

2004 춘계학술발표회 논문집

한국원자력학회

¹¹¹In-labeled Triplex-Forming Oligonucleotide를 이용한 Human N-myc Gene 항유전자

방사선치료

Antigene Radiotherapy Using ¹¹¹In-labeled Triplex-Forming Oligonucleotide Targeting Human
N-myc Gene

최재걸, 손성화, 신은경, 류연미, 박윤희, 박진희, 서상희, 이승호, 이지혜, 김명곤

고려대학교

서울 특별시 성북구 안암동 5가 1

요약

본 논문에서는 ¹¹¹In-labeled TFO의 표적인 human N-myc gene에서 in vivo와 in vitro에서 cellular uptake와 nuclear localization되는 polypurine-polypyrimidine stretch (2950-2978)를 선택하여 연구한다. 정상세포들과 암 세포들을 TFO와 함께 24시간 반응 후 TFO의 전체 cellular uptake의 injected dose (% ID)는 20-54.8%이고 cell lines에서의 nuclear localization은 6.59-30.0% ID이다. 최대 cellular uptake는 human neuroblastoma SK-N-DZ (54.8% ID), human mammary ductal carcinoma T47-D (54% ID), human acute T cell leukemia Jurkat (54% ID), 그리고 multidrug-resistant human breast adenocarcinoma MCF7/TH (49.5% ID)이다. 최소 cellular uptake는 human normal mammary epithelium MCF10A (20.0% ID)이었다. 최대 nuclear localization은 MCF7/TH (30% ID) and SK-N-DZ (28.7% ID)이고 최소는 MCF10A (6.59% ID)이었다. 다음으로 human mammary tumor-xenografted Balb/c nude mice에 TFO를 주입하였다. In vivo에서 TFO의 Tumor 표적은 tumor models의 3 유형에 정맥주사 5시간 후에 MCF7/TH (21.0±3.23% ID/g), MCF7 (7.77 ±2.11% ID/g), MCF10A (4.53 ±1.20% ID/g)의 최대 peak가 나타났다. 주사한지 15분경과 후 혈액에서 TFO는 8.00 ±0.90% ID/g이었고 19시간 경과 후 1.30 ±0.30% ID/g이었다. 신장에서는 15분 후 5.93 ±0.94% ID/g에서 빠르게 증가하여 19시간 후에는 25.1± 5.60% ID/g이었다. 간에서는 TFO의 level이 주사 후 19시간까지 높게 (19.7-24.5% ID/g) 유지되었다. 그래서 우리가 제시하는 것은 ¹¹¹In-labeled N-myc-targeting TFO는 nanoexplosive gene therapy에서 전망 있고, in vivo와 in vitro에서 multidrug-resistant breast carcinoma MCF7/TH의 핵을 대상으로 할 때 효율적이라는 것이다.

Abstract

In this study, by selecting the polypurine-polypyrimidine stretch (2950-2978) in the human N-myc gene as a target, the ¹¹¹In-labeled TFO targeting human N-myc gene (N-mycTFO¹¹¹In) was tested for its cellular uptake and nuclear localization in vitro and in vivo. The total cellular uptake of TFO after the incubation of various normal and cancer cells with TFO for 24 h was 20-54.8% of the injected dose (% ID), and the nuclear localization was 6.59-30.0% ID, depending on cell lines. The highest cellular uptake was found in the human neuroblastoma SK-N-DZ (54.8% ID), human mammary ductal carcinoma T47-D (54% ID), human acute T cell leukemia Jurkat (54% ID), and multidrug-resistant human breast adenocarcinoma MCF7/TH (49.5% ID). The lowest was in the human normal mammary epithelium MCF10A (20.0% ID). The highest nuclear localization was found in MCF7/TH (30% ID) and SK-N-DZ (28.7% ID). The lowest was in MCF10A (6.59% ID). We next injected TFO into human mammary

tumor-xenografted Balb/c nude mice. Tumor targeting of TFO in vivo reached its maximum peak 5 h after the intravenous injection in three types of tumor models. They are $21.0 \pm 3.23\%$ ID per gram of tissue (% ID/g) for MCF7/TH, $7.77 \pm 2.11\%$ ID/g for MCF7, and $4.53 \pm 1.20\%$ ID/g for MCF10A. The TFO blood level decreased from $8.00 \pm 0.90\%$ ID/g 15min after the injection, to $1.30 \pm 0.30\%$ ID/g after 19 h. The kidney TFO level increased rapidly from $5.93 \pm 0.94\%$ ID/g after 15min, to $25.1 \pm 5.60\%$ ID/g after 19 h. A high TFO level ($19.7\text{--}24.5\%$ ID/g) in the liver was maintained until 19 h after the injection. Therefore, we suggest that the ^{111}In -labeled N-myc-targeting TFO, a promising modality for nanoexplosive gene therapy, could effectively target the nucleus of the multidrug-resistant breast carcinoma MCF7/TH in vitro and in vivo.

