

# *C-myb Antisense Oligonucleotides에 의한 혈액암 세포의 성장억제 : Target Sites 설정 및 Cationic Liposomes의 Antisense Oligo 전달 효율비교*

계명대학교 동산의료원 의과학연구소

문 익 재 · 박 종 구

## **Growth Inhibition of Leukemic Cells by *C-myb* Antisense Oligos : Use of Simulational Target Site Search and Enhanced Delivery of Antisense Oligos by Cationic Liposomes**

Ik-Jae Moon Ph.D. and Jong-Gu Park Ph.D.

*Institute for Medical Science, Dongsan Medical Center,  
Keimyeung University, Taegu, Korea*

**Background :** Aberrant expression of *c-myb* gene is often detected in transformed leukemic cells. Inhibition of *c-myb* expression by antisense oligos was shown to inhibit growth of normal as well as leukemic cells. *C-myb* antisense oligo for inhibition of tumor cell growth was, however, not decisive enough to be an effective anti-cancer agent. Thus, we set out to devise a systematic approach to find effective target sites for *c-myb* antisense oligos and to compare cellular uptake of antisense oligos complexed with different liposomes.

**Methods :** A computer simulation program for RNA secondary structures was employed to choose 8 potential target sites free of secondary structures along the entire *c-myb* mRNA sequence. Linear phosphorothioate-capped antisense oligos complementary to the selected target sites were synthesized and delivered into HL-60 and K562 cancer cell lines as liposomes complexes.

**Results :** Three of the 8 target sites were found to be relatively effective for reducing *c-myb* message. The three oligos, MIJ-4, -17 and -18 were able to reduce *c-myb* message by more than 70% and suppressed tumor cell growth by about 70%. When three different cationic liposomes were used to facilitate the cellular uptake of antisense *c-myb* oligos, distinct liposome formulations were found to be comparably effective for reduction of *c-myb* message and inhibition of tumor cell growth.

**Conclusion :** These results show that simulation of RNA secondary structure can be used to search effective target sites for antisense oligos and oligo uptake can be significantly enhanced by liposomes. However, cellular uptake of antisense oligos by liposomes needs further improvement.

**Key Words :** Leukemic cells, Antisense oligos, *C-myb*, Liposomes

본 연구는 1996년도 과학기술부 특별연구 개발사업 간판연구(star project) 연구비 지원과 1998년도 계명대학교 연구소 지원 연구비에 의해 이루어진 것임.

접수 : 1998년 10월 23일, 승인 : 1998년 11월 20일

책임저자 : 박종구, 대구광역시 중구 동산동 194 계명대학교 동산의료원 의과학연구소

Tel : 053)270-7854, Fax : 053)270-7854, E-mail : jonggu@dsmc.or.kr

## 서 론

Antisense oligonucleotides(AS-oligos)를 이용한 유전자의 목적 염기배열의 특이적인 발현 억제는 유전자 기능 연구에 유용한 도구로 사용되어 왔다.<sup>1~3)</sup> AS-oligos에 의해 특이적으로 유전자의 발현을 억제할 수 있고 목표 설정과 제작이 용이한 장점 때문에 암 세포를 대상으로 발암 유전자의 억제에 관해 많은 연구가 이루어져 왔다.<sup>4~10)</sup> AS-oligos에 의한 유전자 발현의 저해는 상보적인 mRNA sequence에 결합하여 RNase H 활성을 유도함으로써 mRNA를 제거하거나 혹은 단백질 번역을 위한 ribosomal complex의 진행을 방해함으로써 이루어진다.<sup>11)</sup>

AS-oligos를 활용하기 위해서는 몇 가지 개선되어야 할 문제점이 있는데 이는 nucleases에 대한 안정성, 목적 염기배열 특이적 결합 및 목표 조직과 세포내 효율적 전달 등이다.<sup>10~12)</sup> Phosphodiester(PO)-oligo는 nucleases에 매우 불안정하기 때문에 phosphorothioate(PS)-oligo, methylphosphonate(MP)-oligo, C-5 propyne pyrimidine oligo와 N 3-prime → P 5-prime phosphoramidates 등 다수의 변형된 oligo 유사체들이 연구되었다.<sup>13~15)</sup> 그러나 이들은 경우에 따라 염기배열 결합 특이성과 RNase H 활성에서 문제점을 나타내고 있다.<sup>10, 11, 13)</sup> AS-oligos의 효율적인 세포내 전달을 위해 liposomes,<sup>12)</sup> folic acid-polylysine carrier,<sup>16)</sup> electroporation<sup>17)</sup> 등 여러가지 방법이 사용되었다. 근년에는 cationic liposomes를 이용한 전달방법이 사용상의 간편함과 세포내 전달 효율성 개선으로 많이 사용되고 있다. Cationic liposomes의 사용에 의해 nucleases에 대한 AS-oligo의 안정성 및 세포내 전달은 상당히 개선되었지만, cationic liposomes은 자체의 독성에 따른 사용량의 한계가 있으며 전달 효율 면에서 아직도 개선해야 할 점들이 있다.<sup>12, 18~20)</sup>

Proto-oncogene *c-myb*은 조혈 세포(hematopoietic cell)에서 세포 증식과 분화 과정을 조절하는 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 보고 있다. 정상적인 조혈 세포에서 *c-myb* 단백질은 분화단계에 따라서 양적인 변화가 있으며 최종 분화상태의 hematopoietic cells에서는 매우 적은 양의 *c-myb* 단백질이 발현된다.<sup>1, 4)</sup> 그러나 많은 경우 혈액암 세포(leukemic cell)에서 *c-myb* 유전자가 비정상적 표현 또는 과발

현(over expression)되고 있다. 전골수성백혈병 세포주 HL-60와 CML(chronic myelogenous leukemia) 세포주 K562 등을 대상으로 이들 oncogene mRNA를 일부 억제 또는 제거시켰을 때 세포의 증식이 저해되거나 apoptosis로 진행된다고 보고되고 있다.<sup>4~7)</sup> 혈액암 세포에서 과발현되는 *c-myb* mRNA의 표현을 효율적으로 제거시키기 위해서는, AS-oligos가 특이적으로 결합하게 될 작용 부위(target sequences) 선택이 antisense 효과를 좌우할 만큼 매우 중요하다.<sup>21)</sup> 세포 내에서 mRNA는 상당한 2차 혹은 3차 구조를 형성해서 자체적인 안정성을 높이는 것으로 알려져있다. mRNA의 복합적 구조는 자체적 염기결합과 RNA 결합성 단백질에 의해 이루어진다. AS-oligos의 작용 부위는 이러한 사실을 감안하여 2차 구조가 최소화된 부위를 선택할 때 antisense 효과가 개선된 것이 보고된 바 있다.<sup>22)</sup> 따라서 본 연구에서는 *c-myb* mRNA의 제거에 따른 암세포 성장 억제를 표지 시스템으로 설정하여 본 연구팀에서 개발한 AS-oligos의 체계적인 목표 부위 설정 방법의 타당성을 조사하고자 했다. 더불어 AS-oligos와 복합체 형성을 위해 사용된 수종의 cationic liposomes의 antisense 효과에 대한 기여를 비교 조사하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Cell line과 세포 배양

혈액암 세포 주인 HL-60(promyelocytic leukemia)과 K562(chronic myelogenous leukemia)는 KTCT(대전, KIST 생명공학연구소)에서 분양받아 실험에 사용하였다. RPMI 1640(Gibco BRL, USA) 배양액에 10% heat-inactivated FBS(Gibco BRL, USA)와 1% penicillin/streptomycin(Gibco BRL, USA)을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 배양하였다. 실험에 사용된 모든 세포는 적정 세포 농도를 유지하며 지나친 성장이 되지 않도록 유의하였다. Transfection 등의 실험에 사용된 세포는 실험 전날(16시간 전) 신선한 배양액으로 교체한 후, 0.4% trypan blue로 viability를 확인한 다음 실험에 사용하였다.

