

# Antisense DNA를 사용한 Cdk2조절에 의한 암세포의 성장 억제

계명대학교 의과대학 의학유전공학교실

엄 석 용 · 박 종 구

## Cancer Cell Growth Inhibition by Novel Cdk2 Antisense

Seok Yong Uhm, Jong Gu Park, Ph.D.

*Department of Medical Genetic Engineering, Keimyung University School of Medicine,  
Taegu, Korea*

**Abstract :** Cancer is characterized by deregulated cell cycle. Recent studies on cell cycle have demonstrated that some proteins, which regulate cell proliferation, may also be involved in oncogenesis. Critical transitions in a cell cycle are regulated by sequential activation of a series of cyclins and cyclin-dependent kinases (Cdks). Cdks are catalytic subunits of a family of serine/threonine protein kinase complexes, and are involved in the progression of cell cycle at various stages through G1, S, G2 and M phases. Cdk2 is essential for transition from G1 to S phase of mammalian cell cycle and overexpressed in cancer cells. In this study, we examined the effects of antisense to Cdk2 with a novel structure. Circular antisense, targeting a large area containing the translation start site of the Cdk2 cDNA, was constructed. When HeLa cells were treated with Cdk2 antisense, dose-dependent decrease of Cdk2 mRNA was observed. Cancer cell growth was found to be inhibited by more than 50% determined by cell counting assays. However, cell growth was not significantly inhibited, when treated with sense and control single strand DNA. These results suggest that Cdk2 plays an important role in the cancer cell proliferation and circular antisense DNA can be employed in the development of molecular antisense drugs for cancer.

**Key Words :** Antisense, Cdk2, Cancer, Transfection

## 서 론

암 세포는 정상 세포와는 다르게 지속적 세포증식 능력을 소유하고 있으며 세포주기 진행과정 중 G1/S기(DNA 합성 준비기/DNA 합성기)에서 작용하는 다수의 암 유전자의 활성화 및 암 억제 유전자의 불 활성화에 의하여 암 세포로 변환된다[1,2]. G1/S기의 세포주기를 조절하는 pRB 단백질은 전사인자 E2F와 결합하여 E2F의 전사활성을 저해하며 세포증식을 억제하는 대표적인 암 억제유전자로 알려져 있다[3,4]. 그러나 세포주기에 관련된 다수의 단백질들을 인산화시키는 효소인 Cdk/cyclin 복합체에 의해 pRB 단백질이 인산화 되면 pRB 단백질은 암 억제인자로서의 활성이 저해되어 pRB/E2F 복합체는 분리된다[3-5]. 그 결과 pRB로부터 분리된 전사인자 E2F가 활성화되어 G1기 진행에 필수적인 유전자군의 전사가 활성화되고 세포주기는 S기로 진행된다[1,3,4]. 이 경로에 의해 G1기를 조절하는 cyclin (cyclin D 혹은 E) 및 Cdk (Cdk4 혹은 Cdk6)는 각각 암 유전자로서 기능을 가지고 있지만 한편 이러한 경로에는 cyclin dependent kinase inhibitor (CKI)라고 불리는 Cdk 저해 단백질도 존재하고 있다[1,6,7]. 암 억제 기능을 가진 CKI 가족 등은 세포주기 진행과정 중 G0 및 G1 초기에 의존적으로 발현하여 유방암을 비롯한 암 세포에 과 발현하는 암 유전자의 산물인 Cdk/cyclin 복합체의 효과적인 저해가 불가능하다. 따라서 pRB/E2F 복합체의 활성화 경로를 저해하는 암 치료제를 개발하기 위하여 pRB의 인산화를 방해하는 기능을 가진 Cdk의 저해제가 암 치료제로 주목되고 있다[5,8]. Cdk2는 G1기 및 S기의 세포주기에 관여하는 serine/threonine protein kinase로서 cyclin A, cyclin E와 결합해서 pRB 단백질을 인산화시키는 인자로서 세포주기 진행에 중요하다[9,10]. G1기로부터 S기의 변환 시에는 cyclin E와 복합체를 형성해서 DNA 복제의 시작을 지시하며, S기에는 cyclin A와 복합체를 형성해서 DNA합성과 분열에 관여한다[11-14].

