



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

약학석사 학위논문

Indolizino [3,2-c]quinoline 골격
화합물을 이용한 생체 기반 바이오 센서
개발에 대한 연구 및 광역학 치료제에
대한 초기 연구

2017 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 약품제조화학 전공

권순범

국문 초록

살아있는 세포 내의 생명활동을 관찰하기 위해서 형광 센서를 통한 세포 이미징 방법은 강력한 도구로써 각광받아 왔다. 이는 비침습적인 방식으로써 세포에 영향이 적다는 장점을 가지고 있기 때문이다. 이러한 점을 바탕으로 본 연구에서는 형광 현미경을 이용해 새로운 폴리헤테로사이클 골격인 Indolizino[3,2-c] quino-line (IQ) 화합물들이 살아 있는 세포내에서 가지는 바이오 센서로써의 특징들을 규명하고자 하였다.

IQ 화합물은 washing과정 없이도 살아있는 세포 안에서 바이오 센서로 작용할 수 있으며 치환기 효과에 따라서 인지하는 DNA나 RNA와 같은 생체 타겟이 바뀔 뿐만 아니라 더 나아가 세포핵, 핵소체, 미토콘드리아 그리고 리소좀과 같은 세포 소기관에 대한 특이적인 형광단으로도 응용될 수 있음을 관찰하였다. 또한 이러한 화합물들은 좋은 세포막 투과성, 높은 광안전성 그리고 적은 세포 독성을 보였다. 특히 큰 stoke shift로 인해 살아있는 세포 안에서 다른 DNA probe와 상보적인 염색이 가능한 화합물 IQ36을 도출하였다. 이와 같은 IQ 화합물들은 살아있는 세포에서 다양한 세포활동들을 밝혀낼 중요한 도구로써 응용될 수 있을 것이라 기대된다.

또한 본 연구에서는 Indolizino[3,2-c]quinoline 화합물이 가지는 광역학적 활성에 대해 연구 하였다. IQ 화합물들 중 빛에 반응하여 활성 산소종의 형성을 통해 항암 활성을 가지는 화합물들을 도출하였고 특히 IQ18 화합물의 경우, 미토콘드리아에서 나타나는 형광을 통해 분자내 표적 위치를 확인하였다. 이

후에는 미토콘드리아의 apoptosis에 관한 추가적인 기전연구를 통하여 새로운 광감각제 개발에 기여할 것으로 기대된다.

주요어 : 형광, 고리화 화합물, Environment-sensitive probe, 광역학 치료

학 번 : 2015-21861

목 차

| | |
|--|----|
| 국문초록..... | 1 |
| 목차..... | 3 |
| 그림목차..... | 5 |
| 표목차..... | 6 |
| 제 1장 서론..... | 7 |
| 제 2장 실험 결과..... | 12 |
| 제 1 절 IQ 유도체들의 substitution effect에 의한 세포내 분포..... | 12 |
| 제 2 절 DNA 또는 RNA 존재하에서 IQ의 광학적 특성..... | 16 |
| 제 3 절 RNA분해에 따른 형광 변화..... | 20 |
| 제 4 절 Counter staining..... | 22 |
| 제 5 절 세포 내에서 나타내는 IQ의 광학적 특성..... | 25 |
| 제 6 절 세포 소기관에 선택적인 IQ의 이미징..... | 29 |
| 제 7 절 IQ의 광학적 특성 및 Singlet oxygen Quantum Yield..... | 32 |
| 제 8 절 시간 흐름에 따른 이미징..... | 34 |
| 제 9 절 광독성 평가..... | 38 |
| 제 10 절 DNA photocleavage..... | 40 |
| 제 11 절 세포 내의 활성산소종 생성 확인..... | 44 |
| 제 12 절 빛 조사에 따른 미토콘드리아의 변화..... | 46 |
| 제 13 절 세포 사멸에 따른 형태학적 변화..... | 50 |
| 제 3 장 실험 방법..... | 54 |
| 1. 형광 이미징..... | 54 |

| | |
|---|----|
| 2. Cell-based high throughput screening | 54 |
| 3. 흡광 및 형광 측정 | 55 |
| 4. RNase에 의한 RNA분해 | 56 |
| 5. Counter-staining | 56 |
| 6. 광안전성 평가 | 58 |
| 7. 세포 독성 평가 | 58 |
| 8. 빛 조사시간에 따른 형광 이미징 | 59 |
| 9. 광독성 평가 | 59 |
| 10. DNA photocleavage | 60 |
| 11. DHE를 통한 세포 내 활성산소종 측정 | 60 |
| 12. 빛 조사시간에 따른 미토콘드리아 이미징 | 61 |
| 13. TMRE staining | 61 |
| 14. PI(Propidium iodide) staining | 62 |
| 15. Hoechst를 이용한 DNA fragmentation 확인 | 62 |
| 제 4 장 결론 및 고찰 | 64 |
| 참고문헌 | 66 |
| Abstract | 74 |

그림 목차

| | |
|---|----|
| [그림 1] IQ 구조 및 광역학 치료의 기전..... | 11 |
| [그림 2] IQ 화합물들에 대한 image-based screening..... | 13 |
| [그림 3] Substituent effect에 따른 IQ 화합물들의 형광 이미징..... | 14 |
| [그림 4] 다양한 live cell에서 IQ 화합물들의 형광 이미징..... | 15 |
| [그림 5] DNA 및 RNA 존재시 IQ의 흡광 및 형광 스펙트럼..... | 17 |
| [그림 6] DNA 및 RNA 존재시 IQ의 형광 변화..... | 18 |
| [그림 7] IQ 존재시 DNA 및 RNA titration..... | 19 |
| [그림 8] RNA digestion 이미징..... | 21 |
| [그림 9] IQ 와 DAPI의 counter-staining 이미징..... | 23 |
| [그림 10] IQ와 Hoescht33259의 counter-staining 이미징..... | 23 |
| [그림 11] IQ의 광안정성 비교 결과..... | 26 |
| [그림 12] IQ의 세포투과성 평가 결과..... | 27 |
| [그림 13] IQ의 세포독성 평가 결과..... | 28 |
| [그림 14] IQ-MP1 및 IQ-MP2의 광학적 특성..... | 30 |
| [그림 15] 세포 소기관 특이적인 IQ화합물에 대한 이미징..... | 31 |
| [그림 16] Furan 및 thiophene 을 지니는 IQ 구조 | 33 |
| [그림 17] IQ18 처리시 빛 조사에 따른 세포 변화 양상..... | 36 |
| [그림 18] IQ42 및 IQ52 처리시 빛 조사에 따른 세포 변화 양상 | 37 |
| [그림 19] 단파장 빛에 대한 IQ52 의 형광 변화 양상..... | 37 |

| | |
|--|----|
| [그림 20] IQ 의 광독성 평가 결과..... | 39 |
| [그림 21] IQ 의 photocleavage 결과..... | 42 |
| [그림 22] IQ 의 세포내 활성산소종 생성량 평가..... | 43 |
| [그림 23] IQ 처리시 빛 조사에 따른 미토콘드리아의 형태 변화 양상..... | 48 |
| [그림 24] IQ 처리시 빛 조사에 따른 미토콘드리아의 막전위 변화 양상..... | 49 |
| [그림 25] PI stainig 결과..... | 52 |
| [그림 26] Hoechst33258 staining 결과..... | 53 |

표 목차

| | |
|---|----|
| [표 1] . Furan 또는 thiophene 을 가지는 IQ 화합물들의 광학적 특성..... | 33 |
| [표 2] 다양한 세포들에서 빛 조사시 나타나는 IQ 화합물의 IC ₅₀ | 39 |
| [표 3] 빛 시간 조사에 따른 Mitotracker 와 IQ 화합물의 Coefficient 변화..... | 49 |

제 1 장 서론

세포등을 통해 생명현상을 이해하기 위해서는 세포 안에 존재하는 소기관 및 생체물질을 가시화하는 것이 필수적이다. 현재까지 생명현상을 가시화하기 위한 방법으로는 형광 유기체를 이용한 방식이 가장 강력한 방법으로 주목받고 있으며 생화학분야의 연구 뿐 아니라 질병 진단이나 신약 개발과 같은 다양한 분야에서 응용되고 있다.¹⁻⁴ 또한 항체를 이용한 방식이나 fixation과정이 필요한 방식들은 그 순간의 단편적인 정보만을 제공하기 때문에 시간에 흐름에 따라 생명현상을 관찰하는데에는 한계가 있으며 fixation뿐 아니라 washing과정 같은 과정이 관찰전에 추가되므로 이러한 과정들이 실제 현상을 방해하는 변수가 될 수 있다. 그렇기 때문에 Washing과 같은 추가적인 절차 없이도 형광을 통해 세포를 관찰하는 것은 살아있는 세포를 실시간으로 관찰하면서 세포내 생명활동들을 정확히 이해하는데 더 용이한 방식이라 할 수 있다.⁵⁻⁸

2014년 노벨 화학상에서 볼 수 있듯이 광학 기술은 20세기 이후 급격히 발전하고 있으며 이러한 이미징 기술들을 뒷받침할 수 있는 다양한 형광물질들의 필요성이 계속되어 대두되어왔다. 현재 이미징을 위해 많이 사용되는 형광 유기체의 대표적인 골격들은 coumarin, BODIPY(boron-dipyrromethene), fluorescein, rhodamine, cyanine을 꼽을 수 있다.² 이들 구조는 형광 유기체로써 많은 장점들을 지니기 때문에 많은 연구들은 위의 골격들을 변형하여 다양한 유도체들을 합성 및 개발하려는 시도를 하고 있다. 하지만 위의 골격들도 이미징 분야에서 이용되기 위해 가져야하는 조건들을 모두 충족하진 못한다. Courmain의 경우 큰 stoke shift를 가진다는 강점을 지니지만 emission 파장대역이 너무 넓어 Red계열의 형광유기체

들과 counter-staining을 통한 multicolor imaging가 어렵다는 단점을 지닌다. BODIPY 계열의 유도체들은 광안정성이 fluorescein과 같은 화합물과 비교했을 때 상대적으로 낮다. 또한 지용성이 크므로 DNA와 같이 수용성이 큰 생체물질을 인지하는 형광유기체를 만들기에 어려움이 있으며 특정 BODIPY 유도체는 수용액에서 낮은 용해도를 보이기도 한다. Rhodamine 및 cyanine의 경우에도 수용액에서 낮은 용해도를 나타낸다. Cyanine의 경우 stoke shift가 크지 않다는 추가적인 단점도 존재한다.

그러므로 적은 세포독성과 좋은 세포 투과성, 높은 광안정성 및 큰 stoke shift라는 성질들을 만족시키는 형광 유기체에 대한 개발은 필수적이며 이를 위해 기존의 골격에서 벗어나 위의 성질들을 만족하는 새로운 골격의 형광 유기체를 개발하려는 노력이 있어왔다.⁹ 이에 본 실험실에서는 항암 활성 뿐 아니라 형광 센서로도 응용되어 왔던 Indolizine 및 Quinoline구조를 이용하여 각각 합성법이 간편한 pictet-spengler reaction을 통해 Indolizino[3,2-c]quinoline (IQs)라는 새로운 골격을 가지는 헤테로 고리 화합물을 합성하였다¹⁰ (그림 1(A)). 더 나아가 IQ구조를 기반으로 하는 여러 유도체들을 합성하였다. 다음으로 다양한 용매에서 그 유도체들이 가지는 광학적 특성을 확인하여 environmental sensitive probe로 작용할 수 있음 또한 확인하였다.

Environmental sensitive한 성질을 지니는 형광유기체의 경우 특정 환경이나 타겟이 존재 시에 형광이 변화하는 성질을 지닌다.¹¹⁻¹⁵ 이러한 성질은 공시간적으로 특정 조건에서 형광이 발생하는 형광 스위치에 적용되기 용이하다. 그러므로 본 연구에서는 친유성 및 친수성의 성질을 가지는 여러 IQ 유도체들이 살아있는 세포내에서 어떠한 형광적 특징들을 지니는지 파악하였고 IQ 화합물이 가진

environmental sensitive 성질을 통해 세포내에서 특정 물질을 인지하는 형광 센서로써의 가능성을 파악하였다. 더 나아가 IQ 화합물 내의 구조 변형을 통해 특정 세포 소기관으로 위치시킴으로써 앞으로의 응용 가능성을 확인하였다.

또한 형광유기체는 이미징 분야 외에도 항암치료제, 특히 광역학 치료에도 이용될 수 있다. 광역학 치료 (Photodynamic therapy)란 평소에는 세포독성을 띄지 않는 물질이 특정 파장의 빛을 흡광 시에 활성산소종(ROS)를 발생시켜 항암 치료를 진행하는 분야를 의미한다.¹⁶ 광역학 치료는 크게 광감각제 (Photosensitizer)와 광원, 그리고 산소라는 3가지 요소로 구성된다.¹⁷ 그 기전을 살펴보면 광감각제는 평소에는 세포독성을 보이지 않지만 특정 파장의 빛을 흡광 시 바닥상태에서 여기 상태로 에너지 준위가 증가하고 이 후 해당 에너지가 산소분자로 전해져 활성산소종(ROS)를 발생시킨다. 이 후 반응성이 높은 활성세포종은 세포내에 피해를 입혀 세포사멸을 유발시킨다. 광감각제가 활성산소종을 생성시키는 기전은 type 1 및 type 2 반응으로 나눌 수 있으며 그에 따라 생성되는 다양한 활성산소종이 생성된다. Type 1 반응은 빛을 받아 triplet 상태가 되었을 때, 세포막이나 생체물질과 같은 기질과 반응하여 라디칼을 형성하고 추후 산소와 반응하는 과정을 겪는다 하지만 type 2 반응에서는 triplet 상태에서 바로 산소와 반응하여 singlet oxygen을 생성시킨 뒤 추후 singlet oxygen에 의한 산화반응이 일어나게 된다¹⁸ (그림 1(B)).

광역학 치료는 암치료 및 건선과 같이 다양한 질병에서 임상적으로 사용되고 있으며 특히 치료의 편의성과 타 항암제와의 병용 투여에 따른 효율성을 고려할 때 많은 주목을 받고 있는 치료법이다.¹⁹⁻²¹ 현재까지 광감각제로 알려진 가장 보편적인 구조는 tetrapyrrole구조를 지닌 phophyrin유래 화합물이다. 실제 임상적으로 사용되고 있는 phophyrin관련 치료제로는 hematoporphyrin 유도체인 photofrin과

photogem이 있으며 5-Amino-levulinic acid인 Levulan 및 그의 유도체인 Metvix등이 있다.¹⁸

그러나 phophyrin구조는 광안정성이 적고 조직 배출율이 적으므로 체내 축적되어 독성을 나타낼 수 있을 뿐만 아니라 용해도가 낮다는 단점을 지니고 있다. 예를 들어 Phtalocyanine 구조의 화합물은 수용액에서 용해도가 낮기 때문에 응집되어 치료제 효율이 낮아진다.²²⁻²⁴ 그러므로 용해도를 높이기 위한 기존 골격의 구조변형 뿐만 아니라 기존과 다른 새로운 골격을 가지는 광감각제에 대한 필요성이 대두되어왔다.

광역학 치료에서는 용해도 외에도 생체내의 작용하는 위치 또한 중요하다. 일반적으로 활성세포종들은 매우 반응성이 크기 때문에 빠르게 사라진다. 예를 들어 singlet oxygen의 경우, 10-320ns라는 짧은 반감기를 가지며 이 때문에 10-55nm 정도의 짧은 세포내 확산을 보인다. 이는 광감각제가 분포하는 주변에서만 활성산소종이 생성되어 영향을 미치므로 광감각제의 위치가 치료 효과에 주요 변수가 될 수 있음을 의미한다.²⁵⁻²⁷ 그러므로 광감각제가 세포사멸에 밀접한 소기관등에 분포하도록 조절하는 것이 중요하다. 동일한 치료제라도 세포 사멸과 관련된 세포 소기관에서 작용할 경우, 적은 용량에서도 원하는 항암효과를 얻을 수 있고 더 나아가 사용량과 부작용 그리고 약물 내성을 줄일 수 있기 때문이다.²⁸ 이를 위한 주요 소기관으로는 미토콘드리아가 주목을 받고있다. 미토콘드리아는 산화적 스트레스와 활성산소종 생성에 관여하며 그 기능을 잃을 경우 세포사멸을 유도하는 세포 소기관이기 때문이다.²⁹⁻³⁰ 하지만 임상적으로 사용되는 광감각제들은 세포내의 분포 양상을 파악하기 쉽지 않으며 항암 기전이 명확하지 않기 때문에 추가적인 치료제 개발에도 어려움이 있어왔다.

형광을 이용한 광학적 치료제의 개발은 위의 문제에 대한 해결책이 될 수 있다.

³¹ 형광 기술은 감도가 높으며 변형이 쉽고 실시간으로 살아있는 세포에서 관찰이 가능하다는 장점을 지니므로 형광기술을 적용한다면 광감각제의 세포내 분포 뿐만 아니라 그에 따른 치료 기전까지 확인 할 수 있기 때문이다.³²

본 연구에서는 기존 광감각제에서 벗어나 다양한 구조의 치료제를 제시할 뿐만 아니라 세포 사멸기전을 명확히 밝힐 수 있는 광감각제를 개발하고자 하였다. 이에 IQ 화합물이 미토콘드리아에 특정적으로 위치하여 형광유기체로 작용할 뿐 아니라 빛을 받을때 세포 사멸을 일으키는 광감각제으로써 응용될 수 있음을 확인하였다.

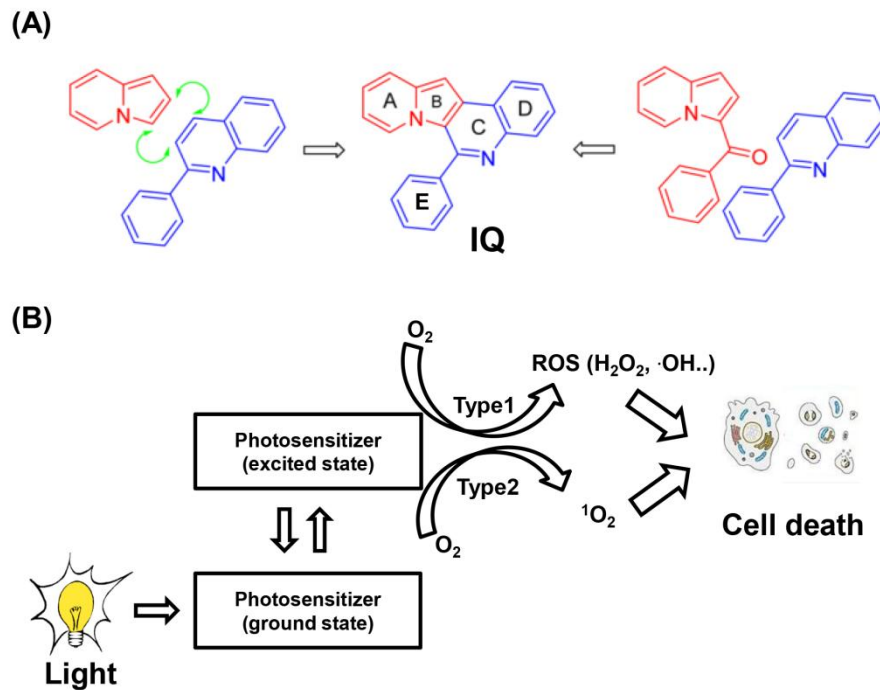


그림 1. (A) Indolizine 및 Quinoline구조를 이용한 IQ 구조. (B) 광감각제에 의한 활성산소종의 생성 기전

제 2 장 실험 결과

제 1 절 IQ 유도체들의 substitution effect에 의한 세포내 분포

50여개의 IQ 유도체들을 Operetta high content imaging system을 이용하여 Hela cell에서 screening을 수행했으며 세포내에서 나타나는 형광의 강도 및 그 위치에 따라 특이적인 유도체들을 선별했다 (그림 2).

