creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

교육학석사학위논문

양친매성 세포 투과 펩타이드를 변형한 T세포 선택적 투과 펩타이드의 개발

Development of a T cell selective penetrating peptide modified from the amphipathic cell penetrating peptide

2018년 8월

서울대학교 대학원

과학교육과 생물전공

김민경

양친매성 세포 투과 펩타이드를 변형한 T세포 선택적 투과 펩타이드의 개발

Development of a T cell selective penetrating peptide modified from the amphipathic cell penetrating peptide

지도교수 이 준 규

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함
2018년 6월

서울대학교 대학원
과학교육과 생물전공
김 민 경

김민경의 교육학석사 학위논문을 인준함
2018년 7월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

본 연구는 세포 투과성이 높은 동시에 T세포에 선택성이 있는 세포 투과 펩타이드(Cell penetrating peptide, CPP)를 개발하고자 하였다.

이를 위해 세포 투과성이 높은 것으로 보고되었으나 세포 선택성이 없는 양친매성 CPP를 변형하여 무작위 서열을 도입한 펩타이드 변이체의 파지 디스플레이 라이브러리를 제조한 후, T세포에 친화성이 있는 펩타이드를 선별하였다. 이들 중 친화성 빈도가 높은 3개의 펩타이드 서열을 합성하여 형광 표지한 후 유세포 분석기로 펩타이드의 세포 투과 효율을 측정한 결과, 세 펩타이드 중 LK3 펩타이드가 T세포에 선택성이 있음을 확인하였다. 또한 LK3 펩타이드는 나노몰 농도에서 세포막 수용체를 매개하여 T세포를 통과하며, T세포의 면역 억제 약물인 Cyclosporin A를 운반하는 능력이 있음을 확인하였다.

본 연구의 결과들을 바탕으로 양친매성 CPP를 변형한 파지 디스플레이 라이브러리의 제조 및 선별 방법이 세포 투과성이 높은 동시에 세포 선택성이 있는 CPP를 개발하는데 유용함을 확인하였다. 향후 다양한 표적 세포 선택적 투과 펩타이드를 개발하는데 적용될 수 있을 것으로 기대한다. 또한 본 연구에서 얻은 LK3 펩타이드는 T세포에 대한 선택성이 높고 T세포로 약물을 운반하는 능력이 있으므로, T세포 선택적 약물 운반체의 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

주요어 : 세포 투과 펩타이드(Cell penetrating peptide, CPP),
파지 디스플레이 기술, Biopanning, T세포

학 번 : 2016-21592

목차

제 1장 서론 ····· 1
1.1 연구 목적 ····· 1
1.2 연구 배경 ····· 3
1.2.1 T세포 ····· 3
1.2.2 세포 투과 펩타이드 ····· 5
1.2.3 파지 디스플레이 기술 ····· 6
1.2.4 Biopanning ····· 7

제 2장 실험 방법 및 실험 재료 ····· 8
2.1 세포 및 실험재료 ····· 8
2.2 파지 디스플레이 라이브러리 제조 ····· 10
2.2.1 재조합 파지미드 제조 ····· 11
2.2.2 파지 조립 ····· 13
2.3 표적 세포의 비오틴 표지 ····· 15
2.4 Cell-surface panning ····· 15
2.5 세포 투과 효율 측정 ····· 18
2.6 펩타이드의 화학적 합성 ····· 18
2.7 IL2 억제능 측정 ····· 19

제 3장 실험 결과 ····· 20
3.1 파지 디스플레이 라이브러리의 제조 과정 ····· 20
3.2 Biopanning을 통한 T세포 친화성 펩타이드의 선별 과정 ··· 21
3.3 파지 디스플레이 기술로 선별된 펩타이드의 T세포 선택적 투과성 ····· 25

3.4 LK3 펩타이드의 세포 투과 기전 ····· 28
3.5 LK3 펩타이드의 약물 운반 능력 ····· 31

제 4장 논의 ····· 33

참고문헌 ····· 36
Abstract ····· 45

표 목차

[표 1] Cell-surface panning을 이용한 T세포 친화성 파지의 선별 과정 22
[표 2] 파지 디스플레이 기술로 선별한 T세포 친화성 후보 펩타이드의 아미노산 서열 24

그림 목차

[그림 1] 파지 디스플레이 라이브러리 제조 과정 10
[그림 2] 재조합 파지미드 제조 과정 12
[그림 3] 하이브리드 비리온 시스템을 이용한 M13 박테리오파지 조립 14
[그림 4] Magnetically activated cell sorting을 이용한 Cell-surface panning 17
[그림 5] Cell-surface panning의 각 Round별 % Bound(10^{-4}) 23
[그림 6] LKR, LK1, LK2, LK3 펩타이드의 세포 투과 효율 26
[그림 7] LK3 펩타이드 농도에 따른 T세포 투과 효율 27
[그림 8] 엔도사이토시스 억제 조건에서 LK3 펩타이드의 T세포(A) 및 골육세포(B) 투과 효율 29
[그림 9] LK3 펩타이드의 CsA 운반 능력 32

제 1장 서론

1.1 연구 목적

면역 반응에 관여하는 도움 T세포의 비정상적인 조절은 면역 관련 질환 뿐만 아니라 악성 종양 생성에도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Miedema et al., 1988; Oh et al., 2002; Nishikawa et al., 2005; Skapenko et al., 2005). 면역 관련 질환의 대표적인 예로는 후천성 면역 결핍 증후군과 자가면역 질환이 있으며 이를 치료하기 위해 Zidovudine, Efavirenz, Saquinavir, Methorexate CyclosporinA와 같은 약물이 개발되었으나, 약효를 나타내기 위해 고용량으로 투여함에 따라 비표적 세포에 여러 부작용을 야기하는 것으로 보고되었다(Carr & Cooper, 2000; Jain et al., 2001; 이중훈 & 김수연, 2010; Lv et al., 2015; Cho & Bae, 2017).

약물의 세포 투과성을 높여 비표적 세포에 미치는 부작용을 완화하기 위한 방안으로 세포 투과 펩타이드(Cell penetrating peptide, CPP)를 이용한 약물 전달이 주목받고 있다(Vivès et al., 2008). CPP는 약물과 복합체를 형성하여 약물의 세포 투과성을 향상시키는 것으로 보고되면서, 세포 투과성 또는 세포 선택성을 향상시킨 다양한 CPP가 개발되었다(Stewart et al., 2008). CPP의 세포 투과성 향상에 중점을 둔 선행연구에서는 나노몰 농도에서 세포를 투과하는 양친매성 CPP를 개발했지만(Hyun et al., 2007; Jang et al., 2014), 표적 세포에 대한 선택성이 없다는 한계가 있었다(Zahid & Robbins, 2015). 한편 CPP의 표적 세포 선택성 향상에 중점을 둔 선행연구에서는 파지 디스플레이 기술을 이용하여 일부 표적 세포 선택적 CPP를 개발했지만 투과성이 낮다는 한계점이 보고되었다(Svensen et al., 2012). 이에 따라 본 연구는 세포 투과성이 높은 동시에 T세포를 선택적으로 투과하는 CPP를 개발하고자 하였다.

이를 위해 양친매성 CPP를 변형한 후 파지 디스플레이 기술을 이용하여 무작위 서열을 도입한 펩타이드 변이체 라이브러리를 제조하고, T세포에 친화성이 있는 펩타이드를 선별하였으며, 선별된 펩타이드를 대상으로 세포 선택성, 투과성, 투과 기전, 약물 운반 능력을 조사하였다.

1.2 연구 배경

1.2.1 T세포

T세포는 골수 줄기 세포에서 생성되어 흉선에서 성숙되는 과정을 거치면서 도움 T세포 또는 세포독성 T세포로 분화한다(Miller, 2011). 도움 T세포는 면역 작용에 필수적인 세포로, 세포독성 T세포의 활성화, B세포의 항체 생산, 식세포의 항박테리아 활동을 촉진한다(Abbas et al., 1996). 도움 T세포의 비정상적인 조절은 후천성 면역 결핍 증후군, 자가면역 질환, 천식 뿐만 아니라 악성 종양 생성과도 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Miedema et al., 1988; Oh et al., 2002; Nishikawa et al., 2005; Skapenko et al., 2005).

후천성 면역 결핍 증후군(Acquired immune deficiency syndrome, AIDS)은 인간 면역 결핍 바이러스(Human immunodeficiency virus, HIV)에 의해 도움 T세포가 파괴되어 면역 결핍을 유발하는 감염성 질환이다(Miedema et al., 1988). HIV 생활사가 밝혀지면서 HIV의 조립을 방해하는 다양한 항레트로바이러스제가 개발되었으며, 이로 인해 AIDS는 치료가 가능한 만성질환으로 인식되고 있다(Arts & Hazuda, 2012). 항레트로바이러스제인 역전사효소 억제제와 단백질분해효소 억제제의 병용요법은 HIV의 증식을 효과적으로 저해하는 것으로 보고되어 AIDS 치료에 널리 이용되고 있으나, 여러 부작용을 야기하는 것으로 보고되었다(Golucci et al., 2018). 역전사효소 억제제의 경우, 고용량으로 복용함에 따라 미토콘드리아 독성, 과민성, 지방 이상증을 야기하며(Carr & Cooper, 2000), 단백질분해효소 억제제는 비표적 세포인 지방 세포에 이상 지질 혈증과 인슐린 저항성을 유발한다(Jain et al., 2001; Lv et al., 2015).

자가면역 질환은 말초성 T세포 관용이 파괴됨에 따라 자기반응성 T세포가 활성화되어 유발되는 만성 염증성 면역 질환이다(Asano et al., 1996). 류마티스관절염은 자가면역 질환의 하나이며, 활막의 염증을 시작으로 전신을 침범하여 관절 및 뼈의 변형을 유발한다(Choy & Panayi, 2001). 류마티스관절염의 치료제로, 엽산의 대사를 억제하여 T세포의 증식과 염증반응을 저해하는 메토트렉세이트(Methotrexate, MTX) 제제가 우선적으로 사용되고 있으나(Cutolo et al., 2001), 혈액 내 잔류 약물에 의해 구강궤양, 간독성, 골수억제, 간질폐렴 등의 부작용이 야기되는 것으로 보고되었다(Cho & Bae, 2017).

Cyclosporin A (CsA)는 T세포의 Interleukin-2 (IL-2) 생성을 억제하는 면역억제제로, 다른 약물에 의한 치료 효과가 적은 자가면역 질환인 농포성 건선, 홍피성 건선을 치료하는데 사용되는 약물이지만, 전립선 비대증, 감각 이상, 신독성 등의 부작용을 야기하는 것으로 보고되었다(이증훈 & 김수연, 2010).

1.2.2 세포 투과 펩타이드

세포 투과 펩타이드(Cell penetrating peptide, CPP)는 세포 투과 능력이 있는 펩타이드로(Vives et al., 1997), HIV-1 외피막 TAT 단백질 연구를 통해 알려졌다(Green & Loewenstein, 1988). CPP는 단백질, 올리고뉴클레오타이드, 저분자 약물과 같이 세포 투과 능력이 낮은 약물을 세포 내부로 전달하는 운반체로 주목받으면서(Stewart et al., 2008), CPP를 약물 운반체로 이용하기 위한 연구가 진행되고 있다(Copolovidi, 2014).

