

유전자 전달에서 양친매성 디펩티드들을 결합시킨 폴리아미도아민 덴드리머의 증대된 형질주입 효율

이제일[#] · 이선화[#] · 최준식[†] 

충남대학교 생화학과

(2018년 3월 22일 접수, 2018년 4월 23일 수정, 2018년 4월 23일 채택)

Enhanced Transfection Efficiency of PAMAM Dendrimer Conjugated with Amphiphilic Dipeptides in Gene Delivery

Jeil Lee[#], Sun Hwa Lee[#], and Joon Sig Choi[†] 

Department of Biochemistry, Chungnam National University, Gung-dong 220, Yuseong-gu, Daejeon 34134, Korea

(Received March 22, 2018; Revised April 23, 2018; Accepted April 23, 2018)

초록: 폴리아미도아민(PAMAM) 덴드리머는 널리 이용되는 비바이러스성 벡터 중 하나이며 생분해성 잔기를 가지고 있기 때문에 비교적 낮은 세포독성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 빈약한 유전자 전달 능력은 폴리아미도아민 덴드리머의 생체 내 연구 및 임상적용에 장벽으로 작용하고 있다. 이러한 문제를 극복하기 위해서 폴리아미도아민 덴드리머 3차와 4차에 양친매성의 디펩티드인 라이신과 페닐알라닌을 도입하고 형질주입 능력을 평가하였다. 표면개질되지 않은 폴리아미도아민 덴드리머 3차, 4차와 비교할 때, 라이신과 페닐알라닌을 도입한 폴리아미도아민 덴드리머 4차는 HeLa, HepG2 세포 주에서 향상된 형질주입 효율을 나타내었고 또한 비교적 낮은 세포독성을 나타내었다. 이러한 결과들은 고분자들에 라이신, 페닐알라닌 디펩티드의 도입은 빈약한 유전자 전달 능력을 향상시킬 수 있음을 암시한다.

Abstract: Polyamidoamine (PAMAM) dendrimer consisting of biodegradable functional groups is one of the non-viral vectors and has showed relatively low cytotoxicity. However, its poor transfection efficiency acts as a barrier of *in vivo* research and medical application. To overcome this problem, we introduced amphiphilic KF dipeptides to PAMAM generation 3 and 4, and evaluated transfection efficiency. Compared with those of native PAMAM generation 3 and 4, PAMAM generation 4-KF showed enhanced transfection efficiency in HeLa and HepG2 cell lines. These results imply that introduction of KF dipeptide to polymers can improve the transfection efficiency.

Keywords: gene delivery, non-viral vector, polyamidoamine, transfection efficiency, cytotoxicity.

서 론

유전자 치료란 외부로부터 치료유전자의 도입을 통해 유전자 수준에서 질병의 치료를 목적으로 하는 모든 기술들을 일컬으며 치료 유전자를 전달하는 방법으로는 전기천공법(electroporation), 유전자총(gene gun), 미량주사법(micro-injection) 등과 같은 물리적 방법과 “벡터” 라고 불리는 전달체를 이용하는 방법이 있다.¹

“벡터”는 바이러스를 이용하는 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 나뉘어진다.

바이러스성 벡터는 우수한 유전자 전달 능력을 나타내지만, 레트로바이러스(retrovirus) 벡터들의 경우 무작위로 숙주 세포에 유전자를 삽입하기 때문에 점 돌연변이에 의한 암 발생 가능성을 내포하고 있으며 아데노바이러스(adenovirus) 벡터들의 경우 대부분의 사람들이 감기에 의한 아데노바이러스에 감염 경험이 있기 때문에 체내 항체들을 가지고 있으며 실제 임상에 적용할 때 면역반응에 의해 유전자 전달 효율이 급격히 감소할 수 있는 단점을 가지고 있다.

이외에도 바이러스 벡터들은 공통적으로 비교적 큰 면역반응을 보이며 심할 경우 환자의 사망가능성을 가지는 등, 안전성 측면에서 많은 문제들을 가지고 있으므로 이러한 단점을 보완하기 위해 비바이러스성 벡터들의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되었다.

비바이러스 벡터들에는 양이온성 고분자(cationic polymer),

[#]These authors contributed equally to this work.

[†]To whom correspondence should be addressed.

joonsig@cnu.ac.kr, ORCID  0000-0002-8463-841X

©2018 The Polymer Society of Korea. All rights reserved.

양이온성 리피드(cationic lipid), 무기나노입자(inorganic nanoparticle) 등이 있다.^{1,2}

비바이러스 벡터들 중에서, 양이온성 고분자들은 표면의 개질과 대량생산이 용이하며 낮은 면역원성과 정전기적 인력을 통한 비교적 높은 세포침투능력을 가지기 때문에 유전자 전달을 위한 유망한 수단으로 여겨진다.

고분자들을 기반으로 하는 유전자 전달의 경우 음전하를 띠는 핵산(nucleic acid)들과 정전기적 인력에 의한 결합으로 폴리플렉스(polyplex)라고 불리는 나노 입자를 형성하는데 이 폴리플렉스들은 내포작용(endocytosis)을 통해 엔도솜(endosome)에 둘러싸여 세포 내로 유입되는데 엔도솜으로부터 폴리플렉스들의 탈출이 어렵다는 단점이 있다.³

따라서 바이러스성 벡터들과 비교할 때 낮은 유전자 전달 효율을 지니며, 비교적 좋지 않은 생분해성 문제와 세포 표면 및 소기관과 강한 정전기적 결합에 의해 야기되는 세포 독성은 해결해야 할 과제로 남아 있다.

이러한 생분해성 문제를 극복하기 위해서 개발된 고분자가 폴리아미도아민(polyamidoamine) 덴드리머이며, 폴리아미도아민 덴드리머는 에틸렌디아민(ethylenediamine)을 코어로 하여 마이클첨가(michael addition)를 통해 펩티드 결합(peptide bond)으로 구성된 고분자로 좋은 생분해성을 지니게 되었으나 생분해성 잔기가 없는 폴리에틸렌이민(polyethylenimine)과 비교할 때 여전히 낮은 유전자 전달능력을 지니고 있다. 여러 연구자들은 이 문제를 해결하기 위해서 고분자 말단의 잔기에 아미노산(amino acid), 세포에 존재하는 특이적 수용체(receptor)에 대한 리간드(ligand) 및 소수성 리간드, 항체(antibody), 핵 수송 신호 펩티드(nuclear localization signal peptide) 등을 도입하여 유전자 전달 능력을 향상시켰다.⁴

본 연구에서는 안정적인 폴리플렉스가 형성되고 세포침투성을 지닌다면 유전자 전달 효율을 향상시킬 수 있을 것이라는 가설을 세우고, 폴리아미도아민 덴드리머의 유전자 전달 능력을 향상시키기 위해 2개의 일차 아민(primary amine)을 가지고 있으며 pKa 값이 높아서 수용액상에서 이온화가 잘 되어 양전하를 띠기 때문에 핵산과 잘 결합하여 안정적인 폴리플렉스 형성을 유도하는 라이신(lysine)과 소수성을 띠는 세포막과 세포소기관 막에 대한 높은 침투성을 가지는 것으로 알려진 페닐알라닌(phenylalanine)을 폴리아미도아민 덴드리머 말단 잔기에 도입하고, 이를 이용한 폴리플렉스 형성과 크기 및 전하와 같은 물리적 특성을 확인하고 세포에 대한 유전자 전달 효율과 독성 평가실험을 통한 유전자 전달체로서의 기능을 확인하였다.