특정 유전자의 mRNA에 결합하여 단백질 합성을 정지하는 역할을 담당하는 antisense는 mRNA를 특이적으로 절단하는 ribozyme과 더불어 특정 유전자의

발현을 억제하는 기능을 소유하고 있다[2,15,16]. 최근에는 다수의 연구 그룹들이 질병을 야기하는 target 유전자에 특이적으로 결합하는 antisense를 이용하여 특정 유전자에 대한 메카니즘 규명과 함께 암을 비롯한 질병 치료를 위한 유전자 치료 방법으로 antisense 연구를 진행하고 있다[15-17].

본 실험에서는 뉴클리아제 활성화에 의한 antisense의 불안정성을 해결하고, 높은 antisense 활성을 나타내는 새로운 antisense를 사용하여 세포주기 진행을 조절하고자 하였다[15,16]. Cdk2에 대한 antisense를 구축하여 HeLa 세포에 lipofection한 후 Cdk2 mRNA를 측정하고, 또한 세포 성장 측정을 통해 HeLa 세포의 성장이 억제되는가를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험 재료 및 시약

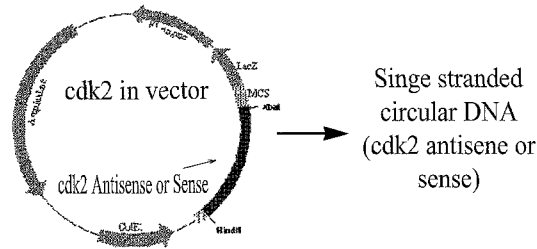
세포 배양에는 fetal bovine serum (FBS, GIBCO BRL, 미국), trypsin-EDTA (GIBCO BRL, 미국), penicillin/streptomycin (JBI, 한국), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM, GIBCO BRL, 미국)배지를 사용하였다. Transfection을 위해 OPTI-MEM (GIBCO BRL, 미국)과, LipofectAMINE PLUS™ reagent (GIBCO BRL, 미국)를 사용하였다. RNA 분리는 TriPure™ Isolation Reagent (Boehringer Mannheim, 독일)를 사용하여 수행하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응 (reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)은 Access™ (Promega, 미국)를 사용하여 이루어졌다. 기타 시약은 특급 내지 일급시약을 구입하여 사용하였다.

### 2. Cdk2에 대한 폐쇄형 단일가닥 DNA의 제작

HeLa 세포에서 분리된 RNA를 사용하여 Cdk2 primers를 이용하여 역전사 중합효소 연쇄반응으로 증폭하였다. Upstream primer에 사용된 염기 서열은 5 prime end-TATTCTAGAATGGAGAACTTC-

CAAAGGT-3 prime end이고, downstream primer에 사용한 염기 서열은 5 prime end-ATAGGATC-CTCAGAGTCGAAGATGGGGTA-3 prime end이다. cDNA 합성은 48 °C에서 45분간 수행하였고, 중

합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)은 94 °C에서 30초, 56 °C에서 1분, 68 °C에서 2분간 반응시켰으며 35회 반복하였다. RT-PCR 산물은 1.0% agarose gel에 전기 영동하여 Cdk2의 발현 여



**Fig. 1.** Construction of a plasmid vector containing Cdk2 cDNA. The Cdk2 gene was cloned into an antisense vector and Cdk2 single stranded circular antisense DNA was constructed through several steps.

부를 확인하였고, RT-PCR 산물을 *XbaI*과 *BamHI*으로 처리 한 후 각각의 벡터에 클로닝 되었다. Cdk2 유전자가 정확히 클로닝 되었는지를 확인하기 위해 Sanger의 dideoxy method를 이용하여 염기서열을 확인하였고, 일련의 과정을 거쳐 새로운 폐쇄형 단일 가닥 DNA가 완성되었다(Fig. 1).

