

Novel Trimeric Complex for Efficient Uptake of Plasmid Vector into HepG2 Cells

Jong-Hyuck Joo^{1,2} and Jong-Gu Park^{1†}

¹Department of Medical Genetic Engineering, Keimyung University School of Medicine,
Dongsan-dong 194, Joonggu, Daegu 700-712, South Korea,

²Department of Biology, Chungnam National University, 220 Kung-Dong,
Yusonggu, Taejon 305-764, South Korea

Viral and non-viral vectors have been used in the delivery of genetic materials into animal cells and tissues, with each approach having pros and cons. Non-viral vectors have many useful merits such as easy preparation, low immunity and size tolerance of a transgene when compared to those of viral vectors. Delivery specificity may be achieved by complex formation between receptor ligands and a non-viral vector. In the present study, non-viral vector systems are investigated in an effort to find a practical delivery means for gene therapy. Receptor-ligand interaction between transferrin-receptor and transferrin was utilized for efficient gene transfer into cancer cells. A plasmid vector, pcDNA3 (*LacZ*) was ligated with a small duplexed oligo fragment in which a Biotin-VNTM phosphoramidite was placed in the middle of the oligo. The plasmid vector labeled by biotin was then conjugated with biotin-labeled transferrin via streptavidin. This trimeric conjugates were delivered to a hepatoma cell line, HepG2. The delivery efficiency of the trimeric conjugate was 2-fold higher than that of cationic liposomes used for transfection of a plasmid vector. These results demonstrate that a plasmid vector can be efficiently transferred into cells by forming a trimeric complex of plasmid vector-linker-ligand.

Key Words: Transferrin, Gene delivery, Trimeric complex, Biotin labeling

서 론

1990년에 현대 유전자 치료의 첫 시도라고 볼 수 있는 adenosine deaminase (ADA) deficiency 치료법 연구로부터 시작하여, 여러 유전자 치료 방법들이 고안되었다^{1,2}. 이에 상응하여 발전되어온 유전자의 세포 내 운반 방법 또한 많은 발전이 있었다. 이 방법에는 크게 바이러스 벡터^{3,4}와 비 바이러스 벡터^{5,6}를 이용한 방법이 사용되고 있다. 바이러스 벡터의 경우, 높은 효율로 유전자를 세포 내로 운반할 수 있지만 바이러스 감염이 가능한 숙주 세포 외에는 응용하기 어렵다. 또한, 운반할 수 있는 유전자의 크기 제한, 면역반응 유발 그리고, 성장 세포에 국한된 유전자의 전달능력 등의

문제가 있다^{4,7-9}.

이런 문제점들을 보완하기 위해 비 바이러스 복합체 벡터들이 개발되었고 일부 사용되고 있다. 실례로서 세포 수용체의 리간드를 플라스미드 벡터나 antisense oligonucleotide에 연결시킨 후 수용체 매개 endocytosis를 이용하는 방법이 개발되었으며 유전자와 특정 세포의 수용체 리간드를 연결시키는 데 polycation (poly-L-lysine)을 이용한 molecular conjugation 방법도 이용되고 있다¹⁰⁻¹⁴. 또한, cationic lipid를 이용하여 수용체 리간드 또는 항체를 유전자에 연결시키는 방법도 사용되고 있다^{15,16}. 위에 열거한 방법을 사용할 때 향상된 유전자 운반능력이 관찰되었고, 무엇보다도 목표로 하는 특정 세포 및 조직에 유전자를 전달할 수 있는 능력과 동물실험 응용 가능성이 제시되었다^{10,11}. 그럼에도 불구하고 비 바이러스 벡터 복합체의 제작이 좀더 용이하고 더불어 지속적으로 반복된 결과를 획득할 수 있는 복합체 전달 시스템 개발이 요구되고 있다.

현재, 유전자 전달에 조직 특이성을 부여하기 위해 transferrin 수용체 (Tfr)와 glycoprotein 수용체가 많이 응용되고 있다. 일반적으로 빠르게 분열하는 악성종양 세포나 헤모글로빈 생성 세포, placental trophoblast와 같이 철이온을 특별한 목

*논문 접수: 2003년 3월 26일

수정 접수: 2003년 5월 9일

†별책 요청 자: 박종구, (우) 700-310 대구광역시 중구 동산동 194, 계명대학교 의과대학 의학유전공학교실

Tel: 053-250-7854, Fax: 053-250-7854

e-mail: jonggu@dsmc.or.kr

*The present research has been conducted by grants of Keimyung University (the Bisa research grant) and of Korean ministry of health and welfare (96-M-4-1036).

적으로 필요로 하는 세포에서는 세포 표면에 매우 많은 수의 Tfr이 존재한다¹⁷⁻²⁰. 그리고, 간세포는 특이적으로 asialoglycoprotein 수용체를 가지고 있어 간세포 특이적 유전자 전달에 응용되고 있다^{10,11}. 본 실험의 유전자 운반에 응용된 세포 수용체는 Tfr로 철이온 수송 단백질인 transferrin (Tf)을 리간드로 한다. Hepatoma 세포인 HepG2 역시 많은 수의 Tfr을 발현하게 되는데, Tf는 이량체 형태로서 Tfr과 결합하여 endocytosis 되고 endoplasmic reticulum에 위치하게 된다. 곧이어, Tfr-Tf 복합체는 Golgi reticulum과 trans-Golgi reticulum을 통과하여 궁극적으로 acidic compartment에 위치하게 되고 Fe³⁺ 이온을 방출한다²¹.