### 2. Antisense Oligos 설정

세포의 transfection에 사용될 선상(linear) AS-oligos는 phosphorothioate-capped oligos(oligo의 양 말단이

phosphorothioate로 backbone이 수정된 것)로 Pioneer(주)(충북 청원)에 주문, 제작하여 사용하였다. AS-oligos의 목표 부위는 c-myb의 cDNA<sup>23)</sup>를 DNAsis program(Ver. 2.1, Hitach software, Japan)에 적용하여 2차 구조 분석을 시행한 후 선정하였다. 100개의 핵산염기를 1개의 분석 단위으로 정하고 순차적으로 분석하였다. 2차 구조분석은 simulation이므로 세포내에서 취하게 될 2차 구조와 가장 근접되도록 구조분석 단위를 30개의 핵산 염기가 순차적으로 중복되면서 어긋나게 진행되도록 하였다. 따라서 주어진 영역이 3번에 걸쳐 2차 구조가 중복 분석되었다. 세 차례의 2차 구조분석을 한 다음 지속적으로 2차 구조가 결여된 영역(loop로 나타나는 영역)이나 상대적으로 2차 구조가 없는 영역(Fig. 1)을 대상으로 15~18 nucleotides 길이의 antisense(AS), sense(S) 그리고 scrambled(SC)-oligos(Table 1)를 설정하였다.

### 3. Oligo-Cationic liposome 복합체의 Transfection

Lipofectin™, Lipofectamine™(Gibco BRL, USA)과 DOSPER™(Boehringer Mannheim, Germany) 등의 cationic liposomes과 AS-oligos의 복합체는 배양 혈청과 항생제를 첨가하지 않은 OPTI-MEM(Gibco BRL, USA)으로 희석, 배양세포에 처리하였다. Oligos(1 μg)와 cationic liposomes(1.2 μg)는 각각 15 μL OPTI-MEM에 희석하고 혼합한 다음, 상온에서 40분간 반응시킨 뒤 oligo-cationic liposomes 복합체를 준비하였다. 실험 전날 신선한 RPMI-1640 배양액으로 교환해 준 leukemic cells은 OPTI-MEM으로 두 번 세척하고 1 × 10<sup>6</sup> cells/mL로 조정하였다. 조정된 세포 용액은 48-well plate에 100 μL씩 분주하였다. 각 well에 oligo-liposomes 복합체를 30 μL씩 처리하고 5% CO<sub>2</sub>에

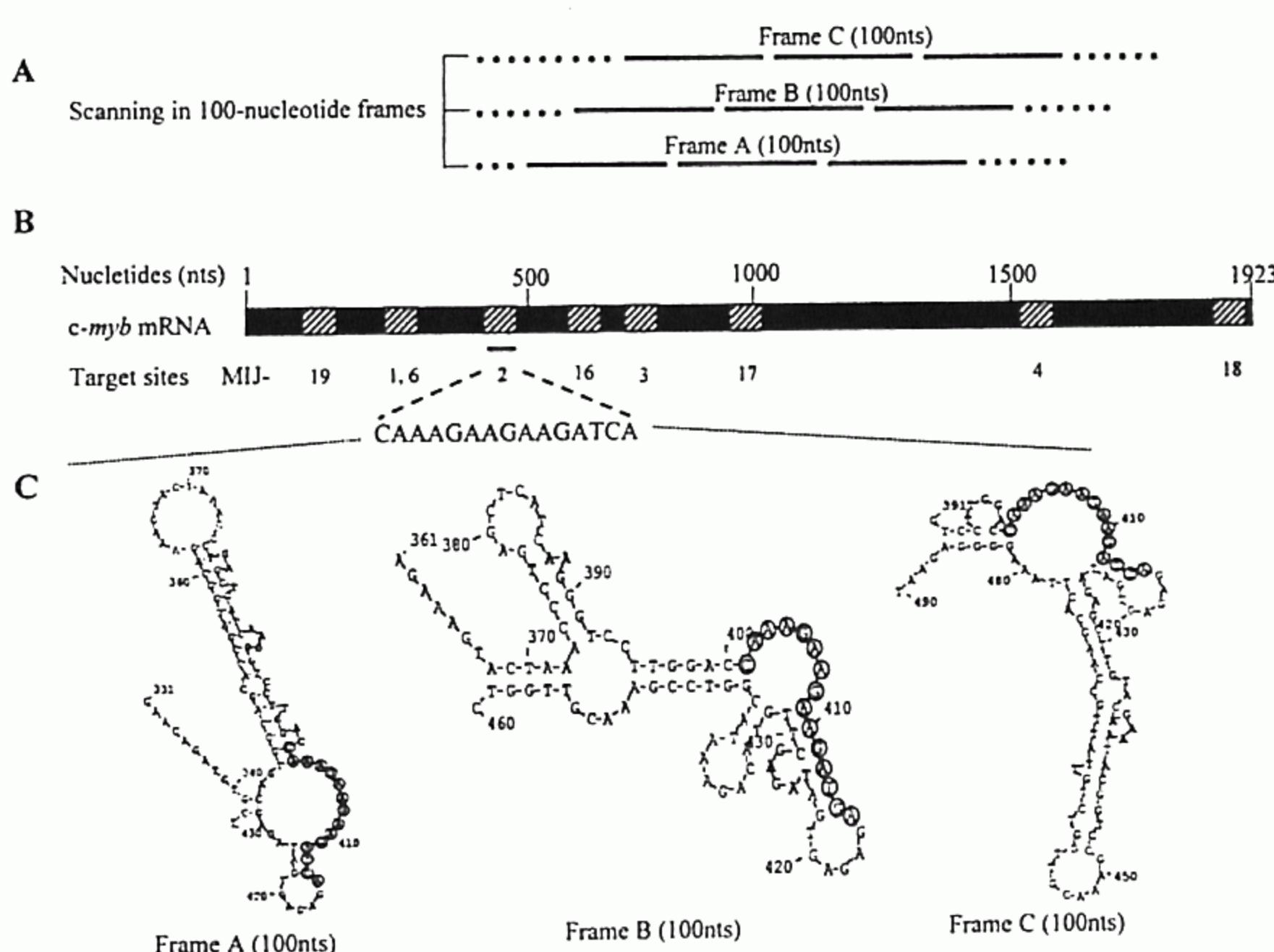


Fig. 1. Selection of a target sequence for the AS-oligos. The cDNA sequence of *c-myb* mRNA is represented by the rectangle(Majello *et al.*, 1986). The entire *c-myb* mRNA sequence was scanned three times with an RNA secondary-structure prediction program to find sequences with minimum secondary structure. Each scanning was performed 30 bases apart in a 100-nucleotide frame(denoted as frames A, B and C; top panel) sequentially. Putative secondary structures in the area of *c-myb* mRNA containing the target MIJ-2 sequence are shown in the three frames of 100 nucleotides each(frames A, B and C; bottom panel). Thus, the given sequence was scanned for putative secondary structure three times in three different frames. The most open sequence 5'-CAAAGAAGAAGATCA-3'(401~415, denoted in circle) in three scannings was chosen as a target MIJ-2 sequence. The other target sites(Table 1) are shown below the *c-myb* mRNA sequence line as short lines.

서 37°C로 배양하였다. 6시간 배양한 뒤 10% FBS (Gibco BRL, USA)가 포함된 OPTI-MEM을 150 μL 가하여 24시간 배양한 후 antisense 효과를 조사하였다.

#### 4. RNA 분리와 RT-PCR Southern blotting

RNA분리는 Tripure™ Isolation Reagent(Boehringer Mannheim, Germany)를 사용하였으며 제조회사에서 권장하는 방법으로 하였다. 각각의 well에서 수집한 세포에 0.4mL Tripure Reagent와 80 μL chloroform을 가하여 total RNA를 분리하고, 분리된 RNA는 Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR)에 사용되었다. RT-PCR은 Access™ RT-PCR kit (Promega, USA)를 사용하여 회사가 추천한 방법을 이용하여 다음과 같이 수행하였다. 0.5mL PCR 시험관에 총 반응양을 50 μL로 하였다. 반응 시험관에 RNA와 primer를 넣고, AMV reverse transcriptase(5 U/μL), Tfl DNA polymerase(5U/μL), dNTP(10mM, 1 μL)와 MgSO<sub>4</sub>(25mM, 2.5 μL)를 넣은 후, DNA Thermal cycler(Perkin Elmer, USA)로 reverse transcription과 polymerase chain reaction을 순차적으로 수행하였다. First strand cDNA 합성은 48°C에서 45분 동안 실시하였으며, second strand cDNA 합성과 PCR 증폭은 94°C에서 30초, 56°C에서 1분, 68°C에서 2분으로 25 cycles 동안 수행하였다. PCR 생성물은 1% agarose gel 상에서 확인하였으며, gel documentation program(Gel Doc. 1000, Bio-Rad, USA)을 이용하여 증폭된 cDNA를 정량적으로 비교, 분석하였다.