1. 서론

항 유전자 방사선치료 (antigene radiotherapy, AR)는 인체질환을 유발하는 특정유전자의 DNA 및 RNA를 표적하는 oligodeoxynucleotides (ODN)에 방사성핵종 (radionuclide)을 표지하고, 생체의 세포내에 주입하여 방사성붕괴에 의한 두 가닥절단 (double strand breaks, DSB) 및 한 가닥절단 (single strand break, SSB)을 유발함으로써 유전자의 발현을 억제하는 유전자 치료의 한 방법이다 (Beal et al., 1991). Antisense ODN는 세포질내의 비정상적인 RNA를 표적하는 합성된 핵산물질로, 주로 짧은 절편으로 구성된 인위적인 DNA 및 RNA를 통틀어 말한다. antisense ODN를 이용하여 변형된 단백질의 합성을 억제함으로써 질병을 치료하고자 하는 새로운 유전자적 치료제 개발의 한 방법론이 Antisense ODN 기술이다 (Ben et al., 1998). Triplex forming oligonucleotide (TFO)란 double-stranded DNA의 topological 구조에서 Watson-Crick 모델에 의한 duplex bases의 수소결합 (예: A=T, G≡C)에 Hoogsteen 수소결합 (예: A-A=T, G-G≡C)이 형성하는 major groove를 따라 세번째 가닥으로 결합할 수 있는 ODN을 의미한다 (Blume et al., 1992). 최초로 Triple-helix의 형성의 발견은 1957년 Felsenfeld, David Davis, Rich가 polyuridine/polyadenosine duplex에 결합하는 안정하고 특정한 한 가닥으로 된 polyuridine 핵산물질을 규명함으로써 이루어졌다 (Cooney et al., 1988). 오제전자방출핵종 (Auger emitters, AEs)은 AR에 쓰이는 방사성 핵종을 말하며, 근접한 genomic DNA의 일부에만 가닥절단을 일으키는 최소방사능을 방출하는 특성을 갖는다. AEs의 방사선 붕괴는 저에너지 전자들의 단계적인 반응을 야기 시키며, 1929년에 이것을 처음 발견한 프랑스의 물리학자 Pierre Auger의 이름을 따서 명명하게 되었다 (Eilers., 1999). AEs의 암 치료 연구에서의 응용은 TFO 또는 DFO에 표지 후 genomic DNA 또는 RNA를 표적하여 질환유발 특정유전자의 손상을 유도하므로 (Frank-Kamenetskii., 1995) AR로써 AEs-표지 ODN를 사용할 수 있다 (Gazitt et al., 1992). AEs의 방사성붕괴 작용은 붕괴가 일어나는 부위 근처에 α particle과 비슷한 고밀도 방사선을 생성하여 인접한 생체분자 (DNA 및 RNA)에 큰 손상을 주게 된다 (Eilers., 1999; Hirose et al., 1998). 암 발생에 관여하는 유전자 결함은 주요한 두 개의 유전자 군에 의해 일어나는데, 이는 종양형성 유전자와 종양억제 유전자이다. 이중 종양형성 유전자는 세포 성장과 세포 분열을 촉진하는 기능을 가진 proto-oncogene이 변이를 일으켜 생기는 것으로, 변이발생 시 암을 일으키는 유전자가 되어, 과도한 세포 증식이 일어난다 (Durland et al., 1994). N-myc 유전자는 세포의 성장과 분화를 조절하는 transcription factors를 암호화하는 유전자로써, N-myc의 유전자의 증폭은 세포의 증식을 유도하며 높은 전이 잠재성을 가져온다. 본 논문에서는 human N-myc에 표적하는 동위원소 표지 TFO를 사용하여 AR를 연구하고자 하였으며, 동위원소 표지에는 ^{111}In 핵종을 사용하였다. 이를 위해 Triplex를 형성하는 실험을 수행하였고, 신경아세포종과 N-myc이 발현되지 않는 세포에서 N-myc 발현에 표적하는 TFO에 의한 nuclear localization (*in vitro*)과 체내분포 (*in vivo*)를 알아보려고 하였다. 이 연구에서 human N-myc에 표적하는 ^{111}In -표지 TFO가 표적유전자의 과발현을 효과적으로 인지할 수 있을 것이라고 예측한다. 특히 TFO는 AR의 효과적인 치료법의 양식으로 이용될 수 있을 것이다.

2. 재료 및 방법

Cell culture

cell line은 Neuroblastoma (SK-N-DZ, ATCC number CRL-2149), promyelocytic leukemia (HL-60, ATCC number CCL-240), breast adenocarcinoma (MCF7, ATCC number HTB-22), 그리고 human mammary epithelium (MCF10A, ATCC number CRL-10317)을 사용하였다. 세포 배양의 모든 방법은 ATCC recommendations를 따랐다. 이 세포들은 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% antibiotic-antimycotic (Gibco BRL, Germany)이 첨가된 RPMI-1640 배지에서 monolayer로 배양하였다. 그리고 37°C, 5% CO₂ 조건 하에서 습도가 유지되는 배양기에 배양하였다.

Recombinant vector construction

Polymerase chain reaction (PCR)의 template로, neuroblastoma (SK-N-DZ, ATGC; CRL-2149) 세포의 genomic DNA를 Nucleon II kit (Scotlab, UK)로 추출하였다. N-myc gene sequence의 2493-3108 bp (616 bp) positions에 대한 primers로 Human N-myc 유전자에서 triple helix를 형성할 수 있는 polypurine-polypyrimidine region을 PCR로 증폭시켰다. 이 PCR fragment를 manufacturers instructions을 따라 pCR-BluntII-TOPO vector (Cat. No. K2800-20; Invitrogen, USA) (Fig. 1)에 클로닝 하였다. Plasmid pCRhN-myc은 Maxiprep kit (Qiagen, USA)를 사용하여 *E. coli*로부터 분리하였다.