본 실험에서 Tf를 플라스미드 벡터에 연결시키기 위하여 biotin과 결합하는 성질이 있는 streptavidin을 사용하였다^{25,26}. 플라스미드 벡터에 biotin을 연결시키기 위해, 중간에 위치한 하나의 염기로서 virtual nucleotide를 삽입한 DNA oligos를 합성하였다. 합성된 DNA oligos에는 제한효소 작용점을 양 말단에 위치시켰으며 플라스미드 벡터에 연결시켜 넣었다. 이렇게 완성된 biotin 벡터와 biotin 표지된 Tf 분자를 streptavidin을 이용하여 삼중 분자 결합체를 형성하였다. 본 연구에서는 이런 형태의 새로운 삼중 분자 결합체를 세포에 처리하여 유전자의 세포 내 도입 효율을 알아보았다.

재료 및 방법

1. 세포 배양

형성된 삼중 분자 결합체의 세포 내 도입에 사용된 세포주는 hepatoma 세포주인 HepG2를 사용하였다. HepG2 세포주는 DMEM (JBI, Korea) 배지에 10% 우 혈청 (JBI, Korea), penicillin (100 µg/ml) 그리고 streptomycin (100 u/ml, JBI, Korea)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포 배양기에서 배양하였다.

2. Biotin 표지 플라스미드 벡터 제작

Biotin 표지 플라스미드 벡터 제작에는 pcDNA3 (Invitrogen, USA)가 사용되었다. 다중 클로닝 부위를 *Not* I과 *Apa* I으로 자른 후, blunting 및 self-ligation을 하여 *Not* I, *Xho* I, *Xba* I 그리고 *Apa* I 제한효소 자리를 제거하였다. pcDNA3의 *Bsm* I으로 자르고, 여기에 *Not* I, *Xba* I 그리고 *Xho* I의 제한효소 카세트를 삽입하였다. 남아있는 다중 클로닝 부위의 *Hind* III와 *Bam* HI을 잘라 β-galactosidase gene을 클로닝하였다. 제한효소 카세트에 넣을 biotin이 결합된 삽입체 oligonucleotide는 각각 26-mer sense (5' GGCCGCAACG ACCCG-VN-GCCGAG-GCA 3') 그리고 26-mer antisense (5' TCGAGTGCCT CGGCG-CGGGT CGTTGC 3') oligonucleotide를 상보적으로 합성하였다. Sense oligonucleotide의 16번째 염기는 virtual nucleotide (VN)인 Biotin-VNTM phosphoramidite (CLONTECH, USA)를 oligonu-

cleotide 중간에 위치시켜 biotin이 돌출되게 하였다. Sense와 antisense oligonucleotide를 함께 95°C에서 2분간 가열한 후 상온까지 천천히 냉각하여 annealing 하였으며 생성된 결과물은 5'쪽에 *Not* I 그리고 3'쪽에는 *Xho* I의 제한효소 부위를 가지도록 하였다. 이를 *Not* I과 *Xho* I으로 자른 pcDNA3 플라스미드 벡터와 ligation 하여 biotin이 표지된 플라스미드 벡터를 생성하였다 (Fig. 1A).

3. Sense oligonucleotide의 biotin 표지 확인

Biotin 표지 삽입체 형성에 사용된 26-mer sense oligonucleotide에 biotin이 존재하는지 알아보기 위하여 biotin 특이적 *p*-dimethylaminocinnamaldehyde 발색반응을 보았다. Silica gel thin layer chromatography (TLC) plate (MERCK, Silica gel 60 F₂₅₄)에 실험군으로 sense oligonucleotide 15 µg과 대조군으로 biotin이 표지되지 않은 antisense oligonucleotide 15 µg 그리고 biotin이 표지된 transferrin (SIGMA) 75 µg을 각각 점적하였다. 점적한 TLC를 건조시키고, 2% *p*-dimethylaminocinnamaldehyde와 2% 황산이 함유된 95% 에탄올을 분무하였다. TLC를 천천히 가열하여 건조시키면서 핑크빛의 발색반응을 관찰하였다 (Fig. 1B).

4. 최적의 biotin 표지 플라스미드 벡터, streptavidin 그리고 biotin 표지 transferrin의 삼중 분자 결합체 형성 비율 결정

Biotin-표지 pcDNA3 플라스미드 벡터에 biotin-표지 transferrin (Sigma, USA)을 연결시켜 주는데 streptavidin (Sigma, USA)을 사용하였다 (Fig. 4). 최적의 삼중 분자 결합체 형성 조건을 알아보기 위하여 biotin 표지 sense oligonucleotide와 streptavidin 그리고 biotin 표지 transferrin을 이용한 gel retardation assay를 실시하였다. Biotin 표지 sense oligonucleotide 말단을 [γ -³²P] ATP로 표지하였다. 표지한 oligonucleotide, streptavidin 그리고 biotin-표지 transferrin을 다양한 비율로 복합체를 형성시켰다. 복합체 형성은 50 µl PBS 완충용액 안에서 실행하였으며 각 분자들을 해당 비율별로 넣은 후, 37°C에서 1 시간 동안 복합체를 형성시켰다. 각 형성된 복합체를 8% native PAGE gel에 150 V, 10 mA로 4시간 동안 전기영동하고 건조시켜 X-ray 필름 (Agfa, CURIX, RP1)에 감광하였다.