먼저 IQ 7, 8, 16, 17의 경우, 주로 세포핵 부분에서 형광이 나타났으며 특히 IQ16은 다른 화합물들과 달리 세포핵을 균일하게 염색하였다. 하지만 IQ 6과 36의 경우에는 세포핵 보다는 핵내에 존재하는 핵소체 부분에서 형광이 더 강하게 나타났다 (그림 3). IQ6, IQ36에서 우세하게 형광이 나타났던 핵소체 부분은 세포 성장과 분열에 중요한 역할을 하는 세포 소기관이며 ribosomal RNA뿐만 아니라 다양한 중요 단백질들이 존재한다.³³⁻³⁴

이러한 현상은 Hela cell 뿐 아니라 MCF7, NIH-3T3 cell과 같은 여러 세포들에서도 동일하게 나타났다 (그림 4). 이미징 분석을 통해 IQ16의 경우 세포핵 내에서 10-30 μm 동안 균일한 형광강도를 나타냈으나 IQ 6과 36의 경우에는 핵소체 부위에서 10배 이상의 선택적인 형광을 보이는 등 IQ화합물이 가진 위치 선택성을 확인하였다. 위와 같은 세포내 형광이 나타나는 위치상의 차이는 IQ 구조를 구성하는 E ring에서의 미세한 치환기 변화에 따라 나타났다는 점이 특징적이었다. 특히 E ring에서 Methoxy기의 개수 뿐 아니라 Para, Meta등의 ring상에서 치환기의 위치에 따라서도 분포 변화가 나타났다. 또한 그 분포부위가 DNA나 RNA와 같은 다양한 물질들이 풍부하게 존재하는 기관이기 때문에 IQ 화합물들은 치환기 변화에 따라 세포 내의 특정 물질을 인지하여 세포내의 형광 위치가 변한다고 유추하였다.

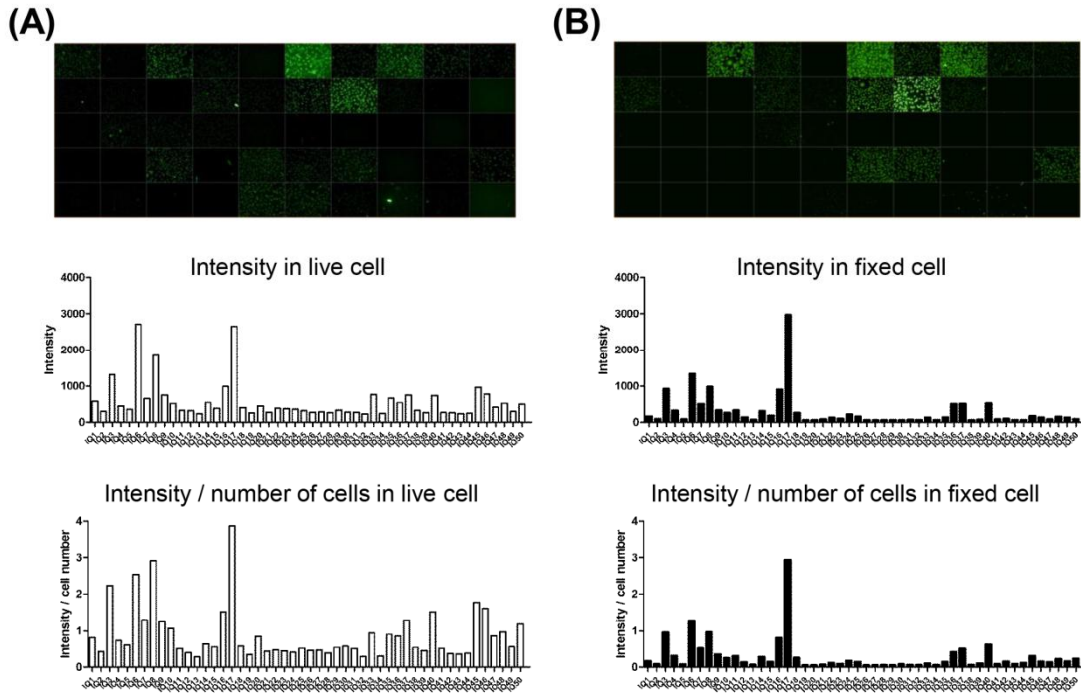


그림 2. IQ library에 대한 image-based screening. (A) live cell 및 (B) fixed cell에서 Operetta high-content imaging system을 통해 screening을 수행하였으며 excitation파장은 460-490nm에서 emission파장은 500-550 nm 에서 이미지를 촬영함.

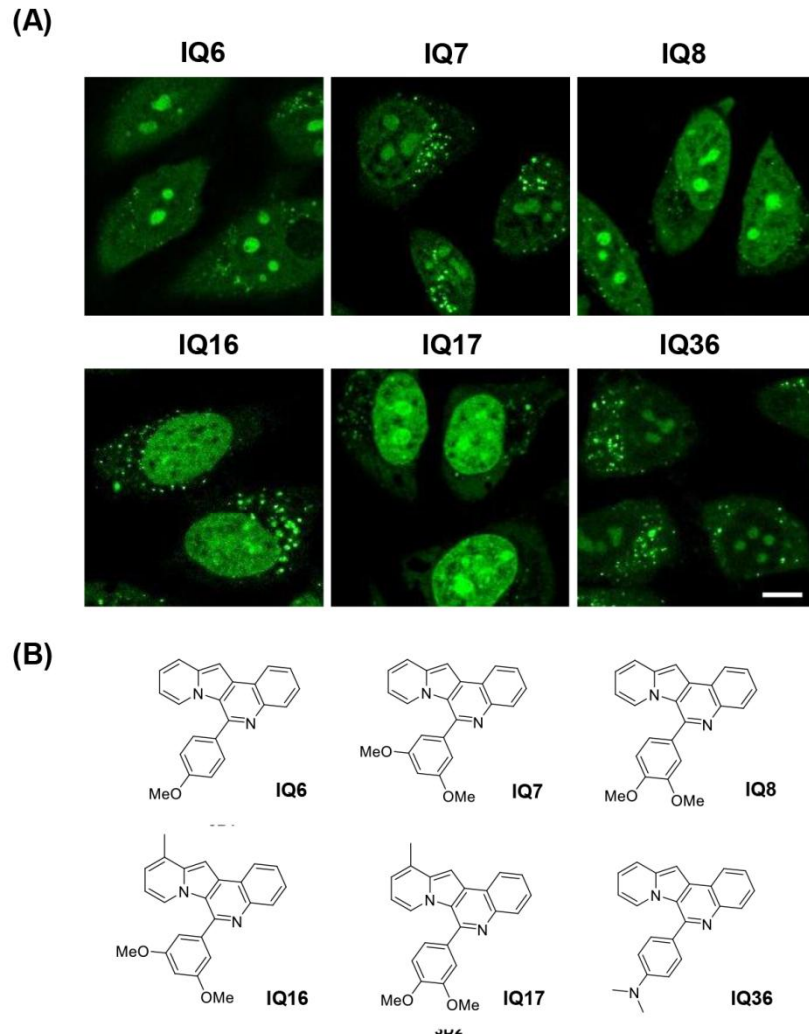


그림 3. IQ6, IQ7, IQ8, IQ16, IQ17 and IQ36 구조에 따른 live cell에서의 형광 이미징. (A) 10 μ M의 IQ화합물들을 1 hr동안 처리. Excitation파장은 488nm, emission 파장은 >493 nm으로 설정하였으며 scale bar는 10 μ m을 나타냄. (B) IQ6, IQ7, IQ8, IQ16, IQ17 및 IQ36의 화학 구조.

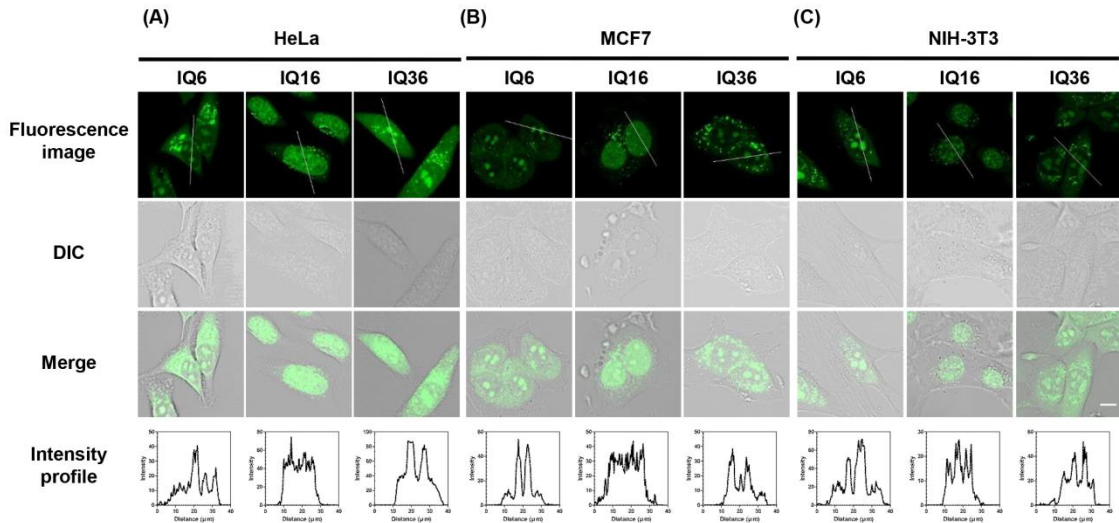
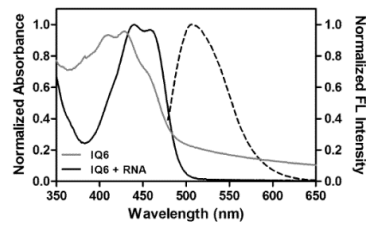
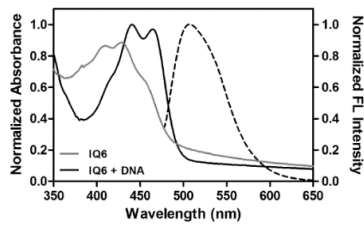


그림 4. 여러 종류의 live cell에서 IQ6, 16, 36이 나타내는 형광 및 DIC 이미지. HeLa 및 NIH-3T3에서는 10 μ M의 IQ 화합물을 30분동안 처리했으며 MCF7에서는 5 μ M의 IQ 화합물을 30분동안 처리. 각 이미지에 제시된 형광세기 분석은 cell을 투과하여 그어진 흰색 실선을 따라 분석함. Scale bar는 10 μ m를 나타냄.

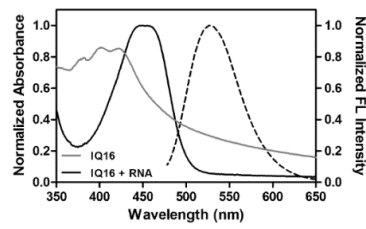
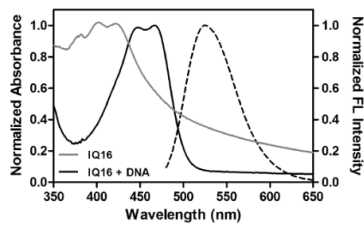
제 2 절 DNA 또는 RNA 존재하에서 IQ의 광학적 특성

IQ 화합물이 DNA가 풍부한 세포핵 및 RNA가 풍부한 핵소체에 위치함에 따라 IQ 화합물이 DNA와 RNA와 같은 핵산을 인지할 것이라 가정하였다. 그리고 이를 확인하기 위해 DNA 또는 RNA가 존재하는 경우, IQ 화합물이 나타내는 광학적 특성들을 살펴보았다. 먼저 IQ 6, 16, 17, 36는 핵산이 존재할 경우와 그렇지 않은 경우를 비교했을 때 흡광 스펙트럼에서 30 nm 정도의 bathochromic shift를 나타냈다 (그림 5). 형광 스펙트럼의 경우 역시 DNA 및 RNA의 농도를 증가시킬수록 IQ 화합물들이 나타내는 형광의 변화가 관찰되었다. 그 변화 정도는 DNA, RNA titration 실험을 통해 확인하였으며 IQ6과 IQ36의 경우, DNA보다 RNA에 더 큰 형광 증가를 보였다. 특히 IQ36의 경우 동일량의 핵산이 존재했을 때, DNA보다 RNA에서 17배 정도의 형광증가를 나타냈으며 이는 다른 화합물에 비교했을 때에 가장 큰 형광증가였다 (그림 6). 또한 IQ36은 RNA를 과량 처리 시 최대 61배라는 큰 형광증가를 보였을 뿐 아니라 ~110 nm의 큰 stoke shift를 보이기도 했다 (그림 7). 형광유기체의 Stoke shift은 그 수치가 클수록 다른 파장대의 간섭을 줄여 이미징상의 장점이 될 수 있다. IQ36의 경우 시판되는 RNA 프로브인 RNaselect보다 더 큰 Stoke shift를 나타냈기 때문에 multicolor imaging에서 더 좋은 형광유기체로써 장점을 가지고 있었다.³⁵ IQ16과 IQ17은 RNA보다 DNA에서 더 강한 형광을 보였으며 IQ16이 더 선택적인 형광증가를 보였다. 또한 형광을 나타내는 주파장대역이 450nm대역으로 DAPI나 Hoechst와 비교하였을 때 IQ16은 장파장쪽에서 형광이 나타나는 장점을 나타냈다. 이를 통해 IQ 화합물 중 IQ16의 경우 녹색계열의 형광을 나타내는 DNA 프로브로 응용될 수 있음을 확인하였다.³⁶⁻³⁷

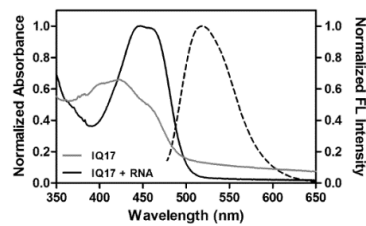
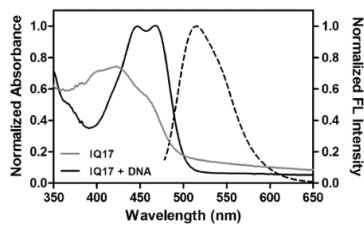
(A) IQ6



(B) IQ16



(C) IQ17



(D) IQ36

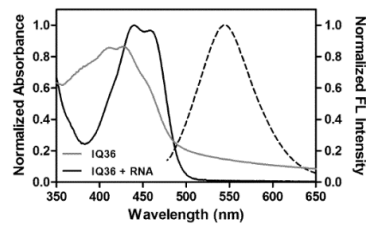
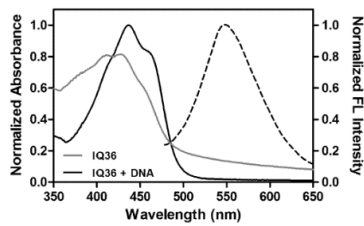


그림 5. DNA 및 RNA를 처리했을 때 IQ6, IQ16, IQ17 and IQ36에 대한 흡광(검정 실선) 및 형광(검정 점선)스펙트럼의 변화양상. Tris-HCl buffer(20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4)에 2 mg/mL의 torula RNA 및 2 mg/mL 의 CT DNA를 녹인 용액을 사용. 핵산이 처리되지 않은 IQ의 흡광 스펙트럼은 회색 실선으로 나타냄.

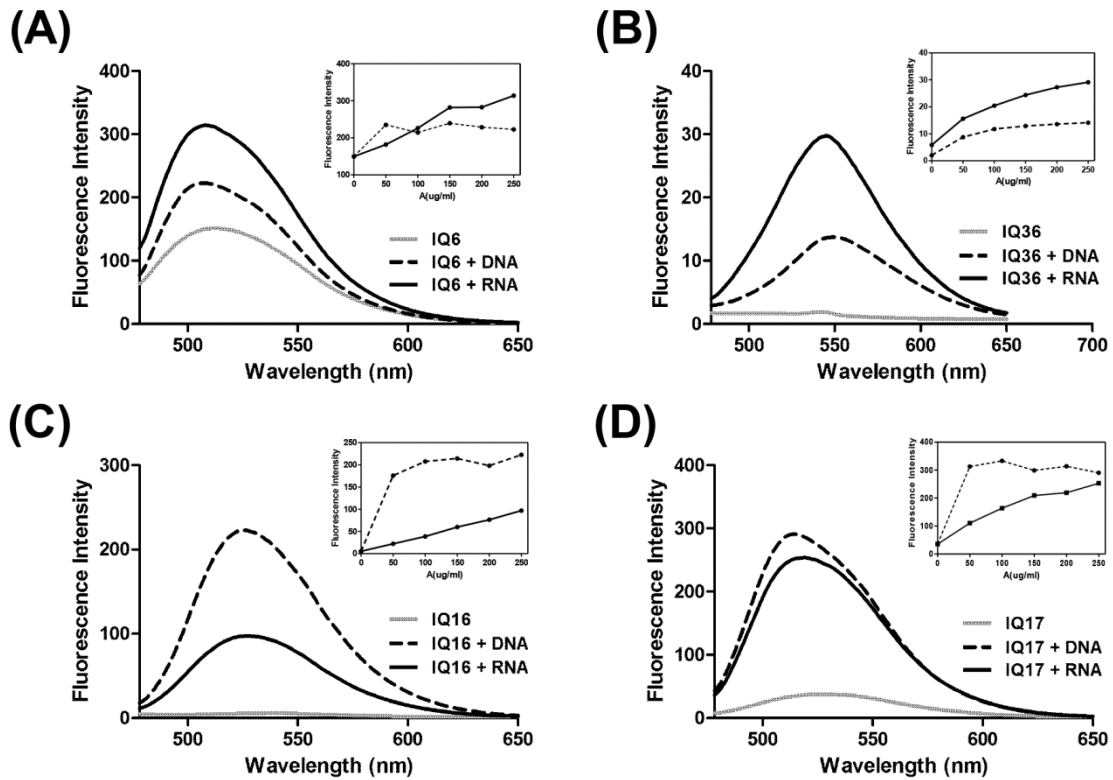


그림 6. RNA 및 DNA에 대한 (A) IQ6, (B) IQ36, (C) IQ16 및 (D) IQ17의 형광 변화양상. Tris-HCl buffer(20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4)에 각각에 2 μ M의 IQ 화합물들이 존재시 250 μ g/mL torula RNA 또는 Calf Thymus DNA을 처리하였을 때의 형광 스펙트럼의 변화. excitation파장은 458nm을 이용하였으며 핵산이 존재하지 않을 때에는 회색 실선으로, DNA가 존재할 때에는 검정 점선으로, RNA가 존재할 때에는 검정 점선으로 형광 스펙트럼을 나타냄. 안쪽 그래프는 Tris-HCl buffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4)에서 458nm로 excitation시 Calf thymus DNA(검정 점선) 및 torula RNA(검정 실선)의 양을 0-250 μ g/mL 까지 증가시킴에 따른 형광세기의 변화를 나타냄..