실 험

시약 및 재료. 본 실험에서 사용된 polyamidoamine dendrimer ethylenediamine core generation 4 solution

(PAMAM G4), ninhydrin, *N,N*-dimethylformamide(DMF), polyamidoamine dendrimer ethylenediamine core generation 3 solution(PAMAM G3), ethidium bromide(EtBr), diisopropylethylamine(DIPEA), piperidine, triisopropylsilane(TIS), trifluoroacetic acid(TFA), dimethylsulfoxide(DMSO)는 Sigma-aldrich(Seoul, South Korea)사를 통해 구입하였다. *N*-hydroxybenzotriazole(HOBt), Fmoc-Phe-OH, 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium(HBTU), Fmoc-Lys(Boc)-OH는 Novabiochem(San Diego, CA, USA)사에서 구입하였다. Luciferase 1000 assay kit와 5X Reporter Lysis Buffer는 Promega(Madison, WI, USA)사를 통해 구입하였다. EZ-cytotoxicity reagent는 Daeil Lab service에서 구입하였으며, Micro BCA Protein Assay Kit는 Pierce(Rockford, IL, USA)를 통해 구입하였다.

Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM), dulbecco's phosphate buffered saline(DPBS), fetal bovine serum(FBS)과 100X antibiotic-antimycotic reagent, picogreen reagent, bisbenzimidazole(Hoechst 33342), Alexa 546 Nucleic Acid Labeling Kit는 Thermo Fisher Scientific(Seoul, South Korea)에서 구입하였다. Luciferase 발현이 가능한 유전자 pCN-Luciferase 플라스미드 DNA는 이전에 발표된 논문을 참고하여 준비하였다.⁵

세포주. HeLa(human epithelial ovary carcinoma) 세포주와 HepG2(Human hepatocellular liver carcinoma) 세포주는 1% antibiotic-antimycotic reagent와 10% FBS를 포함하는 DMEM을 이용해 배양시켰고, 배양기 내의 환경은 37°C, 5% CO₂, 95% 습도를 유지시켰다.

PAMAM Generation 3-K 합성. 2:1(v/v)의 무수 DMF/DMSO 혼합물에 PAMAM Generation 3(PAMAM G3)를 용해시키고, PAMAM G3에 4당량에 해당하는 HOBt, HBTU, Fmoc-Lys(Boc)-OH를 정량한 후 무수 DMF에 용해시키고 PAMAM G3 용액에 첨가한 후 PAMAM G3에 8당량에 해당하는 DIPEA를 첨가한 후 상온에서 18시간 동안 반응시킨다. 그 후에 합성물을 디에틸에테르에 침전시킨 후, 원심분리하고 상층에 디에틸에테르를 제거하고 다시 과량의 디에틸에테르를 이용해 침전물을 씻어준다. 침전물을 질소가스를 이용해 건조시킨 후 7:3(v/v)의 DMF/piperidine 혼합물에 용해시킨 후, 암조건 하에서 Fmoc 보호기에 대한 탈보호(deprotection) 반응을 2시간 동안 진행하였다. 이후에 다시 디에틸에테르 상에 반응물을 침전시키고 앞에서 언급한 것과 동일한 방법으로 디에틸에테르를 제거하고 이를 이용해 침전물을 씻어준 후, 침전물을 건조시키고 Boc 보호기를 제거하기 위해 Boc 탈보호 용액(95:2.5:2.5, TFA/TIS/3차 증류수)에 용해시키고 2시간 동안 반응시켰다. 이후에 디에틸에테르에 반응물을 침전시킨 후 언급된 것과 동일하게 디에틸에테르를 제거하고 침전물을 씻어준 후, 3차 증류수에 용해시킨 후 투

석막(MWCO 3500, spectra/por)에 옮긴 후 18시간 동안 투석을 진행하였다. 투석을 완료한 최종합성물은 동결건조하고, 합성률을 확인하기 위해 600 MHz nuclear magnetic resonance (NMR) 분광계인 AVANCE III 600(Bruker Korea Co., Ltd, Seongnam, South Korea)을 이용해 ^1H NMR 스펙트럼을 측정하였다.

PAMAM Generation 3-KF 합성. 앞서 PAMAM generation 3-K(PAMAM G3-K)를 합성하는 방법과 동일하게 PAMAM G3에 라이신을 합성한 후 7:3(v/v)의 DMF/piperidine 혼합물에 용해시킨 후, 암조건 하에서 Fmoc 보호기에 대한 탈보호(deprotection) 반응을 2시간 동안 진행하였다. 이후에 디에틸 에테르 상에 반응물을 침전시키고, 원심분리를 통해 디에틸 에테르를 제거하고, 다시 과량의 디에틸에테르를 이용해 침전물을 씻어준 후, 침전물을 건조시키고 PAMAM G3에 4당량에 해당하는 HOBt, HBTU, Fmoc-Phe-OH를 정량한 후 무수 DMF에 용해시키고 PAMAM G3-K 용액에 첨가한 후 PAMAM G3에 8당량에 해당하는 DIPEA를 첨가한 후 상온에서 18시간 동안 반응시켰다. 이후에 PAMAM G3-K의 합성과정과 동일하게 PAMAM G3-KF의 Fmoc 보호기를 제거한 후, 얻어진 침전물을 3차 증류수에 용해시키고 투석막(MWCO 3500, spectra/por)에 옮긴 후 18시간 동안 투석을 진행하였다. 투석을 완료한 최종합성물은 동결건조하고, 합성률을 확인하기 위해 앞에서 언급한 것과 동일한 NMR 분광계인 AVANCE III 600(Bruker Korea Co., Ltd, Seongnam, South Korea)을 이용하여 ^1H NMR 스펙트럼을 측정하였다.

PAMAM Generation 4-K 합성. 2:1(v/v)의 무수 DMF/DMSO 혼합물에 PAMAM Generation 4(PAMAM G4)를 용해시키고, PAMAM G4에 4당량에 해당하는 HOBt, HBTU, Fmoc-Lys(Boc)-OH를 정량한 후 무수 DMF에 용해시키고 PAMAM G4 용액에 첨가한 후 PAMAM G4에 8당량에 해당하는 DIPEA를 첨가한 후 상온에서 18시간 동안 반응시켰다. 그 후에 앞서 언급한 PAMAM G3-K의 합성 방법과 동일한 방법으로 Fmoc, Boc 보호기를 제거한 후 얻어진 침전물을 3차 증류수에 용해시키고 투석막(MWCO 3500, spectra/por)에 옮긴 후 18시간 동안 투석을 진행하였다. 투석을 완료한 최종합성물은 동결건조하고, 합성률을 확인하기 위해 앞에서 언급한 것과 동일한 NMR 분광계인 AVANCE III 600(Bruker Korea Co., Ltd, Seongnam, South Korea)을 이용하여 ^1H NMR 스펙트럼을 측정하였다.

