 바와 같이 SWU-20009는 세포의 apoptosis를 유도하여 세포사멸을 일으키는 것으로 확인 할 수 있었다.

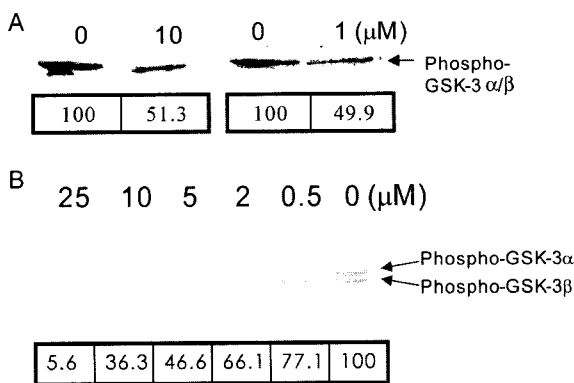


Fig. 3 – Inhibitory effects of SWU-20009 on GSK-3 phosphorylation *in vitro* and in cells. A. The mixtures (described by material and method) were incubated with 1 μg of GSK-3 fusion protein and subjected to Western analysis, using anti-phospho (Ser21/9) GSK3α/β antibody. B. Cells were exposed to SWU-20009 for 30 min. Western analysis used anti-phospho (Ser21/9) GSK-3α/α antibody. The values under blots represent the quantification of phosphorylated GSK-3α/β relative to treatment with DMSO.

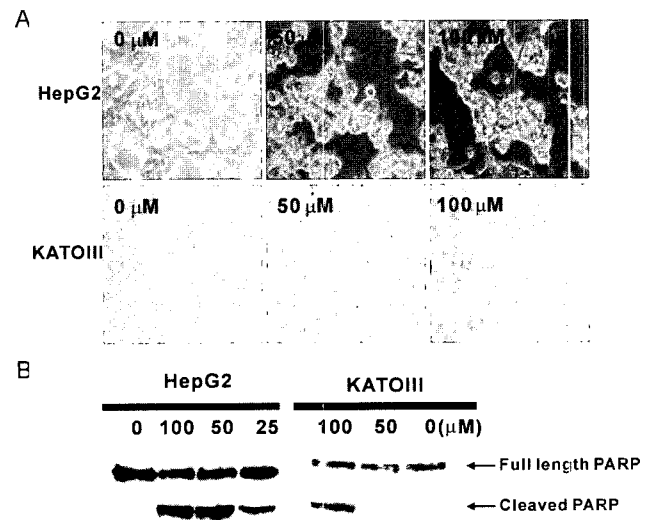


Fig. 4 – PARP cleavage induced by SWU-20009. HepG2 or KATOIII cells were treated with different concentrations of SWU-20009 for 24 hr. A. Morphological changes of HepG2 (upper panel) and KATOIII (lower panel) treated with SWU-20009 at 0, 50, 100 μM. B. Western blot used anti PARP antibody.