Construction of TFO conjugated with DTPA

TFO는 N-myc gene의 616 bp DNA fragment에서 polypurine element가 포함되 TFO targeting이 가능한 29 bp로 고안하였다. 이 TFO sequences의 X position에 ¹¹¹In이 labeling된다. TFO는 ABI-394 DNA synthesizer (Takara Korea, Korea)에서 합성하였다. TFO solution (168 μM) in 1 M sodium bicarbonate (pH8.4)을 준비하였다. 이 solutions에, fresh cyclic DTPA dianhydride (cDTPAA) solution (1000 μM)을 건조된 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 15분 간격으로 세 번에 걸쳐 처리하여 첨가하였다. Conjugation은 cDTPAA solution을 첨가한 뒤 15분 동안 반응시켰다. cDTPAA의 최종 농도는 ODN보다 6.4-fold 더 높게 하였다. DTPA-conjugated ODN은 0.2 M sodium acetate와 0.02 M sodium citrate buffer (pH4.5)로 prewash한 spin G-50 column (5 Prime ↑3 Prime Inc., Boulder, CO)으로 분리하였다. DTPA가 완전히 제거될 때까지 spin column chromatography를 여러 번 반복 수행하였다. 정제된 DTPA-ODN conjugates의 농도는 ultraviolet spectroscopy (Hewlett Packard Co., Gloucester, VA)로 측정하였다.

¹¹¹In labeling with DTPA conjugates of TFO

상온에서 1시간동안 ¹¹¹In chloride (70.6 MBq, 27 pmol in 5.2 μl of 0.05 M HCl) 2.17-fold 이상을 방사 표지한 conjugates (12.4 μM)를 1μl씩 분주한다. solutions의 pH는 2 M sodium acetate를 첨가하여 4.5로 맞춘다. 남아있는 ¹¹¹In ion의 분자는 5 mM DTPA를 처리하여 10분 반응시켜 소멸시킨다. ¹¹¹In-표지양은 reverse-phase (Rp) thin-layer chromatography (TLC) (5×20 cm, eluate 10 mM sodium phosphate pH6.7; Uniplate; RPS-FAnaltech Inc., Newark, DE) 와 size-exclusion high-performance liquid chromatography (HPLC) 실험기와 Supelco G2000SW column and an on-line flow radioactivity detector (Bioscan Inc., Washington, DC)로 정한다. Rp-TLC에서 방사능은 Bioscan System 300 Imaging Scanner detector (Bioscan Inc., Washington, DC)로 조사한다. 방사능 peaks는 TLC plat에서 긁어모은 것과 γ-counter (Packard Co., Downers Grove, IL)로 측정된 것과 ¹¹¹In-DTPA-TFO 와 ¹¹¹In-DTPA에 반응한다. 남은 ¹¹¹In-표지 생성물은 ¹¹¹In-DTPA 가 완전히 제거 될 때 까지 spin column chromatography를 수행한다.

In vitro TFO formation and binding assay

¹¹¹In-labeled TFO와 target plasmid pCRhN-myc를 binding buffer (50 mM Tris-HCl, pH8.0; 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl)에서 65°C, 5분동안 반응시킨 후, 상온에서 서서히 감온 하였다. plasmid와 TFO의 triplex (1.0 pmol/1.5 pmol)의 binding 분석은 1× TBE buffer (with 3 mM MgCl₂)를 사용하여 2% agarose gel에서 전기영동을 하였다. Triplex의 형성은 BSA 1500 Bio-Imaging Analyzer (Fuji, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였으며, triplex와 unbound TFO의 상대적인 밀도는 LabWorks Analysis Software (UVP, Inc. Upland, CA)를 사용하여 측정하였다.

Cellular uptake and nuclear localization *in vitro*

MCF-7 (breast adenocarcinoma), MCF-10A (immortalized breast cells), SK-N-DZ (neuroblastoma), and HL-60 (promyelocytic leukemia)등의 암세포들을 35mm dishes에 1×10⁶ cells로 분주하여 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 그리고, 각 dish당 ¹¹¹In-labeled TFO를 536.5 kBq (536.5 TBq/mmol) 처리하여 37°C에서 24 시간동안 배양하였다. 배지를 모아, 세포를 ice-cold PBS로 washing한 후 1X trypsin-EDTA를 처리하여 원심분리 하였다. Cell pellet은 NP-40 lysis buffer (40 mM Tris-HCl, pH8.0; 120 mM NaCl, 10% NP-40 v/v, protease inhibitor cocktail)로 용해시켰다. 이 lysate를 1,300g에서 5분동안 원심분리하여 상층액을 얻었다. Gamma scintillation counting을 이용하여 상층액으로 cytosolic fraction을 pellet은 nuclear fraction을 방사능으로 측정하였다.

Biodistribution of ¹¹¹In-labeled TFO in animal breast tumor models

Breast cancer cells (MCF7)과 immortalized breast cells (MCF10A)을 *in vivo* 실험에 사용하였고 동물 모델로는, female Balb/c nude mice (5-6 weak old, 18-20g)를 사용하였다. mice groups (n=5)들은 생물학적 손상을 방지하기 위해 멸균된 bed, food, water와 25°C가 유지되는 clean cabinet에서 사육하였다. 새로운 환경의 적응과 안정한 상태를 위해 1주일 동안 homeostatic cabinet에서 적응기를 가졌다. 1주일 후에, mice에 1.5×10⁶ breast cells을 등의 중앙과 중앙으로부터 각각 좌우의 측면에 주사하였다. 주사한지 14일 후에 종양 크기는 대부분 0.5-2 mm diameter가 되었다. 중앙이 형성된 mice에 ¹¹¹In-TFO (317 MBq/ml)가 포함된 phosphate buffered saline (pH7.4)를 0.2 ml씩 주사하였다. Mice Groups (n = 5)별로 ¹¹¹In-TFO를 주사한지 15, 60, 120, 300, 1140분 후에 안락사 시켰다. 각각의 organs (간, 신장, 비장, 폐, 근육, 뼈, 위, 장, two breast cell-originated masses)를 적출하여 무게를 잰 후, radioactivity를 측정하였다. Radioactivity는 γ -counter를 이용하여 ¹¹¹In photo peak (171 and 245 keV)를 측정하였다.