Southern hybridization은 ELC 3' oligo-labelling and detection system(Amersham Life Science, England)을

회사에서 권장하는 방법으로 다음과 같이 하였다. RT-PCR 생성물은 1% agarose gel로 전기영동시킨 후 0.4M NaOH 용액상에서 nitrocellulose membrane에 이전하였다. Oligonucleotide probe labelling은 30mer의 oligonucleotide(5'-TGTAACGCTACAGGGTATGGA ACATGACTG-3') 100pmol에 fluorescein-11-dUTP, carbodilate buffer, terminal transferase를 잘 섞은 후 37°C에서 70분간 반응시켜 labelled probe를 제조하였다. Hybridization은 nitrocellulose membrane에 hybridization 완충액(5X SSC, 0.02% SDS, liquid block) 6 mL로 60°C에서 40분간 처리한 다음 oligonucleotide probe를 6.25ng/mL 넣고 62°C로 1시간 반응시켰다. Membrane의 세척은 0.1% SDS가 포함된 5X SSC로 두 번, 1X SSC(0.1% SDS)로 58°C에서 15분간 두 번 실행하였다. Membrane blocking과정을 거친 후 anti-fluorescein HRP conjugate를 1분간 반응시킨 다음 autoradiography 필름에 노출시키고 현상하였다.

#### 5. MTT 분석과 Soft agar colony assay

세포증식 저해 정도의 측정은 MTT[3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide](Sigma, USA) 시약을 사용하여 다음과 같이 실행하였다. HL-60는 혈청이 들어있지 않은 OPTI-MEM으로 두 번 세척한 후 96-well plate에 6 × 10<sup>4</sup> cells/mL로 세포 농도를 조정하여 50 μL씩 분주하였고, Lipofectin은 0.6 μg/15 μL로 조제하여 40분간 상온에서 반응시켰다. Oligos는 0.2 μg/15 μL로 농도를 조정하고 미리 조제된 Lipofectin 용액을 동량(15 μL) 혼합하여 15분간 더 반응시켰다. Oligo-liposome 혼합체를 5시간 처리한

Table 1. Phosphorothioate-capped linear *c-myb* antisense oligos used for the antisense effect on *c-myb* expression

Name	Complimentary site	Type	Size (mer)	Sequence
MIJ- 1	253~ 267	antisense	15	T <sup>5'</sup> CAGTTTTTCATC <sup>3'</sup> C <sup>5'</sup> T
MIJ- 2	401~ 415	antisense	15	T <sup>5'</sup> GATCTTCTTCTT <sup>3'</sup> T <sup>5'</sup> G
MIJ- 3	613~ 627	antisense	15	G <sup>5'</sup> CTTTGCGATTTC <sup>3'</sup> T <sup>5'</sup> G
MIJ- 4	1545~1559	antisense	15	A <sup>5'</sup> CCGTATTTAATT <sup>3'</sup> T <sup>5'</sup> C
MIJ- 6	253~ 267	scrambled	15	T <sup>5'</sup> ATTCTTCTGCTC <sup>3'</sup> T <sup>5'</sup> A
MIJ-16	585~ 602	antisense	18	C <sup>5'</sup> CCCAGTCTCTTGCT <sup>3'</sup> G <sup>5'</sup> C
MIJ-17	961~ 978	antisense	18	G <sup>5'</sup> GTCTTCATCATTATA <sup>3'</sup> G <sup>5'</sup> T
MIJ-18	1902~1919	antisense	18	C <sup>5'</sup> TGCAAGGGGCTCGCC <sup>3'</sup> A <sup>5'</sup> G
MIJ-19	97~ 114	sense	18	T <sup>5'</sup> GGCGCGGCCGGCGGC <sup>3'</sup> G <sup>5'</sup> G

: Phosphorothioate modified

Nucleotide numbering is in accordance with the published numbering of Majello, B. et al.(1986).

후 10% FBS(HyClone, USA)와 항생제가 포함된 OPTI-MEM을 가하고 37°C로 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 5일간 배양하였다. MTT 시약은 PBS 완충액으로 5 mg/mL로 조제하였으며, 배양액 100 μL/well 당 100 μg의 MTT 시약을 처리하고 5% CO<sub>2</sub>-incubator에서 37°C로 4시간 배양하였다. 그 후 isopropanol(0.1N HCl)을 배양액과 동량으로 처리하여 한 시간동안 상온에서 반응시키고 잘 섞어 준 다음 ELISA reader로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

Antisense 효과를 검증하는 또 다른 방법으로 soft agar 상에서 세포의 군집(colony) 형성 능력을 측정하였다. 암 세포의 군집 형성은 0.4% low melting point (LMP) agarose(Gibco BRL, USA)상에서 다음과 같이 실시하였다. K562세포( $4 \times 10^5$  cells/mL)에 각종 oligos 를 liposomes과 혼합하여 24시간 배양하여 transfection시켰다. Transfection 후, 20% FBS(HyClone, USA) 와 항생제가 포함된 2X RPMI-1640 배양액에 transfection시킨 세포를 200개가 포함되도록 조정하여 0.8% LMP agarose와 1:1로 혼합한 뒤 6-well plate에 분주 및 도포하였다. 0.4% LMP agarose와 세포가 혼합된 6-well plate는 4°C에서 5분간 처리하여 agarose gel을 굳히고, 37°C로 CO<sub>2</sub>-incubator에서 15일간 배양하였다. 군집의 확인과 계산은 20개 이상의 세포로 구성된 군집으로 확인하고 군집 수를 계산하였다.

## 결 과

### 1. 이차구조 simulation을 이용 AS-oligos 에 대한 작용부위 설정

혈액암 세포주인 HL-60와 K562에 처리할 선상 AS-oligos는 *c-myb* mRNA의 2차 구조를 분석한 후 8 개의 AS-oligos가 작용할 영역을 선택하였다(Table 1). 특정 mRNA의 전체 염기 배열을 대상으로 무작위로 AS-oligos의 반응 영역을 삼을 경우 지나치게 많은 AS-oligos를 실제 사용해서 조사해야하는 어려움이 있다. 따라서 computer를 사용한 2차 구조 분석을 수행하여 2차 구조가 최소화된 영역을 선택하고자 하였다. 본 연구에서는 computer simulation의 단점을 보완하기 위해 특정의 염기 배열을 최소한 3개의 상이한 frames에서 분석, 항상 개방된 영역(2차 구조가 최소화된 영역)을 선택함으로서 2차 구조 예측의 신뢰도를 높이고자 하였다. 첫번째 구조 분석 frame은 100개의 핵산 염기로 구성되며, 두 번째는 3

prime 방향으로 30개의 핵산 염기를 건너뛴 후 2번 째의 frame이 시작되며 이러한 과정이 반복되었다. 2 차 구조 분석 frame은 100개의 핵산 염기를 단일 단위로 순차적으로 설정되므로 실제 mRNA의 2차 구조가 합성과 동시에 순차적으로 이루어지는 것을 감안하였다. 상기한 방법으로 2차 구조를 분석할 경우 특정영역에 대해서 3번의 중복적 구조 분석이 상이한 frames에서 이루어진다. 따라서 mRNA 2차 구조를 체계적으로 분석한 후, 선택된 핵산 염기 배열에 상보적인 핵산 염기 배열을 AS-oligos로 설정하였다 (Fig. 1). Human *c-myb* AS-oligos의 작용 부위는 *c-myb* mRNA의 중복적 2차 구조분석으로부터 8군데의 2차 구조가 최소화된 영역을 선택했다. Human *c-myb* AS-oligos는 안정성의 개선을 위해 5 prime과 3 prime 말단의 backbones이 각각 phosphorothioate로 수정(PS-capped)시켜 제작되었다.