CPP의 투과성 향상에 중점을 두면서 인지질 이중층으로 구성된 세포막을 효과적으로 투과하는 다양한 양친매성 CPP가 개발되었다(Ferna'ndez-Carneado et al., 2003). Leucine (L)과 Lysine (K)으로 이루어진 양친매성 CPP는 나노몰 농도에서도 세포를 투과하지만(Hyun et al., 2007; Jang et al., 2014), 세포 선택성이 없어 비표적 세포에 약물 전달 가능성을 높여 부작용을 야기할 우려가 있다(Zahid & Robbins, 2015). 부작용을 최소화 하기 위해 표적 세포에 대한 선택성을 향상한 CPP가 개발되었지만(Martin et al., 2010), 투과성이 낮다는 한계가 있다(Svensen et al., 2012).

한편, CPP의 세포 투과 기전은 명확히 밝혀지지 않았으나, 직접 투과와 엔도사이토시스를 혼용하여 세포막을 통과하는 것으로 알려져 있다(Zorko & Langel, 2005).

1.2.3 파지 디스플레이 기술

파지 디스플레이 기술은 M13 박테리오파지 표면에 펩타이드를 발현하는 기술이다(Smith, 1985). 파지 외피 단백질 N-말단에 펩타이드 변이체를 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리를 제조한 후, 표적에 대한 친화성이 있는 후보물질을 선별하는데 널리 이용된다(Winter et al., 1994; Sidhu, 2000).

파지 디스플레이 라이브러리를 제조하는 방법으로 하이브리드 비리온 시스템이 있다. 하이브리드 비리온 시스템은 파지미드와 헬퍼파지를 이용한다. 파지미드는 융합 외피 단백질 유전자를 가지고 있는 플라스미드로 파지의 복제 원점과 파지 조립 신호를 가지고 있다. 헬퍼파지는 야생형 외피 단백질을 발현하는 파지로 파지 조립에 필요한 모든 유전자를 가지고 있으나 파지 조립 신호에 결함이 있다. 따라서 박테리아에 파지미드와 헬퍼파지를 공동감염하면, 방출되는 파지의 외피 단백질 일부에만 펩타이드 변이체를 제시 할 수 있다(Bass et al., 1990).

이 시스템은 파지의 외피 단백질 일부에만 펩타이드 변이체를 제시한다는 점에서 파지의 박테리아 감염과 파지 조립 기능에 미치는 펩타이드의 영향을 최소화할 수 있다는 장점이 있다(Pande et al., 2010). 또한 파지 유전체를 이용한 방법(Smith, 1985)보다 분자량이 큰 폴리펩타이드를 제시할 수 있다(Fuh & Sidhu, 2000).

1.2.4 Biopanning

Biopanning은 파지 디스플레이 기술을 이용하여 제조한 펩타이드 라이브러리 중에서 표적에 대한 친화성이 있는 펩타이드를 선별하는 과정이다(Hoogenboom et al., 1998). Biopanning은 고체상 표면에 고정한 표적을 파지 디스플레이 라이브러리에 노출시킨 후, 표적에 결합하지 않은 파지는 세척하여 제거하고, 표적에 결합한 파지는 용출하여 증폭하는 일련의 선별 과정을 수차례 반복하는 과정이다. 각각의 선별 과정에서 얻은 파지는 대장균에 감염하여 증폭한 후 다음 선별 과정에 사용되므로, 선별 횟수가 증가하면 표적에 대한 친화성이 큰 파지를 농축 시킬 수 있다(Paschke, 2006).

표적의 고정 방법은 표적의 특성에 따라 직접 고정 또는 간접 고정 방법이 있다. 표적 분자의 특성이 명확히 알려진 경우에는 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) plate, Immunotube, Polystyrene coated bead에 직접 고정하는 방법을 사용한다(Adda et al., 2002). 한편, 표적 분자의 특성이 명확하지 않은 경우나 정제 과정에서 구조적인 변성을 야기할 우려가 있는 경우에는 세포를 간접 고정하는 Cell-surface panning 방법을 사용한다(Siegel, 1997; Shadidi et al., 2003; Martin et al., 2010).

Cell-surface panning은 양성 선택과 음성 선택을 동시에 이용하여 표적에 대한 친화성이 큰 파지 만을 선별하는 과정이다(de Kruif et al., 1995). 이 방법은 비오틴을 표지한 양성 선택 세포와 표지하지 않은 과량의 음성 선택 세포를 섞어 준 후 이들을 파지 디스플레이 라이브러리에 노출시키고, 양성 선택 세포에 대한 친화성이 있는 파지 만을 선별하여 분리하는 과정으로 구성되며, 이를 통해 표적에 친화성이 큰 파지를 탐색할 수 있다(Siegel, 1997).

제 2장 실험 방법 및 실험 재료

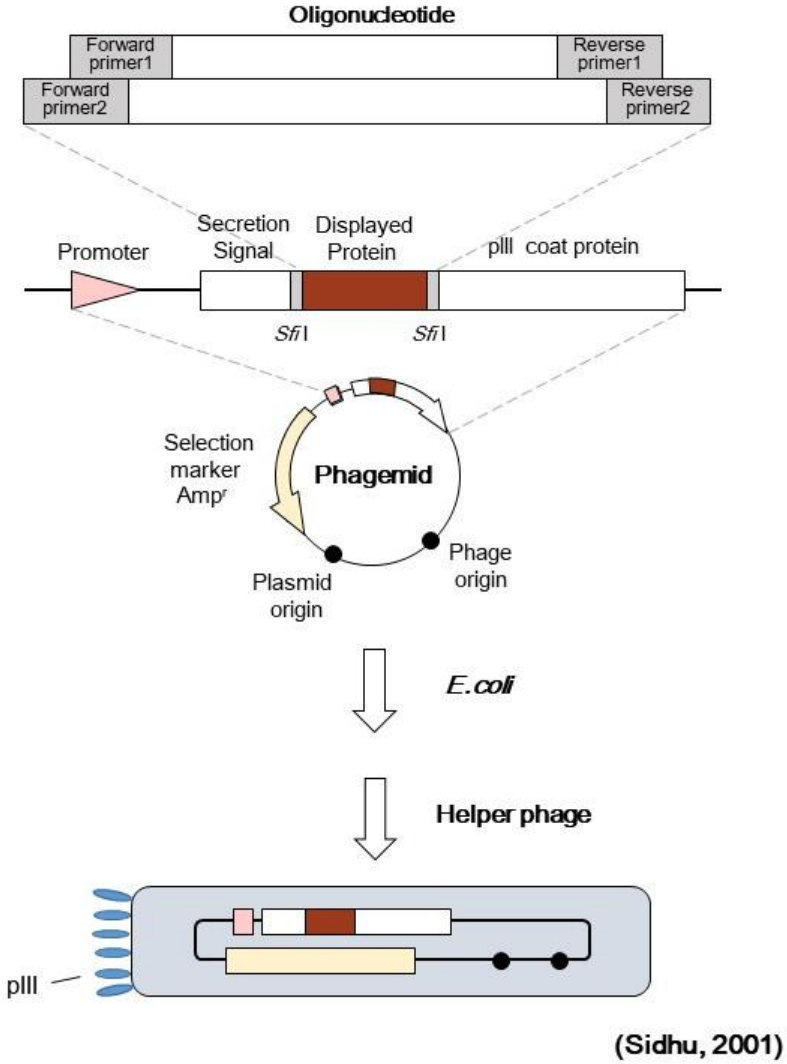
2.1 세포 및 실험 재료

사람의 T 림프구에서 유래한 암세포 JurkatT 세포, 사람의 B 림프구에서 유래한 하이브리도마 세포 F3B6 세포, 전골수구 유래 암세포 HL60 세포를 10% FBS (Fetal bovine serum)와 1% Antibiotic antimycotic solution을 첨가한 RPMI1640 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2 조건의 가습배양기에서 배양하였다. 골육종 세포인 U2OS 세포를 10% FBS와 1% Antibiotic antimycotic solution을 첨가한 DMEM 배지를 사용하여 배양하였다.

올리고뉴클레오타이드와 프라이머는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 제작하였다. nPfu Forte polymerase, 10×nPfu Forte buffer, dNTP, *Sfi*I 제한효소, T4 DNA 연결효소, TOPscript™ RT DryMIX (dT18 plus)는 enzynomics (Daejeon, Korea)에서 구매하였다. XL1-Blue competent cell은 Agilent (California, USA)에서 구매하였고, RPMI1640, DMEM, FBS, Antibiotic antimycotic solution, DPBS, Trypsin-EDTA는 Welgene (Gyeongsangbuk-do, Korea)에서 구매하였다. EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin은 Thermo fisher (Waltham, USA)에서 구매하였고, Anti-Biotin MicroBeads, MACS Cell Separation Column, MiniMACS Separator는 Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Germany)에서 구매하였다. TAMRA 형광을 표지한 LKR, LK1, LK2, LK3 펩타이드(LKR: 5-TAMRA-LKKLLKLLKKLSSGGSSGGLKKLLKLLKKL, LK1: 5-TAMRA-LKKLLKLLKKLLSATSSRALKKLLKLLKKL, LK2: 5-TAMRA-LKKLLKLLKKLSSWSLWSGLKKLLKLLKKL, LK3: 5-TAMRA-LKKLLKLLKKLICRWPSSRLKKLLKLLKKL)는 Anygen (Gwangju, Korea)에서 제작하였다.

TRIzol Reagent는 Invitrogen (California, USA)에서 구매하였고, Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit는 Qiagen (Hilden, Germany)에서 구매하였다. GAPDH와 IL2 프라이머는 GENOTECH (Daejeon, Korea)에서 제작하였다.

2.2 파지 디스플레이 라이브러리 제조

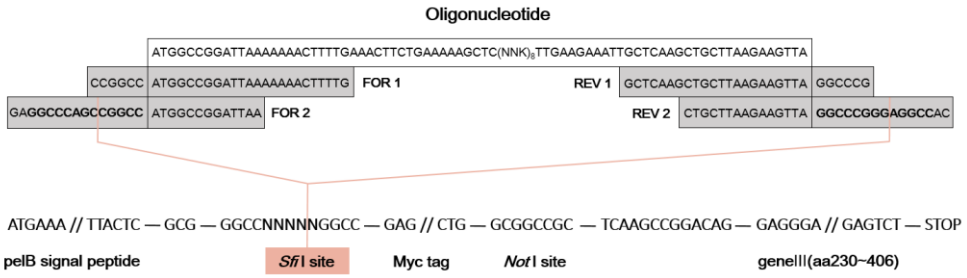


[그림 1] 파지 디스플레이 라이브러리 제조 과정

파지 디스플레이 라이브러리 제조 과정은 실험 방법 2.2.1의 재조합 파지미드 제조와 실험 방법 2.2.2의 파지 조립 과정으로 이루어진다.