3.결과

¹¹¹In labeling with DTPA conjugates of TFO

최대의 특정한 방사능을 갖는 ¹¹¹In-DTPA-NH-TFO를 얻기 위해서, DTPA-NH-TFO의 2.17-fold molar excess로 ¹¹¹In chloride를 첨가하였다. Rp-TLC와 size exclusion HPLC로 확인한 결과, ¹¹¹In-DTPA-NH-TFO의 specific radioactivity는 536.5 TBq/mmol이고 specific concentration은 317 MBq/ml 이었다.

TFO formation and binding assay

¹¹¹I-labeled-N-myc TFO는 human N-myc gene (pCRhN-myc)과 binding buffer (pH 8.0)에서 65°C에서 5 분간 반응시켜 triplex를 형성하였다. 그러나 human estrogen receptor promotor (pCRhERP)와는 triplex를 형성하지 않았다. Fig. 2A에서 위쪽 화살표는 triplex band를 나타내고 아래쪽 화살표는 free unbound TFOs를 나타낸다. Triplex band는 전기 영동한 gel을 ethidium bromide로 염색한 plasmid band와 일치한다. Triplex and TFO 사이에 생긴 smear는 ¹¹¹I의 decay에 의해 유도된 triplex의 disintegration을 나타낸다.

¹¹¹I-labeled-N-myc TFO와 human N-*myc* 사이에서 형성된 triplex와 unbound TFOs의 mean area density를 측정하여 비교하였다. ¹¹¹I-labeled-N-myc TFO와 human N-*myc* gene에서 형성된 triplex는 unbound TFOs와 상대적으로 19.6% mean density를 나타내었다. 반면에 human estrogen receptor promoter와의 triplex formation은 background value를 뺀 unbound TFO와 상대적인 mean density가 1.55%로, 실제적으로 거의 수치가 나타나지 않았다 (Fig. 2B).

Cellular uptake and nuclear localization of N-*myc* targeting TFO in various normal and cancer cell lines

MCF7, MCF10A, MCF7/TH, HL-60 등의 세포에서 cell nucleus, cytoplasm, cultured medium fractions의 ¹¹¹In labeled TFO distribution을 측정하기 위해, 이 system을 이용하였다. 이 실험에서는 N-*myc* sequence가 살아 있는 세포에서 N-*myc* promoter에 표적할 수 있는지의 여부를 연구하였다. 실험을 통해, 세포배양 동안 발생하는 nucleases에 의한 분해로부터의 저항성과 세포로의 잘 흡수되는 TFO의 ability를 평가하였다. Subcellular fractions (i.e., cell nucleus, cytoplasm, cultured medium)는 gamma scintillation counter를 이용하여 각각의 방사능을 측정하였다. 세포에 따른 TFO의 전체 cellular uptake의 범위는 24시간 배양했을 때, 20.0-54.8% of injected dose (ID)로 나타났다. 이 중에서 높은 TFO uptake를 보여준 것은 human neuroblastoma인 SK-N-DZ가 54.8% ID, human mammary ductal carcinoma인 T47-D가 54.0% ID, human acute T cell leukemia인 Jurkat이 54.0% ID, multidrug-resistant human breast carcinoma인 MCF7/TH가 49.5% ID로 normal cell인 immortalized human breast cells (MCF10A); 20.0% ID에 비해 매우 높게 나타났다 (Fig. 3). 여기서 cytosol 보다 생물학적으로 중요한 의미를 갖는 것은 TFO의 nuclear localization인데, 그것은 TFO가 nucleus의 double stranded DNA와 결합할 수 있고, cytosol의 single stranded RNA와는 결합하지 않기 때문이다. TFO의 nuclear localization이 가장 높게 나타난 세포는, MCF7/TH (30.0±1.00% ID)와 SK-N-DZ (28.7±1.20% ID)였고, 가장 낮게 나타난 세포는 MCF10A (6.59±1.03% ID)였다. 그 외에 세포에 따른 각 분류별 percentage의 차이는 다음과 같다. Nucleus : HL-60; 7.50±1.00% ID, MCF7; 7.50±1.47% ID, MCF10A; 6.59±1.03% ID, MCF7/TH; 30.0±1.00% ID, SK-N-DZ; 28.7±1.20% ID, cytoplasm : HL-60; 33.0±1.00% ID, MCF7; 28.5±0.63% ID, MCF10A; 13.4±2.62% ID, MCF7/TH; 19.5±1.00% ID, SK-N-DZ; 26.1±1.00% ID. 이 실험의 결과로, TFO의 nuclear localization과 cellular uptake는 정상세포보다는 다양한 종류의 암세포에서 잘 나타난다는 것을 알 수 있었다.