PAMAM Generation 4-KF 합성. 앞서 PAMAM generation 4-K(PAMAM G4-K)를 합성하는 방법과 동일하게 PAMAM G4에 라이신을 합성한 후 Fmoc 보호기를 제거하고 PAMAM G4에 4당량에 해당하는 HOBt, HBTU, Fmoc-Phe-OH를 정량한 후 무수 DMF에 용해시키고 PAMAM G4-K 용액에 첨가한 후 PAMAM G4에 8당량에 해당하는 DIPEA를 첨가한 후 상온에서 18시간 동안 반응시켰다. 이후에 PAMAM G4-K

의 합성과정과 동일하게 PAMAM G4-KF의 Fmoc 보호기를 제거한 후, 얻어진 침전물을 3차 증류수에 용해시키고 투석막(MWCO 3500, spectra/por)에 옮긴 후 18시간 동안 투석을 진행하였다. 투석을 완료한 최종합성물은 동결건조하고, 합성률을 확인하기 위해 앞에서 언급한 것과 동일한 NMR 분광계인 AVANCE III 600(Bruker Korea Co., Ltd, Seongnam, South Korea)을 이용하여 ^1H NMR 스펙트럼을 측정하였다.

플라스미드 DNA와 PAMAM G3-K, G3-KF, G4-K, G4-KF의 Complex Test. 0.5 μg 의 pCN-Luci 플라스미드 DNA를 기준으로 해서 다양한 중량비의 PAMAM G3, G3-KF와 PAMAM G4, G4-KF를 준비한 후 혼합시키고, 이 혼합물에 HEPES buffer(125 mM HEPES, pH 7.4)를 첨가하여 전체 부피를 10 μL 가 되도록 하고 폴리플렉스가 형성되도록 30분 동안 상온에 두었다. 그 후에 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 의 EtBr이 첨가된 0.7% 아가로스젤 상에서 100 V로 30분 동안 1 mg/mL 농도의 TAE buffer 상에서 전기영동시키고 자외선 투영 장치를 이용해 분석하였다.

입도분석기를 이용한 폴리플렉스의 직경 측정. 2 μg 의 pCN-Luci 플라스미드 DNA를 기준으로 해서 최적의 형질주입(transfection) 효율을 나타내는 중량비의 PEI 25 kDa, PAMAM G3, G3-KF와 PAMAM G4, G4-KF를 준비하고 DNA와 혼합하여 30분 동안 상온에 두었다. 그 후에 각각 3차 증류수를 첨가하여 전체부피가 800 μL 가 되게 한 후, ELSZ-2000S(Photal, Otsuka Electronics, Otsuka, Japan)를 이용하여 측정하였다.

제타전위 측정기를 이용한 폴리플렉스의 제타전위 측정. 입도분석기를 이용해 폴리플렉스를 분석하는 것과 동일한 조건으로 PEI 25 kDa, PAMAM G3, G3-KF, PAMAM G4, PAMAM G4-KF를 준비한 후, Zetasizer Nano ZS(Malvern instruments Ltd, Malvern, UK)를 이용하여 측정하였다.

세포 내 형질주입 실험. 합성된 PAMAM G3-KF, PAMAM G4-KF의 세포 내 형질주입 효율을 측정하기 위해서 HeLa와 HepG2 세포주를 각각 96 well plate에 well 당 18000 세포/100 μL 의 조건으로 세포를 분주한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 95% 습도 조건에서 배양하였다. 0.5 μg 의 pCN-Luci 플라스미드 DNA를 기준으로 해서 다양한 중량비의 PAMAM G3-KF와 PAMAM G4-KF를 준비한 후 혼합시키고 세포 배양액을 첨가하여 전체 부피가 30 μL 가 되게 하여 폴리플렉스를 만들고, 각각의 세포주가 분주된 후 배양기에 배양된 시간이 17시간에 도달할 때 준비된 폴리플렉스들을 세포에 처리하고, 그 후에 24시간 동안 세포들을 배양하였다. 배양된 세포들의 배양액을 제거한 후, DPBS로 세포들을 씻어주고 다시 DPBS를 제거한다. DPBS를 제거한 후, 1 mg/mL 농도의 Reporter Lysis Buffer를 well당 100 μL 씩 처리하고 상온에서 30분 동안 반응시켜 세포들을 용해시키고 생성된 용해물들을 미량원심분리기 상에서 13200 rpm의 속도로 10분간 원심분리를 진

행하였다. 그 후에 상층액을 분리하여 Micro BCA Protein Assay Kit를 이용해 생성된 단백질을 정량하고 Lumat LB 9507 루미노미터(Berthold Technology, Bad Wildbad, Germany)를 이용해 루시페라아제(luciferase) 활성을 측정하여 최종적인 수치를 RLU/ μg protein으로 나타내었다.

세포 내 독성 측정. 합성된 PAMAM G3, G3-KF, PAMAM G4, G4-KF의 세포독성을 확인하기 위해 HeLa와 HepG2 세포주를 각각 96 well plate에 well당 18000 세포/100 μL 의 조건으로 세포를 분주한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 95% 습도조건에서 배양하였다. 배양된 시간이 17시간에 도달할 때, 다양한 농도로 준비된 PEI 25 kDa, PAMAM G3, G3-KF, PAMAM G4, G4-KF를 세포에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 세포들의 배양시간이 24시간에 도달하기 2시간 전에 Ez-Cytox reagent WST-1시약을 각 well당 10 μL 씩 처리한 후 2시간 동안 반응시키고 ELISA 마이크로플레이트리더(VERSAmax, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)에서 450 nm의 조건에서 흡광도를 측정하였다.