2.2.1 재조합 파지미드 제조

pDR-D1 파지미드의 pⅢ 외피 단백질 암호화 부위 5′ 말단에 위치한 *Sfi*I 절단 부위 사이에 펩타이드 변이체, LKKLLKLLKKL$(X)_8$LKKLLKLLKKL를 암호화하는 올리고뉴클레오타이드, ATGGCCGGATTAAAAAAACTTTTGAAACTTCTGAAAAAGCTC$(NNK)_8$TTGAAGAAATTGCTCAAGCTGCTTAAGAAGTTA를 삽입하여 재조합 파지미드를 제조하였다(그림 1, 2). 이를 위해 합성된 올리고뉴클레오타이드를 *Sfi*I 서열이 일부 포함된 프라이머(FOR 1과 REV 1)로 1차 증폭한 다음, 증폭된 DNA를 완전한 *Sfi*I 서열을 가지고 있는 프라이머(FOR 2와 REV 2)로 재증폭하였다. 이와 같이 증폭된 DNA와 pDR-D1 파지미드를 *Sfi*I 제한효소로 절단하고 섞은 후 T4 DNA 연결효소를 처리하여 재조합 파지미드를 제조하였다. PCR에 사용된 프라이머의 서열은 다음과 같다(FOR 1: 5′-CCGGCCATGGCCGGATTAAAAAAACTTTTG-3′, REV 1: 5′-CGGGCCTAACTTCTTAAGCAGCTTGAGC-3′, FOR 2: 5′-GAGGCCCAGCCGGCCATGGCCGGATTAA-3′, REV 2: 5′-GTGGCCTCCCGGGCCTAACTTCTTAAGCAG-3′).

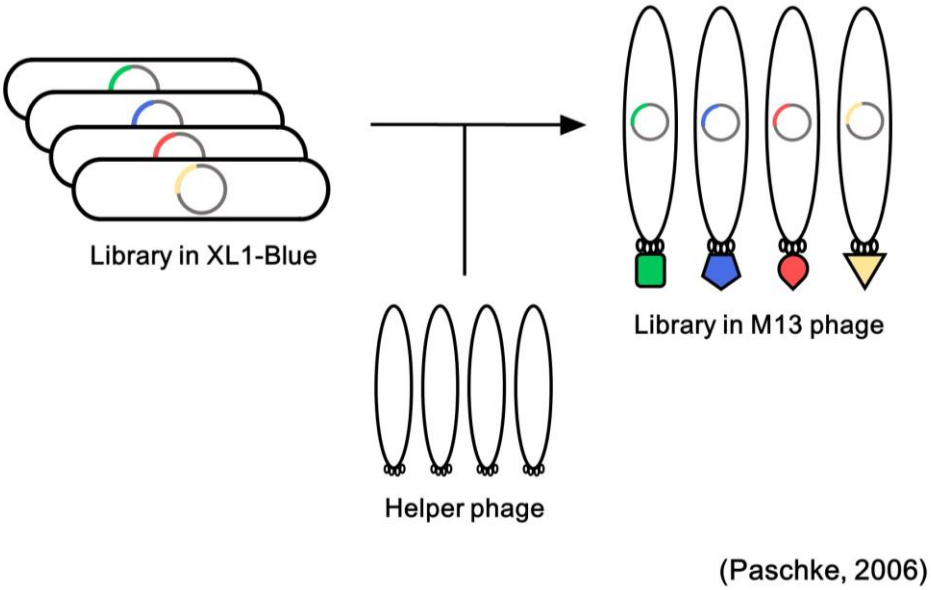


[그림 2] 재조합 파지미드 제조 과정

NNK는 20개의 아미노산을 무작위로 지정하는 코돈이다. N은 A, T, C, G 염기 중 하나를 지정하며, K는 T, G 염기 중 하나를 지정한다.

2.2.2 파지 조립

파지 조립을 위해 재조합 파지미드를 XL1-Blue competent cell에 전기충격을 주어 형질전환한 후, SB배지(Super broth medium; 32 g Tryptone, 20 g Yeast extract, 5 g NaCl)에 넣고 37℃에서 250 rpm으로 1시간 배양하였다. 배양액 일부를 덜어 둔 후, 엠피실린 플레이트에 도말하여 colony forming unit (cfu)로 파지 디스플레이 라이브러리의 다양성을 확인하는데 사용하였고, 나머지 배양액에 테트라사이클린(10 μg/mL)과 카베니실린(50 μg/mL)을 넣고 2시간 추가적으로 배양하여 형질전환된 XL1-Blue 대장균을 선별적으로 증식시켰다. 이후 VCSM13 헬퍼파지 (4.08×10^{12} Pfu)와 카베니실린(50 μg/mL)을 첨가한 배지를 추가로 넣고 2시간 배양한 후, 카나마이신(70 μg/mL)을 넣고 배양하여 헬퍼파지에 감염된 대장균을 선별적으로 증식시켜 파지 조립을 유도하였다(그림 3). 12시간 후 배양액을 4℃에서 12000 rpm으로 5분 원심분리하여 얻은 상층액에 PEG (Polyethyleneglycol, MW:8000, 40 mg/mL)와 NaCl (20 mg/mL)을 처리하고 4℃에서 1시간 반응시킨 다음 12000 rpm으로 5분 원심분리하여 파지를 침전시켰고, 1% BSA (Bovine serum albumin)를 첨가한 TBS (Tris buffered saline, Tris-HCl, pH 8.0, 0.15 M NaCl, 10 mM Tris) 용액으로 풀어준 후, 0.2 μm 필터로 여과하여 멸균한 후 회수하였다. XL1-Blue 대장균 배양액(OD 1.0) 50 μL에 회수한 파지 일부를 연속 희석하여 4 μL 넣어주었고, 상온에서 15분 방치한 후 37℃에서 250 rpm으로 15분 반응시켜 감염한 뒤, 엠피실린 플레이트에 도말하여 cfu로 역가를 확인하였다.



[그림 3] 하이브리드 비리온 시스템을 이용한 M13 박테리오파지 조립

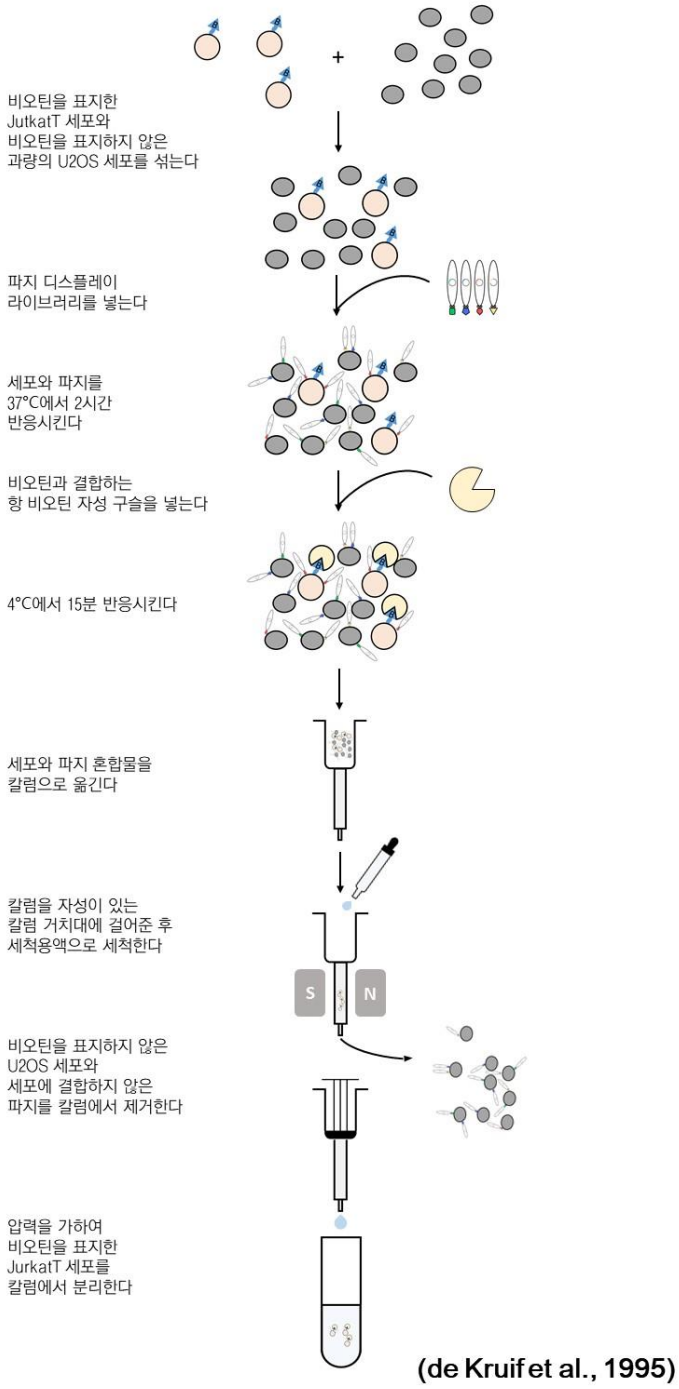
2.3 표적 세포의 비오틴 표지

JurkatT 세포를 수확하고 PBS (Phosphate-buffered saline, pH 8.0 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4) 용액으로 3회 세척하여 배지에 녹아있는 amine을 제거하였다. 세척한 JurkatT 세포를 PBS (pH 8.0)용액으로 풀어준 다음, 0.2 mM EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin을 처리하고 상온에서 30분간 반응시켜 표지하였다. 비오틴 표지 반응이 끝난 JurkatT 세포를 100 mM 글리신을 첨가한 PBS (pH 8.0)용액으로 3회 세척하여 여분의 비오틴을 제거한 후 PBS (pH 8.0)용액에 풀어주었다.

2.4 Cell-surface panning

비오틴을 표지한 JurkatT 세포와 표지하지 않은 U2OS 세포를 섞어 수확하고 3% BSA를 첨가한 PBS (pH 7.4)용액으로 풀어준 후, 상온에서 15분간 방치하여 Blocking하였다. Blocking 반응이 끝난 세포를 수확한 후 MPBS (0.2%(w/v) nonfat dry milk in PBS, pH 7.4)용액으로 1시간 Blocking한 파지와 섞어 37℃에서 2시간 반응시켰다. 이후 세포와 파지의 반응물을 수확하고 2 mM EDTA와 0.5% BSA를 첨가한 PBS (pH 7.4) 용액으로 풀어주었고, Magnetically activated cell sorting (MACS) 방법 (Miltenyi Biotec, Inc)으로 비오틴을 표지한 JurkatT 세포를 분리하였다. 이를 위해 세포와 파지 혼합액에 Anti-Biotin MicroBeads를 넣고 4℃에서 15분 반응시켰고, MACS Cell Separation Column에 혼합액을 넣고 2분 기다린 후 MiniMACS Separator에 걸어주었다. MACS Cell Separation Column을 2 mM EDTA와 0.5% BSA를 첨가한 PBS (pH 7.4) 용액으로 7회 씻어준 후, 압력을 가하여 비오틴을 표지한 JurkatT 세포를 선별적으로 분리하였다(그림 4). 이후 분리한 JurkatT 세포를 수확하여 76 mM 시트르산 용액(pH 2.1) 200 μL으로 풀어준 후 30초 간격으로 10분간

교반하여 파쇄하였고, 2M Tris-base 용액 24 μL로 중화한 후 4℃에서 13000 rpm으로 1분 원심분리하여 파지가 포함된 상층액을 얻었다. 상층액의 파지를 XL1-Blue 대장균 배양액(OD 1.0)에 넣고 상온에서 15분 방치한 후, 37℃에서 250 rpm으로 15분 반응시켜 대장균에 감염하였다. XL1-Blue 대장균 배양액 일부를 덜어둔 후, 엠피실린 플레이트에 도말하여 산출 파지의 역가를 확인하는데 사용하였고, 나머지 XL1-Blue 배양액을 실험방법 2.2.2와 동일한 방법으로 증식시켜 파지 조립을 유도하고 파지를 분리하여 역가를 확인하였다. 증폭한 파지는 희석한 후 다음 선별 과정의 투입 파지로 사용하였다.