5. 방사성 동위원소를 이용한 삼중 분자 결합체의 세포 내 도입능력 확인

Biotin-표지 sense와 antisense oligonucleotide를 annealing 하고, [γ -³²P] ATP로 5'-말단을 표지하였다. pcDNA3 (제한효소 카세트가 삽입된)를 *Not* I/*Xho* I 제한효소로 자른 후, 앞서 준비한 삽입체와 ligation을 수행하여 biotin-표지 플라스미드 벡터를 만들었다. 이렇게 준비된 biotin-표지 플라스미드 벡터 2

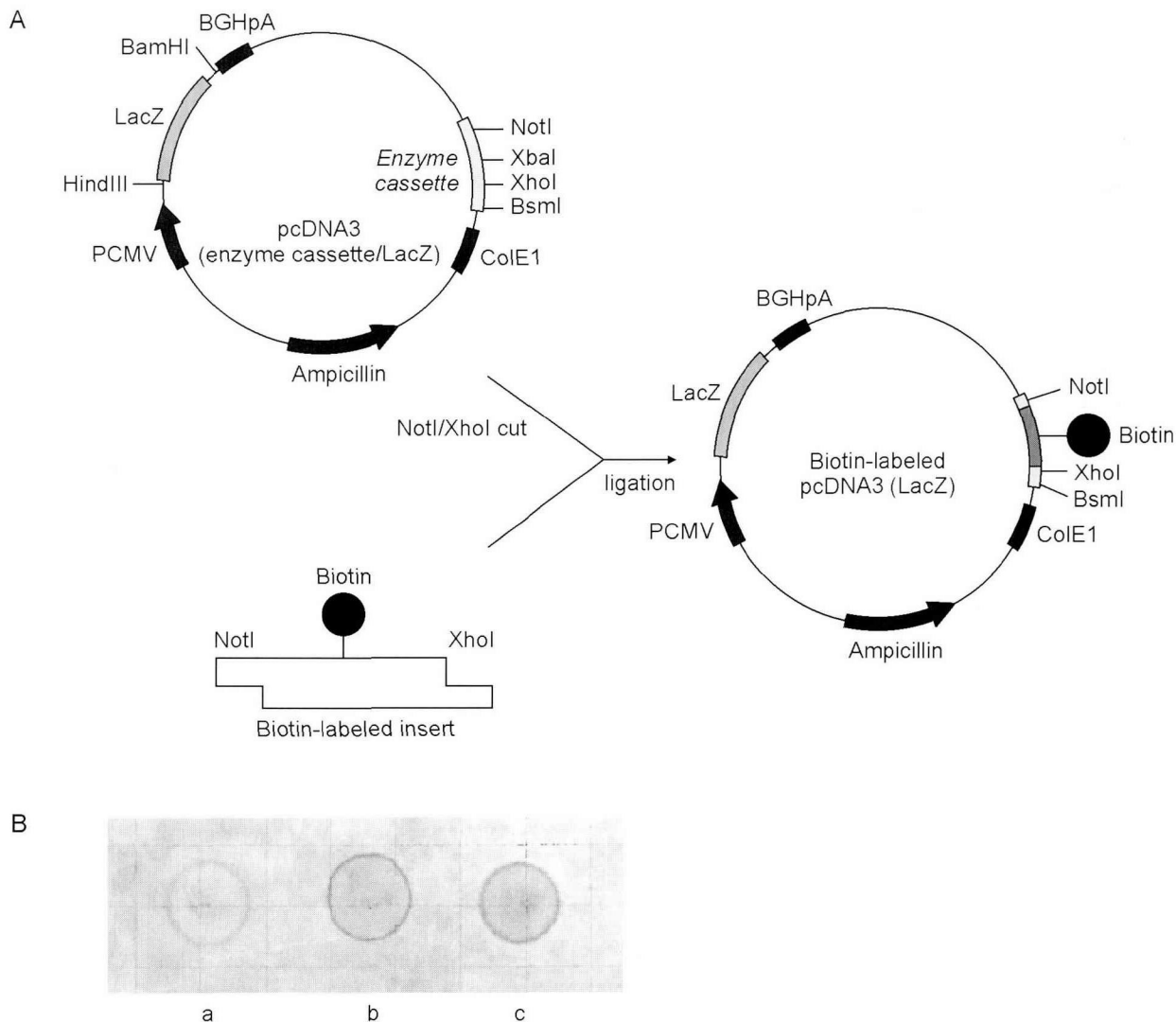


Fig. 1. A scheme for the construction of the biotin-labeled pcDNA3 (*LacZ*). **(A)** The pcDNA3 (*LacZ*/Enzyme cassette) vector was digested with *Not I* and *Xho I*. The vector was ligated with the annealed oligonucleotide duplex containing a VN virtual nucleotide. **(B)** The presence of a biotin at the biotin-labeled insert was determined by a *p*-dimethylaminocinnamaldehyde colorimetric test. The presence of biotin at sense oligonucleotides was visualized as a pink-red spot: antisense oligonucleotides of 26 mer, 15 μ g (**a**), sense oligonucleotides of 26 mer labeled with biotin, 15 μ g (**b**), biotin-labeled transferrin, 75 μ g (**c**).