Biodistribution of ¹¹¹In-labeled TFO in animal breast tumor models

Biodistribution의 시간별 결과는 ¹¹¹In-labeled TFO의 injected dose (% ID)의 percent로 나타내었다 (Table 1). Table 1는 Balb/c nude mice의 tumor-xenografted model에서 tumor targeting ¹¹¹In-labeled TFO를 평가하기 위한 biodistribution의 총괄 결과를 보여준다. Balb/c nude mice에서 각각의 유방암에 표적하는 TFO의 최고점은 ¹¹¹In-labeled TFO를 주사한지 5시간째에 나타났다 : MCF7; 7.77± 2.11% ID per gram of tissue (% ID/g), MCF10A; 4.53±1.20% ID/g, MCF7/TH; 21.0±3.23% ID/g. 중요한 차이점은 시간에 따른 각 기관들에서 보여지고 있다. TFO의 중앙표적은 normal cell-originated tumor보다는 cancer cell-originated tumor에서 더 높게 나타났다. Blood values는 15분경과 후 8.00±0.90 ID/g였으나 19시간 경과 후에는 1.30±0.30 ID/g로 시간에 따라 감소하였고, blood TFO의 반감기는 대략 130분으로 측정되었다. 다른 기관들이 시간의 경과에 따라 감소하는 반면에 신장에서는 증가하는 양상이 나타났다. 신장의 TFO level은 15분 경과 후 5.93±7.91% ID/g이었고, 19시간 경과 후에는 25.1±5.60% ID/g로 측정되었다. 간의 TFO uptake는 19시간이 경과될 때까지 계속 높은 level (19.7%-24.5% ID/g)을 유지하였다. 신장이나 간에서의 이 같은 결과는 체내의 대사과정과 관련이 있음을 나타내준다. 비장이나 폐와 같이 혈관이 많이 분포하는 조직에서는, 비교적 높은 level로 uptake되었다가 시간이 경과할수록 감소되었다 (Spleen; 15.8-4.05% ID/g, lung; 6.35-1.64% ID/g). 근육, 뼈, 위, 장과 같은 조직에서는 실험이 진행되는 동안 계속적으로 낮은 수준

(0.37-3.63% ID/g)을 유지하였다.

4. 고찰

이 논문에서는 human N-myc 유전자에 Hoogsteen 수소 결합을 형성하는 polypurine-polypyrimidine TFO를 고안하여 실험을 수행하였다. 바로 이 polypurine-polypyrimidine 염기서열이 triple-helix의 결합을 안정하게 해줄 수 있다. 실험을 위해 선택한 N-myc 유전자는 polypurine 서열 부위를 가지고 있어 TFO의 결합을 안정하게 할 수 있다. 이는, 특이적인 염기쌍 서열을 인식하고 human genome의 promoter 부위에 안정한 triplex를 형성하는 ODN를 고안하는 것이 현재 연구 개발 분야이기 때문에, 이 논문에서 수행한 N-myc 유전자에 표적하는 TFO를 이용한 연구는 큰 의미를 갖는다. 그리고 N-myc 유전자가 신경아세포종에서 발현되는 유전자이므로 신경 계통의 질병 및 다양한 분야로의 이용 가능성이 크다는 점을 고려해 볼 때, 임상적인 연구에 많은 도움이 될 것으로 보인다.

두 가닥 사슬의 DNA에 triplex 형성을 유도하는 ODN는 *in vitro* (Beal and Dervan, 1991; Blume et al., 1992; Durland et al., 1991; Durland et al., 1994; Maher, 1992; Mayfield et al., 1994; Pilch et al., 1991)와 *in vivo* (Cooney et al., 1988)에서, 유전자 전사와 단백질 합성을 선택적으로 억제한다. Panyutin과 그의 그룹에서, delivery molecule로써 AEs를 이용한 TFO를 이용하여 특이적 유전자에 표적하는 새로운 접근법을 시작하였는데, 그것은 서열 특이적 두 가닥 사슬의 절단이 DNA상에서 AEs의 직접적인 작용에 의해 일어나기 때문이다 (Panyutin and Neumann., 1994; 1996; 1997). TFO는 유전자의 발현을 선택적으로 조절할 수 있는 활성을 갖고 있기 때문에, 동위원소 표지에 의해 표적 유전자를 서열 특이적으로 파괴할 수 있다 (Praseuth et al., 1999). 이러한 점을 이용하면 TFO를 특이 유전자의 기능과 조절을 연구하기 위한 유전자 억제제로 사용할 수 있으며, 치료제로 개발할 수도 있다. 표지하지 않은 TFO는 항유전자 strategy로서 유전자 발현을 미리 조절할 수 있다 (Frank-Kamenetskii and Mirkin, 1995). TFO의 염기서열 특이성과 AEs의 붕괴 능력의 복합작용으로 제한된 DNA의 절단을 일으킨다. 그리고 무엇보다 중요한 점은 이 복합체가 표적 이외의 유전자에는 최소한의 손상만을 일으킨다는 것이다. 바로 이러한 점이 AR의 최종 목표일 것이다 (Karamychev, *et al.*, 2000). TFO가 염기서열에 high-purine과 high pyrimidine 구성성분을 갖고 있는 genomic DNA에서 어떤 유전자에도 표적할 수 있기 때문에, AR의 방법은 유전자 치료법에 매우 전망이 있다. 임상적으로, 이 기술은 증폭된 유전자나 바이러스에서 유래된 이질성을 갖고 있는 암과 같은 질병의 치료에 가장 적합하게 적용될 수 있다. 이 연구에서는 N-myc 표적 TFO가 신경아세포종 뿐만 아니라, 유방암 세포에서도 *in vitro*와 *in vivo*에서 잘 흡수될 수 있는 뛰어난 능력을 갖는다는 확실한 예비 결과를 제시하고 있다.