세포 내 GSK3 인산화 측정

*In vitro*에서 Akt의 활성을 저해하는 SWU-20009를 세포에 처리 시 apoptosis를 유도하는 것을 확인하였다. 따라서 이 물질이 세포 내에 존재하는 Akt의 활성을 실제로 억제하는지를 조사하였다. Akt의 선택적 기질 중 하나인 GSK-3 α/β 의 발현이 세포 내에서 높고 이들의 인산화 형태가 Akt를 활성화시키지 않아도 확인이 가능한 KATOIII 세포주를 선택하여 시험을 수행하였다. Akt는 GSK-3 α 의 21번 serine, GSK-3 β 의 9번 serine을 각각 인산화 시킨다. 여러 농도의 SWU-20009를 KATOIII에 30분 동안 처리 한 후 GSK-3 α/β 인산화 정도를 측정된 결과(Fig. 3B) *in vitro* 결과와 마찬가지로 SWU-20009는 농도 의존적으로 GSK-3 α/β 인산화를 억제하였다. 무 처리군과 비교하여 SWU-20009를 25 μM 처리 시 GSK-3 α/β 의 인산화는 5.6%이었고 심지어는 0.5 μM 의 낮은 농도를 처리 시에도 인산화가 억제되는 것을 확인하였으며 3.4 μM 농도에서 50%의 억제 효과를 보이는 것으로 측정되었다. 비록 GSK-3 α/β 는 Akt 이외의 다른 kinase들¹⁰⁾에 의해서도 인산화 될 수 있으므로 SWU-20009가 이들의 활성도 저해할 수 있다는 가능성을 배제할 수 없지만 이처럼 GSK-3 α/β 의 인산화 억제는 SWU-20009가 *in vitro*에서와 마찬가지로 세포 내에서도 Akt 활성을 억제한다는 것을 간접적으로 제시하는 결과이다. 그러나 SWU-20009에 의한 *in vitro* 및 세포 내 Akt 활성 저해는(*in vitro* Akt 활성 저해 IC₅₀; 1 μM , 세포내 GSK-3 α/β 인산화 억제 IC₅₀; 3.4 μM) 세포 사멸을 보이는 농도(IC₅₀; 21.5 μM)와 일치 하지 않고 이보다 매우 낮은 농도에서 나타났다. 이러한 차이는 SWU-20009의 Akt 활성 저해 정도에 의한 것일 수 있다. SWU-20009는 1 μM 의 낮은 농도에서도 *in vitro* Akt 활성을 저해하나 10 μM 이상의 높은 농도를 처리 시에도 Akt 활성의 완전한 소실을 일으키지 않는 것으로 관찰되었다. 또한 세포내 GSK-3 α/β 인산화도 25 μM 이상의 높은 농도를 처리 시 완전한 인산화 억제를 추정할 수 있고 이하의 농도에서는 인산화 된 GSK-3 α/β 가 관찰 되는 것으로 보아 일부 Akt 활성이 유지되는 것을 예상할 수 있다. 이와 같은 현상으로 보아 SWU-20009의 Akt 활성의 특이적 저해도가 낮다는 것을 예상할 수 있으며 세포사멸을 위해서는 높은 농도의 SWU-20009 처리가 요구된다고 사료된다.

SWU-20009의 ATP-경쟁 저해제 여부 확인

대부분의 kinase 저해제는 Glivec¹¹⁾과 같이 ATP 결합부위에 ATP와 경쟁적으로 작용하여 저해 효과를 보이는 저해제로 알려져 있다. SWU-20009의 Akt 활성 저해 효과도 ATP와 경쟁적으로 작용하여 저해 효과를 보이는지 활성형 Akt1을 이용하여 GSK3- α/β 의 인산화 정도를 Western blot으로 조사하였다(Fig. 5). 일반적으로 이러한 실험은 [γ -³²P]ATP를 이용하나 본 연구에서는 민감도가 다소 떨어지는 Western blot을 사용하였기 때문

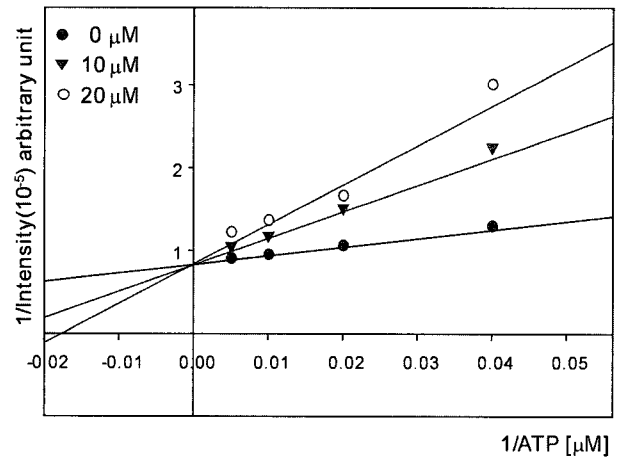


Fig. 5 – Double-reciprocal plots of Akt activities in the presence of varying concentrations of ATP and SWU-20009. Akt activities were determined and expressed as the mean intensities measured by densitometric analysis as described in Materials and Methods.