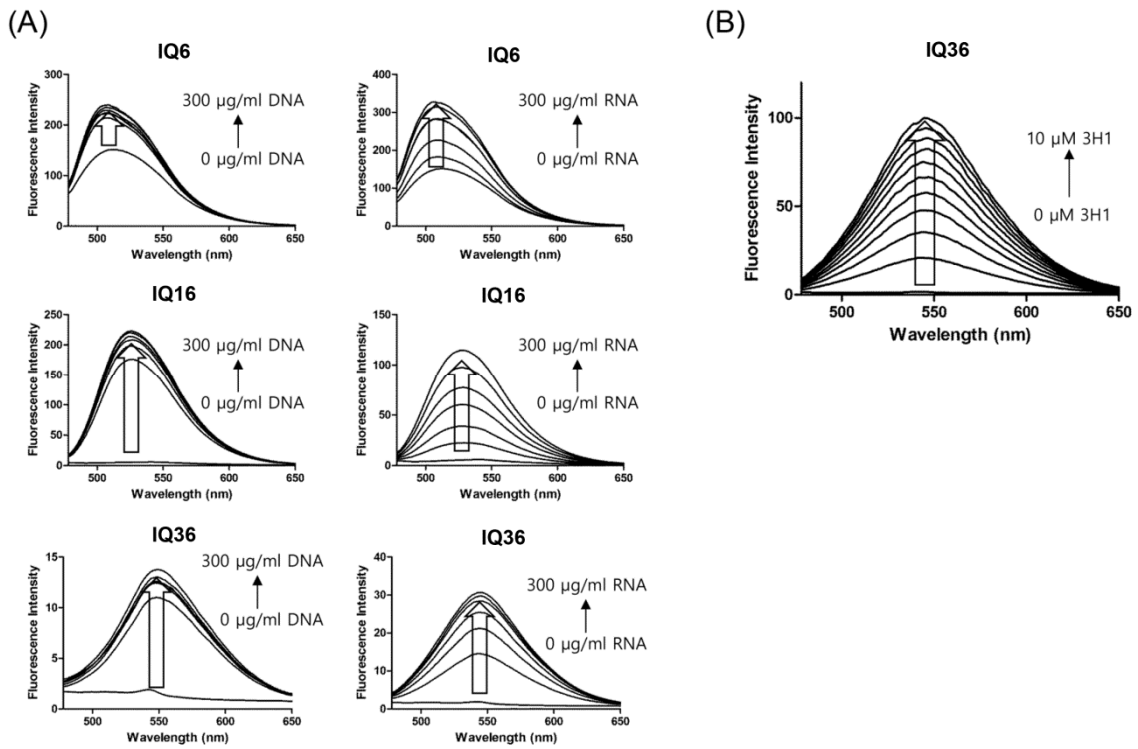


그림 7. (A) Tris-HCl buffer(20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4)에서 Calf thymus DNA 및 torula RNA의 양을 0-300 $\mu\text{g/ml}$ 까지 증가시킴에 따른 IQ6, IQ16, IQ36의 형광 스펙트럼. IQ 화합물의 농도는 모두 2 μM . (B) 100 $\mu\text{g/ml}$ torula yeast RNA가 존재하는 Tris-HCl buffer(20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4)에서 IQ36의 농도를 0-10 μM 까지 증가시킴에 따른 형광 스펙트럼.

제 3 절 RNA분해에 따른 형광 변화

RNase digestion 실험을 통하여 IQ6과 IQ36의 경우 세포 안에서 RNA를 인지하여 형광이 증가되는 성질을 확인하였다 (그림 8). IQ6과 IQ36을 Hela cell에 처리시, SYTO RNaselect의 경우와 유사하게 핵소체 안에서 강한 형광을 나타내었다. 이는 RNA 프로브들이 일반적으로 나타내는 세포 염색 양상이다.³⁸⁻³⁹ RNase를 처리했을 때에는 핵소체 안에 존재하는 RNA가 분해되기 때문에 SYTO RNaselect이 RNA를 인지하지 못하여 핵소체 부분의 형광이 감소하였다. 이러한 현상은 IQ6, IQ36에서 동일하게 나타났다. 반면 IQ16의 경우, RNase 처리 전과 후를 비교했을 때 핵소체 부분의 형광 변화가 나타나지 않았다. 이를 통해 IQ6과 IQ36의 경우 RNase에 의해 RNA가 분해되면 RNA를 인지하지 못하여 형광이 감소되지만 IQ16은 RNA와 무관하기 때문에 RNase 처리 전후에 형광의 차이가 나타나지 않음을 확인하였고 더 나아가 IQ6과 IQ36은 RNA를 인지할 때 형광이 증가하는 프로브로 작용할 수 있다는 것 또한 확인하였다.

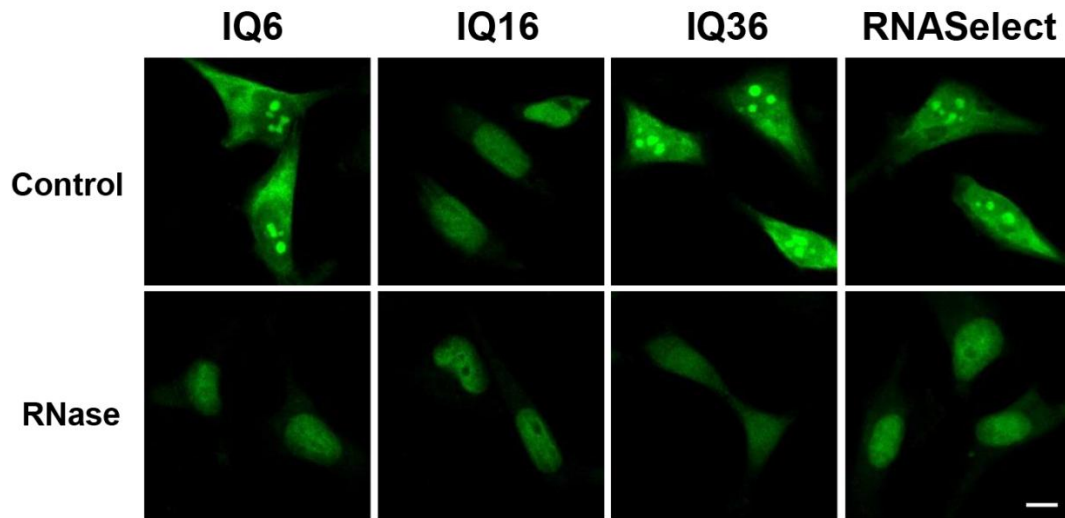


그림 8. RNase를 이용한 세포 내 RNA분해 실험. 10 μ M의 IQ6, IQ16, IQ36 또는 1 μ M SYTO RNASelect을 1시간 처리한 HeLa 에서 RNase A (30 μ g/mL)을 2시간 동안 37 ° C에서 추가 처리 전 후에 따른 이미지. Excitation 파장은 488nm, emission파장은 >493 nm으로 설정하였으며 scale bar는 10 μ m을 나타냄.

제 4 절 Counter staining

IQ6, 16, 36을 각각 세포핵 안의 DNA를 인지할 때 형광이 나타나는 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)와 counter-staining시, IQ6과 IQ36의 경우에는 세포핵보다는 핵소체와 세포질부분에 주로 형광이 나타나는 것을 확인할 수 있었으나 IQ16은 DAPI와 동일하게 세포핵 부분에서 주로 형광이 나타남을 확인하였다 (그림 9).

IQ16은 488nm과 같은 장파장에 의해 excitation될 수 있기 때문에 상대적으로 UV light를 이용하는 DAPI나 Hoechst에 비해 세포에 damage가 적으므로 live cell imaging이 가능하며 또한 DAPI보다 세포막 투과성이 더 좋으므로 fixation과정 없이도 세포 염색이 가능하기 때문에 DAPI에 비해 더 좋은 형광단이라 할 수 있다.

IQ36의 경우, live cell에서도 IQ6, 16보다 더 큰 stoke shift가 나타났다 (그림 10). 이는 in vitro에서 측정한 optical property와 동일한 결과이다. 세포핵 안의 DNA를 염색하는 Hoechst 33258과 IQ36을 live cell에서 counter-staining할 경우 Hoechst 33258은 세포핵 부분에서 형광이 나타났고 IQ36은 핵소체 및 세포질 부분에서 형광이 나타났다. 이처럼 IQ36은 large stoke shift을 가지기 때문에 타 형광체와 counter-staining시 살아있는 세포내에서 multicolor imaging이 가능하며 다른 파장대의 간섭없이 RNA를 선택적으로 관찰할 수 있었다.

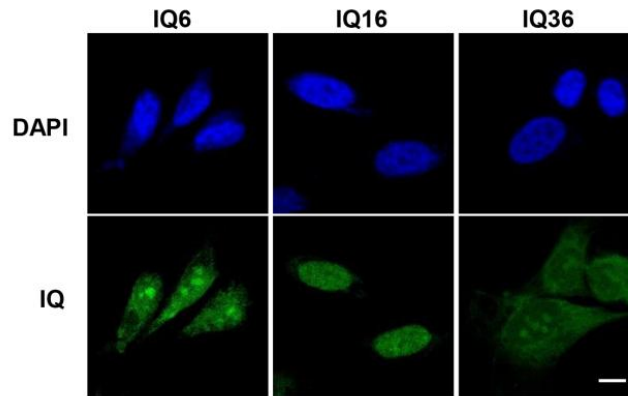


그림 9. IQ 화합물과 DAPI가 Counter-staining시 fixed cell에서 나타내는 형광 이미지. 5 μ M의 IQ6, IQ16 및 IQ36를 30분 동안 Hela cell에 처리한뒤 1 μ g/mL DAPI를 15 min동안 추가처리하여 촬영. DAPI의 경우 excitation파장은 405nm, emission파장은 410-480 nm으로 설정하였으며 IQ의 경우 excitation 파장은 488nm, emission파장은 >493 nm으로 설정함. scale bar는 10 μ m을 나타냄

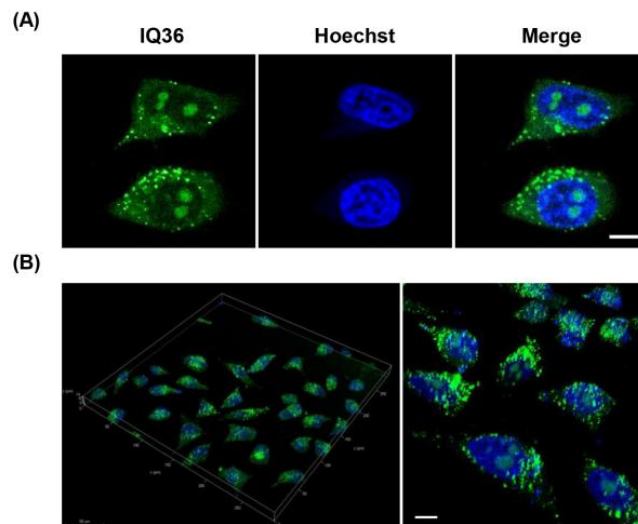


그림 10. IQ36과 Hoechst 33528과 Counter-staining시 live cell에서 나타내는

(A) 2D 및 (B) 3D 형광 이미지. Hela cell에 10 μ M의 IQ36과 처리한뒤 5 μ g/mL Hoechst 33528를 처리. Hoechst 33528의 경우 excitation파장은 405nm, emission파장은 410-480 nm으로 설정하였으며 IQ의 경우 excitation파장은 488nm, emission파장은 >493 nm으로 설정함.. scale bar는 10 μ m을 나타냄

제 5 절 세포 내에서 나타내는 IQ의 광학적 특성

좋은 형광유기체들이 가져야 하는 다양한 특성들을 실험을 통해 살펴보았다. 먼저, 광안정성의 경우 시판되는 다른 형광단(mitotracker red, lysotracker red, SYTO RNaselect)와 비교할 때 IQ 화합물은 더 강한 광안정성을 나타냈다 (그림 11). Confocal laser microscopy에서 각 흡수 파장대의 laser를 최대 출력의 50%의 강도로 조사시켰을 때, 시판되는 dye들은 4 min이 경과할 무렵 50%의 형광이 감소하였으나 IQ 화합물은 최대 형광의 25%정도 형광 감소가 나타났다. 이처럼 IQ 화합물은 시판되는 형광 유기체들에 비해 광안정성의 측면에서 우수하기 때문에 세포 이미징 측면에서 좋은 형광단이라는 강점을 확인하였다.

이어서 IQ 화합물이 가지는 세포투과성을 살펴보았다. IQ6, IQ16 그리고 IQ36를 live cell에 처리 후 시간의 흐름에 따라 세포내의 형광 강도를 조사하였고 시간에 따라 세포 내에 축적되어 10-15 분 이내 최대 형광 강도를 나타내었다 (그림 12). 이는 기존의 좋은 투과성을 지녔다고 알려진 형광단들과 유사하다.⁴⁰ 이러한 장점은 IQ 화합물이 가지는 적절한 친유성과 작은 분자량 때문이라고 추측된다.

마지막으로 IQ 화합물들의 세포 독성을 살펴보았다 (그림 13). Hela, A549, MCF7, NIH-3T3에 각각 IQ 화합물들을 1, 5, 10 μ M의 농도로 각 세포들에 24시간 동안 처리한 뒤 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 다양한 농도범위에서 80-90% 정도의 cell viability를 보였으며 서로 다른 세포들에서도 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 이처럼 제시된 IQ 화합물들은 세포 이미징이 가능한 농도범위 내에서 낮은 세포 독성을 나타냈다.

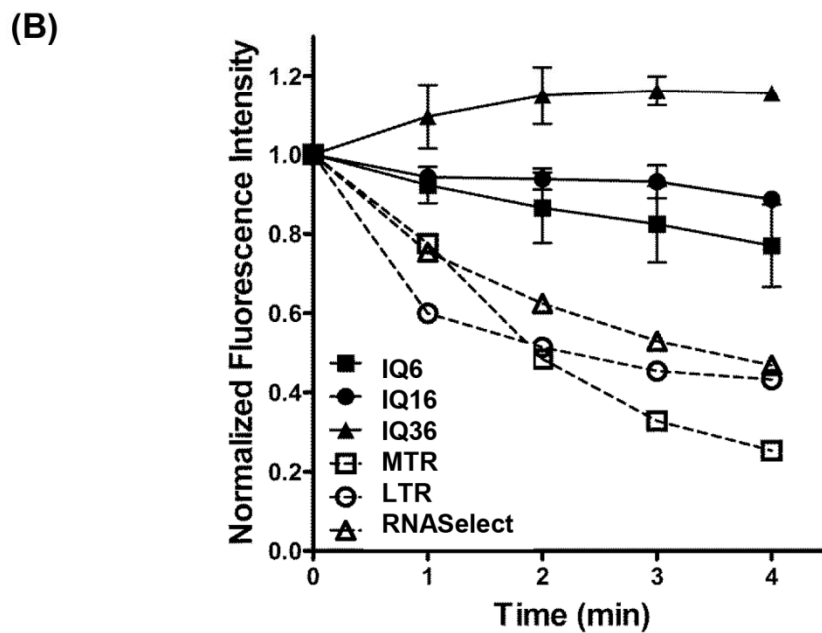
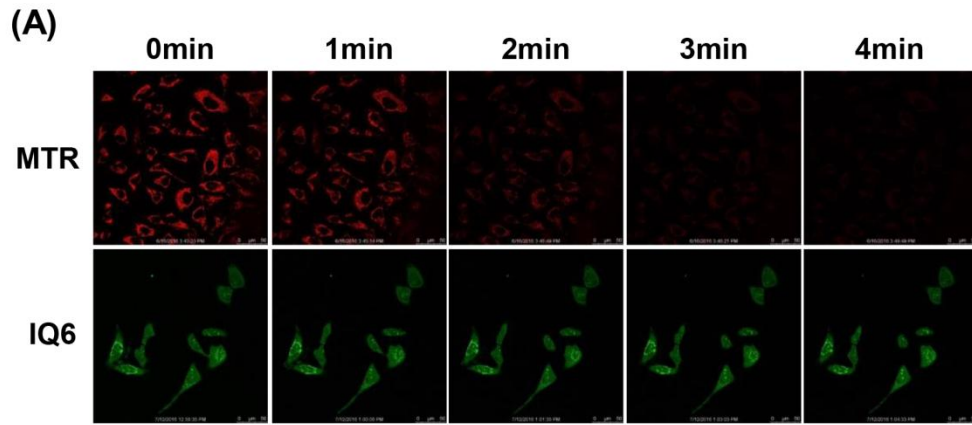


그림 11. (A) 빛 조사에 따라 mitotracker red 또는 IQ6이 세포내에서 나타내는 형광 세기의 변화 양상. HeLa에 200 nM mitotracker red 및 10 μ M IQ6을 처리한 뒤 최대 광원의 50%의 power로 1분 동안 빛을 조사. 현미경에 내재되었는 광원을 이용하여 IQ의 경우 488 nm를 광원 파장으로 사용하였고 mitotracker의 경우 561nm를 광원 파장으로 사용함. (B) 시판되는 다양한 형광유기체와 비교시 광조사 시간에 따라 IQ6, IQ16, IQ36가 나타나는 광안정성

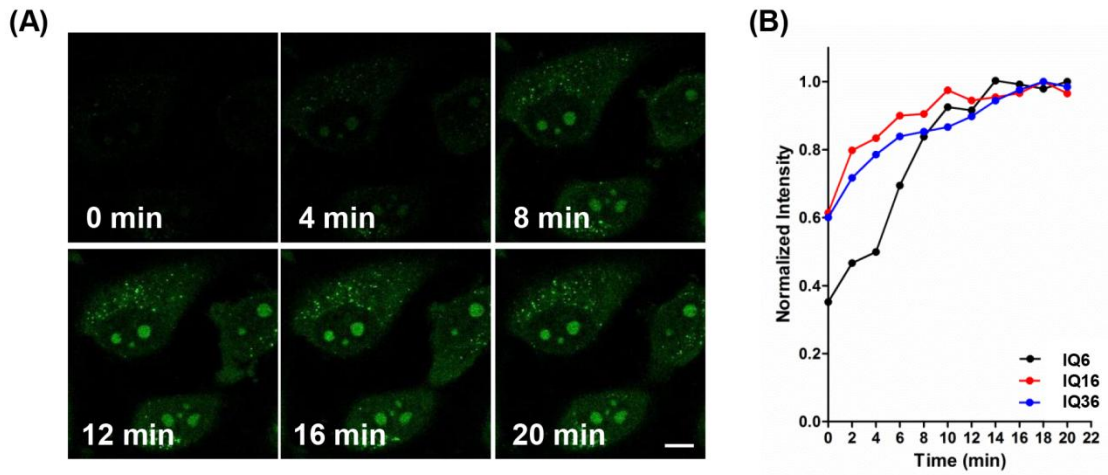


그림 12. (A) live cell에서 시간흐름에 따른 IQ6의 형광 이미지. 10 μ M IQ6를 HeLa 에 처리한 뒤 2분 간격으로 형광 이미지를 촬영. Scale bar는 10 μ m를 나타냄. (B) 시간흐름에 따른 IQ화합물들의 세포 내 형광 세기 변화. 10 μ M의 IQ6, IQ16, IQ36가 처리된 live cell의 형광이미지를 시간에 따라 촬영한 뒤 이를 기반으로 분석함..