[그림 4] Magnetically activated cell sorting을 이용한 Cell-surface panning

2.5 세포 투과 효율 측정

HL60, F3B6, JurkatT, U2OS 세포를 각각 24 well culture dish에 well 당 5×10^4개를 심고 일정 시간 배양한 후 TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rodamine)로 형광 표지된 펩타이드를 처리하였다. 일정 시간 배양한 후 Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 수확하였고, DPBS (Dulbacco's phosphate bufferd saline)로 2회 세척한 후 DPBS 200 μL로 풀어 유세포 분석기로 평균 형광 강도를 측정하였다. 펩타이드의 세포 투과 효율을 상대적인 평균 형광 강도로 나타내었고, Student's t-test를 이용하여 통계 분석하였다. *p* values 값이 0.05미만인 값을 유의한 값으로 보았으며, Excel 2016(Microsoft, Inc)을 사용하여 분석하였다.

2.6 펩타이드의 화학적 합성

LK3 펩타이드(LKKLLKLLKKLICRWPSSRLKKLLKLLKKL)를 고체상 합성 방법을 이용하여 합성한 후, 펩타이드를 안정화시키기 위해 N-말단을 아세틸화하였다. HPLC를 이용하여 합성한 펩타이드를 분리하였으며, 순도는 약 99.2%였다. HPLC 분석에 사용된 칼럼과 이동상의 조성, 분석 방법은 다음과 같다. 칼럼: Zorbax C18 (3.5 μm, 4.6×150 mm), 이동상 A: 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)를 첨가한 물, 이동상 B: 0.1% TFA를 첨가한 Acetonitrile (ACN), 분석 방법: 이동상 B를 1 mL/min의 유속으로 다음의 경사로 흘려주었다(0-5분: 5%, 5-30분: 5-70%, 30-40분: 70-100%, 40-50분: 100%).

2.7 IL2 억제능 측정

LK3 펩타이드, Cyclosporine A (CsA), LK3 펩타이드와 CsA를 24 well culture dish에 각각 처리하고 20분 방치한 후, 5×10^4개의 JurkatT 세포 배양액 400 μL를 넣고 100 nM Ionomycin , Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)(10 ng/mL)를 처리하여 세포를 활성화하였다. 6시간 후 세포를 수확하여 TRIzol Reagent 400 μL로 풀어주었고, chloroform 80 μL를 넣고 교반한 후 4℃에서 11000 rpm으로 15분 원심분리하여 RNA가 포함된 상층액을 얻었다. 상층액에 Isopropanol 200 μL, Glycogen (8 μg/mL)를 넣고 상온에서 10분 반응시킨 후, 4℃에서 11000 rpm으로 10분 원심분리하여 RNA를 침전시켰고, 침전된 RNA를 70% EtOH/DEPC로 세척한 후 15 μL의 0.1% DEPC treated water에 풀어주었다. 이와 같이 분리한 RNA 1 μg을 TOPscript™ RT DryMIX (dT18 plus)(enzynomics, Inc)를 사용하여 cDNA로 역전사한 후, Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen, Inc)를 사용하여 정량하였다. qPCR에 사용된 GAPDH와 IL2의 프라이머 서열은 다음과 같다(GAPDH FOR: 5′-TCGCTCTCTGCTCCTCCTGTTC-3′, GAPDH REV: 5′-CGCCCAATACGACCAAATCC-3′, IL2 FOR: 5′-GTGAAT ATGCTGATGAGACAGCA-3′, IL2 REV: 5′-GAAGGCCTGATATGT TTTAAGTGG-3′).

제 3장 실험결과

3.1 파지 디스플레이 라이브러리의 제조 과정

LK 모듈의 양친매성 CPP(Hyun et al., 2010; Jang et al., 2014)는 세포 투과성이 매우 높은 것으로 보고되었으나, 세포 선택성이 없다는 한계가 있었다(Zahid & Robbins, 2015). 한편, 파지 디스플레이 기술로 무작위 서열의 펩타이드 라이브러리를 제조하여 선별한 세포 선택적 투과 펩타이드는 세포 선택성은 있으나, 세포 투과성이 낮다는 한계점이 보고되었다(Svensen et al., 2012).

따라서 본 연구는 세포 투과성이 우수한 것으로 알려진 LK 모듈의 양친매성 CPP의 일부 서열을 제거한 후 무작위 서열로 변형함으로서, 세포 투과성이 높은 동시에 T세포에 선택성이 있는 CPP를 개발하고자 하였다. 이를 위해 먼저 LKKLLKLLKKLLKLAG 이중체의 일부 서열을 제거한 후 LK 모듈 사이에 무작위 서열, $(X)_8$을 도입한 펩타이드 변이체 LKKLLKLLKKL(XXXXXXXX)LKKLLKLLKKL를 pIII 외피 단백질의 N-말단에 발현하는 파지 디스플레이 라이브러리를 제조하였다. 재조합 파지미드의 재조합 효율은 약 83.3% 였으며, 제조된 파지 디스플레이 라이브러리의 다양성과 증폭 후 파지의 역가는 각각 1.4×10^8 cfu, 9.1×10^9 cfu/μL였다.

3.2 Biopanning을 통한 T세포 친화성 펩타이드의 선별 과정

파지 디스플레이 기술을 이용하여 제조한 1.4×10^8 cfu의 다양성이 있는 펩타이드 라이브러리에서 T세포에 친화성이 있는 펩타이드를 선별하였다.

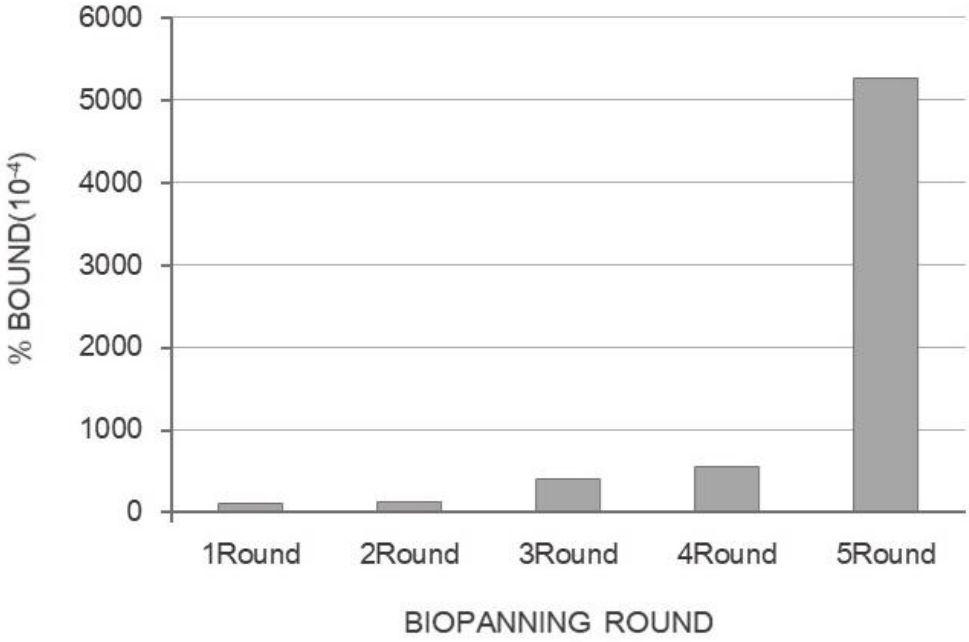
이를 위해 JurkatT 세포를 표적 세포로 선정하고, Biopanning 방법 중 Cell-surface panning을 이용하였다. 비특이적인 친화성이 있는 펩타이드를 제거하기 위해 JurkatT 세포 대비 10-100배 많은 수의 U2OS 세포를 사용하였다. 5번의 선별 과정을 반복한 결과, 산출 파지의 수는 4번째까지 감소한 후 5번째에서 증가했고(표 1), 투입 파지에 대한 산출 파지의 퍼센트(% Bound)는 4번째까지 서서히 증가했지만 5번째에서 급격히 증가했다(그림 5). 이 결과는 4번의 선별 과정을 통해 T세포에 친화성이 있는 파지가 선별되었음을 의미한다(Samli et al., 2005).

이후 4번째 선별 과정에서 얻은 파지 24개를 임의로 선택하여 DNA를 추출한 후 pIII 외피 단백질 N-말단에 융합된, CPP 부위의 염기서열을 조사하였다. 그 결과 CPP 부위의 아미노산 서열을 확인할 수 있었으며, 이를 빈도 순서대로 LK1-LK16으로 명명하였다(표 2).

[표 1] Cell-surface panning을 이용한 T세포 친화성 파지의 선별 과정

	1 Round	2 Round	3 Round	4 Round	5 Round
JurkatT Cell	10^6	10^5	10^5	10^5	10^5
U2OS Cell	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7
Input phage	4.69×10^{10}	6.06×10^8	8.10×10^6	3.58×10^5	3.85×10^5
Output phage	5.47×10^6	7.98×10^4	3.33×10^3	2.00×10^2	2.03×10^3
% Bound(10^{-4})	116.63	131.68	411.11	558.66	5272.73
Enrichment	-	1.13	3.12	1.36	9.44

양성 선택 세포로 JurkatT 세포를, 음성 선택 세포로 U2OS 세포를 사용하였다. 실험 결과 3.1에서 제조한 파지 디스플레이 라이브러리를 1번째 선별 과정의 투입 파지로 사용하였으며, 산출 파지를 증폭하여 다음 선별 과정의 투입 파지로 사용하였다. % Bound는 투입 파지에 대한 산출 파지의 퍼센트이며, Enrichment는 직전 선별 과정 대비 % Bound의 fold increase를 의미한다.



[그림 5] Cell-surface panning의 각 Round별 % Bound(10^{-4})

% Bound는 투입 파지에 대한 산출 파지의 퍼센트이다.