### 2. AS-oligos에 의한 *c-myb* mRNA의 특이적 감소

*C-myb* mRNA에 대한 각각의 antisense와 scrambled(MIJ-1과 염기조성은 같지만 핵산염기를 무작위로 배열한 대조군) oligos를 세종류의 cationic liposomes(DOSPER, Lipofectin, Lipofectamine)와 함께 HL-60 혹은 K562에 transfection하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 먼저 promyelocytic 혈액암 세포인 HL-60 세포에 oligo 1 μg과 Lipofectin 1.2 μg을 혼합하여 transfection시켰을 때 사용된 AS-oligos 모두가 *c-myb* mRNA의 발현을 감소시켜 개방된 영역을 AS-oligos의 목표로 하는 방법의 타당성을 확인하였다(Fig. 2A). 대부분의 AS-oligos는 대조군(liposome 단독 또는 비처리) 대비 60% 이상의 *c-myb* mRNA 감소를 보였으며, 특히 MIJ-4, -17과 -18은 대조군 대비 70% 이상의 *c-myb* mRNA 감소를 유발했다. 반면 비특이적인 SC(scrambled)-oligo는 여타 대조군과 비교했을 때 *c-myb* mRNA 감소를 일으키지 않았다. Liposomes 과의 복합체를 형성하지 않고 AS-oligo만을 처리한 경우에도 전혀 antisense 효과를 관찰할 수 없었다(결과 생략). 추가적으로 다른 두 종류의 cationic liposomes인 Lipofectamine과 DOSPER(각각 1.2 μg)를 세종류의 AS-oligos(MIJ-1, 2와 3, 각각 1 μg)와 혼합하여 transfection했을 때 Lipofectin과 비슷한 정도의 *c-myb* mRNA 감소 결과를 보였다(Fig. 2B). Lipofectamine과 DOSPER를 AS-oligos와 혼합했을 경우 사

용된 모든 AS-oligo에서 antisense 효과를 대조군 대비 60% 이상 *c-myb* mRNA 감소로 확인하였다. SC-oligo 처리후 역시 대조군과 비교했을 때 *c-myb* mRNA 감소가 관찰되지 않아서 AS-oligo 효과가 antisense 특이적임을 알 수 있었다. 후속 실험에서는 시도된 3종의 liposome formulations에서 세포 독성이 경미한 Lipofectin을 실험결과에 대한 신뢰성을 높이기 위해 사용했다.

K562 세포를 대상으로 Lipofectin( $1.2 \mu\text{g}$ )을 이용한 transfection에서도 사용된 AS-oligos( $1 \mu\text{g}$ ) 모두에서 *c-myb* mRNA 발현 감소가 있었다(Fig. 3). 그중 MIJ-3, -4, -17과 -18은 대조군 대비 약 70% 이상 그리고

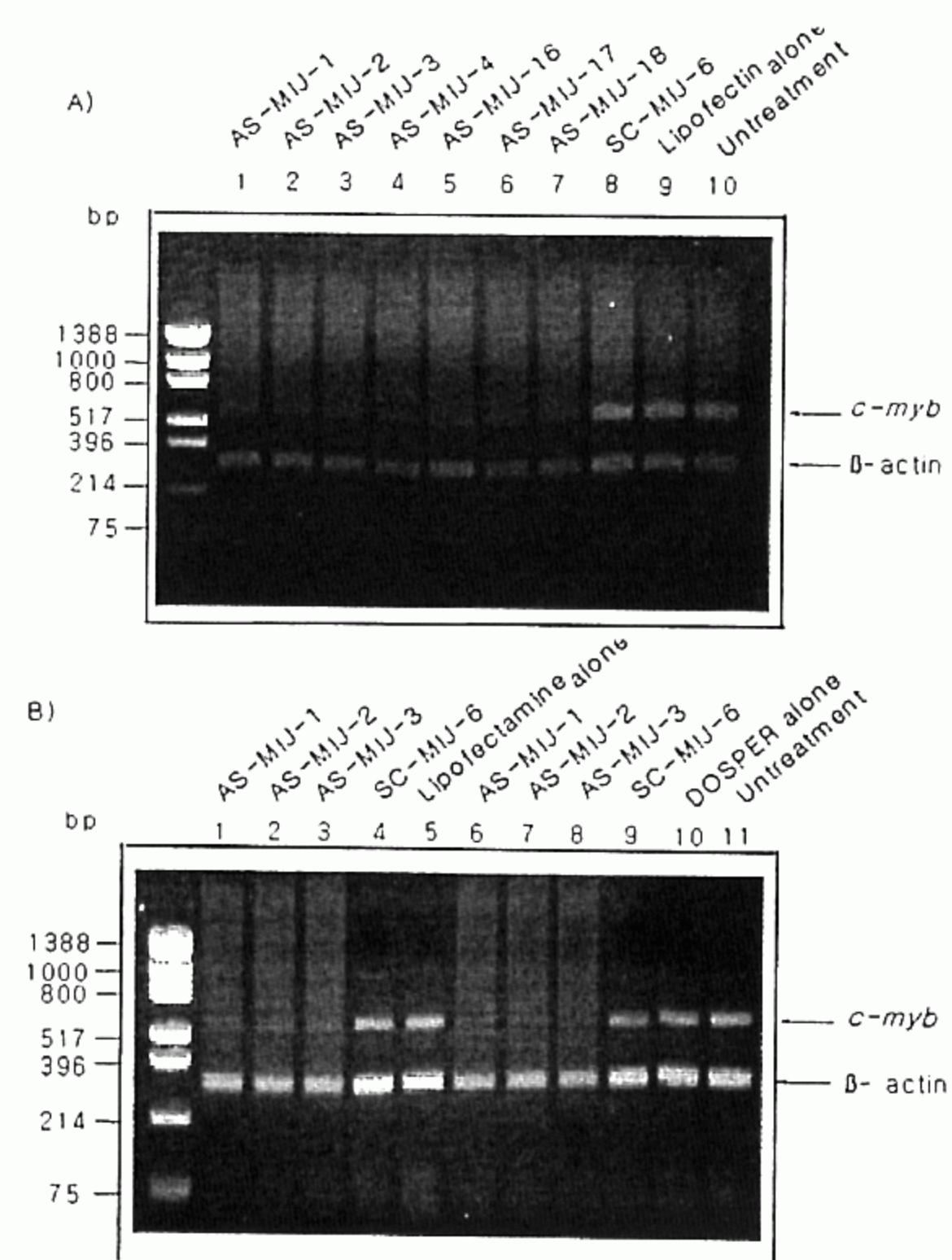


Fig. 2. *C-myb* and  $\beta$ -actin mRNA expression in HL-60 cells treated with cationic liposomes and AS-oligos complexes. mRNA expression determined by RT-PCR analysis 48hrs after treatment with oligos and cationic liposomes complexes. A) Lipofectin; B) Lipofectamine, lane 1~3, and DOSPER, lane 6~8. Cells were treated twice with  $1 \mu\text{g}$  of oligos and  $1.2 \mu\text{g}$  of cationic liposomes for 48hrs. Upper band(583 bp) denotes the amplified level of *c-myb* message and the lower band (318 bp) shows  $\beta$ -actin expression level (negative control). (AS), antisense oligo; (SC), Scrambled control.

다른 AS-oligos는 약 50% 정도로 mRNA 발현 감소를 일으켰다. 반면에 대조군인 SC-oligo, liposomes만 처리한 경우와 아무 것도 처리하지 않은 대조군에서는 *c-myb* mRNA 감소가 거의 나타나지 않았다. 이상의 결과로 2차 구조 분석으로 선택된 AS-oligos 모두 효과적 antisense 효과를 나타내는 것을 관찰했다. 세 종류의 cationic liposomes은 경미한 정도의 차이에도 불구하고 유사한 antisense 효과를 보였다.

AS-oligos를 포함한 SC-oligos를 배양 세포에 transfection한 후, *c-myb* mRNA를 RT-PCR로 증폭한 후 그 진위를 분석하기 위해 southern hybridization을 수행하였다. RT-PCR에 사용한 primer set에 중복되지 않는 중간 영역을 택하여 제작한 30mer의 hybridization primer로 southern blotting을 수행한 결과 AS-oligos인 MIJ-1, -2, -3과 -4 모두에서 *c-myb* mRNA의 발현 감소가 70% 이상 있었음을 재확인 할 수 있었다. 그러나 대조구인 sense(S-oligo) 및 scrambled oligos(SC-oligo)를 처리했을 때는 mRNA의 발현에서 큰 감소가 나타나지 않았다(Fig. 4).