공초점 형광현미경 실험. 실험을 진행하기 전에 Alexa 546 Nucleic Acid Labeling Kit의 protocol에 명시된 것과 동일하게 pCN-Luci 플라스미드 DNA를 형광표지하였다. 간단히 언급하자면 다음과 같다. pCN-Luci 플라스미드 용액과 그 부피의 1/10에 해당하는 3M sodium acetate 버퍼 용액, 그 부피의 2배에 해당하는 순도 99% 이상의 에탄올을 준비하여

혼합한 후 -70 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 냉동시켰다. 그 후에 15분 동안 미량원심분리기에서 12000 rpm의 속도로 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 70% 에탄올로 침천물을 씻어준 후 Nuclease-free H_2O component H를 넣어주고 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 간 DNA를 변성시키고 식혀주었다. 변성된 DNA 양에 맞게 적정량의 ULS reagent를 넣어준 후 80 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 두었다. 다시 식혀준 후 gel filtration-based spin column을 통해 ULS reagent를 제거한 후, DNA를 정량하였다. 이후에 HeLa 세포주를 1 $\mu\text{-Slide}$ 8 well(Ibidi)에 5000 세포/200 μL 의 조건으로 세포를 분주한 후 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 , 95% 습도조건에서 배양하였다. 그 후에 형질주입 실험과 동일하게 배양시간에 17시간에 도달할 때 Alexa 546 형광표지된 DNA와 PEI 25 kDa, PAMAM G3, G3-KF, PAMAM G4, PAMAM G4-KF의 폴리플렉스를 넣어준 후 24시간 동안 배양하였다. 공초점 현미경으로 분석하기 20분 전에 세포핵 염색시약인 Hoechst 33342를 처리한 후, 10분 동안 반응시키고 Zeiss LSM 5 Live laser scanning microscope(Carl Zeiss, Jena, Germany)를 이용해 관찰하였다.

결과 및 토론

PAMAM G3-K, G3-KF, G4-K, G4-KF의 합성. 본 연구에서는 1차 아민 2개를 가지고 있는 라이신(K)을 PAMAM

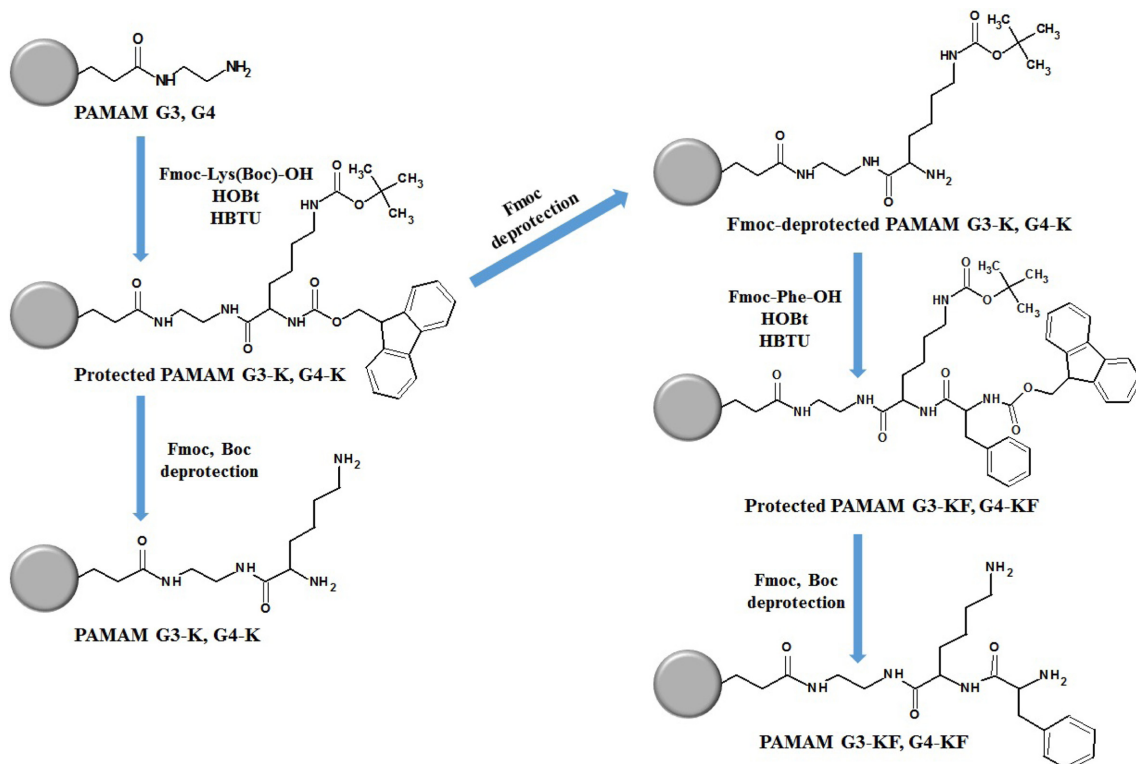


Figure 1. Synthesis scheme of PAMAM G3-K, G3-KF, G4-K and G4-KF.

G3와 G4 말단 잔기에 도입하고, 그 후에 페닐알라닌(F)을 도입하여 성공적으로 합성하였다. 합성은 Figure 1과 같이 진행하였고, ¹H NMR 분석(Figure 2)을 통해 PAMAM G3-K, PAMAM G4-K는 각각 99% 이상임을 확인하였고, PAMAM G3-KF는 라이신이 97% 합성되었고 페닐알라닌은 95% 합성되어 전체적인 KF 디펩티드의 합성률은 95%이고, PAMAM G4-KF는 라이신이 99%, 페닐알라닌이 98%가 합성되어 전체적인 KF디펩티드의 합성률을 98%임을 확인하였다. 합성물에 대한 NMR 스펙트럼분석은 다음과 같다.

PAMAM G3-K: δ 1.45 (라이신의 수소 -CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 1.72 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 1.82 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 2.46 (PAMAM의 수소 -NCH₂CH₂CO-), 2.69 (PAMAM의 수소 -CONHCH₂CH₂N-), 2.87 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 3.03(PAMAM의 수소 -NCH₂CH₂CO-), 3.35 (PAMAM의 수소 -CONHCH₂CH₂NHCO-, -CONHCH₂CH₂NHCO-), 3.72 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-).

PAMAM G4-K: δ 1.44 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 1.72 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 1.78 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 2.45 (PAMAM의 수소 -NCH₂CH₂CO-), 2.67 (PAMAM의 수소 -CONHCH₂CH₂N-), 2.86 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 3.03 (PAMAM의 수소 -NCH₂CH₂CO-), 3.35 (PAMAM의 수

소 -CONHCH₂CH₂NHCO-, -CONHCH₂CH₂NHCO-), 3.60 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-).

PAMAM G3-KF: δ 1.33 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 1.66 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 1.74 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 2.41 (PAMAM의 수소 -NCH₂CH₂CO-), 2.62 (PAMAM의 수소 -CONHCH₂CH₂N-), 2.81 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 2.97 (PAMAM의 수소 -NCH₂CH₂CO-), 3.02 (페닐알라닌의 수소 -NHCOCH(CH₂C₆H₅)NH₂-), 3.28 (PAMAM의 수소 -CONHCH₂CH₂NHCO-, -CONHCH₂CH₂NHCO-), 3.90 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 4.22 (페닐알라닌의 수소 -NHCOCH(CH₂C₆H₅)NH₂-), 그리고 세개의 피크 7.25, 7.34, 7.37는 페닐알라닌의 페닐잔기의 수소를 나타낸다.