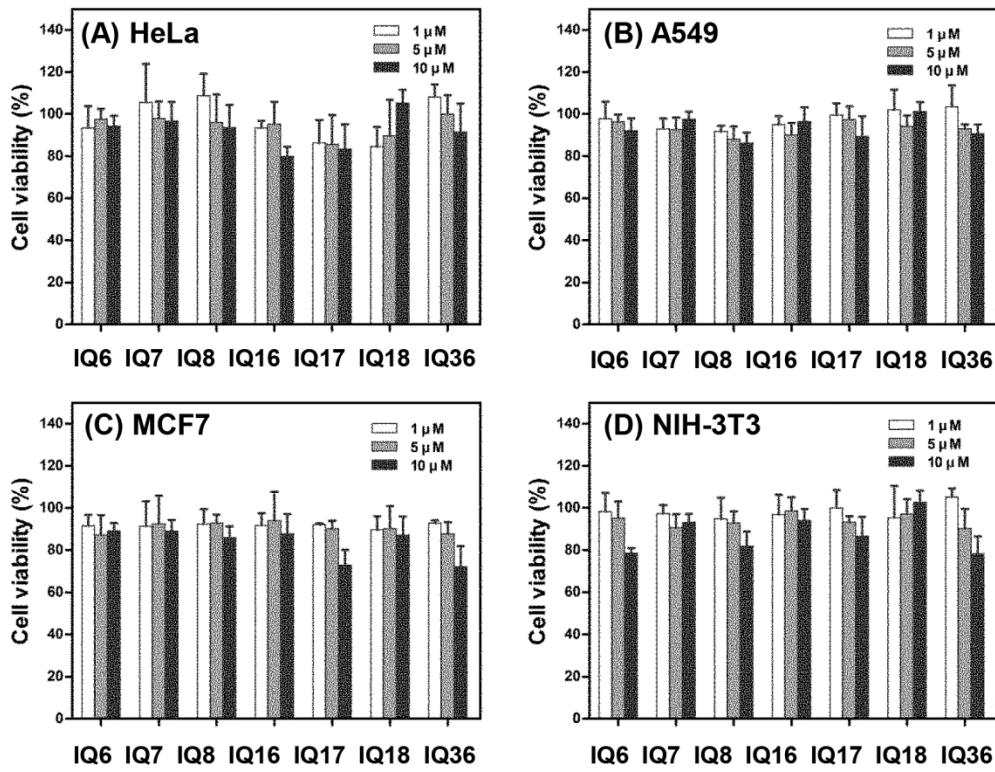


그림 13. (A) HeLa, (B) A549, (C) MCF7 및 (D) NIH-3T3 에서 나타나는 IQ 화합물들의 세포 독성. MTT assay를 통하여 측정함.


제 6 절 세포 소기관에 선택적인 IQ의 이미징

앞선 결과들을 바탕으로 IQ구조가 특정 세포소기관에 위치할 수 있다는 사실을 파악하였고 이에 따라 미토콘드리아 외의 lysosome과 같은 특정 세포 소기관에 분포할 수 있는 새로운 IQ구조를 설계하고자 하였다. Lysosome은 노폐물 분해와 같이 다양한 기능을 수행하는 소기관으로써 pH4.0-6.0와 같이 낮은 pH를 지니는 것이 특징이다.⁴¹ 또한 Morpholine기는 위와 같은 낮은 pH를 인지하여 lysosome으로 유도시키는 치환기로 알려져있다.⁴² 이에 lysosome 특이적인 IQ 유도체를 만들기 위해 Morpholine기를 E ring에 도입한 IQ-MP1, MP2를 합성하였고 이를 세포내에 처리하여 형광양상을 확인하였다.

먼저, IQ-MP1과 IQ-MP2를 비교했을 때 형광 스펙트럼 결과에서 B ring에 electron-donating group의 여부에 따라 주요 형광파장이 단파장쪽으로 변하는 것을 확인했으며 세포 이미징을 통하여 위의 결과가 세포 내에서도 유지됨을 확인하였다. 또한 lysotracker red와 counter-staining을 수행하였을 때 IQ-MP1 및 IQ-MP2는 Pearson's coefficient가 각각 0.832, 0.853으로 높은 일치률을 보였다 (그림 14). 특히 IQ-MP1의 경우 높은 형광 수율을 지닐 뿐만 아니라 lysotracker Red가 가지는 stoke shift(15nm)보다 큰 stoke shif(>50-90nm)를 나타내어 lysosome을 타겟하는 새로운 프로브로써 강점을 보였다. 또한 IQ-MP1과 IQ-MP2를 비교했을 때 형광 스펙트럼 결과에서 B ring에 electron-donating group의 여부에 따라 주요 형광파장이 단파장쪽으로 변하는 것을 확인했으며 세포 이미징을 통하여 위의 결과가 세포 내에서도 유지됨을 확인하였다 (그림 15(A)). 그 밖에도 IQ18의 경우, 세포질 내의 특정 부분에서 주로 형광이 나타났으며 mitotracker red와 counter-staining 결과, 그 위치가 미토콘드리아임을 확인하였

다. (그림 15(B))

위의 결과를 통해 IQ구조는 이론적인 구조 조작의 따라 원하는 특정 소기관을 표지하는 형광물질로써 응용이 가능할 뿐만 아니라 파장대역 역시 조절 가능하다는 것을 확인하였다.

| Entry | λ_{ex} (nm) | R ₁ | R ₂ | R ₃ | λ_{em} (nm) | | | | ϵ_{max} (M ⁻¹ cm ⁻¹) | QY (Φ_{fl}) |
|---------------|----------------------------|----------------|--------------------|---|----------------------------|-------|-------|-------|---|---------------------------|
| | | | | | DW | EtOH | DMF | DCM | | EtOH ^a |
| IQ-MP1 | 422 | H | H |  | 511 | 464.5 | 469.5 | 470.5 | 6591 | 0.746 |
| IQ-MP2 | 401 | | CO ₂ Et | | 479 | 443.5 | 448 | 437 | 12211 | 0.361 |

^a Quantum yields were determined using Coumarin 153 as the standard ($\Phi = 0.53$ in EtOH).

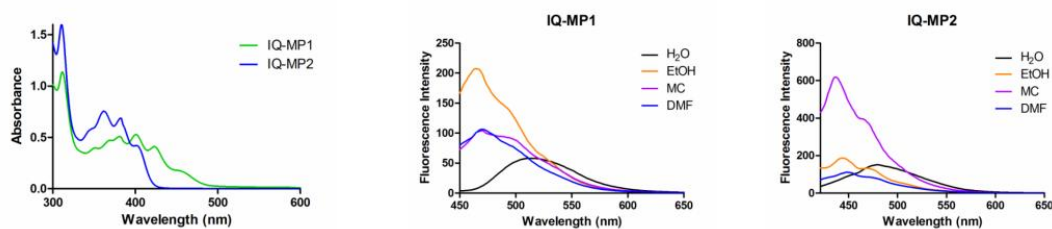


그림 14. IQ-MP1 및 IQ-MP2의 광학적 특성

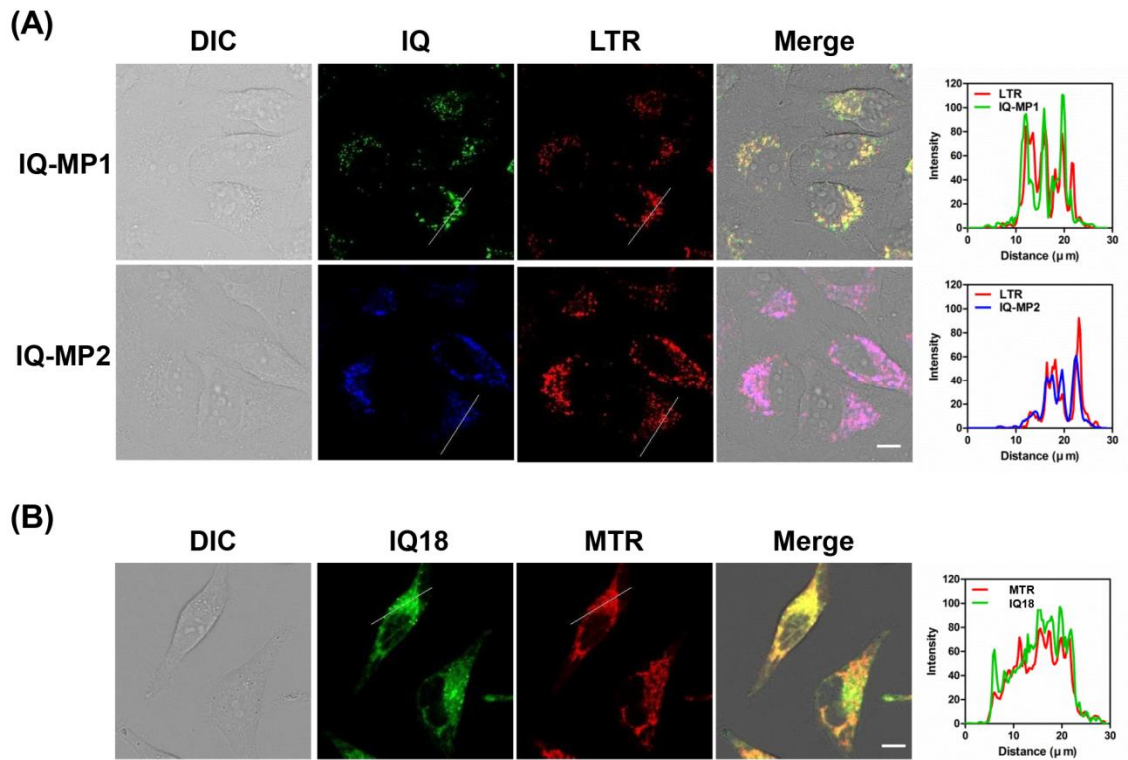


그림 15. (A) IQ-MP1, IQ-MP2가 나타내는 세포 내 형광분포. HeLa에 10 μ M의 IQ-MP1 또는 IQ-MP2와 50nM의 lysotracker red를 counter-staining 수행. (B) IQ18이 나타내는 세포 내 형광분포. HeLa에 IQ18을 mitotracker red와 counter-staining을 수행. Blue channel의 경우 excitation파장은 405nm, emission파장은 410-480 nm으로 설정하였고 green channel의 경우 excitation파장은 488nm, emission파장은 493-550 nm으로 설정하였으며 Red channel의 경우 excitation파장은 561nm, emission파장은 >566 nm으로 설정함. scale bar는 10 μ m를 나타내며 각 그림에 제시된 형광세기 분석은 cell을 투과하여 그어진 흰색 실선을 따라 분석.

제 7 절 IQ의 광학적 특성 및 Singlet Oxygen Quantum Yield

미토콘드리아는 활성 산소종을 생성시킬 뿐 아니라 세포사멸에도 직접적으로 관여하는 주요 소기관이므로 IQ18가 미토콘드리아에 분포하는 현상을 주목하였다. 이를 분석하기 위해 먼저 IQ18과 같이 E ring에 furan를 가지는 IQ 화합물 뿐 아니라 furan과 유사한 thiophene을 가지는 IQ 화합물까지 그들의 광학적 특성들을 살펴보았다 (그림 16 및 표 1). Singlet oxygen quantum yield는 DPBF (1,3-diphenylisobenzofuran)를 이용해 측정하였으며 411nm에서 DPBF의 흡광도 변화를 통해 확인하였다. IQ유도체들 중 A ring에 Br을 포함하는 IQ25의 경우, 가장 큰 singlet oxygen quantum yield를 나타냈으며 furan ring만을 가지는 IQ18의 경우 가장 큰 형광 수율을 나타냈다. IQ18과 IQ52를 비교하였을 때, furan ring이 thiophene ring보다 더 높은 형광수율 및 낮은 singlet oxygen quantum yield를 유도했다. 이러한 현상은 IQ 구조에 할로젠과 같은 heavy atom이나 sulfur와 같이 원자번호가 큰 원소들이 존재하는 경우 triplet QY가 증가되어 singlet-triplet state사이의 에너지 차이를 낮춤으로써 효과적인 intersystem crossing이 나타나기 때문이라 추측한다.⁴³ 이처럼 furan 및 thiophene과 같은 E ring의 변화뿐만 아니라 heavy atom effect에 의해 IQ 화합물들이 나타내는 형광 수율 및 singlet oxygen quantum yield이 변화함을 확인하였다.

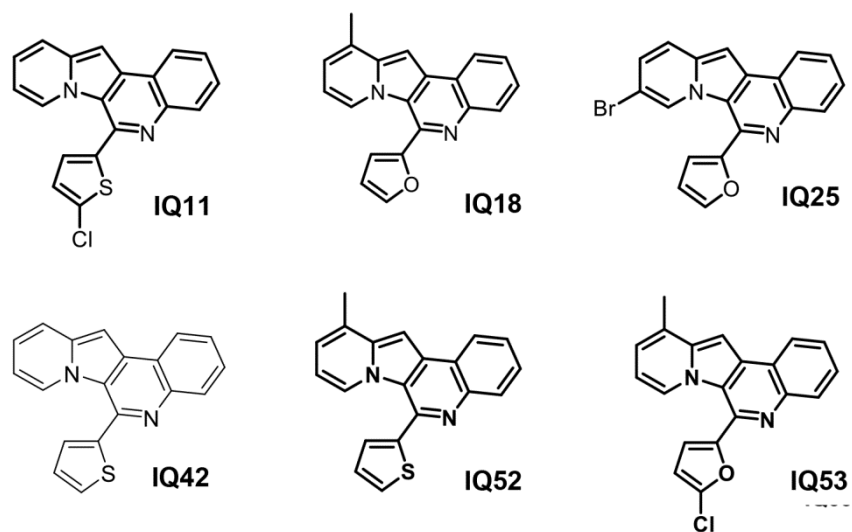


그림 16. Furan 및 thiophene을 가지는 IQ 화합물들의 구조

표 1. Furan 또는 thiophene을 가지는 IQ 화합물들의 광학적 특성^{a,b}

| Compound | $\lambda_{\text{abs}}(\text{nm})$ | $\lambda_{\text{em}}(\text{nm})$ | $\epsilon_{\text{max}}(\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1})$ | QY ^c | QY(¹ O ₂) |
|-------------|-----------------------------------|----------------------------------|--|-----------------|-----------------------------------|
| IQ11 | 407 | 523.5 | 9006 | 0.111 | 0.47 |
| IQ18 | 400 | 502 | 10010 | 0.421 | 0.33 |
| IQ25 | 411 | 487 | 9314 | 0.031 | 0.60 |
| IQ42 | 403 | 508 | 9848 | 0.201 | 0.40 |
| IQ52 | 398 | 514 | 10132 | 0.200 | 0.42 |
| IQ53 | 405 | 508.5 | 10491 | 0.308 | 0.38 |

a. DMSO, B. 2번이상의 실험을 통해 수치값들을 산출함. c. EtOH

제 8 절 시간 흐름에 따른 이미징

Furan 및 thiophene을 가지는 IQ들 중 가장 형광수율이 높은 IQ18을 이미징하였을 때, 그림과 같이 488nm에서 최대 power의 50%으로 빛을 조사할 경우 빛의 조사시간이 증가함에 따라 여러 세포들에서 세포사멸이 나타났다 (그림 17). 세포사멸의 증거인 blebbing 현상은 Hela 및 MCF7 cell에서 8-10분이 지난 뒤 점차 생성되었고 세포가 수축되는 형태학적 변화도 시간이 지남에 따라 특징적으로 나타났다. 반면 NIH3T3 cell의 경우, 16분까지 blebbing현상이 나타나지 않았다. 이러한 세포 사멸 현상은 빛을 받음에 따라 IQ 화합물이 생성하는 활성산소종 때문이라 추측하였고 생성된 활성세포종은 세포마다 세포사멸에 있어서 그 영향이 다르게 나타나는 것을 확인하였다.

또한 빛을 받을수록 Hela cell에서 IQ18에 의한 형광은 미토콘드리아 지역에서 점차 증가하였다. 이러한 현상은 NIH-3T3 및 MCF7에서도 나타났다. 그 증가 정도는 MCF7 cell에서 가장 크게 나타났으며 NIH3T3 cell의 경우에는 빛 조사 5분 이후에는 형광 증가가 나타나지 않았다. 이를 통해 IQ18가 나타내는 형광 증가현상은 세포마다 다르게 나타나며 더 나아가 세포들을 구분할 수 있는 세포 특이적 현상임을 확인하였다.

IQ구조상에 furan 대신 thiophene이 존재하는 IQ42, IQ52의 경우에는 Hela cell에서 위와 동일하게 488nm에서 최대 power의 50%으로 빛을 조사하여도 형광의 증가가 나타나지 않았으나 세포 사멸 현상은 IQ42, 52에서도 관찰되었다 (그림 18). 위와 동일하게 최대 power의 50%으로 빛을 조사했을 경우 6분 후 부터 형태학적 변화가 나타났으며 12분에는 완전히 세포의 형태가 붕괴되었다. 하지만 IQ52의 경우 405nm와 같이 더 짧은 단파장의 광원을 이용해 빛을 조사하였을 때

에는 형광의 증가가 나타났다 (그림 19). 이를 통해 E ring에 furan 또는 thiophene을 가지는 IQ 화합물들은 특정 강도 및 파장의 빛을 받을 때 세포 형광이 증가됨을 확인하였으며 thiophene을 가진 IQ42, IQ52에 비해 furan를 가진 IQ18은 상대적으로 더 장파장 영역의 빛을 받았음에도 가장 큰 형광증가 양상이 나타남을 확인하였다. 이를 통해 IQ18이 시간에 따른 세포변화를 관찰하기 가장 용이한 화합물이라 판단하였다. 세포 사멸의 경우 IQ42 또는 IQ52와 같이 thiophene이 존재하는 경우가 IQ18과 같이 furan이 존재하는 경우보다 짧은 시간 안에 세포 붕괴가 일어남을 확인하였다. 또한 IQ52에서 세포사멸이 진행될 때 형광의 증가폭이 적었으나 세포 사멸이 충분히 진행된 후에 조사했던 405nm 광원의 power와 시간을 각각 50%와 1분으로 늘렸을 때 형광이 증가되는 현상을 통해 세포 사멸 현상과 형광의 증가현상은 서로 독립적임을 확인하였다.