μ g을 기준으로 streptavidin과 biotin-표지 transferrin을 1:2:1 그리고 1:4:1의 분자 비로 복합체를 형성하였다. 복합체 형성은 50 μ l PBS 완충용액에서 37°C, 1시간 동안 수행하였다. 다른 복합체 형성 방법으로, biotin-표지 플라스미드 벡터와 streptavidin을 30분간 먼저 복합체를 형성시킨 후 biotin-표지 transferrin을 첨가하여 30분간 더 복합체를 형성시켰다 (1:2/1 혹은 1:4/1). 형성된 삼중 분자 결합체는, 하루 전에 미리 분주했던 HepG2 세포주 (6-well culture plate, 3×10^5 cells/well/2 ml DMEM)에 처리하였다. 결합체 처리 1시간 전에 태우 혈청이 첨가되지 않은 Opti-MEM I (JBI, Korea) 배지 2 ml로 갈아주고, 각 조건에서 형성된 삼중 분자 결합체를 세포에 처

리하였다. 한 시간 후 각 well을 PBS 완충용액으로 3번 세척을 하였다. 세척한 세포들을 trypsin으로 처리하여 세포를 모으고 liquid scintillation counter (Packard, USA)로 남아있는 방사능을 측정하였다.

6. β -galactosidase assay

삼중 분자 결합체의 세포 도입 하루 전에 12-well cell culture plate에 HepG2 세포 1×10^5 개씩을 DMEM (10% 우혈청) 배지 500 μ l를 먼저 분주한 각 well에 분주하였다. Biotin 표지 플라스미드 벡터 1 μ g을 기준으로 하여 각 분자 형성 비율로 streptavidin과 biotin 표지 transferrin을 넣어 삼중 분자

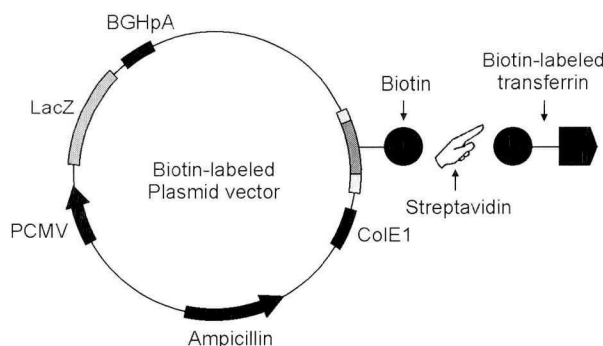


Fig. 2. Schematic diagram of the trimeric conjugates. Biotin-labeled plasmid vector was conjugated with biotin-labeled transferrin via streptavidin.

결합체를 형성하였다. 복합체의 세포 내 도입 1시간 전에 12-well cell culture plate의 배지를 신선한 DMEM (10% 우 혈청) 500 μ l로 갈아주었다. 여기에 형성된 삼중 분자 결합체를 넣어 준 48시간 후에 β -galactosidase assay를 수행하였다.

7. Confocal microscopy를 이용한 삼중 분자 결합체의 세포 내 도입능력 확인

삼중 분자 결합체를 형성시킬 때 streptavidin-fluorescein isothiocyanate (Sigma, USA)를 사용하였다. 결합체의 세포 내 도입 하루 전에 4-well chamber slide에 well 당 1×10^5 개의 Hep G2 세포를 DMEM 0.5 ml에 분주하였다. 삼중 분자 결합체는 biotin-표지 플라스미드 벡터 1 μ g을 기준으로 하여 streptavidin-FITC와 biotin-표지 transferrin을 1:2:1 그리고 1:4:1의 분자 비율로 형성시켰다. 복합체 형성은 50 μ l PBS 완충용액에서 37 $^{\circ}$ C, 1시간 동안 수행하였다. 형성된 분자 결합체를 세포에 도입하기 1시간 전에, 우 혈청이 첨가되지 않은 300 μ l Opti-MEM I으로 배지를 갈아주고 각 분자 결합체를 점등하여 넣었다. 3시간 후에 chamber slide의 배지를 제거하고 PBS 완충용액으로 각 chamber를 3번씩 세척하였다. Slide를 4% paraformaldehyde 용액에 20분간 담가 세포를 고정하고, 3 $\times$ PBS 완충용액에 2분 그리고 1 $\times$ PBS 완충용액에 2분 담가 고정을 중지하였다. 건조된 slide에 universal mount (Research Genetics, USA) 용액을 점등하고 cover glass를 덮은 후 confocal microscopy (ZEISS, Axiovert 135 M)로 세포의 형광을 관찰하였다.

결 과

1. Biotin 표지 sense oligonucleotide의 성공적 합성 여부 확인

Biotin 표지 삽입체를 만드는데 있어 26-mer의 biotin 표지 oligonucleotide의 성공적인 합성 여부는 실험 전체과정 중 매

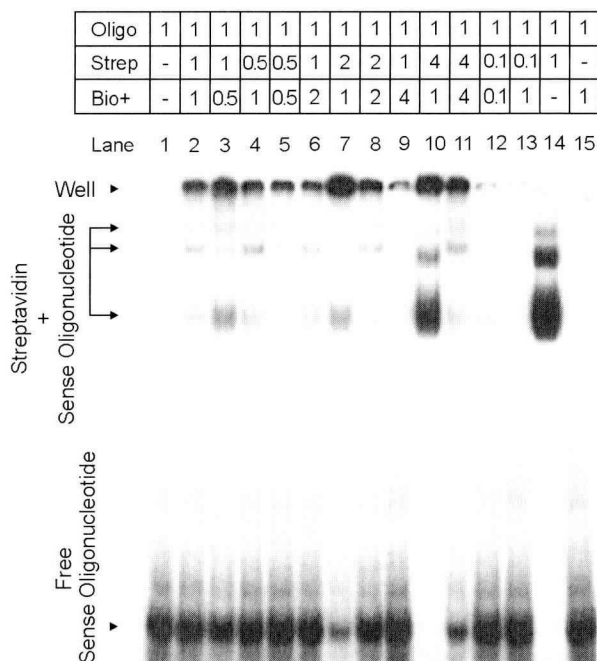


Fig. 3. Gel mobility shift assay determining an optimal ratio of molecular conjugation. Biotin-labeled sense oligonucleotide was labeled with [γ - 32 P] ATP at the 5'-end. The oligonucleotide labeled with a radioisotope was conjugated with biotin-labeled transferrin via streptavidin. The complex formation was performed by adopting the ratio of each component shown in the top panel above the figure. In the top panel, oligo denotes oligonucleotides, strep streptavidin and bio+ biotin-transferrin. Conjugation complexes were separated on an 8% native PAGE gel.