### 3. 폐쇄형 단일가닥 DNA의 Transfection

HeLa 세포를 이용하여 transfection 24시간 전에 48-well plate (Falcon, 미국)에 well 당 약  $5 \times 10^4$  개 정도로 분주하고, 세포는 실험 전에 OPTI-MEM으로 두 번 세척하였고, 100  $\mu$ L OPTI-MEM을 각 well에 새롭게 넣어 주었다. 각각의 폐쇄형 단일가닥 DNA는 농도별로 0.1  $\mu$ g, 0.3  $\mu$ g을 사용하였고, LipofectAMINE PLUS™와 폐쇄형 단일가닥 DNA와의 복합체의 비율은 1 : 4로 제조하였다. 이들 폐쇄형 단일가닥 DNA와 LipofectAMINE PLUS™ 복합체는 50  $\mu$ L의 OPTI-MEM에 희석 시켰고, 15분 동안 실온에서 반응시킨 후 각 well의 세포에 첨가했다. 폐쇄형 단일가닥 DNA에 의해 처리된 세포는 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6시간 동안 배양 후 10% FBS,

penicillin (100 U/mL)과 streptomycin (100  $\mu$ g/mL)이 포함된 DMEM 배지를 넣어 주었다. 그리고 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 48시간 동안 배양하였다.

### 4. 전체 RNA의 분리

TriPure™ isolation reagent를 이용해서 전체 RNA를 분리했는데, 배양된 세포에 TriPure reagent를 1 mL씩 넣어 세포를 수확한 후 200  $\mu$ L chloroform을 각각 넣어서 강하게 혼합한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하였다. 상층 액을 취하고, 같은 양의 isopropanol을 넣은 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 전체 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA를 70% 에탄올로 세척한 후 50  $\mu$ L의 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 증류수에 녹였다. 그리고 DNase I (RNase free) 1  $\mu$ L를 넣어 준 후 37 °C에서 15분간 처리하였다. 그리고 반응물과 동일한 양의 phenol을 넣어 상층액을 취하고, 거기에 같은 양의 chloroform을 넣어 다시 상층 액을 분리하였다. 1/10 용량의 3 M sodium acetate와 2배의 에탄올을 분리된 용액에 넣어주어 12,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 침전시켰다. 침전된 RNA를

70%에탄올에 세척한 후 RT-PCR에 사용하였다.

### 5. 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase polymerase chain reaction, RT-PCR)

역전사 중합효소 연쇄반응은 단일 반응 튜브에서 Access™ RT-PCR kit (Promega, 미국)를 사용하여 수행하였다. Cdk2에 대한 primers와  $\beta$ -actin에 대한 primers를 동시에 이용하여 RT-PCR을 수행하였다. Cdk2에 대한 upstream primer 염기서열은 5 prime end-CTGACCCGACTCGCTGGCGC-3 prime end이고, downstream primer 염기 서열은 5 prime end-GGAGAGGGTGAGATTAGGGC-3 prime end이다. 그리고  $\beta$ -actin에 대한 upstream primer 염기 서열은 5 prime end-GAGCAAGAGAG-GCATCCTCAC-3 prime end이고, downstream primer 염기 서열은 5 prime end-GATGGGCA-CAGTGTGGGTTGAC-3 prime end이다. RT-PCR 튜브에는 RNA, PCR primer, avian myeloblastosis 바이러스 역전사 효소(5 U/ $\mu$ L), Tfl DNA 중합효소 (5 U/ $\mu$ L), dNTP (10 mM, 1  $\mu$ L), MgSO<sub>4</sub> (25 mM, 2.5  $\mu$ L)를 첨가하였다. 그리고 0.1% DEPC를 처리한 증류수를 사용하였다. cDNA 합성은 48 °C에서 45분간 수행하였고, PCR 반응은 94 °C에서 30초, 56 °C에서 1분, 68 °C에서 2분간 반응시켰으며 25회 반복하였다. RT-PCR 산물은 1.0% agarose gel에서 전기 영동하여 Cdk2와  $\beta$ -actin의 유전자의 발현을 확

인하였다.