앞에서 언급한 바와 같이 AR에서는 TFO의 서열 특이성과 아울러 AE의 붕괴 능력 또한 매우 중요한 요인으로 작용한다. *In vitro*의 실험에서, 지금까지 ¹²⁵I이 AR에 많이 이용되어 왔다. 이것은 ¹²⁵I-표지 TFOs가 표지가 잘 되는 장점을 가지고 있고, 순수 분리된 plasmids나 genomic DNA에서 서열 특이적 절단을 일으킬 수 있기 때문이었다. 그러나 ¹²⁵I-표지 TFOs는 반감기가 60일로 매우 길기 때문에 *in vivo*의 AR에서는 적합하지 않다는 단점이 있다. 따라서 동물 모델에는 다른 종류의 AEs가 필요하다 (Karamychev, *et al.*, 2000). 이러한 사항을 만족시킬 수 있는 핵종으로 ¹¹¹In을 들 수 있다. ¹¹¹In은 AEs의 총에너지가 ¹²⁵I의 절반 정도이고 (Sastry *et al.*, 1988), medium-energy γ -ray를 방출하며, 반감기가 2.8일로 비교적 짧다. 그리고, 핵의학 조영법에서 다양한 운반체를 표지하여 이용할 수 있다 (Dewanjee, *et al.*, 1994). 그러나 ¹¹¹In을 표지시키기 위해서는 chelator가 필요하다.

Diethylenetriaminetriacetic dianhydride (DTPA dianhydride)는 ¹¹¹In-DTPA 복합체를 형성하는 음성적 전하를 띤 금속성의 chelator이며, DNA에 indium이 결합하는 것을 방지하는 이온 반발작용을 한다. 이와 마찬가지로, TFOs도 DNA의 표면에 음성적 전하를 많이 나타내도록 하는데, 이것은 DNA의 major groove에 인접한 ¹¹¹In-DTPA 복합체가 결합하지 못하도록 하기 위한 것이다 (Sahu *et al.*, 1995). 서열 특이적 DNA 절단은 다양한 길이의 DTPA linkers를 통해 duplex나 TFOs에 결합된 ¹¹¹In의 방사선 붕괴에 의해서 일어난

다 (Karamychev *et al.*, 2000). DNA 손상은 서열 특이적 DNA로 이동된 ^{111}In 에 의해서 일어나지만 DNA 손상에 적합한 구조는 아직까지 알려진 바가 없다 (Karamychev, *et al.*, 2000).

N-myc 유전자가 유방암에서 많이 발현되는 것은 유전자 증폭과는 관계없이 일어난다. N-myc 과발현과 유방암종을 가진 환자의 예후 사이에 나타나는 역관계는, N-myc expression이 유방암에서 예후 인자로 이용될 수 있다는 것을 제안한다 (Mizukami, *et al.*, 1995). 또한, N-myc overexpression은 leukemia cell lines의 분화를 막을 수 있다 (Hirvonen, *et al.*, 1993). Promyelocytic leukemia cell line인 HL-60는 N-myc mRNA를 인지할 수 없기 때문에, N-myc의 발현을 보여주는 대부분의 논문에서 negative control로 사용된다 (Gazitt, *et al.*, 1992). N-myc 발현의 정확한 조절은 세포의 정상적인 성장과 분화를 위한 결정적인 요인이지만, 아직까지 정상적인 N-myc 발현을 조절하는 특이적 대사과정은 상세하게 밝혀진 바가 없다 (Sivak, *et al.*, 1999).

Deregulated N-myc 유전자의 발현은 유방암종, small-cell lung cancer, Wilms's tumor, 막망아종, 신경아세포종을 포함하는 여러 중요한 악성종양의 발병에 큰 영향을 준다 (Pession *et al.*, 1997; Sivak *et al.*, 1999). 지금까지의 연구에서 N-myc 유전자와 그 단백질 생산물의 발현은 신경아세포종, retinoblastoma 와 small-cell lung cancer의 경우로 제한되어 왔었다. 그러나 최근의 연구에서는 인체종양에서 전반적으로 발현되고 있다는 증거가 증가하고 있다. 또한 N-myc oncoprotein은 대부분의 유방암에서 과발현 되므로 환자들의 임상적 결과에 중요한 의미를 갖는다.

이 논문에서는, neuroblastoma와 breast carcinoma cells에서 N-myc-targeting TFO의 cellular uptake와 nuclear localization을 보았다. Neuroblastoma에서 N-myc gene의 증폭은 잘 알려져 있으며 (Chambery *et al.*, 1999), genomic DNA에서 증가된 N-myc의 copy number가 핵에 targeting하는 N-myc TFOs의 level을 높이는데 기여한다. 현재까지 gene therapy의 범위를 확장시키는데 매우 전망이 있을 것으로 보여지는 radiotracers를 이용하여 in vivo에서 altered cells을 표적으로 하고 있지만, antigene therapy는 여전히 초기 단계이며, 아직까지 인체 연구는 보고 된 바가 없다. 그럼에도 불구하고, 이 방법은 기초적인 연구와 임상적 적용, 두 가지 모두에서 특정한 sequence의 인지와 genome의 destruction으로의 일반적인 접근을 제공한다. 결론적으로, 이 논문에서 보여준 결과들로 N-myc-targeting ^{111}In -labeled TFO가 in vitro와 in vivo에서 항유전자 치료법의 유망함을 증명하였다. 앞으로의 연구에서는 N-myc gene이 발현되는 cultured cells 뿐만이 아니라 in vivo 종양세포에서도 sequence-specific breaks를 보아야 할 것이다. 또한 유방암세포에서 선택적인 TFO localization의 근본적인 mechanism에 대한 이해가 필요하다.