### 3. AS-oligos(phosphorothioate-capped)의 세포 성장 저해 효과

전 항에서 *c-myb* 유전자 발현과 이의 특이적 소멸을 RT-PCR과 southern hybridization으로 살펴보았다. 따라서 본 연구팀에서는 *c-myb* 유전자의 발현이 세

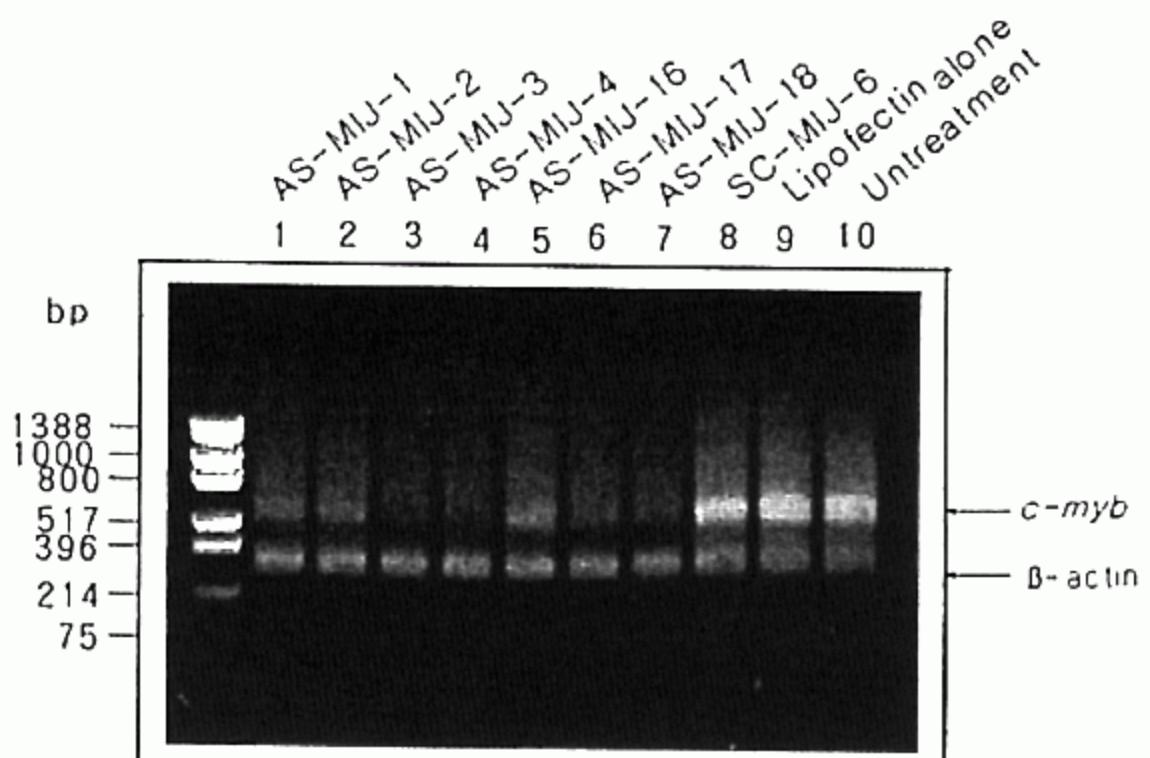


Fig. 3. *C-myb* and  $\beta$ -actin mRNA expression in K562 cells treated with Lipofectin and AS-oligos complexes. Cells were treated with a mixture of AS-oligos and Lipofectin ( $1 \mu\text{g}$  and  $1.2 \mu\text{g}$ , respectively) for 2 days before RNA extraction. Extracted RNA was subjected to RT-PCR for 20 cycles. Upper band (583 bp) denotes the amplified level of *c-myb* message and the lower band (318 bp) shows  $\beta$ -actin expression level (negative control).

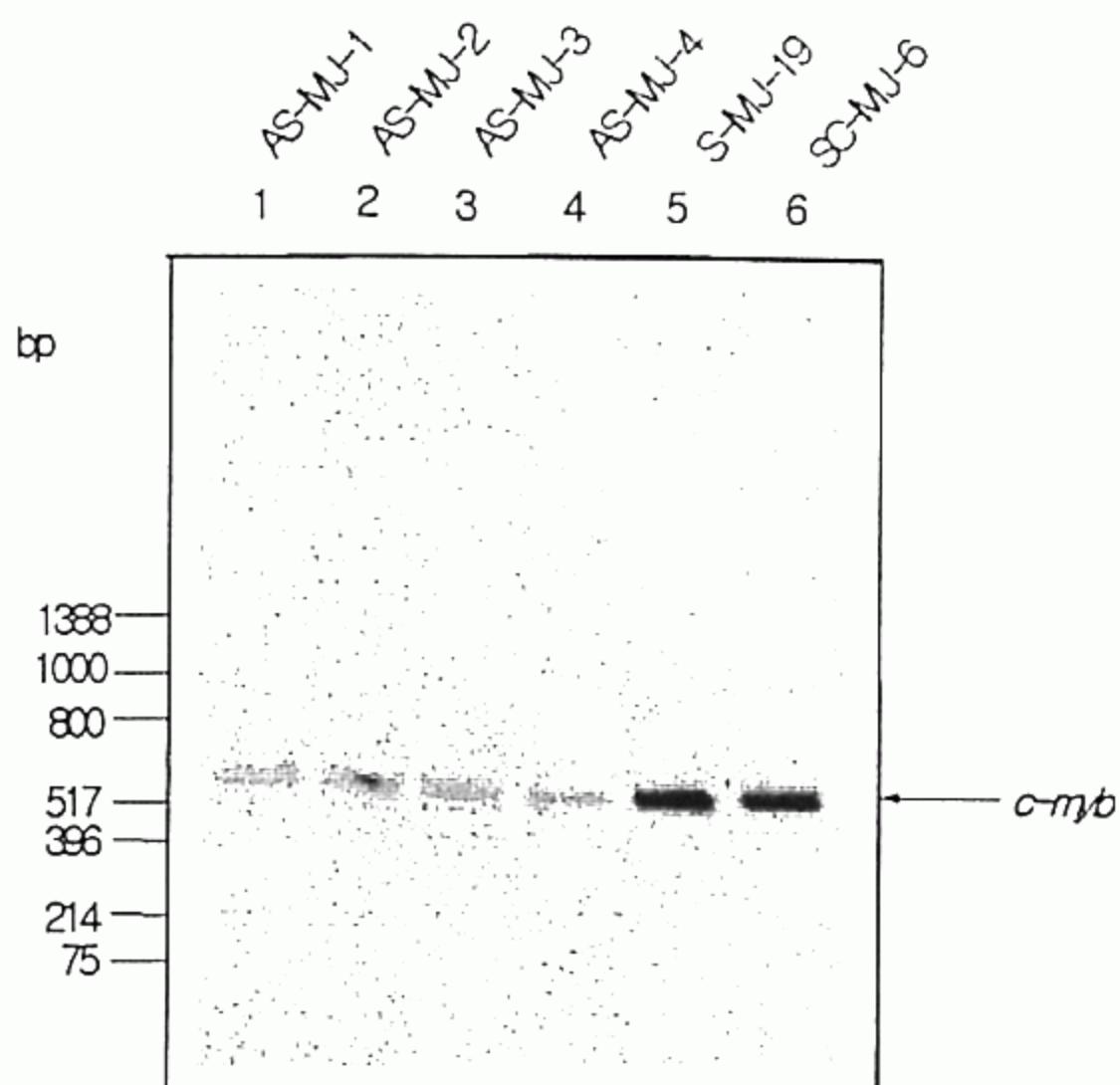


Fig. 4. Detection of different oligos on *c-myb* mRNA levels in HL-60. RT-PCR was performed with total RNA and two *c-myb* primers (described in Material and Methods). PCR products were analyzed by Southern hybridization, and hybridized bands were visualized with anti-fluorescein detection system. The bands show the hybridized RT-PCR band of *c-myb* mRNA. HL-60 cells ( $6 \times 10^4$  cells/mL) were treated twice for 24hrs with complexes containing  $1.2 \mu\text{g}$  of Lipofectin<sup>TM</sup> and  $1 \mu\text{g}$  of anti-sense (AS), sense (S) or Scrambled (SC) phosphorothioate oligos (15-mer linear oligos).