우 중요한 단계이다. 즉, Biotin-VNTM phosphoramidite가 sense oligonucleotide 합성과정에 한 부분으로 포함되므로 biotin을 용이하게 표지할 수 있다. Biotin의 표지 여부를 확인할 수 있는 *p*-dimethylaminocinnamaldehyde colorimetric test를 실시한 결과 biotin으로 표지된 sense oligonucleotide에서 점적한 원의 색깔이 핑크빛으로 변색된 것을 관찰하였다. 음성 대조군으로 biotin이 표지되어 있지 않은 antisense oligonucleotide의 점적에서는 아무런 색깔의 변화를 볼 수 없었다. 그리고 양성 대조군으로 사용된 biotin 표지 transferrin의 경우에는 biotin 표지 sense oligonucleotide처럼 점적의 원이 핑크빛으로 변화된 것을 관찰하였다 (Fig. 1). 이처럼 biotin이 존재할 때 핑크빛으로 변하는 발색검사 결과, 합성된 sense oligonucleotide에서 핑크빛으로의 변색을 확인하고 biotin의 성공적인 표지를 확인하였다. 합성된 sense와 antisense oligonucleotide를 annealing 하고, 이 결과물을 *Not* I과 *Xho* I 제한효소로 절단한 pcDNA3 (LacZ/Enzyme cassette)에 클로닝하였다. 이렇게 biotin으로 표지된 플라스미드 벡터는 유전자 전달 복합체 형성에 사용되었다.

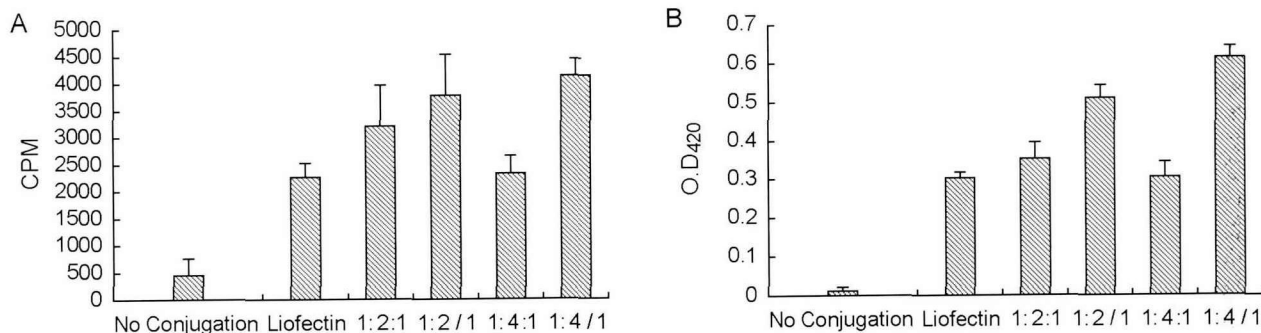


Fig. 4. Trimeric complex facilitated the delivery of plasmid vector into HepG2 cells. Biotinylated insert was labeled at the 5'-end with [γ - 32 P] ATP, and cloned into pcDNA (LacZ/Enzyme cassette). The vector with radioactive labeling was conjugated with biotin-labeled transferrin via streptavidin. Conjugations were performed by adopting the ratio of each component shown under the figures. Each trimeric complex was added to HepG2 cells. Delivery efficiency was determined by residual radio-activity in the cells (A), and β -galactosidase assay. Each bar value represents the mean $\pm$ S.D. of three independent experiments.

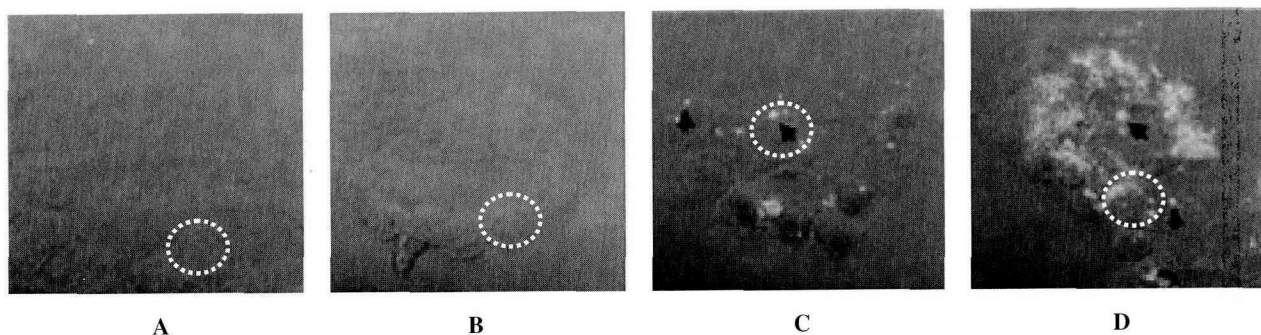


Fig. 5. Uptake of the trimeric complex by HepG2 cells. HepG2 cells were incubated with the FITC-labeled trimeric complex for 3 hours. The cells were examined with a confocal microscope ($\times 400$). Untreated cell only (A), biotin-labeled plasmid vector conjugated with streptavidin-FITC alone (B), biotin-labeled plasmid vector : streptavidin-FITC : biotin-labeled transferrin, 1 : 2/1 complex (C) and 1 : 4/1 complex (D). Black arrows denote the fluorescence emitted by the trimeric complex. Dotted circle in each figure denotes the boundary of a representative cell.