PAMAM G4-KF: δ 1.32 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 1.65 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 1.74 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 2.40 (PAMAM의 수소 -NCH₂CH₂CO-), 2.61 (PAMAM의 수소 -CONHCH₂CH₂N-), 2.80 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 2.97 (PAMAM의 수소 -NCH₂CH₂CO-, 페닐알라닌의 수소 -NHCOCH(CH₂C₆H₅)NH₂-), 3.27 (PAMAM의 수소 -CONHCH₂CH₂NHCO-, -CONHCH₂CH₂NHCO-), 3.82 (라이신의 수소 -CHCH₂CH₂CH₂CH₂NH₂-), 4.21 페닐알라닌의

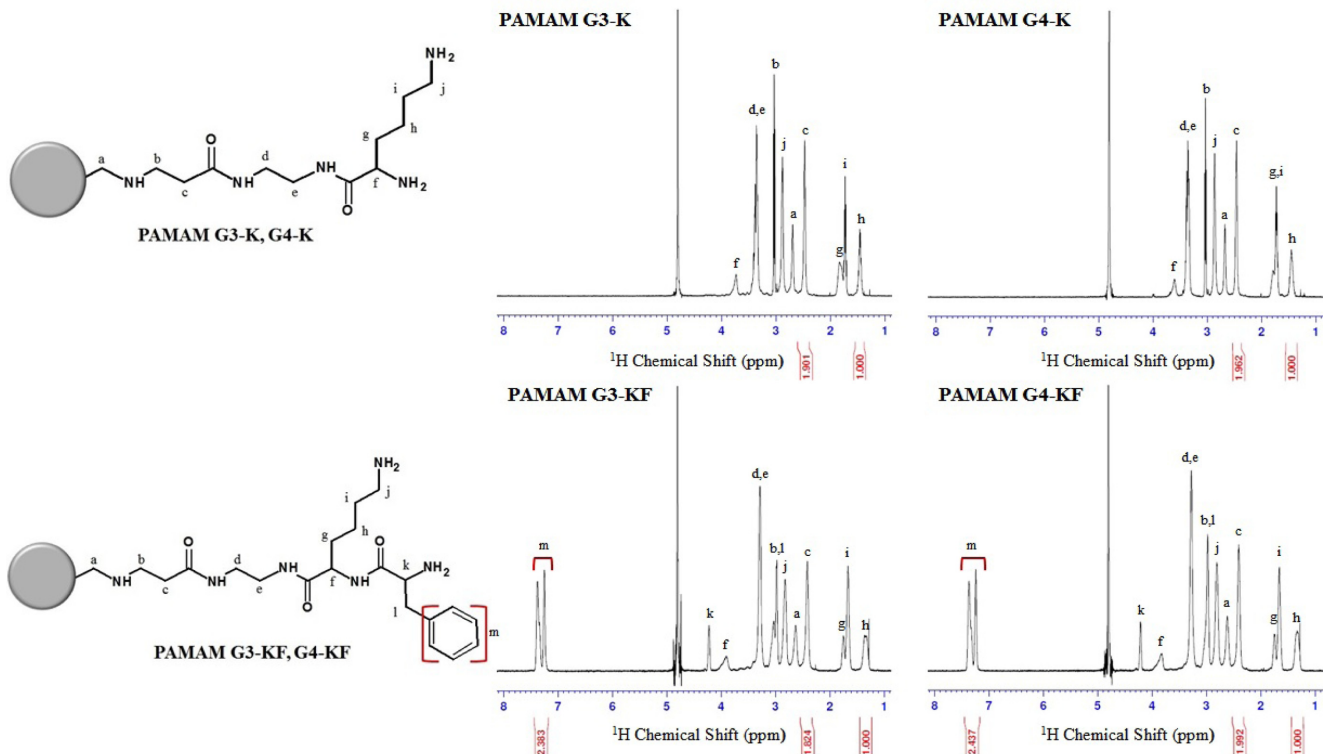


Figure 2. ¹H NMR data of PAMAM G3-K, G4-K, G3-KF and G4-KF.

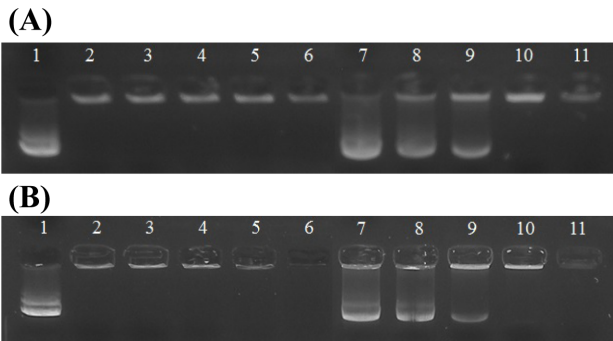


Figure 3. Agarose gel retardation assay for polyplexes of PAMAM G3 and G3-KF (A), and PAMAM G4 and G4-KF (B) with pCN-Luci plasmid DNA. Plasmid DNA only (lane 1 of A and B), the weight ratios of PAMAM-G3 and G4 (lanes 2-6 of A and B), G3-KF and G4-KF (lanes 7-11 of A and B) with pCN-Luci plasmid DNA = 0.5, 1, 2, 4, 8.

수소 $-NHCOCH(CH_2C_6H_5)NH_2$), 세 개의 피크 7.24, 7.32, 7.37는 페닐알라닌의 페닐잔기의 수소를 나타낸다. 페닐알라닌의 도입이 형질주입 효율에 미치는 영향을 확인하기 위한 대조군으로 PAMAM G3-K와 PAMAM G4-K를 합성하고 실험들을 진행하였다.

아가로스젤 전기영동을 이용한 폴리플렉스 형성 중량비 확인. 폴리플렉스가 안정적으로 생성될 때, 음전하를 띠는 DNA를 양이온성 고분자가 완전히 둘러싸게 되어 생성된 폴리플렉스는 양전하를 띠게 된다. 따라서 전기영동을 진행하게 되면 전기영동장치의 (-)극 방향으로 끌리게 되어 밴드가 내려가지 않게 되며, 반면에 폴리플렉스가 안정적으로 생성되지 않으면 DNA의 음전하를 띠는 부분이 노출되어 전기영동장치의 (+)극 방향으로 이끌려 밴드가 내려가게 된다. PAMAM G3-KF와 PAMAM G4-KF는 4:1의 중량비에서부터 폴리플렉스를 형성하기 시작하였다(Figure 3). 이전에 다른 연구자들의 연구결과에 의하면, PAMAM 덴드리머의 표면에 페닐알라닌을 도입할 때 PAMAM 덴드리머의 표면에 전자밀도가 감소하여 폴리플렉스를 형성하기 위해서 보다 많은 덴드리머가 필요하며, 그로 인해 폴리플렉스를 형성하는 중량비가 증가되는 현상이 나타난다고 언급하고 있는데 이 실험에서도 비슷한 경향을 나타내고 있음을 확인할 수 있었다.⁶