포 성장에 관여하므로 *c-myb*에 대한 AS-oligos를 HL-60 세포에 처리한 뒤 세포 성장 억제를 조사하였다. 세포 성장 억제를 조사하기 위해 MTT를 이용한 발색시약의 O.D. 측정으로 세포수의 감소를 측정하였다.

각종 oligos  $0.2 \mu\text{g}$ 과 Lipofectin  $0.6 \mu\text{g}$ 을 혼합하여 HL-60 세포에 transfection한 후, 5일째에 MTT 시약을 처리하고 O.D.를 측정하였다. AS-oligos는 아무 것도 처리하지 않은 대조군과 비교시 55~70% 까지 세포 성장 억제를 보였다(Fig. 5). 특히 AS-oligo인 MIJ-18은 70% 까지 세포 성장 억제를 보였다. 반면에 SC-oligo(MIJ-6)와 Lipofectin 만 처리했을 때는 각각 40%와 20% 세포 성장 억제가 있었다. 이러한 결과는 2차 구조 분석으로 선택된 AS-oligo가 특이적으로 암세포 성장을 억제할 수 있다는 것을 나타낸다. SC-oligo를 사용했을 경우에 경미하지만 부분적인 비특이적인 세포 성장 억제가 관찰되었다.

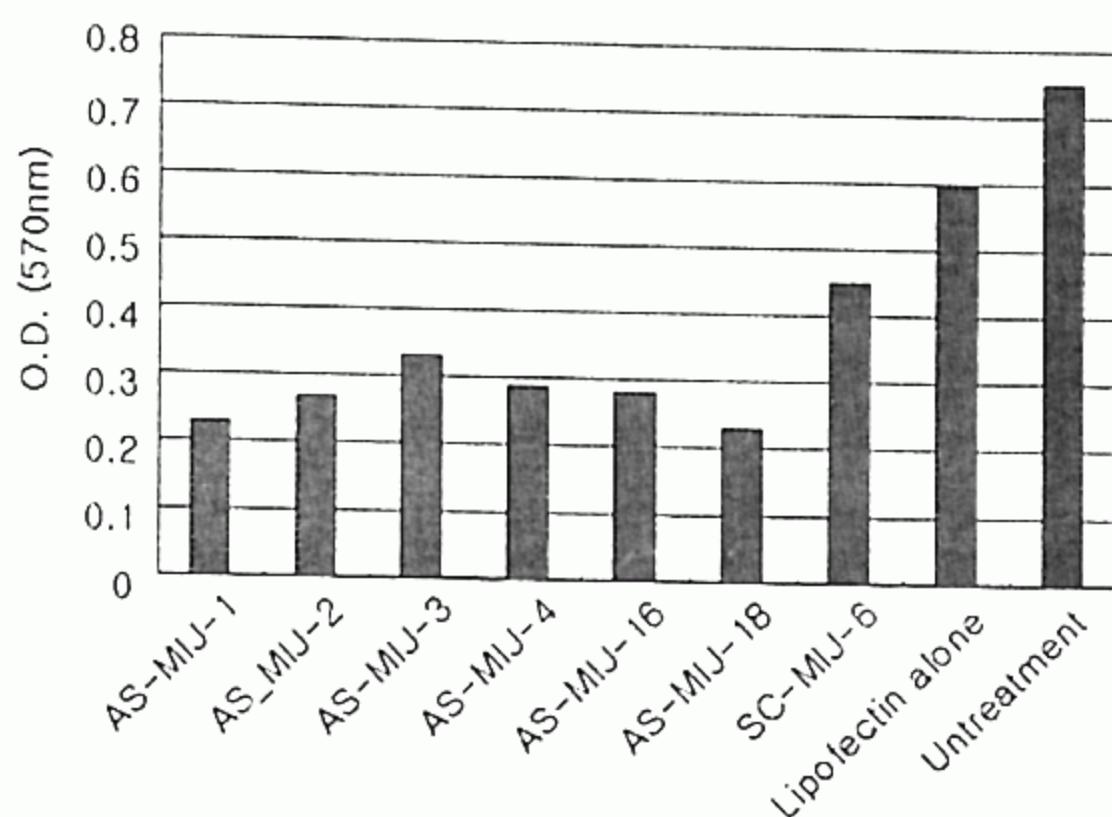


Fig. 5. Effect of AS-oligos on proliferation of HL-60. HL-60 cells were treated with complexes containing  $0.2 \mu\text{g}$  of oligos and  $0.6 \mu\text{g}$  of Lipofectin for 5 days. Solid bars are shown for growth inhibition of HL-60 cells treated with AS-oligos. Cells were assayed with a MTT reagent. Experiments were repeated in two times and similar results were obtained.

AS-oligos에 의한 암 세포 성장 억제를 다른 방법으로 조사하기 위해 soft agarose에서 형성되는 군집을 조사하였다. Soft agarose에서 암세포 군집 형성은 특성상 좀더 진행된 암세포를 사용할 경우 용이하게 이루어진다. 실제 K562 세포에서 암세포 군집 형성이 용이하여 본 실험에서는 K562 세포에 AS-oligos를 처리한 후 군집의 형성을 알아보았다. AS-oligos에 transfection된 K562 세포들을 0.4% LMP(low melting point) agarose와 섞어 plate에 도말하고 15일간 배양한 뒤 형성된 군집 수를 측정하였다. AS-oligos, MIJ-1과 -3를 처리했을 때 K562 세포는 비처리 대조군 대비 각각 55%와 65%의 군집 형성 감소를 나타냈다. 반면 대조군인 sense oligos 및 SC-oligos는 각각 10%와 35% 군집 수를 감소시켰다(Table 2). 이러한 결과는 PS-capped *c-myb* AS-oligos가 K562 세포의 군집 형성 억제에 효과적임이 재차 증명되었다.

## 고 칠

*C-myb* 유전자에 의해 전이되는 단백질 MYB은 몇 가지 뚜렷한 기능 부위(functional regions)를 갖는다.<sup>24, 25)</sup> Amino 말단 부위에 인산화-의존성(phosphorylation-dependent) DNA 결합 부위를 가지며, 중간 부위에는 transcriptional activator, 그리고 carboxy 말

Table 2. Effects of c-myb oligos on colony formation of K562 cells

Structure	Oligos	Type	Number of colony	%
Size(mer)				
Linear	15	AS-MIJ-1	55	44.4
Linear	15	AS-MIJ-3	45	36.3
Linear	15	SC-MIJ-1	84	67.7
Linear	15	S-MIJ-3	110	88.7
Lipofectin™ alone			109	88.0
Untreated control			124	100

$$\cdot : \frac{\text{number of colonies(oligo treated)}}{\text{number of colonies(untreated control)}} \times 100$$

K562 cells were exposed to different oligos for 15 days on 0.4% LMP agarose. Transfection was performed with double treatments of cells with complexes containing 0.8 μg of Lipofectin and 0.3 μg linear phosphorothioate oligos for 24 hrs. Colonies arising in 6-well plates containing cells exposed to sense (S), antisense (AS) and scrambled (SC) oligos were enumerated. Colonies in control (Lipofectin alone or untreated) were shown in the bottom two lines. Experiments were repeated twice and similar results were obtained.

단 부위에는 *v-myb* oncogene에서 결손된 하나의 조절 부위가 존재한다. Myb 단백질은 주로 핵내에 존재하며 DNA에 결합하여 활성화되면 cell cycle에서 G<sub>1</sub>/S phase통과의 조절인자로 작용한다.<sup>26)</sup> 또한 *c-myb* 유전자는 조혈세포의 발생을 조절하는 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려졌다.<sup>27)</sup> 세포의 분화와 증식에 직, 간접적으로 관여하는 *c-myb*은 혈액암 세포에서 빈번히 이상 과발현된다. 이러한 *c-myb* 유전자의 과발현을 AS-oligos로 감소시키거나 제거하여 혈액암 세포의 성장을 억제시킬 수 있음이 보고되었다. 본 연구에서는 *c-myb* mRNA의 효과적 제거를 목표로 해서 체계적인 AS-oligos 작용 부위의 설정 방법을 적용했다. AS-oligos는 양 말단을 phosphorothioates로 수정(PS-capped)한 후 혈액암 세포 HL-60와 K562에 처리하여 antisense 효과를 조사한 결과 안정성이 부분적으로 개선되었다. 더불어 본 실험에서는 3종의 cationic liposomes을 사용해서 AS-oligos의 세포 내 전달 효과를 조사하였는데 사용한 liposomes은 유사한 수준의 antisense 효과를 나타냈다.