2. 최적의 삼중 분자 결합체 형성

삼중 분자 결합체의 세포 내 도입능력을 최적화시키기 위하여, 삼중체를 형성하는 분자들간의 비율을 조정하는 것은 매우 중요하다. 삼중 분자 결합체 형성의 모식도 (Fig. 2)에서 보는 바와 같이 biotin-표지 플라스미드 벡터와 biotin 표지 transferrin을 연결시켜 주는 streptavidin에는 biotin이 붙을 수 있는 자리가 4곳 존재한다²². 그러나, streptavidin에 biotin 표지 플라스미드 벡터와 biotin 표지 transferrin이 분자 결합체에 최소한 각각 한 분자씩은 붙어야 유전자의 세포 내 도입능력이 발생한다. Streptavidin에 벡터 또는 transferrin만이 결합을 하게 되면 세포 내 도입능력을 상실하거나 전달할 유전자를 갖지 못하는 구조가 된다. 플라스미드 벡터 대신 biotin-표지 sense oligonucleotide를 사용하여 여러 비율로 삼중 분자 결합체를 형성시켜 바람직한 분자 비율을 간접적으로 알아 보았다 (Fig. 3). 사진의 밑 부분에 분자 결합체에 참여하지 않은 free sense oligonucleotide가 보이고, well에는 sense oligo-

nucleotide, streptavidin 그리고 biotin 표지 transferrin의 삼중 분자 결합체가 정제되어 있음을 볼 수 있다. Lane 14는 oligonucleotide와 streptavidin만이 결합체를 형성한 경우로 well에 정제된 분자 결합체는 볼 수 없다. 따라서, transferrin이 첨가된 환경 (lane 2~13)에서 well에 정제되어 있는 분자 결합체들을 발견할 수 있었다. 즉 biotin 표지 벡터, streptavidin 그리고 biotin 표지 transferrin이 삼중 분자 결합체를 형성하고 있음을 알 수 있었다. Well에 정제되어 있는 oligonucleotide를 보면 lane 7, 10 그리고 11에서 가장 많았다. 즉, 각각의 삼중 분자 결합체 형성 혼합 비율은 biotin 표지 벡터 : streptavidin : biotin 표지 transferrin의 각각이 1 : 2 : 1, 1 : 4 : 1 그리고 1 : 4 : 4이다.

3. 삼중 분자 결합체의 세포 내 도입능력 확인

1 : 2 : 1 그리고 1 : 4 : 1의 삼중 분자 결합체 형성 비율로 형성된 유전자 복합체를 HepG2 세포에 처리하여, 세포 내 도입 효율을 알아보았다. 또한, 앞의 실험 결과에서 얻어진 최

고 찰

적의 삼중 분자 결합체 형성 비율을 바탕으로 biotin 표지 플라스미드 벡터와 streptavidin을 일차적으로 결합시키고, 이 결합체에 biotin 표지 transferrin을 이차적으로 첨가하여 삼중 분자 결합체의 세포 내 도입 효율의 향상을 알아보았다. 이러한 순차적 삼중체의 형성은 streptavidin에 대한 biotin 표지 플라스미드 벡터와 biotin 표지 transferrin의 결합 경쟁을 피하기 위함이었다. 실제 이런 분자 결합체들의 세포 내 도입 능력을 조사해 보면, 분자 결합체를 형성시키지 않은 biotin 표지 플라스미드 벡터에 비하여 7~11배 세포 내 도입이 증가하였다. 또한 cationic liposomes (lipofectin)을 이용한 경우에 비하여도 2배 높은 세포 내 도입을 나타내었다 (Fig. 4). 따라서, 삼중 분자 결합체의 세포 내 도입능력이 효율적임을 시사하는 바이다. 삼중 분자 결합체 형성 비율에서 1:2:1 그리고 1:4:1 (biotin-표지 플라스미드 벡터: streptavidin: biotin-표지 transferrin)의 비율을 비교하였을 때 1:2:1 비율의 분자 결합체가 세포 내 유전자의 도입이 높은 것으로 나타났다. 삼중 분자 결합체를 형성시킴에 있어 biotin 표지 transferrin을 나중에 분자 결합체 형성에 넣은 경우 (1:2/1, 1:4/1)에는 세포 내 삼중체의 도입 효율이 전자의 (동시에 분자 결합체를 형성시킨 경우, 1:2:1 그리고 1:4:1의 비율) 방법에 비하여 높은 것으로 나타났다. 여기서 "/"의 좌편은 복합체 형성이 먼저 이루어진 것이고 우편은 나중에 첨가된 것이다. 또한, 1:4/1 비율의 삼중체가 1:2/1의 경우보다 세포 내 도입능력이 다소 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 삼중체의 비율과 더불어 복합체 형성의 순서도 세포 내 도입 효율에 영향을 끼친다는 것을 의미한다.