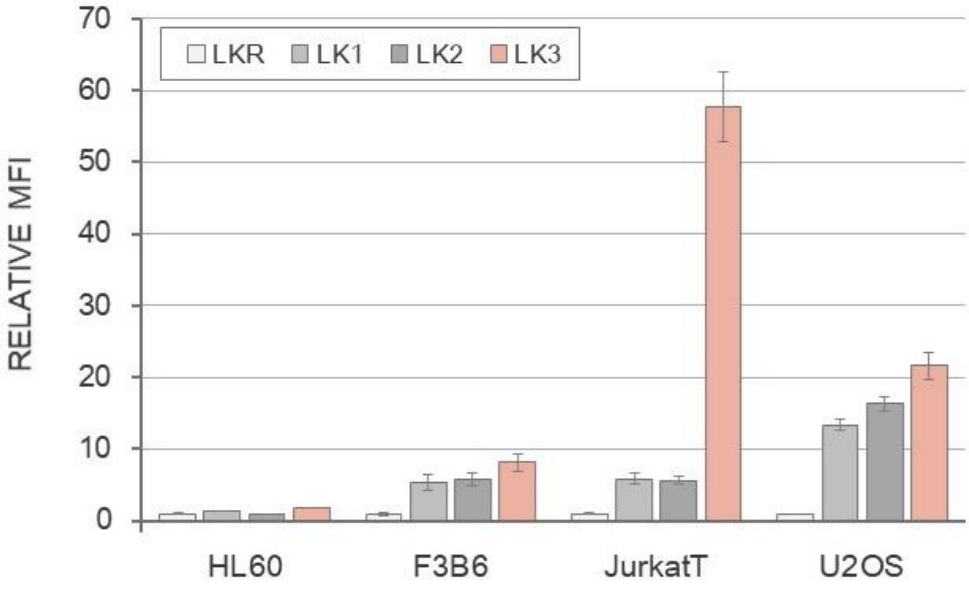
[표 2] 파지 디스플레이 기술로 선별한 T세포 친화성 후보 펩타이드의 아미노산 서열

Peptide	Sequence of peptide	Frequency
LK1	LKKLLKLLKKL LSATSSRA LKKLLKLLKKL	5 (20.8%)
LK2	LKKLLKLLKKL SSWSLWSG LKKLLKLLKKL	3 (12.5%)
LK3	LKKLLKLLKKL ICRWPSSR LKKLLKLLKKL	2 (8.3%)
LK4	LKKLLKLLKKL LLGMKLPY LKKLLKLLKKL	2 (8.3%)
LK5	LKKLLKLLKKL ACVINYIF LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK6	LKKLLKLLKKL DSAVICCQ LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK7	LKKLLKLLKKL FGFPALLV LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK8	LKKLLKLLKKL LLGGARPP LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK9	LKKLLKLLKKL LRNGRPLR LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK10	LKKLLKLLKKL PIWMSCVA LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK11	LKKLLKLLKKL PTIACVLD LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK12	LKKLLKLLKKL RRFPKSHR LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK13	LKKLLKLLKKL SLWLGMDL LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK14	LKKLLKLLKKL SVFRFWLF LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK15	LKKLLKLLKKL TRVSMQKH LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK16	LKKLLKLLKKL WSWDRRAS LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)

3.3 파지 디스플레이 기술로 선별된 펩타이드의 T세포 선택적 투과성

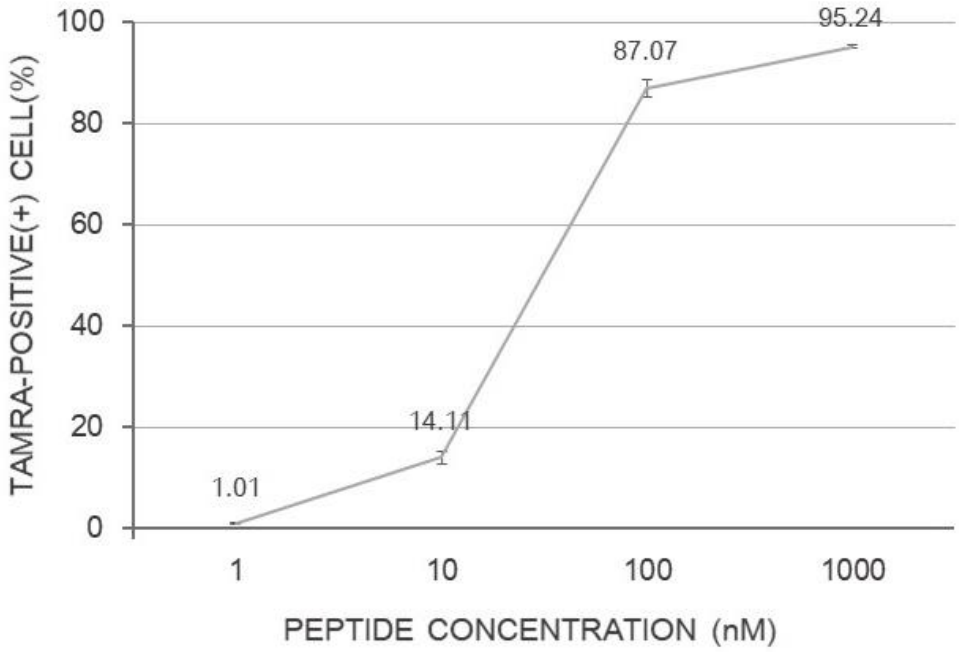
파지 디스플레이를 통해 선별된 LK 변형의 CPP 서열들이 실제로 T세포에 선택적 투과성이 있는지를 조사하였다. 이를 위해 확인된 16개의 서열 중 빈도가 높은 LK1, LK2, LK3을 조사 대상으로 선정하였으며, LK 모듈 사이에 SSGGSSGG의 임의 서열을 삽입한 펩타이드를 음성 대조군으로 사용하였다. 각각의 서열에 해당하는 펩타이드를 화학적으로 합성하고, N-말단을 형광 물질인 TAMRA (6-carboxy-tetramethyl-rodamine)로 표지하여 세포에 처리한 후, 유세포 분석기로 세포 투과 효율을 측정하였다. 그 결과 LKR 펩타이드에 대한 상대적인 평균 형광 강도(Relative MFI)가 LK1 펩타이드는 HL60, F3B6, JurkatT, U2OS 세포에서 각각 약 1.4, 5.4, 5.9, 13.4였으며, LK2 펩타이드는 각각 약 0.9, 5.7, 5.6, 16.3이었다. LK3 펩타이드는 HL60, F3B6, U2OS 세포에서 각각 약 1.8, 8.2, 21.6인 반면, JurkatT 세포에서는 약 57.7이었다(그림 6). 이 결과는 LK1, LK2 펩타이드는 T세포에 대한 선택성이 없는 반면 LK3 펩타이드는 T세포에 선택성이 있으며, LK 모듈 사이에 도입된 아미노산 서열인 ICRWPSSR에 의해 T세포의 표적과 상호작용할 가능성이 높음을 의미한다.

이후 T세포에 선택성이 있는 것으로 선별된 LK3 펩타이드의 농도에 따른 T세포 투과 효율을 조사하였다. 이를 위해 TAMRA 표지된 LK3 펩타이드를 4단계 농도로 세포에 처리한 후, 유세포 분석기로 세포 투과 효율을 측정하였다. 그 결과 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM 농도에서 형광을 나타내는 Jurkat T세포의 비율은 각각 약 1.01%, 14.11%, 87.07%, 95.24%였다(그림 7).



[그림 6] LKR, LK1, LK2, LK3 펩타이드의 세포 투과 효율

HL60 세포, F3B6 세포, JurkatT 세포, U2OS 세포에 각각의 TARMA 표지된 펩타이드를 100 nM 농도로 처리하고 12시간 배양한 후, 유세포 분석기로 각 세포가 나타내는 형광의 평균 세기를 측정했다. 펩타이드의 세포 투과 효율을 음성 대조군인 LKR에 대한 LK1, LK2, LK3의 상대적인 평균 형광 강도로 나타내었다. 독립적으로 3회 실행한 실험의 결과이며, Error bar는 표준편차를 나타낸다.



[그림 7] LK3 펩타이드 농도에 따른 T세포 투과 효율

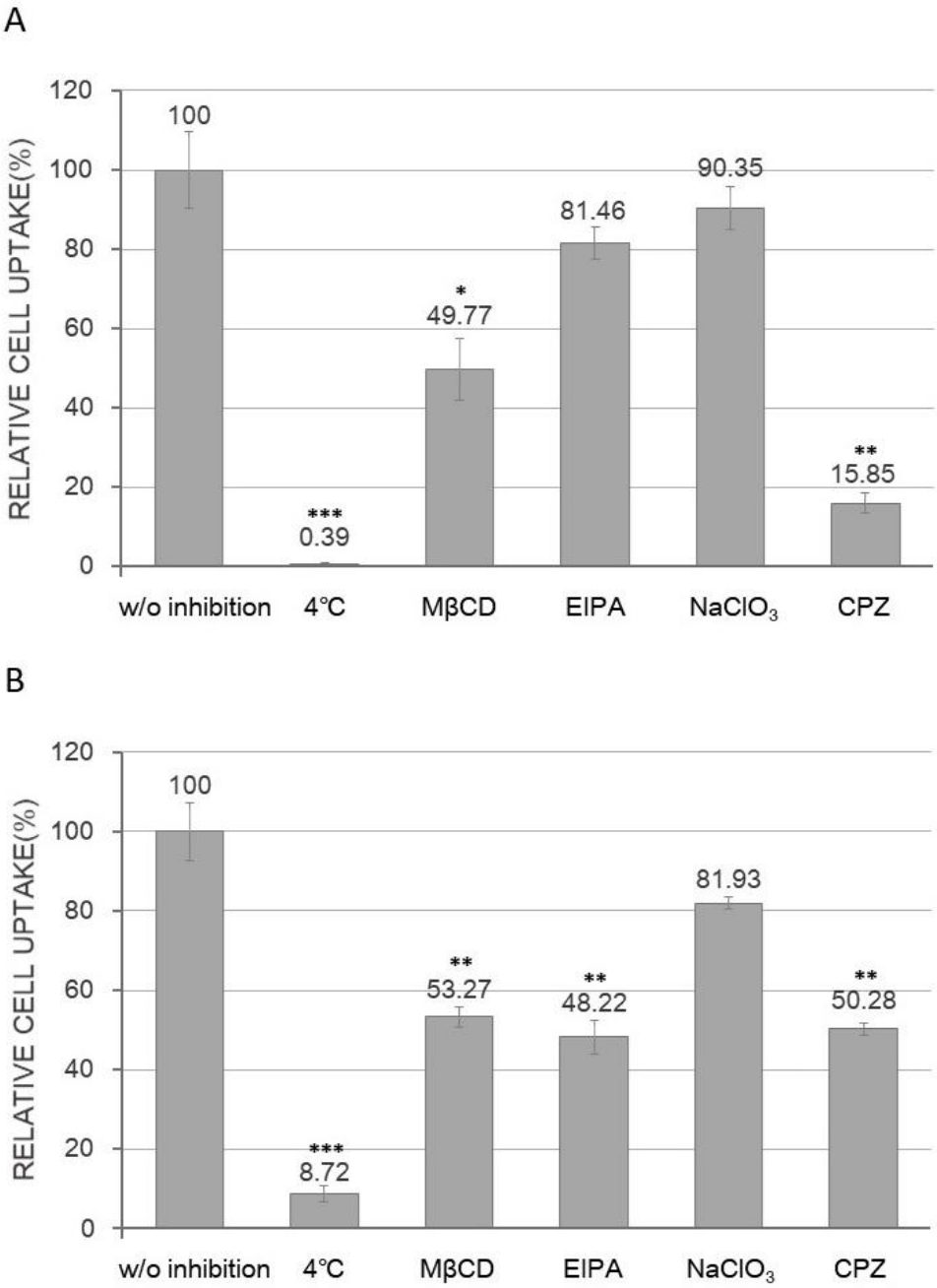
JurkatT 세포에 TARMA 표지된 LK3 펩타이드를 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1000 nM 농도로 각각 처리하고 12시간 배양한 후, 유세포 분석기로 형광을 나타내는 세포의 비율을 측정했다. 독립적으로 3회 실행한 실험의 결과이며, Error bar는 표준편차를 나타낸다.