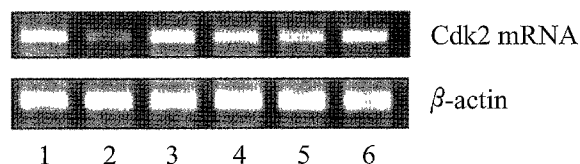
## 성 적

### 1. Cdk2 antisense에 의한 Cdk2 mRNA의 감소

Cdk2에 대한 새로운 구조의 antisense 분자를 제작한후 antisense 활성을 확인하기 위해 *in vitro* 세포주 실험을 실행하였다. HeLa 세포에 농도별로 Cdk2 antisense를 처리하였다. 대조군으로는 Cdk2 sense, 그리고 control 단일 가닥 DNA를 transfection 처리한 후 48시간만에 RNA를 분리하였다. DNase I (RNase free)을 처리한 후 RT-PCR을 통하여 Cdk2의 mRNA의 level을 측정하였다. Cdk2 antisense 0.3  $\mu$ g을 처리하였을 때 타겟 RNA에 특이적으로 antisense 분자가 작용하는 것을 관찰하였다. 반념에 대조군에서는 Cdk2 mRNA가 큰 영향을 받지 않는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 추가적으로  $\beta$ -actin mRNA의 감소는 실험군과 대조군에서 공통적으로 나타나지 않았다.

### 2. Cdk2 antisense에 의한 HeLa 세포의 성장 억제

다음으로 Cdk2 antisense 분자가 실제 세포 성장 주기 그리고 나아가 세포성장 억제에 영향을 주는지



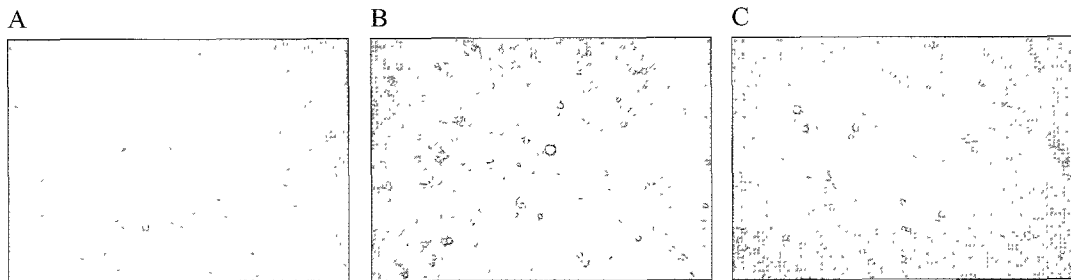
**Fig. 2.** Specific decrease of Cdk2 mRNA by Cdk2 antisense. Cells were treated with Cdk2 antisense, Cdk2 sense, and control single stranded DNA (ss) for 2 days before extraction of RNA. Extracted RNA was subjected to RT-PCR for 25 cycles. Amplified DNA fragments were run on 1 % (W/V) agarose gel. RT-PCR was performed with total RNA and two Cdk2 primers. Lane 1: Cdk2 antisense 0.1  $\mu$ g; lane 2: Cdk2 antisense 0.3  $\mu$ g; lane 3: Cdk2 sense 0.1  $\mu$ g; lane 4: Cdk2 sense 0.3  $\mu$ g; lane 5: control ss 0.1  $\mu$ g; lane 6: control ss: 0.3  $\mu$ g.

관찰하였다. HeLa 세포에 실험군으로 Cdk2 antisense 0.3  $\mu$ g, 대조군으로 Cdk2 sense 0.3  $\mu$ g, control 단일가닥 DNA 0.3  $\mu$ g을 처리하였다. Antisense 처리 48시간 후에 광학현미경으로 세포의 성장을 관찰하였을 때 대조군과 비교해서 상대적으로 세포의 성장이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 또한 HeLa 세포에 실험군으로 Cdk2 antisense 0.3  $\mu$ g을 처리하거나, 대조군으로 Cdk2 sense 0.3  $\mu$ g, control 단일가닥 DNA 0.3  $\mu$ g을 처리한 후 24시간마다 5일 동안 세포 수를 측정하였다. 이때 대조군과 비교해서 실험군의 세포의 수가 상대적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 그리고 세포의 증식을 관찰하기 위해 실험군으로 Cdk2 antisense 0.1  $\mu$ g을 세포에 처리하거나, 대조군으로 Cdk2 sense 0.1  $\mu$ g,