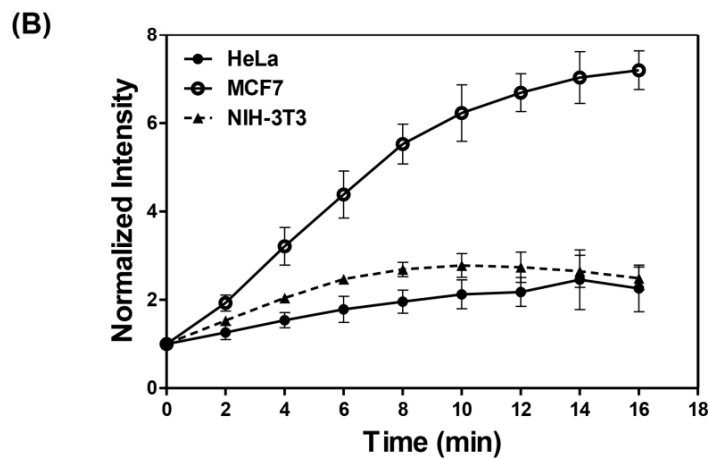
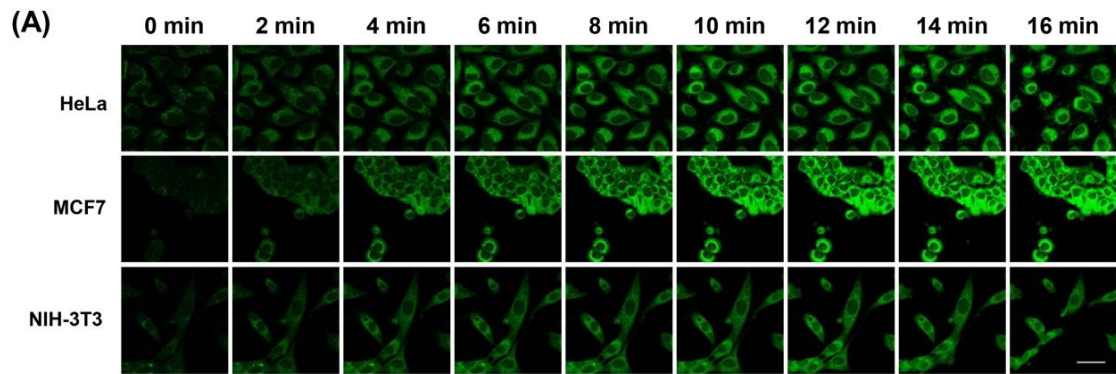


그림 17. (A) Live cell에서 빛 조사에 따라 변화하는 IQ18 형광 세기 이미징. 10 μ M의 IQ18을 HeLa, MCF7 및 NIH3T3에 처리한 뒤 현미경내의 광원을 이용하여 488nm의 빛을 최대 power의 50%로 2분동안 조사. Excitation파장은 488nm, emission파장은 >493 nm으로 설정하였고 Scale bar 는 50 μ m을 나타냄. (B) Live cell에서 빛 조사에 따라 변화하는 IQ18의 형광 세기 그래프. 시간에 따라 촬영한 형광이미지를 기반으로 분석. 2-3번의 반복실험을 수행함.

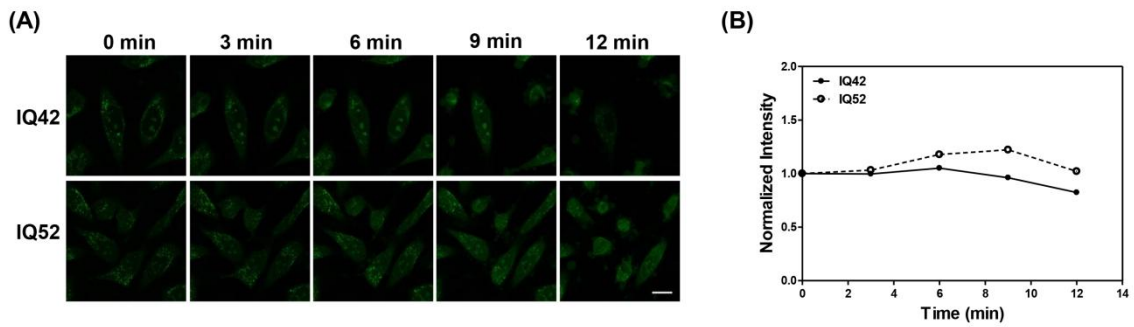


그림 18. (A) Live cell에서 빛 조사에 따라 변화하는 IQ42 및 52의 형광 이미징. 10 μ M의 IQ18을 HeLa에 처리한 뒤 현미경내의 광원을 이용하여 488nm의 빛을 최대 power의 50%로 3분동안 조사. Excitation파장은 488nm, emission파장은 >493 nm으로 설정하였고 Scale bar 는 20 μ m을 나타냄. (B) 빛 조사에 따라 변화하는 IQ42 및 IQ52의 형광 세기 그래프. 위의 형광이미지를 기반으로 분석함.

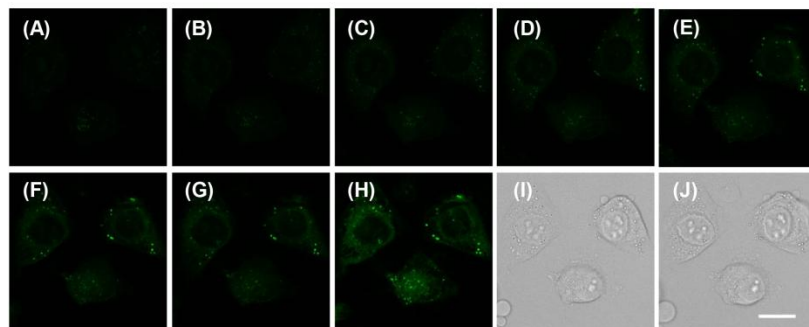


그림 19. Live cell에서 빛 조사에 따라 변화하는 IQ52의 형광 이미징. (A-G) 10 μ M의 IQ52을 HeLa에 처리한 뒤 현미경내의 광원을 이용하여 405nm의 빛을 최대 power의 10% 로 10초동안 조사하였고 마지막에는 (H) 405nm의 빛을 최대 power의 50% 로 1분간 조사. Excitation파장은 405nm, emission파장은 >493 nm으로 설정하였고 Scale bar 는 20 μ m을 나타냄. (I) (G)의 DIC 이미지, (J) (H)의 DIC 이미지.

제 9 절 광독성 평가

앞서 나타난 IQ 화합물들의 광독성을 평가하기 위해 HeLa, MCF7, A549에서 MTT assay를 수행하였다. Blue LED를 광원으로 하여 동일한 빛의 양 (800–850 lux)을 조사하였을 때, IQ 유도체의 농도가 증가됨에 따라 cell viability가 감소되었다 (그림 20). 하지만 빛을 조사하지 않았을 때에는 IQ25을 제외한 IQ 유도체들은 24시간동안 처리하여도 세포 독성을 거의 나타내지 않았다. IQ 유도체의 농도를 2 μ M 동일하게 처리하고 빛의 조사시간 5분에서 10분으로 증가시켰을 때에도 빛 조사시간과 비례하여 cell viability가 감소함을 확인하였다.

IC₅₀은 빛을 동일하게 조사하였을 때 0.4–3.7 μ M의 IQ 농도 범위에서 산출하였다. A549 및 MCF7 cell에서는 E ring에 Cl이 포함되었을 때 더 세포독성이 강하게 나타났다.(표 2) 또한 A ring에 Br이 포함되었을 때에는 빛을 받지 않았을 때에도 독성을 나타냈다. 이러한 결과는 할로겐이 heavy atom으로 작용하기 때문이라 유추된다. Br, I와 같은 heavy atom이 존재할 경우 intersystem crossing에 영향을 미쳐 ROS형성량이 증가하며 Br, I과 같은 heavy atom의 경우 세포독성을 유발한다고 알려져 있다.⁴⁴ Hela cell에서는 IQ11이 다른 세포에서와 다르게 더 강한 광독성을 나타냈다. 특히 0.5 μ M 라는 상대적으로 낮은 농도에서도 50%이상의 cell viability감소를 나타냈다. 이는 IQ유도체들은 단순히 ROS 형성량만이 세포사멸을 결정하는 것이 아니라 화합물이 존재하는 세포 내 위치 및 상호작용하는 세포내 생체물질들이 광독성에 영향을 미치기 때문이라고 추측된다. 위의 결과는 더 나아가 추후 연구를 통해 특정 세포에서만 광역학 활성을 나타내는 광감각제 뿐만 아니라 암세포 특이적인 광감각제의 개발이 가능하다는 점을 시사한다.

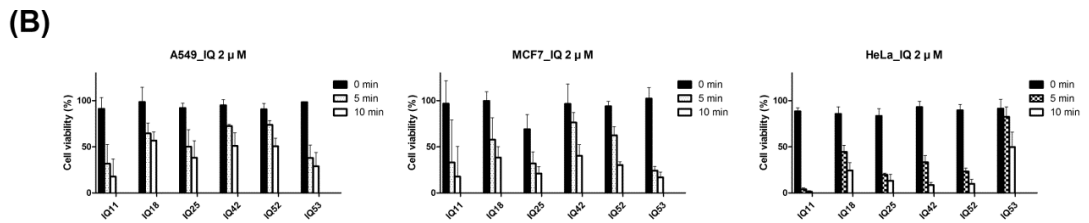
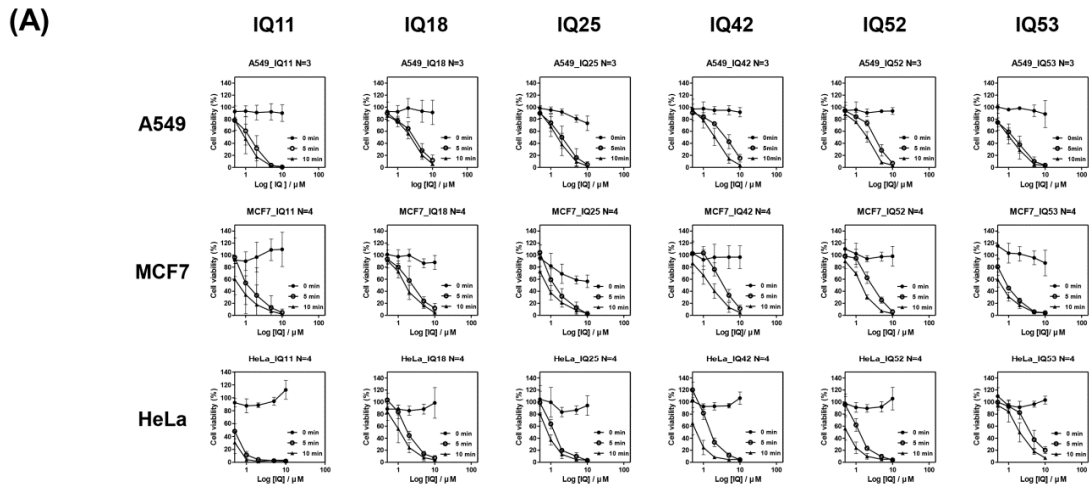


그림 20. (A) IQ 화합물이 빛 조사시에 나타내는 세포독성. A549, MCF7 및 HeLa 에 IQ11, 18, 25, 42, 52, 53을 0-10 μM 의 농도 범위에서 처리. blue LED를 광원으로 이용하였으며 빛 조사 시간도 0, 5, 10분의 범위에서 처리. 3-4번 반복실험을 통해 cell viability를 산출. (B) 2 μM IQ 화합물들을 처리할 경우 빛 조사 시간에 따른 cell viability의 변화.

표 2. 다양한 세포들에서 빛 조사시 나타나는 IQ 화합물의 IC_{50} (μM)

| Compound | A549 | | MCF7 | | HeLa | |
|-------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 5 min | 10 min | 5 min | 10 min | 5 min | 10 min |
| IQ11 | 1.33 \pm 0.73 | 1.03 \pm 0.54 | 1.68 \pm 1.67 | 1.04 \pm 1.11 | 0.49 \pm 0.08 | 0.41 \pm 0.11 |
| IQ18 | 2.96 \pm 0.84 | 2.37 \pm 0.57 | 2.39 \pm 0.88 | 1.67 \pm 0.50 | 1.76 \pm 0.22 | 1.12 \pm 0.38 |
| IQ25 | 2.16 \pm 0.96 | 1.59 \pm 0.60 | 1.33 \pm 0.38 | 0.83 \pm 0.24 | 1.14 \pm 0.12 | 0.81 \pm 0.12 |
| IQ42 | 4.15 \pm 0.84 | 1.99 \pm 0.48 | 3.46 \pm 1.10 | 1.55 \pm 0.43 | 1.45 \pm 0.23 | 0.63 \pm 0.15 |
| IQ52 | 3.38 \pm 0.80 | 1.99 \pm 0.32 | 2.68 \pm 0.54 | 1.39 \pm 0.12 | 1.17 \pm 0.16 | 0.55 \pm 0.19 |
| IQ53 | 1.43 \pm 0.56 | 1.13 \pm 0.49 | 0.93 \pm 0.07 | 0.62 \pm 0.14 | 3.51 \pm 0.58 | 2.07 \pm 0.69 |

제 10 절 DNA photocleavage

Blue LED를 광원으로 빛을 조사할 때 IQ 유도체들이 가지는 DNA damage 정도를 pBR322 supercoiled plasmid를 이용하여 확인하였다. IQ와 pBR322를 빛이 없는 상태에서 처리한 경우 DNA cleavage가 나타나지 않았다. 하지만 빛을 조사한 경우에는 photocleavage현상을 통해 DNA가 잘려 supercoil circular 형태에서 nicked circular 형태가 나타났다 (그림 21(A)). 또한 IQ 유도체 모두에서 농도(1, 5, 40 μ M)가 증가됨에 따라 nicked circular 형태가 점차 증가하는 현상도 확인하였다 (그림 21(B)). A ring에 Br을 지닌 IQ25의 경우 IQ18과 비교하였을 때 더 강한 DNA Photocleavage를 나타냈으며 이는 표 1에서 나타낸 singlet oxygen quantum yield의 경향과도 일치하는 결과였다.

IQ42와 IQ52를 비교하였을 때, IQ구조상 A ring에 methyl기는 DNA photocleavage에 큰 영향을 주지 않았다. IQ18과 IQ52를 비교하였을 때, E ring에 furan보다 thiophene을 지닐 경우 더 강한 DNA Photocleavage를 나타냈으며 IQ42와 IQ52의 경우 할로젠과 같은 heavy atom없이도 강한 DNA photocleavage를 나타내었다. 이를 통해 furan 보다 thiophene이 존재할 때 더 많은 ROS를 형성하여 DNA에 피해를 입힘을 확인하였다

더 나아가 DNA photocleavage의 기전을 알아보기 위해 ROS scavenger들을 처리한 상태에서 빛을 조사하였다 (그림 20(C)). IQ18 및 IQ52의 경우, hydrogen peroxide의 scavenger인 KI를 첨가했을 때 DNA photocleavage이 가장 효과적으로 감소하였다. 단, hydroxyl radical의 scavenger인 mannitol를 처리한 경우에는 DNA photocleavage 변화가 나타나지 않았으며 singlet oxygen의 scavenger인 sodium azide (NaN_3)를 처리한 경우에는 IQ25 및 IQ52에서만 약간의 감소가 나

타났다. 이를 통해 IQ 유도체들이 DNA photocleavage를 유도하는 주요 생성 ROS는 hydrogen peroxide임을 확인하였다. 또한 ROS scavenger에 따른 DNA photocleavage감소 현상이 IQ 유도체들마다 서로 다르게 나타났으므로 IQ 유도체들이 나타내는 주요 ROS 및 ROS 생성 기전은 구조에 따라 서로 다르다고 추측된다. 이는 광감각제에 의한 ROS형성은 type1 기전과 type 2 기전이 일반적으로 동시에 섞여서 나타날 수 있기 때문일 것이다.

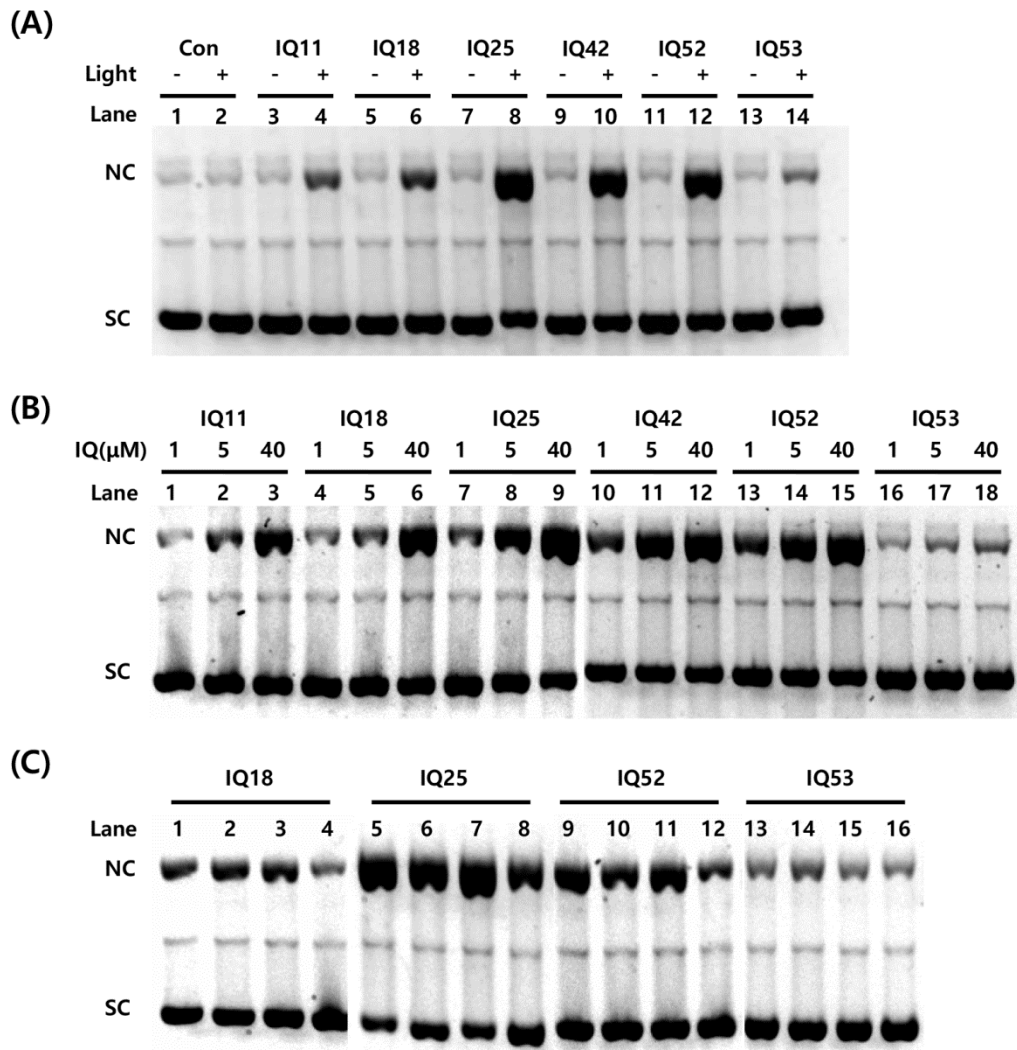


그림 21. IQ 화합물 pBR322 DNA을 이용한 IQ 화합물의 photocleavage 정도 분석. (A) 빛의 유무에 따른 IQ 화합물들의 photocleavage. 30분 동안 blue LED(800–850 lux)를 이용하여 빛을 조사한 뒤 agarose gel electrophoresis를 통해 관찰함.. Lane 1과 lane 2 : DNA만 처리; lane 3와 lane 4: DNA와 IQ11를 처리; lane 5와 lane 6 : DNA 와 IQ18를 처리; lane 7 와 lane 8: DNA와 IQ25를 처리, lane 9 과 lane 10: DNA와 IQ42를 처리; lane 11와 lane 12 : DNA와 IQ52를

처리; lane 13 와 lane 14: DNA와 IQ53를 처리. -와 +는 빛의 유무를 의미. (B) 농도 증가에 따른 IQ 화합물들의 DNA photocleavage. 농도 범위는 1, 5, 40 μ M 로 처리했으며 Blue LED를 광원으로 30분동안 조사. (C) ROS scavenger 존재에 따른 IQ 화합물들의 DNA photocleavage. 30분 동안 blue LED(800-850 lux)를 이용하여 빛을 조사한 뒤 agarose gel electrophoresis를 통해 관찰. Lanes 1, 5, 9, 및 13 : DNA 와 IQ 화합물만 존재; lanes 2, 6, 10 및 14 : DNA + IQ화합물+ NaN_3 (100 mM); lanes 3, 7, 11 및 15 : DNA + IQ화합물 + Mannitol (100 mM); lanes 4, 8, 12 및 16 : DNA + IQ화합물 + KI (100 mM). 모든 반응은 공기로 순환된 Tris-HCl buffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4)에서 진행하였으며 SC와 NC는 supercoiled circular와 nicked-circular forms를 의미.

