

## Downstream Reporter Gene Imaging for Signal Transduction Pathway of Dopamine Type 2 Receptor

Department of Nuclear Medicine, Chonnam National University Medical School

Uyenchi N. Le \*, Jung-Joon Min, Sungmin Moon, Hee-Seung Bom

**Purpose:** The Dopamine 2 receptor (D2R) signal pathway regulates gene expression by phosphorylation of proteins including cAMP response element-binding protein (CREB), a transcription factor. In this study, we developed a reporter strategy using the GAL4 fusion CREB to assess the phosphorylation of CREB, one of the targets of the D2R signal transduction pathway. **Methods:** We used three plasmids: GAL4 fusion transactivator (pCMV-CREB), firefly luciferase reporter with GAL4 binding sites (pG5-FLUC), and D2R plasmid (pCMV-D2R). Group 1 293T cells were transiently transfected with pCMV-CREB and pG5-FLUC, and group 2 cells were transfected with all three plasmids. Transfected cells were stimulated with different concentrations of dopamine (0-200 M). For animal studies, group 1 and 2 cells ( $1 \times 10^6$ ) were subcutaneously injected on the left and right thigh of six nude mice, respectively. Dopamine stimulation was performed with intraperitoneal injection of L-DOPA in combination with carbidopa, a peripheral DOPA decarboxylase inhibitor. Bioluminescence optical imaging studies were performed before and after L-DOPA injection. **Results:** In cell culture studies, group 1 cells showed strong luciferase activity which implies direct activation of the signaling pathway due to growth factors contained in culture medium. Group 2 cells showed strong luciferase activity and a further increase after administration of dopamine. In animal studies, group 1 and 2 cells showed bioluminescence signal before L-DOPA injection, but signal from group 2 cells significantly increased 12 h after L-DOPA injection. The signal from group 1 cells disappeared thereafter, but group 2 cells continued to show signal until 36 h of L-DOPA injection. **Conclusion:** This study demonstrates imaging of the D2R signal transduction pathway and should be useful for noninvasive imaging of downstream effects of G-coupled protein pathways.

## <sup>99m</sup>Tc 표지 antisense oligonucleotide를 이용한 Bcl-2 유전자 발현 영상

원자력의학원 싸이클로트론응용연구실<sup>1</sup>, 핵의학과<sup>2</sup>

이태섭<sup>1</sup> \*, 정재호<sup>1</sup>, 정혜경<sup>1</sup>, 우광선<sup>1</sup>, 정위섭<sup>1</sup>, 이명진<sup>1</sup>, 최태현<sup>1</sup>, 김소연<sup>1</sup>, 김성은<sup>2</sup>, 천기정<sup>2</sup>, 최창운<sup>2</sup>, 임상무<sup>2</sup>

**목적:** 종양에서 Bcl-2 유전자의 과다한 발현은 다양한 치료제에 대한 세포고사를 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 Bcl-2 유전자 발현을 영상화하기 위하여 <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 Antisense oligonucleotide (AS-ODN)을 이용하여 Bcl-2 유전자의 발현을 영상하고자 하였다. **방법:** <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 AS-ODN의 유전자 서열 특이적인 결합을 size exclusion HPLC를 이용하여 확인하였다. Bcl-2 유전자가 발현하는 HL-60세포주와 유전자가 발현하지 않는 Daudi 세포주를 사용하여 RT-PCR을 수행하여 유전자의 발현유무를 확인하고, 각각의 세포에서 <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 AS-ODN의 4시간까지 섭취율을 평가하였다. 정상백서에서의 생체분포는 <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 AS-ODN (100µCi/1µg, n=4)을 정맥 주사후 30 분, 1 시간, 4 시간에 생체분포를 평가하였다. HL-60 또는 Daudi 종양 형성 누드마우스 모델에서 <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 AS-ODN의 생체분포와 생체영상을 평가하였다. **결과:** <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 AS-ODN는 Sense Bcl-2 유전자 서열과 특이적으로 결합하는 것을 확인하였다. RT-PCR 분석결과 HL-60은 Bcl-2 유전자를 발현하며 Daudi는 발현하지 않는 것을 확인하였다. <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 AS-ODN의 섭취율은 HL-60 세포가 Daudi 세포보다 높았다 (p<0.01). HL-60세포에서는 AS-ODN이 sense ODN보다 특이적인 섭취를 보였다 (p<0.01). <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 AS-ODN는 간과 비장에서 높은 섭취율을 나타내었으며, 주로 신장을 통하여 배출되는 것으로 확인되었다. 4 시간의 생체분포에서 HL-60 종양에서 Daudi 종양에서 보다 2 배 높은 섭취율을 나타내었으며, 감마카메라 영상에서도 HL-60 종양에서 국소적인 집적을 확인하였다. **결론:** <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Bcl-2 antisense oligonucleotide은 Bcl-2 유전자가 발현하는 HL-60 종양에 특이적으로 섭취되는 것으로 확인되어, Bcl-2 유전자를 영상화 하는데 유용하게 사용될 수 있을 것으로 기대된다.