4. 삼중 분자 결합체의 세포 내 도입능력의 현미경적 관찰

상기한 복합체의 세포 내 도입 효율을 용이하게 관찰하기 위하여 streptavidin 대신에 형광물질로 표지되어 있는 streptavidin-FITC를 이용하여 삼중 분자 결합체를 형성하였다. 형성된 삼중체를 HepG2 세포에 처리하여 transferrin-receptor와의 결합과 세포 내 도입을 confocal microscopy를 이용하여 관찰하였다. 여기서 사용된 삼중체는 상기한 1:2/1 그리고 1:4/1 비율의 삼중체가 사용되었다. 각 삼중체를 처리한 세포들에서 형광의 점들이 세포의 주변이나 세포 안에서 관찰되고 있음을 관찰할 수 있었다. 반면에 biotin 표지된 플라스미드 벡터와 streptavidin-FITC만을 분자 결합에 참여시킨 경우에는 세포 내에서 아무런 형광이 관찰되지 않았다 (Fig. 5). 이러한 관찰은 삼중체의 transferrin이 세포의 transferrin-receptor와 결합하고, 후속적으로 유전자와 함께 세포 내로 endocytosis 되고 있음을 나타낸다.

유전자를 세포 내로 운반하고 발현시키는 방법들 중에 세포의 수용체 리간드 (receptor-ligand)를 이용하여 보다 적극적이고, 세포 특이적으로 운반하려는 방법에 일환으로 Transferrin Infection Method가 1990년에 개발되었다¹²⁾. 이후에 세포의 수용체를 매개로 한 유전자의 전달 방법이 여러 가지 측면으로 연구되어 왔다. 주로 많이 이용되고 있는 세포 수용체는 간세포 특이적으로 발현되는 asialoglycoprotein 수용체와 세포분열이 활발한 세포들에서 많이 발현되는 transferrin 수용체이다^{10-14,16)}. 유전자에 리간드를 연결시키는 방법은 몇 가지로 나누어 볼 수 있다. 첫째는, 수용체 리간드와 poly-L-lysine 결합체를 다시 DNA와 재결합시키는 방법으로 90년대 초반부터 많이 사용되고 있는 방법이다^{12-14,23,24)}. 두번째로, cationic lipid를 이용하는 방법으로 lipid의 수용체 리간드 그리고 DNA와의 결합성을 이용하는 방법이다¹⁶⁾. 이 방법은 유전자 전달 효율에서 매우 높은 편이나 lipid의 ligand와 결합하는 힘이 약하여 *in vitro* 실험에서의 응용성이 검증되어야 할 것이다. 세번째로 수용체 리간드를 DNA에 직접 붙이지 않고 biotinylation된 DNA와 리간드를 avidin이나 streptavidin으로 매개하여 복합체를 형성시키는 방법이다¹⁵⁾.

본 실험에서는 벡터를 biotinylation 시키는데 virtual nucleotide인 biotin-VNTM phosphoramidite를 사용하여 벡터의 일부 서열을 oligonucleotide로 합성한 후 모체가 되는 플라스미드 벡터에 삽입하였다. 이 방법은 기존의 무작위적인 벡터의 biotinylation 방법에 비하여 보다 정확한 구조를 제공한다. 즉, 벡터에 존재하는 biotin의 위치와 개수를 정확하게 알 수 있다. 삼중 분자 결합체 형성에 최적의 결합 비율을 결정하기 위하여 행한 gel retardation assay에서, 1:2:1 또는 1:4:1 (biotin 표지 벡터: streptavidin: biotin 표지 transferrin)의 비율일 때 바람직한 분자 결합체가 형성되는 것을 관찰하였다. 그리고, biotin 표지 transferrin을 나중에 삼중 분자 결합체에 첨가하여 줄 경우에 세포 내 도입능력이 좀더 향상됨을 알 수 있었다. 이러한 사실은 삼중체 형성의 비율과 더불어 삼중체 형성의 순서도 중요함을 나타낸다. 본 실험에서 제작된 삼중체는 lipofectin을 이용한 경우에 비하여 두배 향상된 세포 내 도입능력을 보여주고 있다. 이는 새로운 삼중 분자 결합체의 세포 내 도입능력이 충분히 우수함을 보여준다. 특히 세포주 특이적인 수용체를 통한 유전자의 도입으로 우리가 원하는 세포에만 유전자를 전달할 수 있다는 의미가 있다. Liposomes을 이용한 유전자의 도입은 원하는 세포 또는 조직 특이적인 전달에 어려움이 있다. 본 실험에서 제시된 방법을 사용하여 특정 세포의 수용체 또는 암세포 특이적으로 과발현되는 세포 표면 수용체 또는 항원을 이용하여