폴리플렉스들의 직경과 제타전위 측정. 아가로스젤 전기

영동을 통해서, G3-KF와 PAMAM G4-KF는 4:1의 중량비 이후에서 안정적이고 치밀한 폴리플렉스를 형성함을 확인하였다. PAMAM G4는 PAMAM G3보다 많은 일차아민을 가지고 있기 때문에 페닐알라닌을 도입할 때, 전자밀도 감소에 의한 효과는 PAMAM G3-KF보다 PAMAM G4-KF가 더 클 것이다. 따라서 PAMAM G4-KF 폴리플렉스는 PAMAM G3-KF 폴리플렉스보다 직경이 증가할 것이며, 안정적인 폴리플렉스를 형성하기 위해 보다 많은 덴드리머가 필요로 하기 때문에, 생성된 폴리플렉스는 상대적으로 높은 제타전위 값을 가지게 될 것이다. 우리는 이러한 가설을 확인하기 위해 두 암세포주들에서 비교적 최대의 형질주입효율을 나타내는 중량비의 폴리플렉스를 준비한 후, 그 직경과 제타전위를 측정하였고(Table 1), 실제로 PAMAM G4-KF는 PAMAM G3-KF보다 30 nm 정도 큰 직경을 나타내었고, 제타전위도 6 mV 정도 증가되는 것을 확인하였다.⁶⁻¹⁰

암세포주에서 형질주입효율. 많은 연구자들은 양이온성 고분자의 형질주입효율을 향상시키기 위한 수단으로 소수성 아미노산의 도입에 대해 주목해왔다.

소수성 아미노산은 세포막의 인지질과 효율적으로 소수성 상호작용을 형성하며 그로 인해 막 침투성을 지니기 때문에, 양이온성 고분자에 도입할 때 생성된 폴리플렉스는 엔도솜 탈출능력의 향상으로 형질주입 효율이 높아지는 것이 여러 연구들을 통해서 확인되었다.^{6,9-11} PAMAM 덴드리머에 소수성 아미노산들 중에서 특히 방향족 아미노산들을 도입할 때 비방향족 아미노산들을 도입한 것보다 폴리플렉스가 세포 내에서 쉽게 와해되기 때문에 보다 높은 형질주입효율을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 과도한 방향족아미노산들을 도입할 경우 PAMAM 덴드리머 표면으로 노출되는 전하의 밀도가 감소하여 안정적인 폴리플렉스 형성이 저해되며, 강한 소수성 상호작용에 의해 세포막을 손상시킬 수 있으며 그로 인해 상대적으로 높은 세포독성을 야기하기 때문에, 양전하와 방향족 잔기의 수가 균형을 이루는 것이 중요하며, 이러한 균형이 유지될 때 이상적인 형질주입효율을 나타낸다.⁶⁻¹⁰

앞선 연구결과들처럼, 페닐알라닌의 도입이 형질주입효율을 증가시키는지 확인하기 위해서 HeLa, HepG2 이 두 암세포주에서 형질주입실험을 수행하였다. 이전에 연구들을 바탕으로 PEI 25kDa과 PAMAM G3, G4는 각각 2:1, 16:1, 4:1의 중량비로 폴리플렉스를 준비하였고 PAMAM G3-KF와

Table 1. Diameter Measurement Using Dynamic Light Scattering and Zeta-potential Analysis of PAMAM Polyplexes

	PEI 25kDa	PAMAM G3	PAMAM G4	PAMAM G3-KF	PAMAM G4-KF
Weight ratio	2:1	16:1	4:1	12:1	12:1
Diameter (cumulants, nm)	196.9	873.4	303.8	119.3	149.6
ζ -potential (mV)	46.7±6	49.8±6	48.1±6	43.6±9	54.1±6
PDI	0.732	0.441	0.181	0.196	0.205

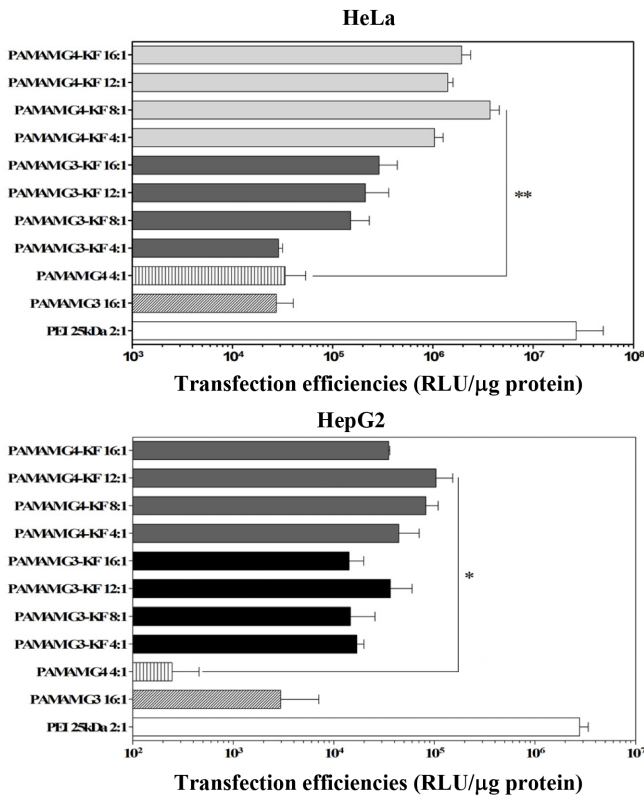


Figure 4. Transfection efficiencies of PEI 25 kDa, PAMAM G3, PAMAM G3-KF, PAMAM G4 and PAMAM G4-KF in various cell line. Data are shown as mean \pm standard deviation ($n = 3$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

PAMAM G4-KF는 다양한 중량비로 폴리플렉스를 준비하여 실험을 진행하였다.

본 연구에서 사용한 pCN-Luci 플라스미드 DNA가 세포에 형질주입되면 루시페라아제라는 효소가 발현되고, 발현된 루시페라아제는 루시페린이라는 물질을 옥시루시페린으로 산화시키는데 이 과정에서 발광이 일어나고, 이는 루미노미터를 이용해 측정할 수 있는데, 루미노미터는 광자의 수를 측정할 수 없고 이를 전류의 출력신호를 측정하므로 출력신호에 상대적이라고 하여 relative light unit(RLU)라는 단위를 사용하며 이를 이용하여 발광을 측정한다. 본 연구는 세포 용해물 10 μ L 내에 존재하는 μ g 중량의 단백질당 나타내는 RLU를 측정하였다. 형질주입능력이 뛰어나면 루시페라아제가 많이 발현되기 때문에 루시페린과 반응시킬때 비교적 높은 수치의 RLU 값이 측정되고 형질주입능력이 떨어지면 루시페라아제가 많이 발현되지 않기 때문에 비교적 낮은 수치의 RLU 값이 측정된다. 이러한 RLU 값의 크기를 통해서 형질주입능력을 평가할 수 있다. 흥미롭게도, 라이신과 페닐알라닌을 도입할 때 형질주입효율은 아미노산을 도입하지 않은 PAMAM 덴드리머보다 증가되었다. 형질주입효율의 증가는 PAMAM G3보다 PAMAM G4에서 두드러지게 나타났다.