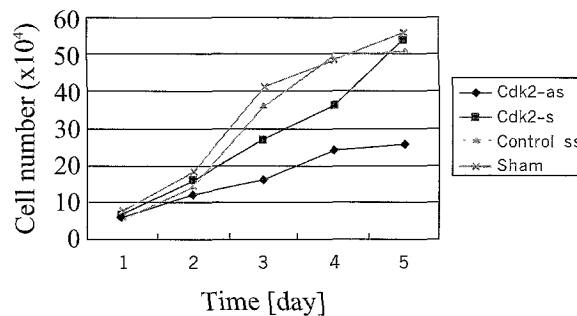
control 단일가닥 DNA 0.1  $\mu$ g한 경우에 transfection 4일 뒤에 MTT assay에서 antisense 처리군에서 세포의 증식 억제를 관찰하였다(자료 생략). Cdk2 antisense을 처리하였을 때 대조군과 비교하여 50% 이상 세포의 증식이 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 새로운 구조로 제작된 Cdk2 antisense가 세포주기의 진행 억제 및 나이가 세포성장의 억제에 효과적으로 이용될 수 있음을 나타낸다.

### 고찰

암은 궁극적으로 세 사람 중 한 명 정도에서 암으로 발생하고, 다섯 명중에서 한 명은 암으로 인하여 사망



**Fig. 3.** Growth inhibition of HeLa by Cdk2 antisense (X 100). HeLa cells were seeded on a 48-well plate at a concentration of  $5 \times 10^4$  cells/well. On the next day, cells were treated with 0.3  $\mu$ g each of Cdk2 antisense (A), Cdk2 sense (B), and control single stranded DNA (C). Cell growth was examined using a microscope after 48 hrs of the transfection.



**Fig. 4.** Growth inhibition of HeLa cells by Cdk2 antisense. HeLa cells were seeded on 24-well plate at a concentration of  $5 \times 10^4$  cells/well. On the next day, cells were transfected with 0.3  $\mu$ g each of Cdk2 antisense, Cdk2 sense and control single stranded DNA. The number of cells were calculated by hemocytometric scoring after 5 days of the transfection.

하는 것으로 추정된다. 암 세포는 정상적인 성장 조절 기작에서 이탈하여 형질이 바뀐 자기세포이며, 또한 세포 주기 질병이라고 정의할 수 있다. 즉 세포의 주기가 조절되지 않는 질병으로서 암 세포에서 변화된 세포 주기 조절 인자를 차단함으로써 암세포의 성장 억제와 apoptosis를 유발시켜 암을 치료 할 수 있다는 취지에서 본 실험이 시도되었다.

세포주기 조절에는 cyclins, Cdks, retinoblastoma tumor suppressor protein (pRB), E2F, p53, mouse double minute 2 (MDM2), dihydrofolate reductase (DHFR), thymidine kinase (TK), thymidylate synthase (TS) 등 많은 인자들이 관여한다[18,19]. 그 중에서 Cdk는 세포 주기의 G1, S, G2, M기에의 모든 과정에 관여하는 세포 주기의 필수적인 인자로서 그 중에서 Cdk2는 세포 주기의 G1기와 S에 관여하고 있고, 많은 암 세포에서 과잉 발현된다(15). 따라서 Cdk2의 과잉 발현을 억제한다면 세포 주기를 억제하여 세포의 성장을 억제할 수 있을 것으로 예상할 수 있으며, 실제 Cdk2 antagonists나 inhibitors를 이용 세포 주기를 억제해서 세포의 성장을 억제할 수 있다는 보고가 있다[20,21]. 따라서 본 실험에서는 기존의 뉴클레아제 활성화에 의한 antisense의 불안정성을 해결하고, 다중의 antisense를 도입할 수 있는 고 효율성의 새로운 형태의 폐쇄형 단일가닥 환형 antisense DNA를 이용하여 Cdk2의 과잉 발현을 억제하고자 하였다. Cdk와 밀접한 관련을 가진 세포 조절 인자 cyclin D1에 대한 antisense 선형 oligonucleotides를 이용하여 세포의 성장을 억제시킨 결과가 있지만, 세포 내에서는 선형 oligonucleotides의 뉴클레아제에 대한 안정성이 떨어지고, 세포 내로의 DNA의 전달 효율도 매우 낮은 단점을 가지고 있다. 본 실험에서는 폐쇄형 단일가닥 환형 antisense DNA를 사용하여 뉴클레아제에 대한 안정성을 높였다. 본 연구에서는 Cdk2 cDNA를 합성할 때 Cdk2 mRNA 번역 개시 부분의 약 1kb 정도의 염기 서열을 이용함으로써 antisense에 의한 Cdk2의 활성을 최대한으로 억제하고자 하였다.