원하는 세포에만 유전자를 전달하는 효율을 높일 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

- 1) Balaguer P, Terouanne B, Boussieux AM and Nicolas JC (1991): Quantification of DNA sequences obtained by polymerase chain reaction using a bioluminescent adsorbent. *Anal Biochem*, **195**: 105-110.
- 2) Bamum-Huckins K and Adrian GS (2000): Iron regulation of transferrin synthesis in the human hepatoma cell line HepG2. *Cell Biol Int*, **24**(2): 71-77.
- 3) Blaese RM, Culver KW and Anderson WF (1990): The ADA human gene therapy clinical protocol. *Hum Gene Ther*, **1**: 331-362.
- 4) Blaese RM (1993): Development of gene therapy for immunodeficiency: Adenosine deaminase deficiency. *Pediatr Res*, **33** (Suppl): S49-S55.
- 5) Bunnell BA, Askari FK and Wilson JM (1992): Targeted delivery of antisense oligonucleotides by molecular conjugates. *Somat Cell Mol Genet*, **18**: 559-569.
- 6) Cheng PW (1996): Receptor ligand-facilitated gene transfer: Enhancement of liposome-mediated gene transfer and expression by transferrin. *Hum Gene Ther*, **7**: 275-282.
- 7) Cotten ML, Längle-Rouault F, Kirlappos H, Wagner E, Mechtler K, Zenke M, Beug H and Birnstiel ML (1990): Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulated transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 4033-4037.
- 8) Cotten M and Wagner E (1993): Non-viral approaches to gene therapy. *Curr Opin Biotech*, **4**: 705-710.
- 9) Faulk WP, Hsi BL and Stevens PJ (1980): Transferrin and transferrin receptors in carcinoma of the breast. *Lancet*, **II**: 390-392.
- 10) Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE and Mason DY (1983): Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance. *J Clin Pathol*, **36**: 539-545.
- 11) Ginsberg HS, Moldawar LL, Schgal PB, Redington M, Kilian DL, Chanock RM and Prince GA (1991): A mouse model for investigating the molecular pathogenesis of adenovirus pneumonia. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**: 1651-1655.
- 12) Gonzalez M, Bagatolli LA, Echabes IS, Arrondo JLR, Argaraña CE, Cantor CR and Fidelio GD (1997): Interaction of biotin with streptavidin. *J Biol Chem*, **17**: 11288-11294.
- 13) Graziadei I, Weiss G, Bohm A, Werner-Felmayer G and Völkl W (1997): Unidirectional upregulation of the synthesis of the major iron proteins, transferrin-receptor and ferritin, in HepG2 cells by the acute-phase protein α 1-antitrypsin. *J Hepatol*, **24**(7): 716-725.
- 14) Huebers HA and Finch CA (1987): The physiology of transferrin and transferrin-receptors. *Physiol Rev*, **67**: 520-582.
- 15) Landgraf A, Reckmann B and Pingoud A (1991): Quantitative analysis of polymerase chain reaction (PCR) products using primers labeled with biotin and a fluorescent dye. *Anal Biochem*, **193**: 231.
- 16) Ledley FD (1994): Non-viral gene therapy. *Curr Opin Biotechnol*, **5**: 626-636.
- 17) Lloyd JM, O'Dowd T, Driver M and Tee DE (1984): Demonstration of an epitope of the transferrin receptor in human cervical epithelium: a potentially useful cell marker. *J Clin Pathol*, **37**: 131-135.
- 18) Ma DD and Wei AQ (1996): Enhanced delivery of synthetic oligonucleotides to human leukemic cells by liposomes and immunoliposomes. *Leuk Res*, **20**: 925-930.
- 19) Morgan JR, Tompkins RG and Yarmush ML (1993): Advances in recombinant retroviruses for gene delivery. *Adv Drug Del Rev*, **12**: 143-158.
- 20) Neeffjes JJ, Hengeveld T, Tol O and Ploegh HL (1990): Intracellular interactions of transferrin and its receptor during biosynthesis. *J Cell Biol*, **111**: 1383-1392.
- 21) Russel DW, Miller AD and Alexander IE (1994): Adeno-associated virus vectors preferentially transduce cells in S phase. *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**: 8915-8919.
- 22) Stoorvogel W, Geuze HJ and Strous GJ (1987): Sorting of endocytosed transferrin and asialoglycoprotein occurs immediately after internalization in HepG2 cells. *J Cell Biol*, **104** (5): 1261-1268.
- 23) Tanaka T, Fujishima Y and Kaneo Y (2001): Receptor mediated endocytosis and cytotoxicity of transferrin-mitomycin C conjugate in the HepG2 cell and primary cultured rat hepatocyte. *Biol Pharm Bull*, **24**(3): 268-273.
- 24) Trapnell BC and Gorziglia M (1994): Gene therapy using adenoviral vectors. *Curr Opin Biotechnol*, **5**: 617-625.
- 25) Wagner E, Zenke M, Cotten M, Beug H and Birnstiel ML (1990): Transferrin-polycation conjugates as carriers for DNA uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 3410-3414.
- 26) Wu CH, Wilson JM and Wu GY (1989): Targeting genes: delivery and persistent expression of a foreign gene driven by

- mammalian regulatory elements in vivo. *J Biol Chem*, **264**: 16985-16987.
- 27) Yang Y, Nunes FA, Berencsi K, Gonczol E, Engelhardt JF and Wilson JM (1994): Inactivation of E2a in recombinant adenovirus improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet*, **7**: 362-369.
- 28) Zauner W, Kichler A, Schmidt W, Sinski A and Wagner E (1996): Glycerol enhancement of ligand-polylysine/DNA transfection. *Biotechniques*, **20**: 905-913.
- 29) Zauner W, Kichler A, Schmidt W, Mechtler K and Wagner E (1997): Glycerol and polylysine synergize in their ability to rupture vesicular membranes; A mechanism for increased transferrin-polylysine-mediated gene transfer. *Exp Cell Res*, **232**: 137-145.
- 30) Zenke M, Steinlein P, Wagner E, Cotten M, Beug H and Birmstiel ML (1990): Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**: 3655-3659.
-