3.4 LK3 펩타이드의 세포 투과 기전

T세포에 선택성이 있는 것으로 나타난 LK3 펩타이드의 세포 투과 기전을 조사하였다. LK3 펩타이드가 세포막을 직접 투과하는지 엔도사이토시스 기전으로 들어가는지를 확인하기 위해 엔도사이토시스 억제 조건인 4℃ 조건에서 T세포를 배양한 후 유세포 분석기로 LK3 펩타이드의 세포 투과 효율 변화를 측정하였다. 실험 결과 LK3 펩타이드의 T세포 투과 효율은 4℃ 조건에서 억제를 가하지 않은 조건 대비 거의 100% 감소했다(그림 8A). 이 결과는 LK3 펩타이드가 에너지 의존적인 엔도사이토시스로 세포막을 통과함을 의미한다.

LK3 펩타이드의 엔도사이토시스 경로를 조사하기 위해 T세포에 다양한 엔도사이토시스 억제제인 Methyl-β-cyclodextrin (MβCD, Lipid raft 연관 엔도사이토시스 억제제), 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA, Cdc42 의존적 엔도사이토시스 억제제), Chlorpromazine(CPZ, Clathrin 매개 엔도사이토시스 억제제), Sodium chlorate ($NaClO_3$, Heparan sulfate proteoglycan 매개 엔도사이토시스 억제제)를 처리한 조건에서 LK3 펩타이드의 세포 투과 효율 변화를 측정하였다. 그 결과, LK3 펩타이드의 T세포 투과 효율은 억제제인 MβCD, EIPA, $NaClO_3$,를 처리한 조건에서 억제를 가하지 않은 조건 대비 각각 약 50%, 19%, 10% 감소했으며, 특히 CPZ을 처리한 조건에서 84% 이상 크게 감소했다(그림 8A). 이 결과는 LK3 펩타이드가 세포막 수용체를 매개하여 T세포를 통과함을 의미한다.

한편, LK3 펩타이드의 골육세포 투과 효율은 4℃ 조건에서 억제를 가하지 않은 조건 대비 약 91% 감소했으며, MβCD, EIPA, $NaClO_3$, CPZ 처리 조건에서 억제를 가하지 않은 조건 대비 각각 약 47%, 52%, 18%, 50% 감소했다(그림 8B).



[그림 8] 엔도사이토시스 억제 조건에서 LK3 펩타이드의 T세포(A) 및 골육세포(B) 투과 효율

JurkatT 세포와 U2OS 세포를 엔도사이토시스 억제 조건에서 30분

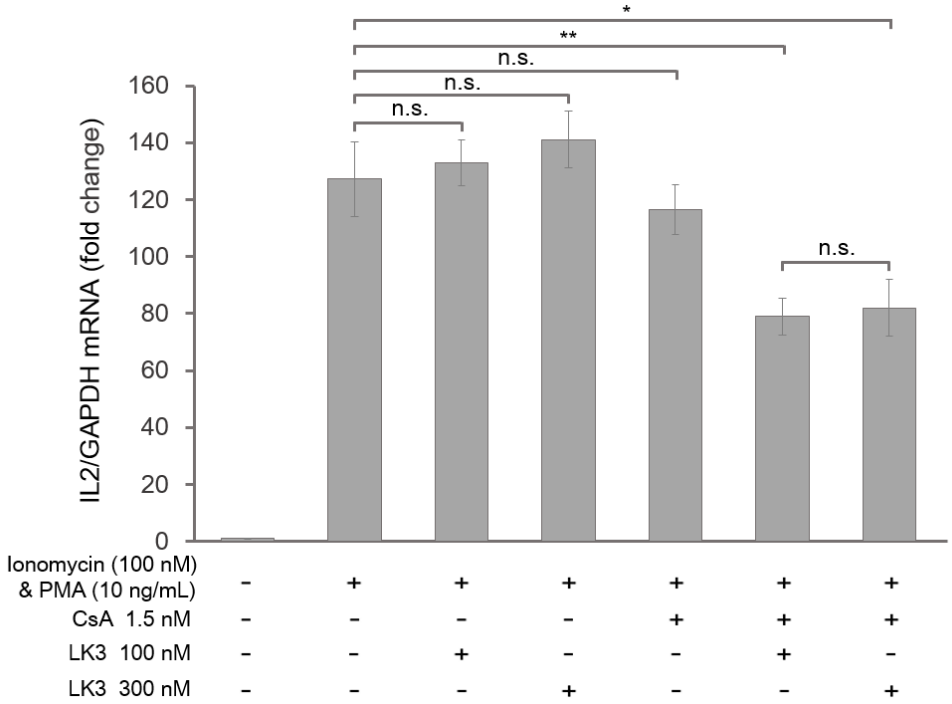
배양한 후 100 nM 농도의 펩타이드를 처리하고 1시간 추가적으로 배양한 뒤 유세포 분석기로 각 세포가 나타내는 형광의 평균 강도를 측정하였다. 엔도사이토시스 억제 조건에서 LK3 펩타이드의 JurkatT 세포(그림 8A) 및 U2OS 세포(그림 8B) 투과 효율 변화를 억제를 가하지 않은 조건의 세포 투과 효율에 대한 상대적인 비율(Relative cell uptake(%))로 나타내었다. 독립적으로 3회 실행한 실험의 결과이며, Error bar는 표준편차를 나타낸다(*p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001).

3.5 LK3 펩타이드의 약물 운반 능력

LK3 펩타이드의 약물 운반 능력을 조사하고자 하였다. 이를 위해 Ionomycin과 PMA를 처리하여 T세포의 Interleukin-2 (IL-2) 생성을 활성화한 후, IL-2 생성을 억제하는 약물인 Cyclosporine A (CsA)를 단독으로 처리한 조건과 CsA와 LK3 펩타이드를 함께 처리한 조건에서 GAPDH에 대한 IL-2의 상대적인 mRNA 발현량을 q-RT PCR로 확인하였다.

그 결과 GAPDH에 대한 IL-2의 상대적인 mRNA 발현량은 CsA를 1.5 nM 농도로 처리한 조건에서 약 116.58로, 활성화 조건의 발현량인 약 127.18과 유의미한 차이가 없었다. 반면, CsA 1.5 nM와 LK3 펩타이드 100 nM, CsA 1.5 nM와 LK3 펩타이드 300 nM를 함께 처리한 조건에서는 각각 약 78.93, 82.05로, 활성화 조건의 발현량과 유의미한 차이를 보였다. LK3 펩타이드가 T세포의 IL-2 발현량에 영향을 미쳐 이와 같은 결과가 나타난 것인지를 확인하기 위해, LK3 펩타이드 만 처리한 조건에서 GAPDH에 대한 IL-2의 상대적인 mRNA 발현량을 조사하였다. 그 결과 LK3 펩타이드 100 nM와 LK3 펩타이드 300 nM을 처리한 조건에서 각각 약 132.92, 141.13으로 활성화 조건과 유의미한 차이가 없었다(그림 9). 이 결과는 LK3 펩타이드가 CsA를 T세포 내부로 운반하는 능력이 있음을 의미한다.

한편, LK3 펩타이드의 CsA 운반 능력은 100 nM와 300 nM의 농도에서 유의미한 차이가 없었다(그림 9).



[그림 9] LK3 펩타이드의 CsA 운반 능력

CsA와 LK3 펩타이드를 개별적으로 처리한 조건과 CsA와 LK3 펩타이드를 함께 처리한 조건에서, Ionomycin과 PMA를 처리하여 활성화한 JurkatT 세포의 IL-2 mRNA 발현량 변화를 qRT-PCR로 확인하였다. IL-2 mRNA 발현량은 GAPDH에 대한 상대적인 발현량으로 정규화하였으며, Ionomycin과 PMA를 처리하지 않은 조건의 상대적인 IL-2 mRNA 발현량에 대한 fold change로 나타내었다. 독립적으로 3회 실행한 실험의 결과이며, 각 회당 2번의 qRT-PCR 결괏값을 정량하였다. Error bar는 표준편차를 나타낸다(*p <0.05, ** p <0.01).

제 4장. 논의

세포 투과 펩타이드(CPP)는 세포 투과 능력이 낮은 약물을 세포 내부로 전달하는 운반체로 주목받으면서, 세포 투과성 또는 세포 선택성을 향상시킨 다양한 CPP가 개발되었다. 현재까지 개발된 CPP의 아미노산 서열은 CPP마다 큰 차이가 있지만, 양이온성, 소수성, 양친매성 CPP는 세포 투과성이 높은 반면 세포 선택성은 없으며(Zahid, 2015), 파지 디스플레이 기술로 개발된 세포 선택적 CPP는 세포 선택성이 있는 반면 세포 투과성은 낮은 것으로 알려져 있다(Svensen et al., 2012).

본 연구에서는 세포 투과성이 높은 동시에 T세포에 대한 선택성이 있는 CPP를 개발하고자 하였다. 이를 위해 LK 모듈의 양친매성 CPP를 변형하여 무작위 서열을 도입한 펩타이드 변이체의 파지 디스플레이 라이브러리를 제조한 후, 이를 이용하여 T세포 친화성 후보 펩타이드를 선별하였다(표 2). T세포에 대한 친화성 빈도가 높은 LK1, LK2, LK3 펩타이드 서열을 합성하여 형광 표지한 후 세포 투과 효율을 측정한 결과, LK3 펩타이드만 T세포에 대한 선택성이 있음을 확인할 수 있었다(그림 6). M13 박테리오파지의 pIII 외피 단백질에 발현된 LK1, LK2 펩타이드의 카피 수가 LK3 펩타이드의 카피 수보다 많아 선별 과정에서 농축되어 LK3 펩타이드보다 친화성이 높게 나타난 것으로 보여진다(Bazan et al., 2012).

T세포에 선택성이 있는 것으로 선별된 LK3 펩타이드의 농도에 따른 T세포 투과 효율을 조사한 결과, LK3 펩타이드는 100 nM 농도에서 약 87%, 1000 nM 농도에서 약 95%의 높은 세포 투과성이 있는 반면 10 nM 농도에서는 약 14%의 제한된 세포 투과성을 보였다(그림 7). LK3 펩타이드의 세포 투과성은 10 nM 농도에서 70~90%의 세포 투과성

이 있는 LK 모듈의 양친매성 CPP(Jang et al., 2014)와 비교하면 낮은 수치였으나 25 μM 이상의 농도에서 세포 투과성이 있는 세포 선택적 CPP(Mi et al., 2003; Zahid et al., 2010)와 비교하면 높은 수치였다. 펩타이드 라이브러리의 제작 과정에서 기대한 바와 같이 양친매성 CPP의 일부 서열을 제거하고 무작위 서열을 도입하여 세포 투과성은 LK 모듈의 CPP보다 낮아졌지만, 8개의 무작위 서열로 인해 T세포에 대한 선택성을 가질 수 있었던 것으로 보여진다.