AS-oligo에 대한 목적 sequence 설정은 antisense 효과를 극대화시키는데 중요한 요소가 된다. mRNA는 세포 내에서 단일 가닥의 선상배열로 존재하지 않고 2차 또는 3차 구조를 취하기 때문에 AS-oligos의 작용 부위 선택을 신중히 고려해야 한다. 안정된 hairpin loop를 취하는 Ha-ras 유전자의 mRNA를 이용하여 10mer의 oligos와 상보적 결합성(hybridization)을 측정한 결과 loop 양쪽의 5 prime 또는 3 prime 말단

부위 보다는 단일가닥 loop 지역이 10<sup>6</sup>배 더 높게 나타난다고 보고하고 있다.<sup>22, 28)</sup> 따라서 *c-myb* mRNA에 작용하게 될 antisense sequence의 설정은 2차 구조 분석에 의해 나타나는 stem loop 지역을 선택할 경우 antisense 효과가 개선될 수 있음을 나타낸다. 본 연구에서는 2차 구조 분석 프로그램을 이용하여 *c-myb* mRNA가 세포 내에서 취할 수 있는 구조를 예측하고자 했다. 100 nucleotides를 하나의 frame으로 정하고 30 nucleotides씩 frame을 3 prime 방향으로 이동시켜서 한 부위를 각각 다른 frame으로 3번에 걸쳐 2차 구조를 중복하여 조사하였다. 조사된 antisense sequence 중 2차 구조가 적은 부위(주로 loop 형성부위)와 G+C 함량이 30% 이상 되는 것을 AS-oligos 목표 지점으로 선택하였다. 모든 염기에 황(sulfate)으로 수정된 PS-oligos는 laminin과 fibronectin과 같은 extracellular 단백질의 heparin 결합 부위 또는 근처에 결합하려는 비특이적 결합 뿐만 아니라 fibroblast growth factor(FGF) 등과 결합하는 성질을 갖고 있다.<sup>29)</sup> 부분적으로 황으로 수정된(5 prime에 2개, 3 prime 말단에 4개) PS-oligos는 nucleases 저항성이 남아있고 heparin 결합력이 없기 때문에,<sup>30)</sup> 선택된 7종의 AS-oligos는 nuclease 저항성을 높이기 위해서 5 prime과 3 prime 말단에 각각 1개와 2개의 phosphorothioate로 수정하였다. 실제 5 prime과 3 prime 말단을 phosphorothioate로 capping을 시켰을 때 nucleases에 대한 안정성이 현저히 증가함을 본 연구 팀이 보고한 바 있다.<sup>21)</sup>

PO-oligos는 인간 혈청 내에서 30분안에 완전히 분해되었으며, 10% fetal calf serum이 포함된 특정 배양액 내에선 PO-oligos는 빠르게 분해되고 PS-oligos는 1시간 안에 분해 산물이 나타나기 시작했다. MP-oligos 역시 PS-oligos처럼 nucleases에 대한 부분적인 안정성의 증가를 보고한 바 있다.<sup>31)</sup> 그러나 MP-oligos는 용해도 및 sequence 특이성이 다소 떨어지며, RNase H의 활성을 저해한다.<sup>32)</sup> 따라서 MP-oligos는 단지 mRNA에 ribosome이 결합하는 것과 진행을 방해하기 때문에 단백질 번역을 저해하는 능력에 있어서 효과적이지 못하다. AS-oligos를 이용한 다수의 연구에서 AS-oligos의 작용 영역이 주로 단백질 번역 개시 codon을 중심으로 집중되어 있었다.<sup>2, 24)</sup> 그러나 단백질 번역 개시 codon을 중심으로 down stream쪽에 G-4 배열이 존재하는데 이 G-4 배열은 비특이적인 antisense 효과를 나타낸다고 논란이 되고 있으며,<sup>33)</sup> 따라서 G-4 배열을 피하기 위해서 단백질 번역 개시 codon영역을 제외시켰다.

현재까지 *c-myb*에 대한 antisense 연구는 주로 PO-, PS-oligos를 이용하여 이루어지거나 중점적으로 하고 있으며, expression vector<sup>34)</sup> 등의 방법으로 antisense 연구가 이루어져 왔다. 본 실험에서는 *c-myb* mRNA의 정량적 감소와 유전자 표현의 특이적 억제에 따른 암세포 성장 억제를 AS-oligos 효과의 표지로 삼고자 했다. PS-capped AS-oligos를 Lipofectin과 혼합하여서 HL-60 세포에 transfection시켰을 때 사용한 모든 AS-oligos에서 성장 저해를 보여서 mRNA에서 이차 구조가 개방된 영역이 효과적인 AS-oligos의 목표 지점이 되는 것을 알 수 있다. AS-oligos를 세 종류의 cationic liposomes(Lipofectin, Lipofectamine과 DOSPER)과 혼합하여 transfection시켰을 때 *c-myb* mRNA의 양적 감소가 서로 비슷한 결과를 나타냈다. 그러나 DOSPER와 Lipofectamine을 사용하였을 경우 다소 세포 독성이 나타났다. AS-oligos에 의한 암세포 성장 억제는 MTT 분석에서 70% 이상 성장 억제 능력이 있는 것으로 나타났으며 또한 군집 형성 억제 능력에 있어서 AS-oligos는 50% 이상 저해를 보였다. 따라서 2차 구조 분석으로 선택된 AS-oligos가 암세포 성장을 억제 할 수 있다는 것을 나타낸다.

이상과 같은 결과는 PS-capped AS-oligos가 antisense 효과 면에서 우수하며 더불어 체계적인 mRNA 이차구조 분석을 통한 AS-oligo 작용 지점 설정의

타당성을 잘 대변하고있다. mRNA의 체계적 목표 부위 선정과 PS-capped oligos의 활용은 antisense 연구에 많은 도움을 줄 것으로 사료되며, 암 치료제의 개발 및 유전자의 기능 연구에 있어서도 유용한 소재로 활용될 수 있을 것이다.

## 요 약

**배경 :** *C-myb* 유전자의 이상발현은 혈액 종양 세포에서 흔히 관찰된다. AS-oligo로 *c-myb* 발현을 억제하면 혈액 종양 세포뿐만 아니라 정상 세포의 성장을 억제한다. 그러나 종양 세포의 성장에 대한 antisense의 효과는 항암제로서의 충분한 기능을 발휘하지는 못한다. 따라서 본 연구팀은 *c-myb* AS-oligos에 대한 효과적인 목표 설정 부위를 찾기 위해서 체계적으로 접근하고자 하였다. 그리고 liposomes 을 매개로해서 AS-oligos의 암세포내 전달 효율을 비교하고자 하였다.

**방법 :** *C-myb* mRNA의 2차 구조 분석을 위해 컴퓨터 가상 프로그램을 이용하여 8군데의 antisense 작용 부위를 채택했다. 선택된 목표 설정 부위에 상보적인 선상 phosphorothioate-capped AS-oligos를 합성해서 DNA-liposome 복합체를 만들어 HL-60과 K562 세포내로 전달했다.

**결과 :** 8군데의 목표 설정 부위에 대한 As-oligos 중 3개의 oligos가 비교적 antisense 효과가 우수한 것으로 나타났다. 그중 AS-MIJ-4, -17과 -18의 oligos는 70%이상의 *c-myb* mRNA발현 감소를 유발하였으며, 암세포 성장을 약 70% 억제하였다. 3종류의 cationic liposomes은 AS-oligo의 세포 내 전달이 효율적이었으며, 특정 liposomes은 *c-myb* 발현의 감소와 세포 성장 억제에 있어서 비교적 효과적이었다.