References

- Beal, P. A. and Dervan, P. B. (1991) Second structural motif for recognition of DNA by oligonucleotide-directed triple-helix formation. *Science* 251, 1360-1363.
- Ben-Yosef, T., Yanuka, O., Halle, D., and Benvenisty, N. (1998) Involvement of Myc targets in c-myc and N-myc induced human tumors. *Oncogene* 17, 165-171.
- Blume, S. W., Gee, J. E., Shrestha, K., and Miller, D. M. (1992) Triple helix formation by purine-rich oligonucleotides targeted to the human dihydrofolate reductase promoter. *Nucleic Acids Res.* 20, 1777-1784.
- Chambery, D., Nohseni-Zadeh, S., Galle, B. D., and Babajko, S. (1999) N-myc regulation of type I insulin-like growth factor receptor in a human neuroblastoma cell line. *Cancer Res.* 59, 2898-2902.
- Cooney, M., Czernuszewicz, G., Postel, E. H., Flint, S. J., and Hogan, M. E. (1988) Site-specific oligonucleotide binding represses transcription of the human c-myc gene in vitro. *Science* 241, 456-459.
- Dewanjee, M. K., Ghafouripour, A. K., Kapadvanjwala, M., Dewanjee, S., Serafini, A. N., Lopez, D. M., and Sfakianakis, G. N. (1994) Noninvasive imaging of c-myc oncogene messenger RNA with

- indium-111-antisense probes in a mammary tumor-bearing mouse model. *J. Nucl. Med.* 35, 1054-1063.
- Durland, R. H., Kessler, D. J., Gunnell, S., Duvic, M., Pettitt, B. M., and Hogan, M. E. (1991) Binding of triple helix forming oligonucleotides to sites in gene promoters. *Biochemistry* 30, 9246-9255.
- Durland, R. H., Rao, T. S., Revankar, G. R., Tinsley, J. H., Myrick, M. A., Seth, D. M., Rayford, J., Singh, P., and Jayaraman, K. (1994) Binding of T and T analogs to CG base pairs in antiparallel triplexes. *Nucleic Acids Res.* 22, 3233-3240.
- Eilers, M. (1999) Control of cell proliferation by Myc family genes. *Mol. Cells* 9, 1-6
- Frank-Kamenetskii, M. D. and Mirkin, S. M. (1995) Triplex DNA structures. *Annu. Rev. Biochem.* 64, 65-95.
- Gazitt, Y., He, Y. J., Chang, L., Koza, S., Fisk, D., and Graham-Pole, J. (1992) Expression of N-myc, c-myc, and MDR-1 proteins in newly established neuroblastoma cell lines: a study by immunofluorescence staining and flow cytometry. *Cancer Res.* 52, 2957-2965.
- Hirose, M. and Kuroda, Y. (1998) p53 may mediate the mdr-1 expression via the VT1 gene in human vincristine-resistant leukemia/lymphoma cell lines. *Cancer Letters* 129, 165-171.
- Hirvonen, H., Hukkanen, V., Salmi, T. T., Pelliniemi, T. T., and Alitalo, R. (1993) L-myc and N-myc in hematopoietic malignancies. *Leuk. Lymphoma* 11, 197-205.
- Hoque, A. T., Sedelnikova, O. A., Luu, A. N., Swaim, W. D., Panyutin, I. G., and Baum, B. J. (2000) Use of polyethylenimine-adenovirus complexes to examine triplex formation in intact cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10, 229-241.
- Karamychev, V. N., Panyutin, I. G., Kim, M. K., Le, N., Paik, C. H., Carrasquillo, J. A., Reed, M. W., and Neumann, R. D. (2000) DNA cleavage by ¹¹¹In-labeled oligodeoxyribonucleotides. *J. Nucl. Med.* 41, 1093-1101.
- Maher, L. J., 3rd (1992) Inhibition of T7 RNA polymerase initiation by triple-helical DNA complexes: a model for artificial gene repression. *Biochemistry* 31, 7587-7594.
- Martin, R. F. and Haseltine, W. A. (1981) Range of radiochemical damage to DNA with decay of iodine-125. *Science* 213, 896-898.
- Mayfield, C., Ebbinghaus, S., Gee, J., Jones, D., Rodu, B., Squibb, M., and Miller, D. (1994) Triplex formation by the human Ha-ras promoter inhibits Sp1 binding and in vitro transcription. *J. Biol. Chem.* 269, 18232-18238.
- Mizukami, Y., Nonomura, A., Takizawa, T., Noguchi, M., Michigishi, T., Nakamura, S., and Ishizaki, T. (1995) N-myc protein expression in human breast carcinoma: prognostic implications. *Anticancer Res.* 15, 2899-2905.
- Nakagawara, A., Kadomatsu, K., Sato, S., Kohno, K., Takano, H., Akazawa, K., Nose, Y., and Kuwano, M. (1990) Inverse correlation between expression of multidrug resistance gene and N-myc oncogene in human neuroblastomas. *Cancer Res.* 50, 3043-3047.
- Panyutin I. G. and Neumann, R. D. (1997) Radioprobng of DNA: distribution of DNA breaks produced by decay of ¹²⁵I incorporated into a triplex-forming oligonucleotide correlates with geometry of the triplex. *Nucleic Acids Res.* 25, 883-887.
- Panyutin I. G., and Neumann, R. D. (1996) Sequence-specific DNA breaks produced by triplex-directed decay of iodine-125. *Acta Oncol.* 35, 817-823.
- Panyutin, I. G. and Neumann, R. D. (1994) Sequence-specific DNA double-strand breaks induced by triplex forming ¹²⁵I labeled oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 22, 4979-4982.
- Pession, A., Trere, D., Perri, P., Rondelli, R., Montanaro, L., Mantovani, W., Derenzini, M., and Paolucci, G. (1997) N-myc amplification and cell proliferation rate in human neuroblastoma. *J. Pathol.* 183,

339-344.