본 실험에서의 어려웠던 점은 폐쇄형 단일가닥 DNA의 세포독성을 최소화하는 것이었다. HPLC를 통해 순수한 DNA만을 분리하려고 노력하였으나 완전

히 세포독성을 제거하는 것은 어려웠고, 또한 LipofectAMINE PLUS™ 에서도 약간의 세포독성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 대조군에서 아무것도 처리하지 않은 것과 비교했을 때 폐쇄형 단일가닥 DNA를 처리한 것에서는 약간의 독성이 나타나는 것을 볼 수 있다. 따라서 DNA의 세포 내 전달을 극대화하고, 세포에 대한 독성을 최소화한다면 보다 나은 결과를 얻을 수 있을 것으로 기대된다.

결론적으로 새로운 형태의 폐쇄형 단일가닥 환형 antisense DNA를 이용한 Cdk2 antisense에 의해 Cdk2 mRNA가 효과적으로 감소되었으며 그로 인하여 단백질의 감소와 세포주기의 진행을 차단함으로써 동시에 세포성장을 억제시켰다. Cdk2 뿐만 아니라 세포 주기에 관여하는 많은 인자들을 동시에 억제할 수 있는 다중의 antisense를 구축하여 세포 내에 도입한다면 더욱더 효과적으로 세포 성장을 억제할 수 있을 것으로 기대한다. 앞으로 생체 내 실험을 통해 폐쇄형 단일가닥 환형 antisense DNA의 효과를 검증하는 것은 흥미로운 결과를 가져올 것으로 기대된다.

## 요 약

암 세포의 두드러진 특징은 세포 증식 조절능력이 없다는 것이다. 세포 증식 주기의 조절에서 G1기와 S기에서 중요한 역할을 담당하는 Cdk2의 발현 억제를 통해서 세포 주기 진행의 차단과 그에 의한 세포 성장 억제를 관찰하고자 하였다.

HeLa 세포로부터 세포 조절 인자 Cdk2 유전자의 발현을 RT-PCR을 통해 관찰하였고, HeLa 세포 mRNA로부터 Cdk2 번역 개시부분의 Cdk2 cDNA를 합성하여 뉴클레아제에 안정하고 고 효율성의 폐쇄형 단일가닥 환형 antisense DNA (Cdk2 antisense, Cdk2 sense)를 제작하였으며, HeLa 세포에 농도 별로 실험군으로 Cdk2 antisense, 대조군으로 Cdk2 sense, control 단일가닥 DNA를 LipofectAMINE PLUS™ 와 복합체를 형성하여 transfection하였을 때 실험군에서 Cdk2 mRNA가 특이적으로 감소하는 것을 확인 할 수 있었다. 또한 Cdk2 mRNA 감소에 의한 세포주기의 진행차단은 세

포의 성장을 억제하였다. 따라서 암 치료제의 개발을 위해 antisense를 이용한 유전자 치료가 수행될 수 있음을 나타낸다.