제 11 절 세포 내의 활성산소종 생성 확인

세포 안에서 IQ 화합물이 빛을 받을 때 ROS를 형성하여 세포독성을 유발시킨다는 추정을 확인하고자 DHE(dehydroethidium)를 이용하였다. DHE란 세포막을 투과할 뿐만 아니라 superoxide와 같은 활성산소종과 만났을 때 형광을 띄는 화합물이기 때문에 세포내의 활성산소종의 양을 측정하기 위해 주로 이용되는 화합물이다. 세포내에서 IQ화합물들이 나타내는 활성산소종의 생성 정도를 파악하기 위해 IQ 화합물과 DHE를 함께 세포에 처리하였고 빛조사에 따른 DHE의 형광변화를 관찰하였다. 실험 결과 IQ 화합물들은 빛을 받을 때 세포안에서 형광이 증가됨을 확인하였고 또한 그 증가량은 IQ 화합물의 농도가 증가함에 따라 증가하였다 (그림 22). 이를 통해 IQ 화합물들은 세포내에서 빛을 받을 때 활성산소종을 생성시킴을 확인하였다. 형광증가 정도가 IQ 화합물에 따라 다르게 나타났다. 이는 IQ 화합물마다 주로 생성하는 활성산소종이 다양한 반면 DHE이 가장 강하게 반응하는 활성산소종은 superoxide로 특정되었기 때문이라 유추된다. 이처럼 IQ 화합물마다 생성되는 주요 활성산소종이 다른 현상은 DNA photocleavage에서 나타난 결과와 일치한다.

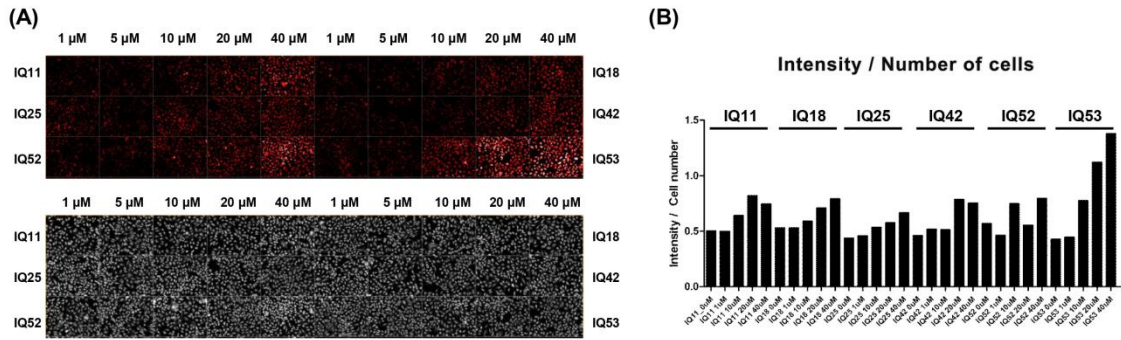


그림 22. IQ에 의한 세포내 DHE 형광의 변화 양상. (A) HeLa에 1-40 μ M 농도의 IQ화합물 및 DHE를 처리한 뒤 blue LED를 광원으로 빛을 조사하고 DHE의 형광 증가를 촬영하였다. Operetta high-content imaging system을 통해 수행하였으며 형광파장은 520-550 nm에서 excitation시키고 emission파장은 580-600 nm에서 이미징을 수행하였다. (B) DHE 형광 증가량에 따른 IQ의 활성산소종 형성량 분석

제 12 절 빛 조사에 따른 미토콘드리아의 변화

이러한 빛을 조사했을 때 IQ 화합물에 의한 미토콘드리아의 변화를 확인하고자 counter-staining을 수행하였다. 먼저 살아있는 Hela cell에 Mito-tracker red와 IQ18 또는 IQ52를 counter-staining한 이후, 488nm laser로 빛을 조사하여 조사량에 따라 mitochondria의 형태 변화를 촬영하였고 각 이미지들을 Image J를 이용하여 분석했다 (그림 23 및 표 3). 먼저 미토콘드리아의 형태는 빛을 받을수록 본래의 실선형태에서 둥글게 형태가 바뀌어갔다. 이러한 미토콘드리아 붕괴 현상은 IQ18과 IQ52를 처리한 세포에서 모두 나타났다. 특히 IQ52에서는 붕괴현상과 더불어 누수현상까지 확인할 수 있었다.

이와 동반하여 빛의 조사시간이 증가함에 따라 IQ와 mitotracker red의 Coefficient값은 점차 증가했다. IQ18의 경우 6분동안 빛을 조사하였을 때 Pearson's Coefficient가 0.82였으나 IQ52의 경우 0.768로 IQ52의 경우 IQ18보다 상대적으로 더 낮은 수치를 나타냈다 (그림 22 및 표 3). 이를 통해 IQ18은 IQ52보다 미토콘드리아에 더욱 선택적으로 위치하여 형광을 나타냄을 확인하였다. 또한 Table 1에서 제시된 형광수율에서도 알 수 있듯이 IQ18은 IQ52보다 형광 세기가 강하기 때문에 IQ52보다 IQ18이 살아있는 세포의 변화양상을 관찰하기에 더 적합함을 알 수 있다. 이러한 성질은 IQ18이 가지고 있는 furan부분이 thiophene과 달리 미토콘드리아가 붕괴되며 노출되는 특정 단백질이나 미토콘드리아 안에서 산화-환원 과정에 관여하는 철이온과 작용하여 나타난다고 추측된다.

또한 TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate)을 이용하여 빛과 IQ화합물에 의한 미토콘드리아의 변화를 확인하였다 (그림 24). TMRE은 미토콘드리아에 존재하는 막전위 차이에 의해 미토콘드리아만을 선택적으로 염색하는 시약

이다.⁴⁵ 미토콘드리아의 막전위는 암세포에서 더 강하게 나타난다 알려져 있으며 이는 실험결과에서도 동일하게 나타났다.⁴⁶ 동일 농도로 TMRE를 처리했을 때 Hela 및 MCF7의 경우에는 광원 power의 0.2~0.3%로 excitation시켜도 충분한 형광이 관찰되었으나 NIH3T3의 경우에는 광원 power의 3%이상으로 excitation시켜야 형광이 관찰되었다. 이 때 빛만 조사한 경우에는 TMRE의 형광이 미토콘드리아에서 나타났으나 IQ18 및 IQ52를 처리한 뒤 빛을 조사한 경우에는 TMRE에 의한 형광이 상대적으로 크게 감소하였다. 이를 통해 IQ18과 IQ52를 처리한 세포에서 빛을 조사할 경우 미토콘드리아의 붕괴가 나타나 미토콘드리아 막전위가 사라짐을 확인하였다. 더욱이 DIC image에서는 apoptosis의 증거인 blebbing현상까지 확인되었다. 이를 통해 IQ18 및 IQ52를 처리한 뒤 빛을 조사한 경우에는 활성산소종 생성에 의해 미토콘드리아의 붕괴에 따라 막전위가 사라지고 이에 따라 세포사멸이 유도됨을 확인하였다.⁴⁷ 이러한 현상은 Hela cell외에도 MCF7 및 NIH3T3 cell에서도 나타났다.

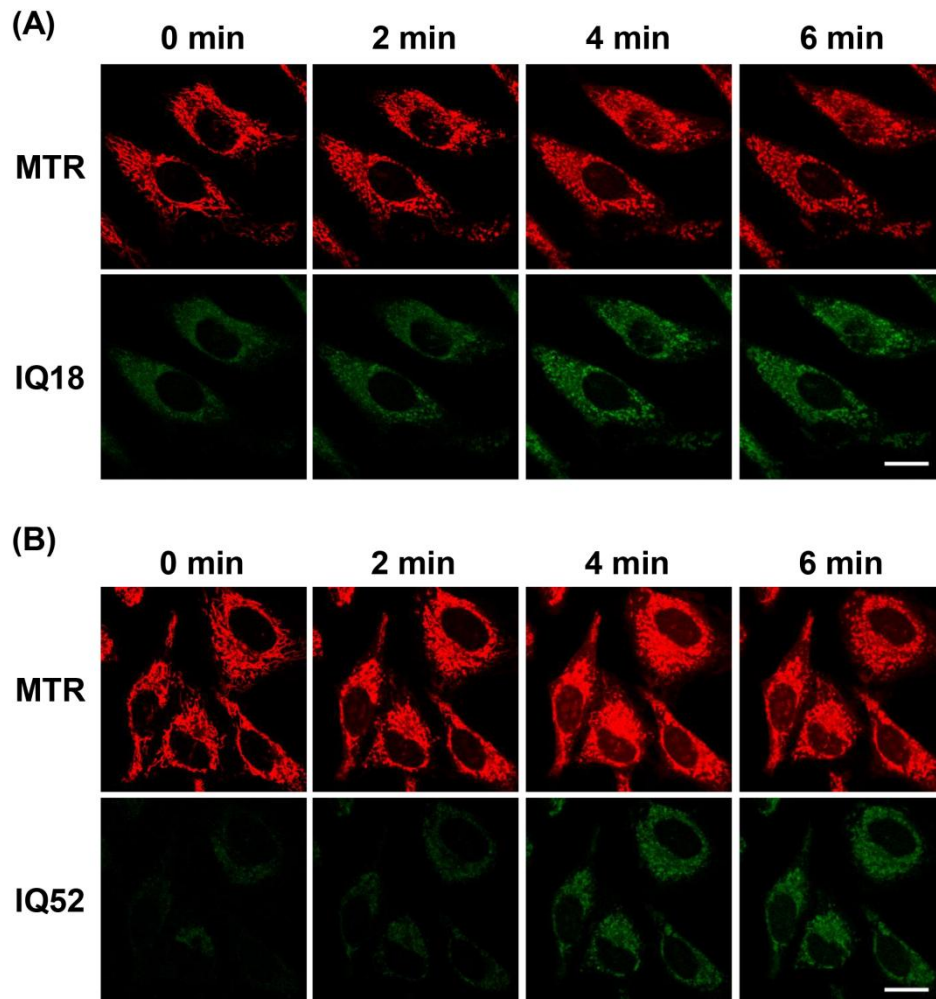


그림 23. IQ 화합물 처리 후 빛에 따른 미토콘드리아의 형태변화. (A) IQ18 및 (B) IQ52을 10 μ M으로 처리 한뒤 현미경내의 광원으로 488nm의 2분 간격으로 빛을 조사한 관찰. IQ 화합물의 Excitation파장은 488nm, emission파장은 >493 nm으로 설정하였고 mitotracker red의 Excitation파장은 561nm, emission파장은 >566 nm으로 설정함. Scale bar 는 20 μ m을 나타냄.

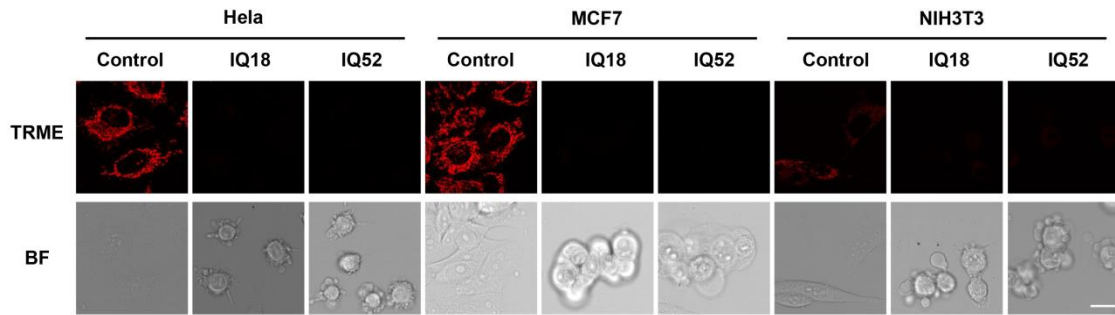


그림 24. IQ 화합물 처리 후 빛에 따른 TMRE 염색 변화. (A) HeLa, (B) MCF7 및 (C) NIH3T3에 10 μ M의 IQ18 and IQ52를 처리한 뒤 50nM의 TMRE를 counter-staining 이 후 Blue LED를 광원으로 하여 5분간 빛을 조사. IQ화합물을 처리하지 않은 세포를 control로 설정. TMRE의 Excitation파장은 561nm, emission 파장은 >566 nm으로 설정했으며 scale bar 는 20 μ m을 나타냄.

표 3. 빛 시간 조사에 따른 Mitotracker와 IQ 화합물의 Coefficient 변화

| Time | Coefficient | IQ18 | IQ52 |
|------|-------------|-------|-------|
| 0min | Pearson's | 0.613 | 0.294 |
| | Overlap | 0.658 | 0.336 |
| 2min | Pearson's | 0.725 | 0.512 |
| | Overlap | 0.759 | 0.535 |
| 4min | Pearson's | 0.82 | 0.71 |
| | Overlap | 0.846 | 0.733 |
| 6min | Pearson's | 0.82 | 0.768 |
| | Overlap | 0.846 | 0.789 |

제 13 절 세포 사멸에 따른 형태학적 변화

IQ에 의한 세포 사멸 기전을 확인하기 위해 IQ 유도체들에 대한 PI(Propidium iodide) staining을 수행하였다 (그림 25). PI는 살아있는 세포에서는 염색되지 않지만 late apoptic cell 및 dead cell에서는 붕괴된 세포막을 통과하여 세포핵 내 DNA를 염색하는 화합물이다. 이를 통해 살아있는 세포와 죽은 세포를 구분할 수 있다. 0 μ M, 0.5 μ M, 10 μ M 농도로 IQ 유도체들을 처리한 뒤 빛을 조사하였을 때, 0.5 μ M 와 같은 저농도에서는 형태학적 변화가 적을 뿐 아니라 PI에 의한 형광이 나타나지 않았으나 10 μ M 과 같이 IQ유도체를 고농도로 처리하였을 때에는 IQ11을 제외하고 blebbing현상 및 세포 수축과 같은 apoptosis에서 나타나는 형태학적 변화와 더불어 PI에 의한 형광도 나타났다. 10 μ M 과 같은 고농도의 IQ 유도체를 처리했어도 빛을 조사하지 않은 경우에는 형태학적 변화 및 PI에 의한 형광이 나타나지 않았다. 위의 결과는 빛에 의해서만 IQ에 의한 독성이 나타남을 제시하며 MTT assay를 통한 광독성 평가의 결과와 일치한다.

더 나아가 세포 사멸 기전을 추가적으로 확인하기 위해 동일 농도 조건에서 IQ 유도체들의 의한 세포핵 내의 DNA의 변화를 Hoechst staining을 통해 살펴보았다 (그림 26). 세포핵 내의 DNA가 분절되어 여러 DNA과편들이 보이는 현상(DNA fragmentation)은 apoptosis의 특징이며 이는 Hoechst와 같은 DNA를 염색하는 화합물을 통해 확인할 수 있기 때문이다.⁴⁸⁻⁴⁹ 앞선 결과와 같이 0.5 μ M과 같은 저농도에서는 형태학적 변화 및 세포핵의 변화가 나타나지 않았다. 하지만 10 μ M와 같은 고농도의 IQ가 존재할 경우 IQ11을 제외한 IQ 화합물들에서 앞선 결과와 동일하게 apoptosis의 특징적인 형태학적 변화가 나타났으며 더불어 DNA fragmentation 현상까지 확인할 수 있었다. 이를 통해 대부분의 IQ 유도체들은 빛

을 받을 경우 apoptosis를 통해 세포사멸을 유도함을 확인하였다. 단, IQ11의 경우 고농도에서 Giant bubble와 같이 necrosis에서 나타나는 형태학적 변화가 관찰되었다.⁵⁰⁻⁵¹ 이는 Hela cell에서 IQ11이 생성하는 ROS량이 다른 IQ유도체들보다 더 많기 때문에 apoptosis보다 necrosis를 유도하는 것으로 추정된다.

IQ 화합물은 주로 apoptosis를 통한 세포 사멸을 유도하지만 IQ11의 경우 necrosis까지도 유도 가능함을 확인하였다. 일반적으로 광감각제는 다른 항암제들과 달리 apoptosis외에 necrosis까지 유발할 수 있기 때문에 면역반응을 유발하여 더 강한 항암효과를 나타낸다는 장점을 지닌다.⁵² 이를 바탕으로 IQ 화합물 역시 추후 연구를 통해 necrosis를 유도하는 항암제로 응용될 수 있을 뿐만 아니라 apoptosis와 necrosis를 조절할 수 있는 광감각제 개발이 가능하다는 것을 확인하였다.

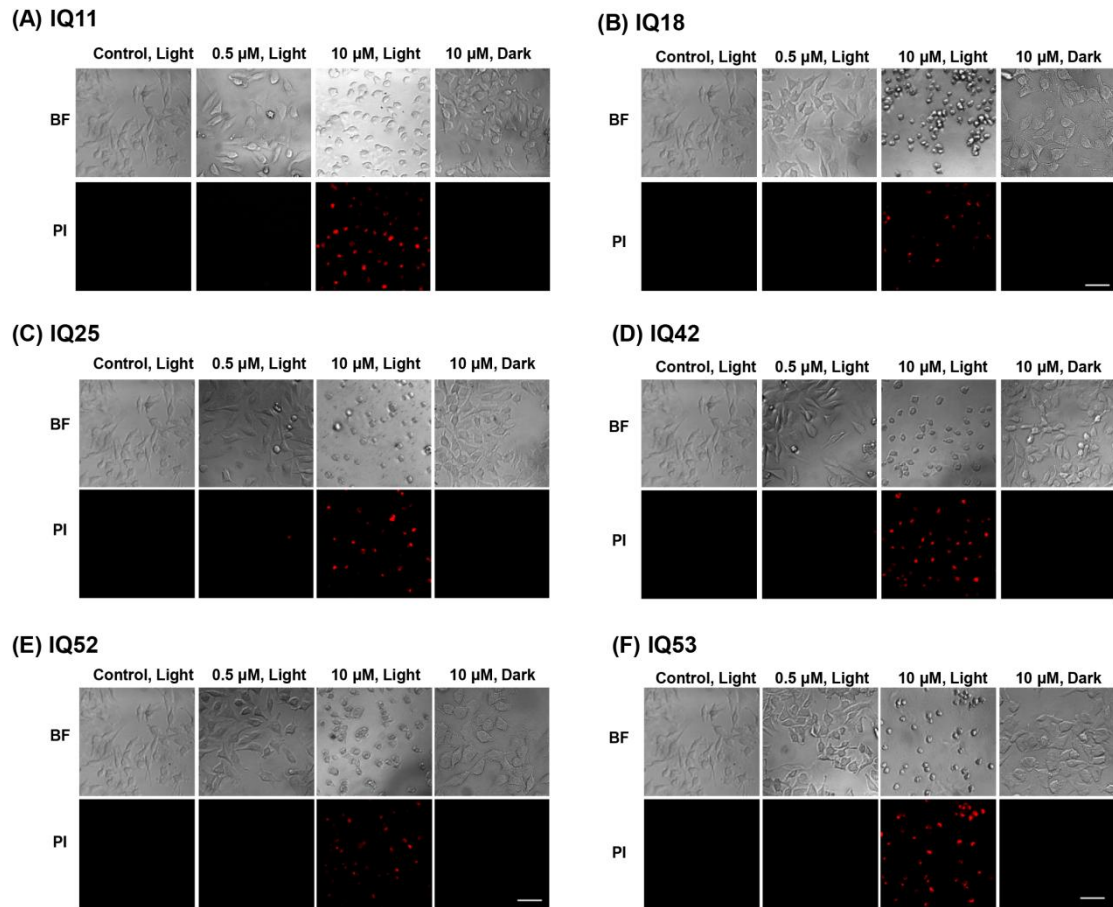


그림 25. IQ 화합물에 의한 apoptosis 특성 분석을 위한 PI staining. 암조건 : IQ 화합물을 24시간 동안 처리 및 배양함. 빛 조건 : IQ 화합물을 암조건에서 1시간동안 처리한 뒤 Blue LED로 5분 빛 조사 후 14시간 추가 배양. Scale bar는 50 μ m를 나타냄.