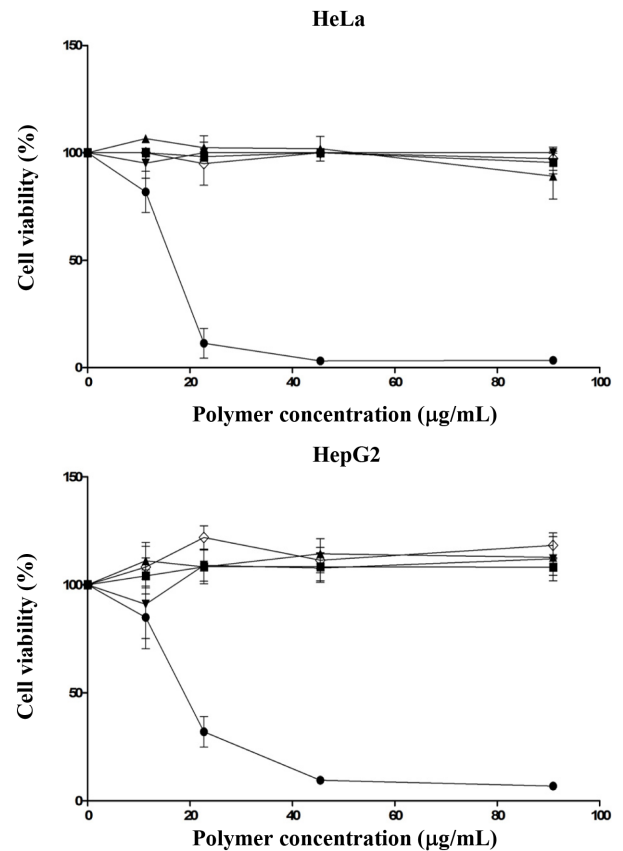


Figure 5. Cytotoxicity assay in various cell line. PEI 25kDa(●), PAMAM G3(■), PAMAM G4(▲), PAMAM G3-KF(▼) and G4-KF(◇). The data of respective point indicates average and standard deviation from quadruple.

PAMAM G4-KF는 PAMAM G4와 비교할 때, HeLa 세포주에서는 약 110배, HepG2 세포주에서는 약 420배 정도 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 실제로, 양이온성 고분자들에 의한 형질주입의 효율은 폴리플렉스를 형성하기 시작하는 중량비보다 어느정도 증가된 중량비에서 최고의 효율을 나타내는데, 그 이유는 폴리플렉스를 형성하는데 참여하지 못한 채로 남아있는 양이온성 고분자들 때문이다. 폴리플렉스 형성에 참여하지 못한 양이온성 고분자들은 세포막의 인지질과 정전기적 인력으로 결합하여 나노 크기의 구멍을 형성하며, 그로 인해 생성된 폴리플렉스들이 세포 내부로 보다 쉽게 유입될 수 있도록 도와주어 형질주입효율이 증가하게 된다.^{12,13} 나노 크기의 구멍 형성은 고분자가 가지고 있는 일차아민기의 수에 의존하며, 폴리플렉스 형성에 참여하지 않은 양이온성 고분자들의 수가 과도할 경우 세포독성을 유발하게 되므로 최적의 효율을 나타내기 위해서 적절한 양의 고분자들이 필요하다.¹⁴ PAMAM G3-KF는 PAMAM G4-KF와 비교할 때, 상대적으로 1차 아민 잔기의 수가 적고 세포막에 나노 크기의 구멍을 만드는 효율이 떨어지기 때문에, 형질주입의 효율의

차가 발생하였을 것이다.

세포 독성 평가. 합성된 PAMAM G3-KF, G4-KF의 세포 독성을 평가하기 위해서 water soluble tetrazolium(WST)을 이용하였다. WST는 살아있는 세포 내로 흡수되면 미토콘드리아 내에 존재하는 succinate-tetrazolium 환원효소에 의해 tetrazolium의 링 구조가 열리면서 450 nm에서 최대 흡광도를 보이는 수용성의 formazan으로 전환되는데, 죽은 세포에서는 효소가 활성을 나타내지 못하기 때문에 formazan을 분석하여 세포독성을 확인할 수 있다. 다양한 농도 조건의 PEI 25 kDa, PAMAM G3, G3-KF, PAMAM G4, PAMAM G4-KF를 준비한 후 HeLa, HepG2 세포주에 처리하였다(Figure 5). 전자 밀도의 감소는 안정적인 폴리플렉스의 형성을 방해하는 반면에 음전하를 띠는 세포막의 인지질과 강한 상호작용에 감소시켜 세포막 손상에 기인한 세포독성을 감소시킬 수 있다. PAMAM G3-KF와 PAMAM G4-KF의 낮은 세포독성은 이러한 현상에 의한 것으로 사료된다.

공초점 현미경을 이용한 유전자 전달능력 확인. 비바이러스성 벡터를 이용한 효율적인 플라스미드 DNA의 전달 및 형질주입을 위해서는 1차적으로는 많은 폴리플렉스들이 세포막을 거쳐 유입되어야 하고 2차적으로는 유입된 폴리플렉스들이 엔도솜으로부터 탈출하여 세포질 내로 방출되어야 한다.

또한 궁극적으로 핵막을 거쳐 핵 내부로 폴리플렉스들이 유입되어 DNA를 방출해야 원하는 유전자를 잘 발현시킬 수 있다. 형질주입 실험(Figure 4)에서 PAMAM G4-KF와 PAMAM G3, G4, PAMAM G3-KF의 형질주입효율의 차는 세포 내로 유입된 폴리플렉스들이 세포질 및 핵막 내부로 DNA를 전달하는 효율 차이에 기인한 것이라는 가설을 세우고 이를 확인하기 위해서 공초점 현미경을 이용해 확인하였다. HeLa 세포에 최적의 형질주입 효율을 나타내는 중량비의 폴리플렉스를 주입하였다(Figure 6). 관찰결과 PAMAM G3는 세포 내 플라스미드 DNA의 분포가 적었는데 이는 입도분석기를 이용한 분석결과로부터 짐작할 수 있듯이 세포 내로 유입되면 폴리플렉스의 크기와 전달효율이 효율적이지 못하여 세포 내로 폴리플렉스들이 잘 유입되지 못했기 때문인 것으로 사료된다. PAMAM G4, G3-KF는 PAMAM G3에 비해서 세포 내로 플라스미드 DNA가 많이 유입되었는데 핵막 내에 거의 존재하지 못하고 핵 내부가 아닌 핵의 주변부에 밀집되었다. 그러나 PAMAM G4-KF는 PEI 25 kDa처럼 핵 내부로 플라스미드 DNA를 잘 전달하였다. PAMAM G3, G4, PAMAM G3-KF 보다 비교적 큰 PAMAM G4-KF의 형질주입효율은 세포 내로 유입된 플라스미드 DNA를 핵 내부로 많이 전달했기 때문이며, 이는 PAMAM G4-KF의 극성 라이신 잔기와