**결론 :** RNA 2차 구조 분석이 AS-oligos에 대한 목표 설정 부위를 찾는데 효과적인 도구가 될 수 있으며, liposomes과 복합체를 형성할 경우 AS-oligo의 세포내 흡수가 상당히 개선됨을 보여주었다. 그럼에도 불구하고 liposome을 이용한 AS-oligs의 세포내 전달은 좀 더 개선이 필요한 과제로 남아 있다.

## 참 고 문 헌

- Thompson CB, Challoner PB, Neimon PE,

- Groudine M: *Levels of c-myc oncogene mRNA are invariant throughout the cell cycle.* *Nature* 314:363-366, 1985
- 2) Melani C, Rivoltini L, Parmiani G, Calabretta B, Colombo MP: *Inhibition of proliferation by c-myb antisense oligodeoxynucleotides in colon adenocarcinoma cell lines that express c-myb.* *Cancer Res* 51:2897-2901, 1991
  - 3) Anfossi G, Gewirtz AM, Calabretta B: *An oligomer complementary to c-myb encoded mRNA inhibits proliferation of human myeloid leukemia cell lines.* *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3379-3383, 1989
  - 4) Kamano H, Ohnishi H, Tanaka T, Ikeda K, Okabe A, Irino S: *Effects of the antisense c-myb expression on K562 human leukemia cell proliferation and differentiation.* *Leuk Res* 14: 831-839, 1990
  - 5) Chavany C, Connell Y, Necker L: *Contribution of sequence and phosphorothioate content to inhibition of cell growth and adhesion caused by c-myc antisense oligomers.* *Mol Pharm* 4: 738-746, 1995
  - 6) Wyllie AH, Rose KA, Morris RG, Steel CM, Foster E, Spandidos DA: *Rodent fibroblast tumors expressing human myc and ras gene; growth, metastasis and endogenous oncogene expression.* *Br J cancer* 56:251-259, 1987
  - 7) Kimura S, Maekawa T, Hirakawa K, Murakami A, Abe T: *Alterations of c-myc expression by antisense oligodeoxynucleotides enhance the induction of apoptosis in HL-60 cells.* *Cancer Res* 55:1379-1384, 1995
  - 8) Kastan MB, Stone KD, Civin CI: *Nuclear oncoprotein expression as a function of lineage, differentiation stage, and proliferative status of normal human hematopoietic cells.* *Blood* 74: 1517-1524, 1989
  - 9) Thaler DS, Liu S, Tomblin G: *Extending the chemistry that supports genetic information transfer in vivo; phosphorothioate DNA, phosphorothioate RNA, 2'-O-methyl RNA, and methylphosphonate DNA.* *Proc Natl Acad Sci USA* 93:1352-1356, 1996
  - 10) Wagner RW: *Gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides.* *Nature* 372:333-335, 1994
  - 11) Dolnick BJ: *Antisense agents in cancer research and therapeutics.* *Cancer Invest* 9:185-194, 1991
  - 12) Albrecht T, Schwab R, Peschel C, Engels HJ, Fischer T, Huber C, Aulitzky WE: *Cationic liposomes mediated transfer of c-abl and bcr antisense oligonucleotides to immature normal myeloid cells; uptake, biological effects and modulation of gene expression.* *Ann Hematol* 72:73-79, 1996
  - 13) Akhtar S, Kole R, Juliano L: *Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera.* *Life Sci* 49:1793-1801, 1991
  - 14) Wagner RW, Matteucci MD, Lewis J G, Gutierrez AJ, Moulds C, Froehler BC: *Antisense gene inhibition by oligonucleotides containing C-5 propyne pyrimidines.* *Science* 260:1510-1513, 1993
  - 15) Gryaznov S, Skorski T, Cucco D, Nieborowska-Skorska M, Chiu CY, Lloyd D, Chen JK, Koziolkiewicz M, Calabretta B: *Oligonucleotide N3'→P5' phosphoramidates as antisense agents.* *Nucleic Acids Res* 24:1508-1514, 1996
  - 16) Ginobbi P, Geiser TA, Ombres D, Citro G: *Folic acid-polylysine carrier improves efficacy of c-myc antisense oligodeoxynucleotide on human melanoma(M14) cells.* *Anticancer Res* 17: 29-36, 1997
  - 17) Bergan R, Connell Y, Fahmy B, Neckers L: *Electroporation enhances c-myc antisense oligodeoxynucleotide efficacy.* *Nucleic Acids Res* 21: 3567-3573, 1993
  - 18) Capaccioli S, Pasquale GD, Mini E, Mazzei T, Quattrone A: *Cationic liposomes improve antisense oligonucleotide uptake and prevent degradation in cultured cells and in human serum.* *Biochem Biophys Res Commun* 197:818-825, 1993
  - 19) Williams SA, Chang L, Buzby JS, Suen Y, Cairo MS: *Cationic liposomes reduce time and dose of c-myc antisense oligodeoxynucleotides required to specifically inhibit Burkitt's lymphoma cell growth.* *Leukemia* 10:1980-1989, 1996
  - 20) Flanagan WM, Wagner RW: *Potent and selective gene inhibition using antisense oligodeoxynucleotides.* *Mol Cell Biochem* 172:213-225, 1997
  - 21) Lima WF, Monia BP, Ecker DJ: *Implication of RNA structure on antisense oligonucleotide hybridization kinetics.* *Biochem* 31:12055-12061, 1992
  - 22) Matsuda M, Park JG, Wang D, Hunter S,

- Chien P, Schreiber AD : *Abrogation of the Fc  $\gamma$  receptor II A-mediated phagocytic signal by stem-loop syk antisense oligonucleotides.* Mol Biol Cell 7:1095-1106, 1996
- 23) Majello B, Kenyon LC, Dalla-Favera R : *Human c-myb protooncogene: nucleotide sequence of cDNA and organization of the genomic locus.* Proc Natl Acad Sci USA, 83:9636-9640, 1986
- 24) Ratajczak MZ, Hijiya N, Catani L, DeRiel K, Luger SM, McGlave P, Gewirtz AM : *Acute- and Chronic-phase chronic myelogenous leukemia colony-forming units are highly sensitive to the growth inhibitory effects of c-myb antisense oligodeoxynucleotides.* Blood 79:1956-1961, 1992
- 25) Luscher B, Christenson E, Litchfield DW, Krebs EG, Eisenman RN : *Myb DNA binding inhibited by phosphorylation at a site deleted during oncogenic activation.* Nature 344:517-525, 1990
- 26) Gewirtz AM, Anfossi G, Venturelli D, Valpreda S, Sims R, Calabretta B : *G<sub>1</sub>/S transition in normal human T-lymphocytes requires the nuclear protein encoded by c-myb.* Science 245: 180-182, 1989
- 27) Duprey SP, Boettiger D : *Developmental regulation of c-myb in normal myeloid progenitor cells.* Proc Natl Acad Sci USA. 82:6937-6942, 1985
- 28) Ho PTC, Parkinson DR : *Antisense oligonucleotides as therapeutics for malignant diseases.* Semin Oncol 24:187-202, 1977
- 29) Augustine K : *Antisense approaches for investigating mechanisms of abnormal development.* Mutation Res 396:175-193, 1997
- 30) Cumminis L, Gratt D, Beaton G, Marshall WS, Caruthers MH : *Biochemical and physicochemical properties of phosphorodithioate DNA.* Biochem 35:8734-8741, 1996
- 31) Akhtar S, Kole R, Juliano L : *Stability of antisense DNA oligodeoxynucleotide analogs in cellular extracts and sera.* Life Sci 49:1793-1801, 1991
- 32) Furdon PJ, Dominski Z, Kole R : *RNase H cleavage of RNA hybridized to oligonucleotides containing methylphosphonate, phosphorothioate and phosphodiester bonds.* Nucleic Acids Res 17:9193-9204, 1989
- 33) Burgess TL, Fisher EF, Ross SL, Bready JV : *The antiproliferative activity of c-myb and c-myc antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by a nonantisense mechanism.* Proc Natl Acad Sci USA 92:4051-4055, 1995
- 34) Kamano H, Ohnishi H, Tanaka T, Ikeda K, Okabe A, Irino S : *Effects of the antisense v-myb' expression on K562 human leukemia cell proliferation and differentiation.* Leuk Res 14: 831-839, 1990