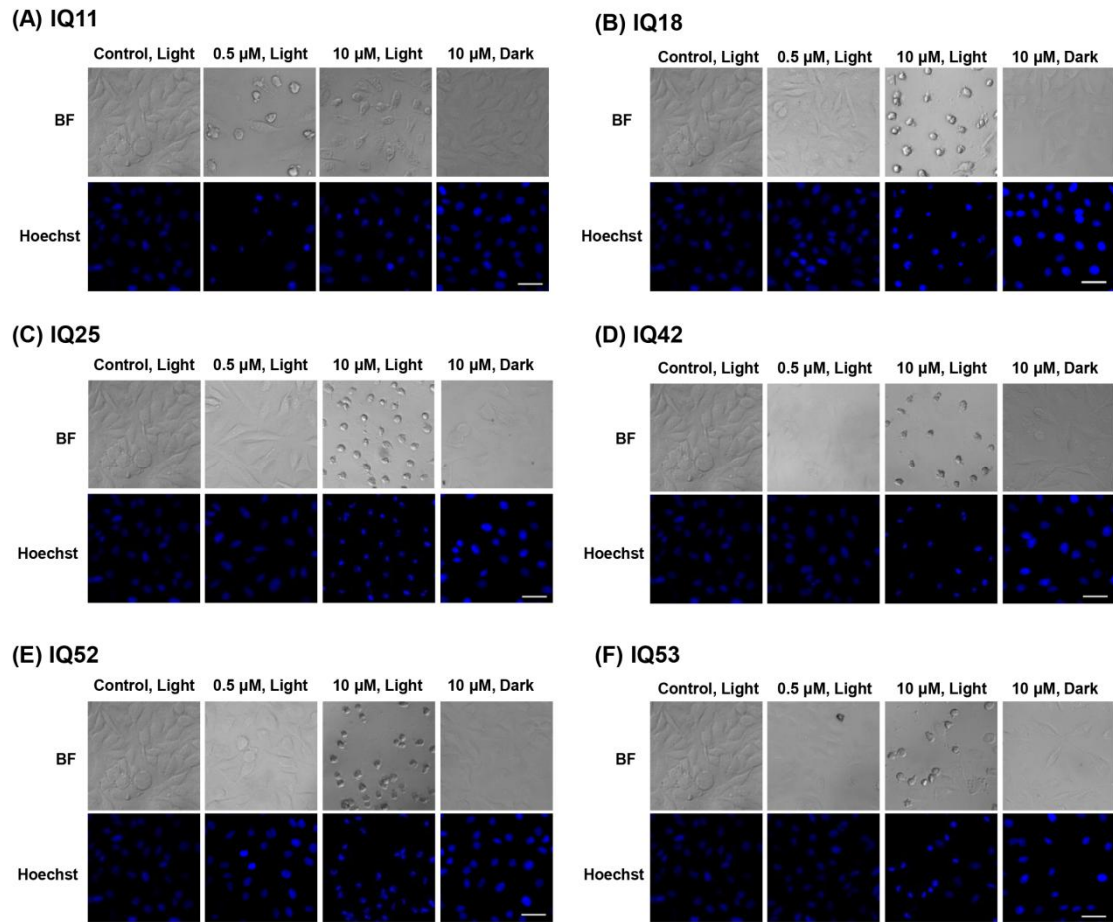


그림 26. IQ 화합물에 의한 apoptosis 특성 분석을 위한 Hoechst33528 염색. 암조건 : IQ 화합물을 24시간 동안 처리 및 배양함. 빛 조건 : IQ 화합물을 암조건에서 1시간동안 처리한 뒤 Blue LED로 5분 빛 조사 후 23시간 추가 배양. Scale bar는 50 μ m를 나타냄.

제 3 장 실험 방법

1. 형광 이미징

Hela, NIH-3T3, A549 그리고 MCF7 세포 모두 한국 세포주은행에서 분양받았으며 Hela 세포 및 NIH-3T3 세포의 경우 10% FBS와 streptomycin, penicillin, amphotericin B가 첨가된 DMEM 배양액을 사용하였고 A549와 MCF7의 경우 동일 조건의 RPMI 1640 배양액을 사용하였다. 위의 모든 세포는 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. live cell imaging의 경우 confocal dish에 12-24시간 동안 배양한 뒤 10 μ M의 IQ 화합물을 배양액에 섞어 1시간동안 처리하였고 washing 과정 없이 관찰하였다. Fixed cell imaging의 경우 coverslip위에 각 세포들을 12-24시간동안 배양한 다음 DPBS로 washing하였고 이 후 4% para-formaldehyde로 상온에서 10분 동안 고정시키고 DPBS에 희석된 0.5% Triton X-100을 2분간 상온에서 처리하였다. 이 후 10 μ M IQ 화합물을 1시간동안 처리한 뒤 DPBS로 washing 후 slide glass에 mounting하여 관찰하였다. 세포 형광은 TCS-SP8 confocal laser microscopy (Leica, Germany)에서 40배율 렌즈를 이용해 488nm laser를 광원으로하여 관찰하였다.

2. Cell-based high throughput screening

Hela cell을 black 96 well cell carrier (PerkinElmer, USA)에 각 well당 1X10⁴로 seeding한 뒤 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. live cell imaging의 경우, 배양된 세포에 IQ 화합물을 10 μ M의 농도로 30분간 배양액 상

에 처리한 뒤 media를 100 μ l DPBS로 교체하고 Operetta (PerkinElmer, USA)를 이용해 20배율 렌즈에서 스크리닝을 수행했다. Fixed cell imaging의 경우, 배양된 세포에 IQ 화합물들을 10 μ M의 농도로 배양액에 30분 동안 처리한 뒤 DPBS로 washing한 후 4% paraformaldehyde에 10분 동안 상온에서 고정시켰다. 이후 DPBS로 washing한 뒤 각 well당 DPBS 100 μ l를 첨가한 상태에서 operetta를 이용해 스크리닝을 수행했다. 이미지 분석은 Harmony software를 이용해 수행하였다.

3. 흡광 및 형광 측정

흡광 스펙트럼의 경우 Lambda 25 UV/Vis spectrometer (PerkinElmer, USA)를 이용하여 측정하였으며. 형광 스펙트럼의 경우 FP-6500 spectrofluorometer (JASCO, Japan)를 이용하여 측정하였다.

1-10 mM의 IQ stock을 이용하여 각 실험에 맞는 농도로 실험을 진행했다. 형광 스펙트럼의 경우, 2 μ M의 농도로 진행하였으며 DMSO에서 확인한 최대 흡수 파장을 이용하여 형광 스펙트럼을 확인하였다. 이 때 H₂O, DMSO, Ethanol, Methanol, Methylene chloride, Tris-HCl buffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4)들을 용매로 이용하여 스펙트럼을 얻었다. 측정 band width는 excitation의 경우에 3 nm, emission의 경우에 5 nm으로 설정하였다.

Singlet Oxygen QY의 경우, 용매로는 10분간 aerated된 DMSO를 이용하였으며 광원으로는 FP-6500 spectrofluorometer (JASCO, Japan)상의 Xe lamp (shielded lamp house, 150 W)를 이용하여 cuvette상에 356nm 파장의 빛을 excitation 및 emission에서 band width를 5 nm으로 설정하고 2분 동안 조사하였

다. 빛에 의한 ROS형성은 광원조사 이후에 DPBF (Alfa Aesar, USA)의 411nm에 서의 흡광 감소를 Lambda 25 UV/Vis spectrometer (PerkinElmer, USA)를 이용하여 확인함으로써 ROS 형성량을 파악하였다. 위의 과정을 총 14분 동안 반복하였고 반복 시마다 1분간 aeration을 추가하였다. 이후 Rose Bengal (Alfa Aesar, USA)를 기준으로 Singlet oxygen QY을 0.76으로 설정하여 Singlet oxygen QY를 계산하였다.

DNA 및 RNA 적정 실험의 경우, Calf Thymus DNA (Sigma, USA) 및 Torula yeast RNA (Sigma, USA)를 Tris-HCl buffer (20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4)에 용해하여 이용하였다.

4. RNase에 의한 RNA분해

Hela cell을 cover slip위에 12-24시간동안 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 배양시킨다. DPBS로 washing한 이 후 4% paraformaldehyde로 10분간 상온에서 고정시켰다. 다음으로 DPBS로 washing한 후 DPBS에 희석된 0.5% Triton X-100을 2분간 상온에서 처리하였다. 이 후 DPBS로 washing한 뒤 10 μM의 IQ6, IQ16, IQ36을 1시간 동안 처리하였다. 그 다음에 30 mg/mL RNase A(Thermo Fischer)를 처리하고 2시간 동안 37 ° C에서 배양하였다. RNase A를 처리하지 않거나 1 μM의 SYTO RNaselect (Molecular probes, USA)만을 처리한 세포를 대조군으로 이용하였다. Slide glass에 mounting 후 형광 변화는 TCS-SP8 Confocal laser microscopy (Leica, Germany)를 통해 확인하였다.

5. Counter-staining

DAPI를 이용한 경우, Hela cell을 cover slip위에 12-24시간동안 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 배양시키고 DPBS washing이후 4% paraformaldehyde로 10분간 상온에서 고정화 시킨다. 다음으로 10 μM IQ6, IQ16, IQ36를 30분간 처리하였다. DPBS로 washing 한 뒤 1 μg/ml DAPI를 15분간 상온에서 처리하였고 이어서 DPBS로 washing 후 Slide glass에 mounting하여 TCS-SP8 Confocal laser microscopy (Leica, Germany)를 통해 형광을 확인하였다.

Hoechst33258을 이용한 경우, confocal dish에 Hela 세포를 12-24시간동안 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 10 μM IQ36을 배양액 상에서 1시간 동안 처리한 뒤 5 μg/mL Hoechst 33258 (Molecular Probe, USA)를 실온에서 30분 동안 처리하였다. 다음 DPBS로 washing 한 뒤 배양액상에서 TCS-SP8 confocal laser microscopy (Leica, Germany)를 통해 관찰하였다.

Mitotracker를 이용한 경우, Confocal dish에 Hela 세포를 12-24시간동안 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 10 μM IQ18을 배양액 상에서 1시간 동안 처리한 뒤 200 nM Mitotracker Red(Molecular probe, USA)가 희석된 배양액으로 교체하여 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 30분 동안 추가 처리하였다. 이 후 DPBS로 washing한 뒤 배양액상에서 TCS-SP8 confocal laser microscopy (Leica, Germany)를 통해 관찰하였다.

Lytotracker를 이용한 경우, Confocal dish에 Hela 세포를 12-24시간동안 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 10 μM IQ-MP1 및 IQ-MP2를 배양액상에서 1시간 동안 처리한 뒤 50 nM LysoTracker Red(Molecular probe, USA)가 희석된 배양액으로 교체하여 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 30분 추가 처리하였다. 이 후 DPBS로 washing 한 뒤 배양액에서 TCS-SP8 confocal laser microscopy

(Leica, Germany)를 통해 관찰하였다.

6. 광안전성 평가

TCS-SP8 confocal laser microscopy (Leica, Germany)에 설치된 laser를 광원으로 이용하여 IQ 화합물들의 광안정성을 확인하였다. IQ 화합물들과 SYTO RNaselect (Molecular probe, USA) 의 경우 Multi Argon Gas laser (20 mW)에 의한 488 nm laser를 광원으로 이용하여 493 nm 이상의 파장을 수집하였고 Mitotracker Red와 Lysotracker Red (Molecular probe, USA) 의 경우 Diode-Pumped Solid State laser (20 mW)에 의한 561 nm laser를 광원으로 하여 566 nm 이상의 파장을 수집하였다. 각 광원이 나타내는 최대 출력의 50%의 세기로 laser를 1분간 조사하였고 그에 따른 세포내의 형광 세기 변화를 관찰하였다.

7. 세포 독성 평가

Hela, NIH-3T3, A549 및 MCF7 를 이용하여 세포생존율의 변화를 MTT assay 방법으로 확인하였다. 96 well plate에 각 well당 1×10^4 cell의 세포를 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 배양한 뒤 1, 5, 10 μ M의 IQ 화합물을 배양액에 처리하였다. 이 후 24시간 동안 추가 배양한 뒤 MTT (Molecular probe, USA)를 DPBS에 녹여 5 mg/mL의 MTT solution을 만든 뒤 각 well에 20 μ L MTT solution를 첨가하고 3시간동안 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 추가 배양하였다. 다음으로 각 well에 배양액을 모두 제거하고 100 μ L DMSO를 추가하여 세포내의 Formazin crystal을 용해시켰으며 이어서 Mithras2 plate reader (Berthold Technologies, Germany)를 이용해 570 nm에서 흡광값을

측정하였다. Cell viability를 확인하기 위한 대조군으로는 DMSO를 처리한 세포군을 이용하였다.

8. 시간변화에 따른 형광 이미징

Confocal dish에 HeLa, MCF7 및 NIH-3T3세포를 12-24시간 동안 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 배양한 후 10 μM의 IQ 화합물을 배양액에 희석하여 1-3시간 동안 처리하였다. 이 후 washing 과정 없이 TCS-SP8 confocal laser microscopy (Leica, Germany)에서 관찰하였다. 이 때 광원으로 488nm laser를 이용하여 광원 최대 출력의 50% 세기로 1분 동안 조사하였으며 그에 따른 세포내의 형광 변화를 488nm laser를 이용하여 확인하였다.

9. 광독성 평가

HeLa, MCF7, A549 세포를 이용하여 빛에 따른 IQ의 세포독성을 MTT assay의 방식으로 확인하였다. 96 well plate에 각 well당 1x10⁴ cell의 세포를 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 뒤 1, 2, 5, 10 μM의 IQ 화합물을 1시간 동안 처리하였다. 이 후 새로운 배양액으로 교체한 뒤 Blue LED (470nm, 800-850 lux)를 광원으로 이용해 0, 5, 10분 동안 빛을 조사하였다. 그 다음에 24시간 동안 배양한 뒤 20uL MTT solution (5 mg/mL)를 첨가하고 3시간 동안 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 추가 배양하였다. 이후 각 well에 배양액을 모두 제거하고 100 uL DMSO를 추가하여 세포내의 Formazin crystal을 용해시킨 뒤 Mithras2 plate reader (Berthold Technologies, Germany)를 이용해 570nm에서 흡광값을

측정하였다. cell viability를 확인하기 위한 대조군은 DMSO를 처리한 세포를 이용하였다.

10. DNA photocleavage

pBR322 plasmid의 경우, pBR322 plasmid (NEB, USA)를 XL-1 strain에 transformation한 뒤 Exprep plasmid SV kit (Geneall, Korea)를 이용하여 원하는 농도의 pBR322 plasmid를 얻었다.

이 후 1000ng/ul의 pBR322 plasmid를 1분간 aerated된 Tris-HCl buffer(20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 7.4) 상에 1 μ M, 10 μ M, 20 μ M 그리고 40 μ M IQ 화합물과 혼합한 뒤 blue LED (470nm, 800-850 lux)를 광원으로 하여 30분 동안 빛을 조사하였다. 빛 조사 이후, 각 sample들을 10 μ l을 취하여 Safe pinky(GenDEPOT, USA) 으로 prestainig된 1% agarose gel에 loading하고 TAE(Tris-acetic acid-EDTA) buffer에서 100 V의 전압으로 1 시간동안 전기영동을 수행하였다. 이 후 LAS 4000(GE healthcare, USA)의 EtBR filter를 통하여 각 조건에 따른 DNA의 절단 정도를 확인하였다. 동일 조건에 빛을 조사하지 않은 plasmid를 대조군으로 이용하였다.

11. DHE를 통한 세포 내 활성산소종 측정

Hela cell을 black 96 well cell carrier (PerkinElmer, USA)에 각 well당 1×10^4 로 seeding한 뒤 37 ° C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이 후 IQ 화합물을 0, 1, 10, 20, 40 μ M의 농도로 1시간 동안 배양액 상에 처리한 뒤 10 μ M DHE가 섞여있는 배양액으로 교체했다. 30분 동안 추가 배양한 다음 Blue

LED(470nm, 800–850 lux)를 광원으로 하여 15분 동안 빛을 조사했다. 이어서 DPBS로 washing한 후 4% paraformaldehyde에 10분 동안 상온에서 고정시켰다. 이 후 DPBS로 washing한 뒤 각 well당 DPBS 100 μ l를 첨가한 상태에서 operetta를 이용해 스크리닝을 수행했다. 이미지 분석은 Harmony software를 이용해 수행하였다.

12. 빛 조사에 따른 미토콘드리아 이미징

Confocal dish에 Hela세포를 12–24시간 동안 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 배양한 뒤 10 μ M의 IQ18과 IQ52가 희석된 배양액에 1시간동안 처리하였다. 이 후 200 nM Mitotracker Red (Molecular Probe, USA)가 희석된 배양액으로 교체하여 30분 동안 추가 처리하였다. 그 다음 DPBS로 washing하고 배양액으로 교체한 뒤 TCS–SP8 confocal microscopy (Leica, Germany)에서 빛 조사에 따른 세포내의 미토콘드리아의 변화양상을 형광을 통해 관찰하였다. 광원으로는 488nm laser를 이용하였으며 광원 최대 출력의 50% 세기로 1분 동안 조사하였고 그에 따른 미토콘드리아의 변화양상은 488nm 및 561nm laser를 이용하여 IQ18 또는 IQ52의 형광과 Mitotracker Red의 형광을 통해 확인하였다.