또한 세포 투과 기전을 조사한 결과, LK3 펩타이드는 직접 투과와 엔도사이토시스를 혼용하여 세포막을 통과하는 일반적인 CPP와 달리 엔도사이토시스 기전으로 T세포를 통과하며, 주로 세포막 수용체를 매개하여 T세포를 통과하였다(그림 8A). 반면 LK3 펩타이드가 골육 세포를 통과할 때는 T세포에서의 투과 기전과 달리 약 9%가 세포막을 직접 투과하였으며, 특정 엔도사이토시스 경로에 대한 선호없이 여러 엔도사이토시스 경로를 혼용하여 세포막을 통과하였다(그림 8B). MβCD를 처리한 조건에서는 LK3 펩타이드의 세포 투과 효율이 T세포와 골육 세포에서 유사한 수준으로 감소하였다(그림 8). MβCD가 Lipid raft의 콜레스테롤 뿐만 아니라 세포막의 콜레스테롤을 고갈(depletion)시켜 세포막의 불안정성이 증가하면서 비특이적인 엔도사이토시스 억제 효과가 나타난 것으로 보여진다(Mahammad & Parmryd, 2008). LK3 펩타이드와 상호작용하는 T세포의 세포막 수용체에 대해서는 향후 추가적인 연구가 필요하다.

LK3 펩타이드의 약물 운반 능력을 조사한 결과, T세포의 IL-2에 의한 면역 반응을 억제하는 약물인 Cyclosporin A를 T세포 내부로 운반하는 능력이 있음도 확인하였다(그림 9). LK3 펩타이드가 CsA를 T세포에 선택적으로 운반하여 약효를 나타내는지에 대해서는 *In vivo*에서의 추가 실험이 필요하다.

본 연구의 결과들을 바탕으로 양친매성 CPP를 변형한 파지 디스플레이 라이브러리의 제조 및 선별 방법이 세포 투과성이 높은 동시에 세포 선택성이 있는 CPP를 개발하는데 유용함을 확인하였다. 향후 파지 디스플레이 라이브러리의 다양성을 높이는 연구를 통해 여러 표적 세포 선택적 투과 펩타이드를 개발하는데 적용될 수 있을 것으로 기대한다. 또한 본 연구에서 얻은 LK3 펩타이드는 T세포에 대한 선택성이 높고 T세포로 약물을 운반하는 능력이 있으므로, T세포에 대한 약물의 효능을 증가시키고 약물 복용으로 인해 비표적 세포에 야기되는 부작용을 감소시킬 수 있는 T세포 선택적 약물 운반체 개발에 이용될 수 있을 것으로 기대한다.

참고문헌

이증훈, 김수연. (2010). 농포성 건선 및 홍피성 건선의 치료. *대한건선학회지, 7*(1), 5-8.

최현정. (2016). *파지 디스플레이 라이브러리를 이용한 세포특이적 투과펩타이드의 탐색*. 석사학위논문, 서울대학교, 서울.

Abbas, A. K., Murphy, K. M., & Sher, A. (1996). Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature, 383*(6603), 787-793.

Adda, C. G., Anders, R. F., Tilley, L., & Foley, M. (2002). Random sequence libraries displayed on phage: identification of biologically important molecules. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 5*(1), 1-14.

Arts, E. J., & Hazuda, D. J. (2012). HIV-1 antiretroviral drug therapy. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2*(4), a007161.

Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., & Sakaguchi, S. (1996). Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *Journal of Experimental Medicine, 184*(2), 387-396.

Bass, S., Greene, R., & Wells, J. A. (1990). Hormone phage: an enrichment method for variant proteins with altered binding properties. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 8*(4), 309-314.

Bazan, J., Całkosiński, I., & Gamian, A. (2012). Phage display—A powerful technique for immunotherapy: 1. Introduction and potential of therapeutic applications. *Human Vaccines & Immunotherapeutics, 8*(12), 1817-1828.

Carr, A., & Cooper, D. A. (2000). Adverse effects of antiretroviral therapy. *The Lancet, 356*(9239), 1423-1430.

Chatila, T., Silverman, L., Miller, R., & Geha, R. (1989). Mechanisms of T cell activation by the calcium ionophore ionomycin. *The Journal of Immunology, 143*(4), 1283-1289.

Cho, S.-K., & Bae, S.-C. (2017). Pharmacologic treatment of rheumatoid arthritis. *Journal of the Korean Medical Association, 60*(2), 156-163.

Choy, E. H., & Panayi, G. S. (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *New England Journal of Medicine, 344*(12), 907-916.

Copolovici, D. M., Langel, K., Eriste, E., & Langel, U. (2014). Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano, 8*(3), 1972-1994.

Cutolo, M., Sulli, A., Pizzorni, C., Seriolo, B., & Straub, R. (2001). Anti-inflammatory mechanisms of methotrexate in rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases, 60*(8), 729-735.

de Kruif, J., Terstappen, L., Boel, E., & Logtenberg, T. (1995). Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 92*(9), 3938-3942.

Duchardt, F., Fotin-Mleczek, M., Schwarz, H., Fischer, R., & Brock, R. (2007). A comprehensive model for the cellular uptake of cationic cell-penetrating peptides. *Traffic, 8*(7), 848−866.

El−Sayed, A., & Harashima, H. (2013). Endocytosis of gene delivery vectors: from clathrin−dependent to lipid raft−mediated endocytosis. *Molecular Therapy, 21*(6), 1118−1130.

Fernández-Carneado, J., Kogan, M. J., Pujals, S., & Giralt, E. (2004). Amphipathic peptides and drug delivery. *Peptide Science, 76*(2), 196−203.

Fuh, G., & Sidhu, S. S. (2000). Efficient phage display of polypeptides fused to the carboxy-terminus of the M13 gene-3 minor coat protein. *FEBS letters, 480*(2−3), 231−234.

Golucci, A. P. B. S., Marson, F. A. L., Valente, M. F. F., Branco, M. M., Prado, C. C., & Nogueira, R. J. N. (2018). Influence of AIDS antiretroviral therapy on the growth pattern. *Jornal de Pediatria*, *652*, 1−11.

Green, M., & Loewenstein, P. M. (1988). Autonomous functional domains of chemically synthesized human immunodeficiency virus tat trans−activator protein. *Cell, 55*(6), 1179−1188.

Hoogenboom, H. R., de Bruine, A. P., Hufton, S. E., Hoet, R. M., Arends, J. W., & Roovers, R. C. (1998). Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology, 4*(1), 1−20.

Hyun, S., Choi, Y., Lee, H. N., Lee, C., Oh, D., Lee, D.−K., Lee, C., Lee, Y., Yu, J. (2018). Construction of histidine−containing hydrocarbon stapled cell penetrating peptides for in vitro and in vivo delivery of siRNAs. *Chemical Science*, *9*, 3820−3827.

Hyun, S., Kim, H. J., Lee, N. J., Lee, K. H., Lee, Y., Ahn, D. R., Kim, K., Jeong, S., Yu, J. (2007). α-helical peptide containing N, N-dimethyl lysine residues displays low-nanomolar and highly specific binding to RRE RNA. *Journal of the American Chemical Society, 129*(15), 4514-4515.

Hyun, S., Na, J., Lee, S. J., Park, S., & Yu, J. (2010). RNA Grooves Can Accommodate Disulfide-Bridged Bundles of a-Helical Peptides. *ChemBioChem, 11*(6), 767-770.

Jain, R. G., Furfine, E. S., Pedneault, L., White, A. J., & Lenhard, J. M. (2001). Metabolic complications associated with antiretroviral therapy. *Antiviral Research, 51*(3), 151-177.

Jang, S., Hyun, S., Kim, S., Lee, S., Lee, I. S., Baba, M., Lee, Y., Yu, J. (2014). Cell-Penetrating, Dimeric alpha-Helical Peptides: Nanomolar Inhibitors of HIV-1 Transcription. *Angewandte Chemie-International Edition, 53*(38), 10086-10089.

Lim, S., Lee, J. A., Koo, J. H., Kang, T. G., Ha, S. J., & Choi, J. M. (2016). Cell Type Preference of a Novel Human Derived Cell-Permeable Peptide dNP2 and TAT in Murine Splenic Immune Cells. *Plos One, 11*(5), 1-17.

Lv, Z., Chu, Y., & Wang, Y. (2015). HIV protease inhibitors: a review of molecular selectivity and toxicity. *HIV/AIDS (Auckland, NZ), 7*, 95-104.

Madani, F., Lindberg, S., Langel, Ü., Futaki, S., & Gräslund, A. (2011). Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *Journal of Biophysics, 2011*, 1-10.

Mahammad, S., & Parmryd, I. (2008). Cholesterol homeostasis in T cells. Methyl-β-cyclodextrin treatment results in equal loss of cholesterol from Triton X-100 soluble and insoluble fractions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes, 1778*(5), 1251-1258.

Malik, P., Terry, T. D., Gowda, L. R., Langara, A., Petukhov, S. A., Symmons, M. F., Welsh, L, C., Marvin, D, A., Perham, R. N. (1996). Role of capsid structure and membrane protein processing in determining the size and copy number of peptides displayed on the major coat protein of filamentous bacteriophage. *Journal of Molecular Biology, 260*(1), 9-21.

Martín, I., Teixidó, M., & Giralt, E. (2010). Building cell selectivity into CPP-mediated strategies. *Pharmaceuticals, 3*(5), 1456-1490.

Mi, Z., Lu, X., Mai, J. C., Ng, B. G., Wang, G., Lechman, E. R., Watkins, S., Rabinowich, H., Robbins, P. D. (2003). Identification of a synovial fibroblast-specific protein transduction domain for delivery of apoptotic agents to hyperplastic synovium. *Molecular Therapy, 8*(2), 295-305.

Miedema, F., Petit, A., Terpstra, F. G., Schattenkerk, J., De Wolf, F., Al, B., Roos, M., Lange, J., Danner, S., Goudsmit, J. (1988). Immunological abnormalities in human immunodeficiency virus (HIV)-infected asymptomatic homosexual men. HIV affects the immune system before CD4+ T helper cell depletion occurs. *The Journal of Clinical Investigation, 82*(6), 1908-1914.

Miller, J. F. (2011). The golden anniversary of the thymus. *Nature Reviews Immunology, 11*(7), 489-495.

Molek, P., Strukelj, B., & Bratkovic, T. (2011). Peptide Phage Display as a Tool for Drug Discovery: Targeting Membrane Receptors. *Molecules, 16*(1), 857-887.