## 참고 문헌

- Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* 1996; **274**: 1872-7.
- Cagnoli M, Aarieri F, Bruzzo C, B S, Alama A: Control of cyclin D1 expression by antisense oligonucleotides in three ovarian cancer cell lines. *Gynecol oncol* 1998; **70**: 372-7.
- Zhu L, Enders G, Lees JA, Beijersbergen RL, Harlow E: The pRB-related protein p107 contains two growth suppression domains : independent interactions with E2F and cyclin/Cdk complexes. *EMBO J* 1995; **14**: 1904-13.
- Dyson N: The regulation of E2f by pRB-family proteins. *Genes & Dev* 1998; **12**: 2245-62.
- Pchen YN, Sharma SK, Ramsey TM, Jiang L, Martin MS, Baker K, *et al.*: Selective killing of transformed cells by cyclin/cyclin-dependent kinase 2 antagonists. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 4325-9.
- Bresnahan WA, Boldogh I, Ma T, Albrecht T, Thompson EA: Cyclin E/Cdk2 activity is controlled by different mechanism in the G0 and G1 phase of the cell cycle, *Cell Growth Differ* 1996; **7**: 1283-90.
- Yu B, Lane ME, Pestell RG, Albanese C, Wadler S: Downregulation of cyclin D1 alters Cdk4- and Cdk2-specific phosphorylation of retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 2000; **3**: 352-9.
- Meikrantz W, Schlegel R: Suppression of apoptosis dominant negative mutants of cyclin-dependent protein kinases. *J Biol chem* 1996; **271**: 10205-9.
- Shiffman D, Brooks EE, Brooks AR, Chan CS, Milner PG: Characterization of the Human cyclin-dependent kinase 2 gene. *J Biol Chem* 1996; **271**: 12199-204.
- Rosenblatt J, Gu Y, Morgan DO: Human cyclin-dependent kinase 2 is activated during the S and G2 phases of the cell cycle and associates with cyclin A. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 2824-8.
- Furuno N, Elzen ND, Pines J: Human cyclin A is required for mitosis until mid prophase. *J Cell Biol* 1999; **147**: 295-306.
- Tikoo R, Zanazzi G, Shiffman D, Salzer J, Chao MV: Cell cycle control of schwann cell proliferation: role of cyclin-dependent kinase-2. *J Neurosci* 2000; **20**: 4627-34.
- Spruck CH, Won KA, Reed SL: Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature* 1999; **401**: 297-300.
- Hua XH, Yan H, Newport J: A role for Cdk2 kinase in negatively regulating DNA replication during S phase of the cell cycle. *J Cell Biol* 1997; **137**: 183-92.
- Moon IJ, Choi KS, Choi YK, Park JG: Potent growth inhibition of leukemic cells by novel ribbon-type antisense oligonucleotides to c-myb1. *J Biol Chem* 2000; **295**: 4647-53.
- Moon IJ, Lee YG, Kwak CS, Park JG: Target site search and effective inhibition of leukaemic cell growth by a covalently closed multiple antisense oligonucleotide to c-myb. *Biochem J* 2000; **346**: 295-303.
- Kampmeier J, Behrns A, Wang Y, Anderson WF, Hall HL, Gordon EM, *et al.*: Inhibition of rabbit keratocyte and human fetal lens epithelial cell proliferation by retrovirus-mediated transfer of antisense cyclin G1 and antisense MAT1 constructs. *Human Gene Therapy* 2000; **11**: 1-8.
- Cangi MG, Cukor B, Soung P, Sigoretti S, Moreira G Jr, *et al.*: Role of the cdc25A phosphatase in human breast cancer. *J Clin Invest* 2000; **106**: 753-61.
- Chen L, Agrawal S, Zhou W, Zhang R, Chen J: Synergistic activation of p53 by inhibition of MDM2 expression and DNA damage. *Proc Natl Acad Sci*

- USA 1998; **95**: 195-200.
20. Morishita R, Gibbons GH, Ellison KE, Nakajima M, Leyen HVD, Zhang L, *et al.*: Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense Cdk2 kinase oligonucleotides. *J Clin Invest* 1994; **93**: 1458-64.
21. Carlson BA, Dubay MM, Sausville EA, Brizuela L, Worland PJ: Flavopiridol induces G1 arrest with inhibition of cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) and Cdk4 in human breast carcinoma cells. *Cancer Res* 1996; **56**: 2973-8.