- Pilch, D. S., Levenson, C., and Shafer, R. H. (1991) Structure, stability, and thermodynamics of a short intermolecular purine-purine-pyrimidine triple helix. *Biochemistry* 30, 6081-6088.
- Prados, J., Melguizo, C., Fernandez, A., Aranega, A. E., Alvarez, L., and Aranega, A. (1996) Inverse expression of *mdr 1* and *c-myc* genes in a rhabdomyosarcoma cell line resistant to actinomycin D. *J. Pathol.* 180(1), 85-89
- Praseuth, D., Guieysse, A. L. and Helene, C. (1999) Triple helix formation and the antigene strategy for sequence-specific control of gene expression. *Biochim. Biophys. Acta* 1489, 181-206.
- Sahu, S. K., Kassis, A. I., and Makrigiorgos, G. M. (1995) The effects of indium-111 decay on pBR322DNA. *Radiat. Res.* 141, 193-198.
- Sastry, K. S., Howell, R. W., and Rao, D. V., (1988) Dosimetry of Auger emitters: physical and phenomenological approaches; in *DNA Damage by Auger Emitters*, Baverstock, K. F. and Charlton, D. E. (eds), pp. 27-38, Taylor & Francis, London.
- Sedelnikova, O. A., Panyutin, I. G., Luu, A. N., Reed, M. W., Licht, T., Gottesman, M. M., and Neumann, R. D. (2000) Targeting the human *mdr1* gene by ¹²⁵I-labeled triplex-forming oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 10, 443-452.
- Sivak, L. E., Pont-Kingdon, G., Le, K., Mayr, G., Tai, K. F., Stevens, B. T., and Carroll, W. L. (1999) A novel intron element operates posttranscriptionally To regulate human *N-myc* expression. *Mol. Cell. Biol.* 19, 155-163.

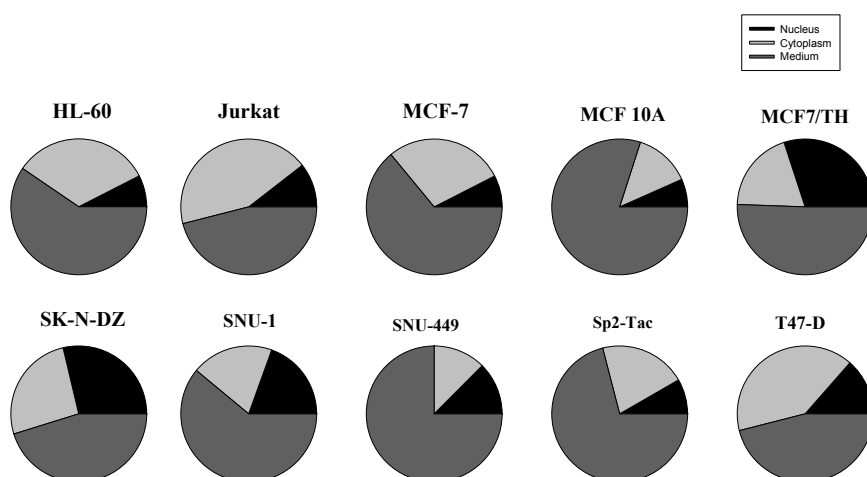


Fig. 3. Cellular uptake and nuclear localization of N-mycTFO¹¹¹In in various cancer and normal cell lines. Cells were plated in 35 mm dishes (1 × 10⁶ cells/dish) and incubated at 37°C for 24 h. Cells were treated with 536.5 kBq (536.5 TBq/mmol) of the N-mycTFO¹¹¹In for 24 h. The medium was collected, and cells were harvested by mild trypsinization. The cytoplasm and nuclear fractions were separated as described in Materials and Methods. Sectors represent cytoplasm (gray), nucleus (black) and medium (dark gray).

Table. 1 Biodistribution in Mice of ¹¹¹In-labeled N-myc TFO*

Organ	15min	1h	2h	5h	19h
Blood	8.00 0.90	5.30 0.50	4.80 0.20	1.30 0.10	1.30 0.30
Kidney	5.93 0.94	7.91 0.62	17.1 1.40	23.9 7.90	25.1 5.60
Liver	22.8 1.03	24.5 2.31	22.8 1.43	20.6 1.28	19.7 0.70
Spleen	15.8 1.19	13.7 0.97	10.7 1.12	4.05 0.46	6.17 1.04
Lung	6.35 0.56	3.76 0.42	3.01 0.31	2.53 0.22	1.64 0.07
Muscle	0.44 0.04	1.77 0.63	0.74 0.26	0.34 0.06	0.49 0.04
Bone	2.45 0.62	3.63 0.44	1.89 0.76	1.32 0.17	1.37 0.27
Stomach	1.46 0.14	1.23 0.17	0.88 0.09	1.95 0.21	0.37 0.18
Intestine	0.88 0.08	1.47 0.17	0.57 0.18	0.44 0.05	0.81 0.12
MCF7	1.23 0.34	1.45 0.23	2.78 0.78	7.77 2.11	3.33 0.99
MCF 10A	0.86 0.12	0.79 0.07	1.68 0.18	4.53 1.20	1.84 0.84
MCF7-TH	2.86 0.53	8.01 0.54	19.2 3.08	21.0 3.23	10.8 1.43

* Percent injected dose per gram of tissue (% ID/g)

The biodistribution data are mean ± S.D. of five independent experiments