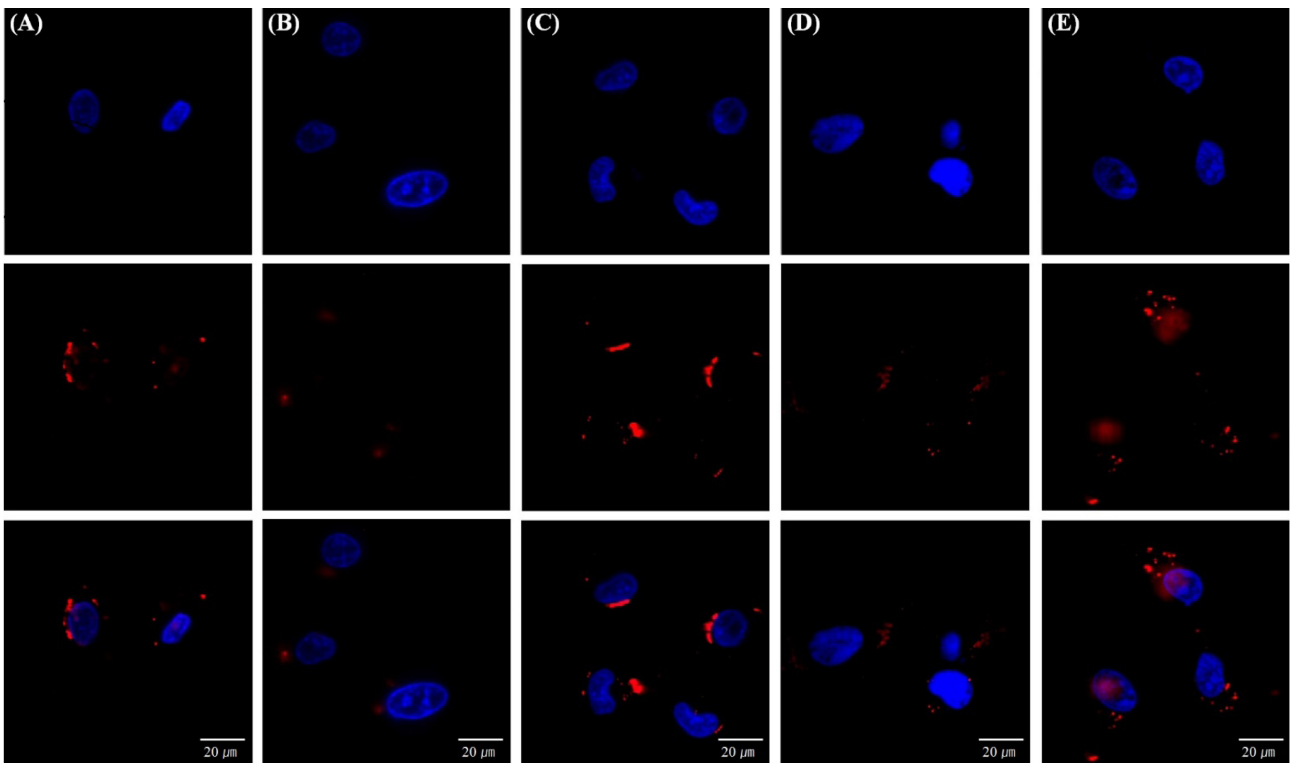


Figure 6. Confocal microscopy images of polyplexes of PEI 25 kDa (A); PAMAM G3 (B); PAMAM G4 (C); PAMAM G3-KF (D); PAMAM G4-KF (E) with plasmid DNA in HeLa cells. The upper column indicates Hoechst 33342-labelled nuclei (blue), middle column is Alexa Fluor 546-labelled plasmid DNA (red), and bottom column indicates the merged images between upper and middle.

소수성 페닐알라닌 잔기에 의한 폴리플렉스의 세포막 및 핵막 침투성이 증가하여 상대적으로 많은 플라스미드 DNA 전달에 기인한 것으로 사료된다.

결 론

결론적으로, 실험결과들은 페닐알라닌을 도입하는 것이 형질주입 효율을 개선할 수 있고, 생체 내 실험 및 임상연구에 사용가능성을 시사한다. 하지만, 형질주입의 효율이 증가되기 위해서는 소수성의 페닐잔기와 양전하를 띠는 일차아민의 수가 조화를 이루어야 하며 그러한 의미에서 라이신과 같은 아미노산의 도입이 필수적이다. 본 연구에서 PAMAM G4에 KF 디펩티드들을 도입할 때 두 암세포주에서 비교적 높은 형질주입 효율과 낮은 세포독성을 나타냈다. 이 결과들은 KF의 디펩티드의 도입은 PAMAM 덴드리머를 넘어 다양한 양이온성 고분자들이 가지고 있는 유전자 전달효율 문제를 해결할 수 있는 하나의 해결책이 될 수 있음을 보여주었다.

감사의 글: 본 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. M. Ramamoorth and A. Narvekar, *J. Clin. Diagn. Res.*, **9**, GE01 (2015).
2. J. H. Jeong, S. W. Kim, and T. G. Park, *Prog. Polym. Sci.*, **32**, 1239 (2007).
3. T. F. Martens, K. Remaut, J. Demeester, S. C. De Smedt, and K. Braeckmans, *Nano Today*, **9**, 344 (2014).
4. C. Dufes, I. F. Uchegbu, and A. G. Schatzlein, *Adv. Drug Delivery Rev.*, **57**, 2177 (2005).
5. H. W. Park, G. S. Yu, S. J. Song, and J. S. Choi, *Polym. Korea*, **39**, 727 (2015).
6. X. Wang, Y. He, J. Wu, C. Gao, and Y. Xu, *Biomacromolecules*, **11**, 245 (2010).
7. F. Wang, Y. Wang, H. Wang, N. Shao, Y. Chen, and Y. Cheng, *Biomaterials*, **35**, 9187 (2014).
8. F. Wang, K. Hu, and Y. Cheng, *Acta Biomater.*, **29**, 94 (2016).
9. K. Kono, H. Akiyama, T. Takahashi, T. Takagishi, and A. Harada, *Bioconjug. Chem.*, **16**, 208 (2005).
10. H. Chang, J. Zhang, H. Wang, J. Lv, and Y. Cheng, *Biomacromolecules*, **18**, 2371 (2017).
11. J. L. Santos, H. Oliveira, D. Pandita, J. Rodrigues, A. P. Pêgo, P. L. Granja, and H. Tomás, *J. Control. Release*, **144**, 55 (2010).
12. N. Lewinski, V. Colvin, and R. Drezek, *Small*, **4**, 26 (2008).
13. S. Vaidyanathan, B. G. Orr, and M. M. Banaszak Holl, *Acc. Chem. Res.*, **49**, 1486 (2016).
14. P. E. Smith, J. R. Brender, U. H. Durr, J. Xu, D. G. Mullen, M. M. Banaszak Holl, and A. Ramamoorthy, *J. Am. Chem. Soc.*, **132**, 8087 (2010).