13. TMRE staining

Confocal dish에 Hela, MCF7 및 NIH–3T3 세포를 12–24시간 동안 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 배양한 뒤 10 μ M의 IQ18 및 IQ52를 1시간동안 처리하였다. 이 후 Blue LED (470nm, 800–850 lux)를 광원으로 하여 5분 동안 빛을 조사하였고 TMRE (Tetramethylrhodamine ethyl ester, Sigma, USA)을 세포배양액에

50 nM이 되도록 희석하여 배양액을 교체하고 30분 동안 추가 배양하였다. DPBS로 washing 뒤에는 새로운 배양액으로 교체하고 TCS-SP8 confocal laser microscopy (Leica, Germany)에서 561nm laser를 이용해 미토콘드리아에서 나타나는 형광 변화를 관찰하였다. 대조군으로는 IQ 화합물을 처리하지 않은 세포를 이용하였다.

14. PI(Propidium iodide) staining

96 well plate에서 각 well당 1×10^4 cell의 Hela 세포를 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 뒤 0, 5, 10 μ M의 IQ 화합물을 1시간 동안 처리하였다. 이어 새로운 배양액으로 교체한 뒤 blue LED (470 nm, 800-850 lux)을 이용해 5 분 동안 빛을 조사하였다. 그 다음에 14시간 동안 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 추가 배양한 뒤 PI solution (1 μ g/mL in DPBS)를 첨가하고 30분 동안 상온에서 염색하였다. 이 후 DPBS로 washing하고 100 μ l의 DPBS를 각 well에 채운 뒤 Axiovert 200M (Carl Zeiss, Germany) 형광현미경을 통해 PI에 염색된 세포 수를 관찰하였다. 대조군으로는 DMSO를 처리한 세포 및 빛을 조사하지 않은 세포를 이용하였다.

15. Hoechst를 이용한 DNA fragmentation 확인

96 well plate에 각 well당 1×10^4 cell의 Hela 세포를 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 뒤 0, 5, 10 μ M의 IQ 화합물을 1시간 동안 처리하였다. 이 후 새로운 배양액으로 교체한 뒤 Blue LED (470 nm, 800-850 lux)를 이용해 5 분 동안 빛을 조사하였다. 이 후 37 ° C 및 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안

배양하였다. 다음으로 DPBS으로 washing하였고 이어서 4% paraformaldehyde를 각 well에 100 μ l씩 분주하여 상온에서 10분간 고정화시켰다. DPBS washing 뒤, 5 μ g/mL Hoescht 33258(Molecular Probe, USA)를 각 well에 분주하여 15분 동안 상온에서 염색하였다. 이어 DPBS washing 이후, 100 μ l의 DPBS를 다시 각 well에 채운 뒤 Axiovert 200M (Carl Zeiss, Germany) 형광현미경을 이용하여 세포핵의 형태를 관찰하였다. DMSO를 처리한 세포 및 빛을 조사하지 않은 세포를 대조군으로 설정하였다.

제 4 장 결론 및 고찰

본 연구에서는 Indolizino[3,2-c]quinolones (IQ) 유도체들이 가지는 생물학적 활용 및 의의를 밝히고자 하였다. 먼저, IQ 구조에서 A, B 및 E ring에 존재하는 치환기들에 따라 살아있는 세포 내에서 화합물의 성질이 바뀌는 현상을 관찰하였다. 특히, E ring의 변화는 세포 내의 분포양상에 극적인 변화를 유도하였으며 이러한 변화는 IQ 유도체 마다 인지하는 세포내의 생체물질이 다르기 때문임을 밝혔다. 이를 통해 IQ 구조에서 미세한 구조 변화를 통해서 특정 생체물질을 선택적으로 인지하는 새로운 구조의 형광단을 개발할 수 있는 가능성을 제시하였다.

여러 IQ 유도체들 중 IQ16와 DNA 프로브로, IQ36은 RNA 프로브로 응용이 가능함을 확인하였다. 또한 이들은 형광단이 가져야 할 낮은 세포독성, 높은 광안전성, 좋은 세포투과성을 모두 지니고 있었기에 IQ구조가 형광단으로 가치있는 구조임을 확인하였다. 특히 IQ36의 경우, 현재 시판되는 RNA 프로브가 많지 않다는 점을 고려할 때 새로운 RNA 프로브의 발견은 의미있다 할 수 있다. 더 나아가 특정 소기관으로 분포를 유도한다고 알려진 치환기를 도입하여 새로운 IQ 유도체를 설계하였고 예상과 같은 분포를 확인하였다. 이를 통해 IQ 화합물에서 이론적인 구조 설계가 적용 가능하며 높은 응용 가능성을 제시하였다.

IQ 유도체들은 이미징을 위한 형광단뿐만 아니라 광역학 치료분야에서도 응용될 수 있음을 확인하였다. 실험을 통해 IQ 화합물들이 광역학 치료제로의 작용할 수 있는 기전은 다음과 같이 예측된다. IQ18의 경우, 첫번째로 핵막을 통과하기 보다는 미토콘드리아 내부에 존재하는 DNA에 영향을 미쳐 ROS형성에 따른 DNA damage를 유발할 것으로 유추된다. 두번째로 미토콘드리아의 세포막에도 영향을

미처 막투과성을 낮추고 막전위가 사라지는 등 미토콘드리아의 붕괴를 유도할 것이다. 더 나아가 이러한 붕괴는 미토콘드리아 내부에 존재하는 caspase와 같은 apoptosis 유도 물질들이 세포질 쪽으로 노출시킬 것이며 추후에는 일련의 과정을 통해 세포사멸이 일어나는 것이라 유추된다. 특히 IQ18의 경우, 미토콘드리아가 붕괴되는 과정에서 미토콘드리아 부분의 형광이 점차 강해지는 특징을 보였으므로 특정 소기관을 타겟하면서 동시에 세포기전을 관찰할 수 있는 광학적 치료제로써 가치가 있다고 판단된다. 단, 미토콘드리아에서 일어나는 산화적 스트레스에 대한 기전은 아직 뚜렷하게 밝혀지지 않았기 때문에 IQ18에 의한 산화 환원작용에 따른 미토콘드리아 안에서의 작용기전 및 형광이 증가되는 현상을 밝히기 위해서는 관련된 추가 연구들이 필요할 것이다.

또한 비록 MTT assay에서는 세포간의 뚜렷한 세포독성 차이는 나타나지 않았으나 이미징을 통해 세포 사멸을 관찰하였을 때에는 세포마다 형광강도 및 형태학적 변화에서 차이점들을 확인하였다. 그러므로 추후 연구를 통해 암세포 특이적인 광감각제를 개발할 수 있을 것이라 생각된다.

이처럼 IQ 화합물들은 이미징 분야에서부터 광학적 치료제까지 다양한 생물학적인 응용이 가능함을 밝혔다. 더 나아가 IQ 화합물은 제시하지 않은 분야에서도 응용될 수 있을 것이다. 첫째로 합성과정 비교적 용이하기 때문에 구조변화가 용이하다는 성질을 지니며 두번째로 구조변화에 따른 특성변화 역시 다양하게 나타나기 때문이다. 그러므로 본 연구는 새로운 형광단 및 광학적 치료제로써 가치있는 물질 및 구조를 제시하였다는데 의의를 가진다.

참 고 문 헌

1. Miller, A.; Tanner, J., *Essential of Chemical Biology*. third ed.; Wiley: 2007.
2. Lavis, L. D.; Raines, R. T., Bright Building Blocks for Chemical Biology. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9* (4), 855–866.
3. Schaferling, M., The Art of Fluorescence Imaging with Chemical Sensors. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2012**, *51* (15), 3532–3554.
4. Guo, Z.; Park, S.; Yoon, J.; Shin, I., Recent progress in the development of near-infrared fluorescent probes for bioimaging applications. *Chem. Soc. Rev.* **2014**, *43* (1), 16–29.
5. Ghosh, K. K.; Jeong, Y. M.; Kang, N. Y.; Lee, J.; Si Yan Diana, W.; Kim, J. Y.; Yoo, J.; Kim, D.; Kim, Y. K.; Chang, Y. T., The development of a nucleus staining fluorescent probe for dynamic mitosis imaging in live cells. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2015**, *51* (45), 9336–8.
6. Kowada, T.; Maeda, H.; Kikuchi, K., BODIPY-based probes for the fluorescence imaging of biomolecules in living cells. *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44* (14), 4953–4972.
7. Zhang, S.; Fan, J.; Li, Z.; Hao, N.; Cao, J.; Wu, T.; Wang, J.; Peng, X., A bright red fluorescent cyanine dye for live-cell nucleic acid imaging, with high photostability and a large Stokes shift. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2* (18), 2688.

8. Stephens, D. J.; Allan, V. J., Light microscopy techniques for live cell Imaging. *Science* **2003**, *300* (5616), 82–86.
9. Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. third ed.; Springer: 2006.
10. Park, S.; Kwon, D. I.; Lee, J.; Kim, I., When Indolizine Meets Quinoline: Diversity–Oriented Synthesis of New Polyheterocycles and Their Optical Properties. *ACS Comb. Sci.* **2015**, *17* (8), 459–469.
11. Kim, Y. K.; Lee, J. S.; Bi, X. Z.; Ha, H. H.; Ng, S. H.; Ahn, Y. H.; Lee, J. J.; Wagner, B. K.; Clemons, P. A.; Chang, Y. T., The Binding of Fluorophores to Proteins Depends on the Cellular Environment. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (12), 2761–2763.
12. Yamaguchi, E.; Wang, C. G.; Fukazawa, A.; Taki, M.; Sato, Y.; Sasaki, T.; Ueda, M.; Sasaki, N.; Higashiyama, T.; Yamaguchi, S., Environment–Sensitive Fluorescent Probe: A Benzophosphole Oxide with an Electron–Donating Substituent. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2015**, *54* (15), 4539–4543.
13. Zhuang, Y. D.; Chiang, P. Y.; Wang, C. W.; Tan, K. T., Environment–Sensitive Fluorescent Turn–On Probes Targeting Hydrophobic Ligand–Binding Domains for Selective Protein Detection. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2013**, *52* (31), 8124–8128.
14. Er, J. C.; Tang, M. K.; Chia, C. G.; Liew, H.; Vendrell, M.; Chang, Y. T., MegaStokes BODIPY–triazoles as environmentally sensitive turn–on fluorescent dyes. *Chem. Sci.* **2013**, *4* (5), 2168–2176.

15. Sunahara, H.; Urano, Y.; Kojima, H.; Nagano, T., Design and synthesis of a library of BODIPY-based environmental polarity sensors utilizing photoinduced electron-transfer-controlled fluorescence ON/OFF switching. *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129* (17), 5597–5604.
16. Abrahamse, H.; Hamblin, M. R., New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J* **2016**, *473* (4), 347–64.
17. Lovell, J. F.; Liu, T. W. B.; Chen, J.; Zheng, G., Activatable Photosensitizers for Imaging and Therapy. *Chem. Rev.* **2010**, *110* (5), 2839–2857.
18. Dolmans, D. E. J. G. J.; Fukumura, D.; Jain, R. K., Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *3* (5), 380–387.
19. Agostinis, P.; Berg, K.; Cengel, K. A.; Foster, T. H.; Girotti, A. W.; Gollnick, S. O.; Hahn, S. M.; Hamblin, M. R.; Juzeniene, A.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Mroz, P.; Nowis, D.; Piette, J.; Wilson, B. C.; Golab, J., Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA: a cancer journal for clinicians* **2011**, *61* (4), 250–81.
20. Acedo, P.; Stockert, J. C.; Canete, M.; Villanueva, A., Two combined photosensitizers: a goal for more effective photodynamic therapy of cancer. *Cell death & disease* **2014**, *5*, e1122.
21. Mallidi, S.; Anbil, S.; Bulin, A. L.; Obaid, G.; Ichikawa, M.; Hasan, T., Beyond the Barriers of Light Penetration: Strategies, Perspectives and Possibilities for Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2016**, *6* (13), 2458–

2487.

22. Makhseed, S.; Machacek, M.; Alfadly, W.; Tuhl, A.; Vinodh, M.; Simunek, T.; Novakova, V.; Kubat, P.; Rudolf, E.; Zimcik, P., Water-soluble non-aggregating zinc phthalocyanine and in vitro studies for photodynamic therapy. *Chemical communications (Cambridge, England)* **2013**, *49* (95), 11149–51.
23. Jia, X.; Yang, F. F.; Li, J.; Liu, J. Y.; Xue, J. P., Synthesis and in vitro photodynamic activity of oligomeric ethylene glycol-quinoline substituted zinc(II) phthalocyanine derivatives. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (14), 5797–805.
24. Li, H.; Jensen, T. J.; Fronczek, F. R.; Vicente, M. G., Syntheses and properties of a series of cationic water-soluble phthalocyanines. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (3), 502–11.
25. Dysart, J. S.; Patterson, M. S., Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Phys Med Biol* **2005**, *50* (11), 2597–616.
26. Moan, J.; Berg, K., The Photodegradation of Porphyrins in Cells Can Be Used to Estimate the Lifetime of Singlet Oxygen. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *53* (4), 549–553.
27. Ogilby, P. R., Singlet oxygen: there is indeed something new under the sun. *Chem. Soc. Rev.* **2010**, *39* (8), 3181–3209.
28. Rajendran, L.; Knolker, H. J.; Simons, K., Subcellular targeting strategies for drug design and delivery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **2010**, *9* (1), 29–42.

29. Fulda, S.; Galluzzi, L.; Kroemer, G., Targeting mitochondria for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **2010**, *9* (6), 447–64.
30. Weinberg, S. E.; Chandel, N. S., Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat. Chem. Biol.* **2015**, *11* (1), 9–15.
31. Marrache, S.; Dhar, S., Engineering of blended nanoparticle platform for delivery of mitochondria-acting therapeutics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109* (40), 16288–93.
32. Zhang, C.-J.; Hu, Q.; Feng, G.; Zhang, R.; Yuan, Y.; Lu, X.; Liu, B., Image-guided combination chemotherapy and photodynamic therapy using a mitochondria-targeted molecular probe with aggregation-induced emission characteristics. *Chem. Sci.* **2015**, *6* (8), 4580–4586.
33. Scheer, U.; Hock, R., Structure and function of the nucleolus. *Curr. Opin. Cell Biol.* **1999**, *11* (3), 385–390.
34. Tsai, R. Y.; Pederson, T., Connecting the nucleolus to the cell cycle and human disease. *FASEB J.* **2014**, *28* (8), 3290–6.
35. Johnson, I. S. M. T. Z., *Molecular Probes Handbook, A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies*. Eleventh edition ed.; 2010.
36. Peng, X.; Wu, T.; Fan, J.; Wang, J.; Zhang, S.; Song, F.; Sun, S., An effective minor groove binder as a red fluorescent marker for live-cell DNA imaging and quantification. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50* (18), 4180–3.
37. Feng, S.; Kim, Y. K.; Yang, S.; Chang, Y. T., Discovery of a green DNA probe for live-cell imaging. *Chemical communications (Cambridge, England)*

2010, 46 (3), 436–8.

38. Song, G.; Sun, Y.; Liu, Y.; Wang, X.; Chen, M.; Miao, F.; Zhang, W.; Yu, X.; Jin, J., Low molecular weight fluorescent probes with good photostability for imaging RNA-rich nucleolus and RNA in cytoplasm in living cells. *Biomaterials* **2014**, 35 (7), 2103–2112.
39. Zhou, B.; Liu, W.; Zhang, H.; Wu, J.; Liu, S.; Xu, H.; Wang, P., Imaging of nucleolar RNA in living cells using a highly photostable deep-red fluorescent probe. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 68, 189–96.
40. Lalande, M. E.; Ling, V.; Miller, R. G., Hoechst 33342 Dye Uptake as a Probe of Membrane-Permeability Changes in Mammalian-Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1981**, 78 (1), 363–367.
41. Christensen, K. A.; Myers, J. T.; Swanson, J. A., pH-dependent regulation of lysosomal calcium in macrophages. *J. Cell Sci.* **2002**, 115 (Pt 3), 599–607.
42. Wan, Q.; Chen, S.; Shi, W.; Li, L.; Ma, H., Lysosomal pH rise during heat shock monitored by a lysosome-targeting near-infrared ratiometric fluorescent probe. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2014**, 53 (41), 10916–20.
43. Peceli, D.; Hu, H.; Fishman, D. A.; Webster, S.; Przhonska, O. V.; Kurdyukov, V. V.; Slominsky, Y. L.; Tolmachev, A. I.; Kachkovski, A. D.; Gerasov, A. O.; Masunov, A. E.; Hagan, D. J.; Van Stryland, E. W., Enhanced intersystem crossing rate in polymethine-like molecules: sulfur-containing squaraines versus oxygen-containing analogues. *J. Phys. Chem. A* **2013**,

- 117 (11), 2333–46.
44. Lim, S. H.; Thivierge, C.; Nowak–Sliwinska, P.; Han, J.; van den Bergh, H.; Wagnieres, G.; Burgess, K.; Lee, H. B., In vitro and in vivo photocytotoxicity of boron dipyrromethene derivatives for photodynamic therapy. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (7), 2865–74.
45. Scaduto, R. C., Jr.; Grotyohann, L. W., Measurement of mitochondrial membrane potential using fluorescent rhodamine derivatives. *Biophys. J.* **1999**, *76* (1 Pt 1), 469–77.
46. Chen, L. B., Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol* **1988**, *4*, 155–81.
47. Buytaert, E.; Dewaele, M.; Agostinis, P., Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1776* (1), 86–107.
48. Taylor, R. C.; Cullen, S. P.; Martin, S. J., Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2008**, *9* (3), 231–41.
49. Elmore, S., Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35* (4), 495–516.
50. Rello, S.; Stockert, J. C.; Moreno, V.; Gamez, A.; Pacheco, M.; Juarranz, A.; Canete, M.; Villanueva, A., Morphological criteria to distinguish cell death induced by apoptotic and necrotic treatments. *Apoptosis* **2005**, *10* (1), 201–8.
51. Ziegler, U.; Groscurth, P., Morphological features of cell death. *News*

Physiol Sci **2004**, *19*, 124–8.

52. Castano, A. P.; Mroz, P.; Hamblin, M. R., Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer* **2006**, *6* (7), 535–45.

Abstract

Studies on the Indolizino [3,2- c]quinoline as environment-sensitive probes and photosensitizers

Kwon Soonbum
College of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

Live cell imaging using small organic fluorophores has emerged as a powerful approach to visualizing dynamic cellular processes. Compared to other methods, it is a non-invasive method that enables real-time readout of various dynamic processes in live cells.

Here, we characterized the environmentally sensitive properties of indolizino [3,2-c]quinolines (IQs), a new fused heterocyclic system, for bio-imaging application. The environment-sensitive features of IQs yielded desirable properties for no-wash live cell imaging. In addition, substituents on the E ring dramatically affected the subcellular location by enabling recognition of different molecular targets as DNA and RNA inside the cell, leading to the development of RNA (IQ36) and DNA (IQ16) selective probes.

We demonstrated that IQs were mainly localized in specific cellular organelles including lysosomes or mitochondria. The ease of synthesis, low cytotoxicity, good photostability compared to commercial dyes, and a large stoke shift ensured that the newly developed IQ series shows promise as a live cell imaging tool.

We also reported the characterization of IQ-based photosensitizers. IQs with furan or thiophene were found to generate reactive oxygen species (ROS) upon light irradiation which could be used in photodynamic therapy. In particular, IQ18 was able to selectively accumulate in mitochondria under irradiation as a light-up probe. Further investigations of IQ series will provide a new opportunity for the development of novel photosensitizers.

Keywords : Fluorescence, Heterocycle, Environment-sensitive probe, Photodynamic therapy

Student number : 2015-21861