에 [γ -³²P]ATP 사용 시 보다 높은 농도 범위의 ATP를 사용하여 실험을 수행하였다. SWU-20009를 10 μM 과 20 μM 을 처리하고 ATP 농도 변화에 따라 SWU-20009가 활성형 Akt1의 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 무 처리군과 마찬가지로 SWU-20009를 처리 시 ATP 농도가 증가할수록 Akt 활성이 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 변화를 ATP 농도에 따라 Akt 활성을 대응시킨 Lineweaver-Burk plot에 적용하였을 때 0, 10, 20 μM 의 SWU-20009를 처리한 것 모두 Vmax는 동일하면서 SWU-20009의 처리 농도가 높아질수록 Km은 커지는 것으로 보아 SWU-20009가 ATP 경쟁 저해제를 알 수 있었다. 이 결과를 바탕으로 SWU-20009가 Akt의 ATP 결합 부위에 ATP와 경쟁적으로 작용하여서 Akt 활성을 저해하는 것으로 사료된다.

결론

3종의 화합물 SWU-20004, SWU-20009, SWU-20025는 *in vitro*에서 Akt 활성을 저해하였으나 SWU-20009만이 KATOIII에서 세포 독성을 나타내었으며 세포 내의 Akt 활성을 저해한다는 것을 확인하였다. SWU-20009에 의한 세포 독성은 PAPER cleavage가 관찰되는 것으로 보아 세포 사멸이 apoptosis 과정으로 일어난다는 것을 알 수 있었다. 또한 SWU-20009는 Akt의 ATP 결합 부위에 대해 ATP와 경쟁적으로 작용하는 기전으로 Akt 활성을 저해하는 물질이라는 것을 밝혀내었다. 결론적으로, SWU-20009는 ATP 경쟁 저해제로서 Akt 활성을 억제하고 이로 인해 apoptosis를 유도하여 세포독성을 보이는 물질임을 확인하였다. 이러한 사실은 항암효과를 보이는 약물로써 SWU-20009의 잠재적 효용 가치를 시사하고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 한국화학물은행의 화합물들을 대상으로 수행하였기에 한국화학물은행에 감사를 드립니다.

문헌

- 1) Haslam, R. J., Kolde, H. B. and Hemmings, B. A. : Pleckstrin domain homology. *Nature* **363**, 309 (1993).
- 2) Shaw, G. : The pleckstrin homology domain : an intriguing multifunctional protein module. *Bioessays* **18**, 35 (1996).
- 3) Lewis, C. C. : The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655 (2002).
- 4) Reuveni, H., Livnah, N., Geiger, T., Klein, S., Ohne, O., Cohen, I., Benhar, M., Gellerman, G. and Levitski, A. : Toward A PKB inhibitor : Modification of a selective PKA inhibitor by rational design. *Biochemistry* **41**, 10304 (2002).
- 5) Staal, S. P. and Hartley, J. W. : Thymic lymphoma induction by the AKT8 murine retrovirus. *J. Exp. Med.* **167**, 1259 (1988).
- 6) Ozes, O. N., Myyom L. D., Gustin, J. A., Pfeffer, S. R., Pfeffer, L. M. and Donner, D. B. : NF-kappaB activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* **401**, 82 (1999).
- 7) Romashkova, J. A. and Makarov, S. S. : NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature* **401**, 86 (1999).
- 8) Kwon, T. G., Kwon D. Y., Chun, J. S., Kim, J. H. and Kang, S. S. : Akt protein kinase inhibits Rac1-GTP binding through phosphorylation at serine 71 of Rac1. *J. Biol. Chem.* **275**, 423 (2000).
- 9) Tang, D., Okada, H., Ruland, J., Liu, L., Stambolic, V., Mak, T. W. and Ingram, A. J. : Akt is activated in response to an apoptotic signal. *J. Biol. Chem.* **276**, 30461 (2001).
- 10) Frame, S. and Cohen, P. : GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**, 1 (2001).
- 11) Roskoski, R. Jr. : STI-571 : an anticancer protein-tyrosine kinase inhibitor. *Biochem. Biophys Res. Commun.* **309**, 709 (2003).