Nishikawa, H., Jäger, E., Ritter, G., Old, L. J., & Gnjatic, S. (2005). CD4+ CD25+ regulatory T cells control the induction of antigen-specific CD4+ helper T cell responses in cancer patients. *Blood, 106*(3), 1008-1011.

Oh, J.-W., Seroogy, C. M., Meyer, E. H., Akbari, O., Berry, G., Fathman, C. G., DeKruyff, R, H., Umetsu, D. T. (2002). CD4 T-helper cells engineered to produce IL-10 prevent allergen-induced airway hyperreactivity and inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 110*(3), 460-468.

Pande, J., Szewczyk, M. M., & Grover, A. K. (2010). Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances, 28*(6), 849-858.

Paschke, M. (2006). Phage display systems and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology, 70*(1), 2-11.

Rothbard, J. B., Garlington, S., Lin, Q., Kirschberg, T., Kreider, E., McGrane, P. L., Wender, P. A., Khavari, P. A. (2000). Conjugation of arginine oligomers to cyclosporin A facilitates topical delivery and inhibition of inflammation. *Nature Medicine, 6*(11), 1253-1257.

Ruigrok, V. J., Levisson, M., Eppink, M. H., Smidt, H., & Van Der Oost, J. (2011). Alternative affinity tools: more attractive than antibodies? *Biochemical Journal, 436*(1), 1-13.

Samli, K. N., McGuire, M. J., Newgard, C. B., Johnston, S. A., & Brown, K. C. (2005). Peptide-mediated targeting of the islets of Langerhans. *Diabetes, 54*(7), 2103-2108.

Shadidi, M., & Sioud, M. (2003). Selective targeting of cancer cells using synthetic peptides. *Drug Resistance Updates, 6*(6), 363-371.

Sidhu, S. S. (2000). Phage display in pharmaceutical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology, 11*(6), 610-616.

Sidhu, S. S. (2001). Engineering M13 for phage display. *Biomolecular Engineering, 18*(2), 57-63.

Siegel, D. L., Chang, T. Y., Russell, S. L., & Bunya, V. Y. (1997). Isolation of cell surface-specific human monoclonal antibodies using phage display and magnetically-activated cell sorting: applications in immunohematology. *Journal of Immunological Methods, 206*(1-2), 73-85.

Skapenko, A., Leipe, J., Lipsky, P. E., & Schulze-Koops, H. (2005). The role of the T cell in autoimmune inflammation. *Arthritis Research & Therapy, 7*(2), S4-S14.

Smith, G. P. (1985). Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science, 228*(4705), 1315-1317.

Stewart, K. M., Horton, K. L., & Kelley, S. O. (2008). Cell-penetrating peptides as delivery vehicles for biology and medicine. *Organic & biomolecular chemistry, 6*(13), 2242-2255.

Svensen, N., Walton, J. G., & Bradley, M. (2012). Peptides for cell-selective drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences, 33*(4), 186-192.

Terashima, T., Amakawa, K., Matsumaru, A., & Yamaguchi, K. (2002). Correlation between cysteinyl leukotriene release from leukocytes and clinical response to a leukotriene inhibitor. *Chest, 122*(5), 1566-1570.

Vives, E., Brodin, P., & Lebleu, B. (1997). A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *Journal of Biological Chemistry, 272*(25), 16010-16017.

Vivès, E., Schmidt, J., & Pèlegrin, A. (2008). Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1786*(2), 126-138.

Weinblatt, M., Kaplan, H., Germain, B., Merriman, R., Solomon, S., Wall, B., Anderson, L., Block, S., Small, R., Wolfe, F. (1991). Methotrexate in rheumatoid arthritis: effects on disease activity in a multicenter prospective study. *The Journal of Rheumatology, 18*(3), 334-338.

Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., & Hoogenboom, H. R. (1994). Making antibodies by phage display technology. *Annual Review of Immunology, 12*(1), 433-455.

Yamashita, H., Kato, T., Oba, M., Misawa, T., Hattori, T., Ohoka, N., Tanaka, M., Naito, M., Kurihara, M., Demizu, Y. (2016). Development of a cell-penetrating peptide that exhibits responsive changes in its secondary structure in the cellular environment. *Scientific Reports, 6*, 33003-33010.

Zahid, M., Phillips, B. E., Albers, S. M., Giannoukakis, N., Watkins, S. C., & Robbins, P. D. (2010). Identification of a cardiac specific protein transduction domain by in vivo biopanning using a M13 phage peptide display library in mice. *Plos One, 5*(8), e12252.

Zahid, M., & Robbins, P. D. (2015). Cell-Type Specific Penetrating Peptides: Therapeutic Promises and Challenges. *Molecules, 20*(7), 13055-13070.

Zorko, M., & Langel, U. (2005). Cell-penetrating peptides: mechanism and kinetics of cargo delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews, 57*(4), 529-545.

Abstract

Development of a T cell selective penetrating peptide modified from the amphipathic cell penetrating peptide

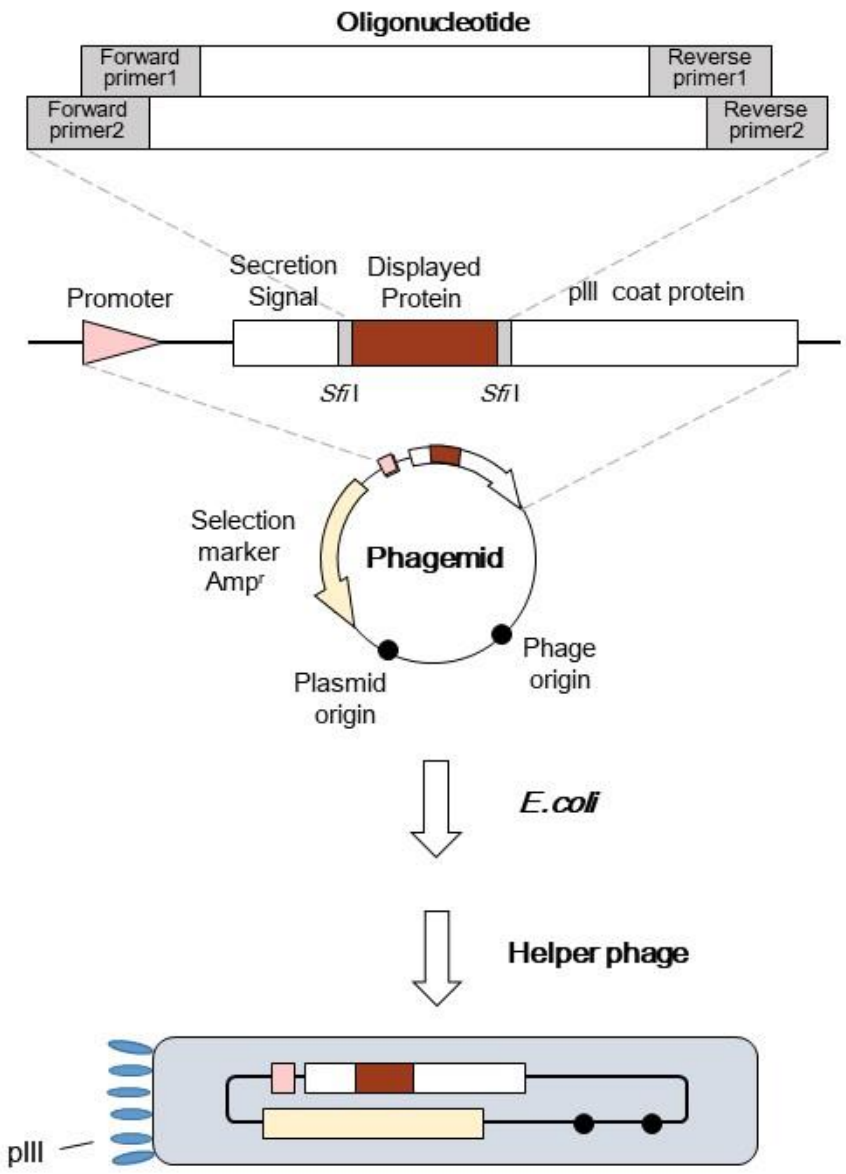
Min Kyoung, Kim
Biology Education Major
Department of Science Education
The Graduate School
Seoul National University

This study aimed to develop Cell Penetrating Peptide(CPP) which has high cell permeability and selectivity to T cell.

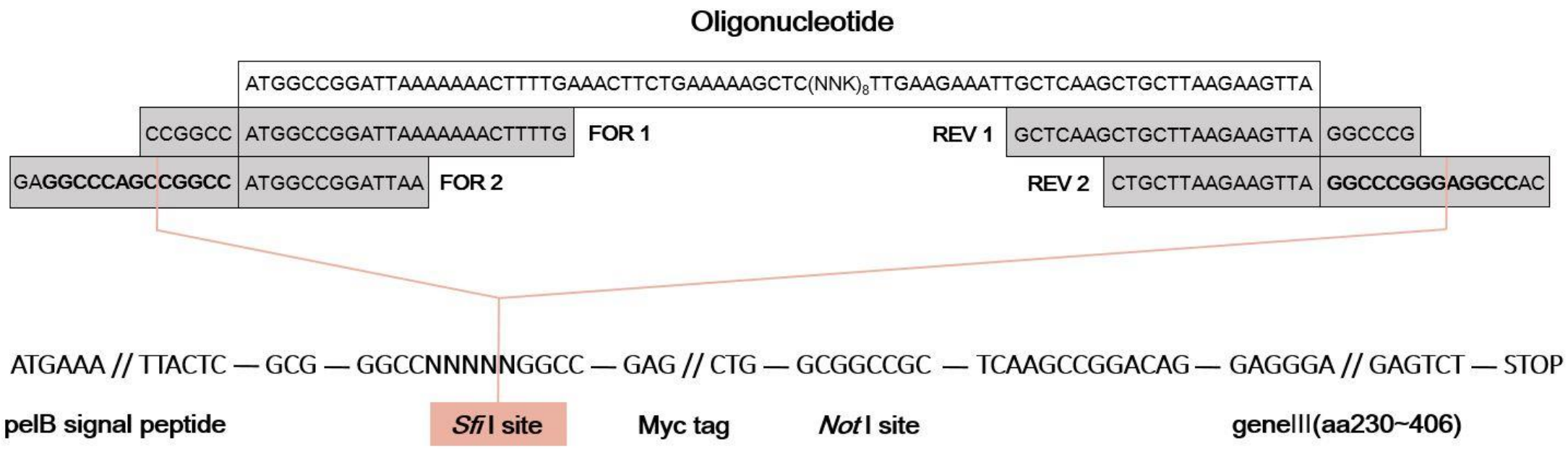
For this purpose, phage display library of peptide variants with random sequence which is modified from the amphipathic CPP known as having high cell permeability were prepared. And peptides with affinity to T cells were screened. Among these, we choose three peptide sequences with high affinity. These peptides were synthesized and tagged with fluorescence labeling, and the cell penetration efficiency was measured with a flow cytometer. Among the three peptides, LK3 peptides showed high selectivity to T cells. In addition, LK3 peptides pass through T cells in a cell membrane receptor-dependent manner at the nanomolar concentration, and carry immunosuppressive drug cyclosporin A to T cells.

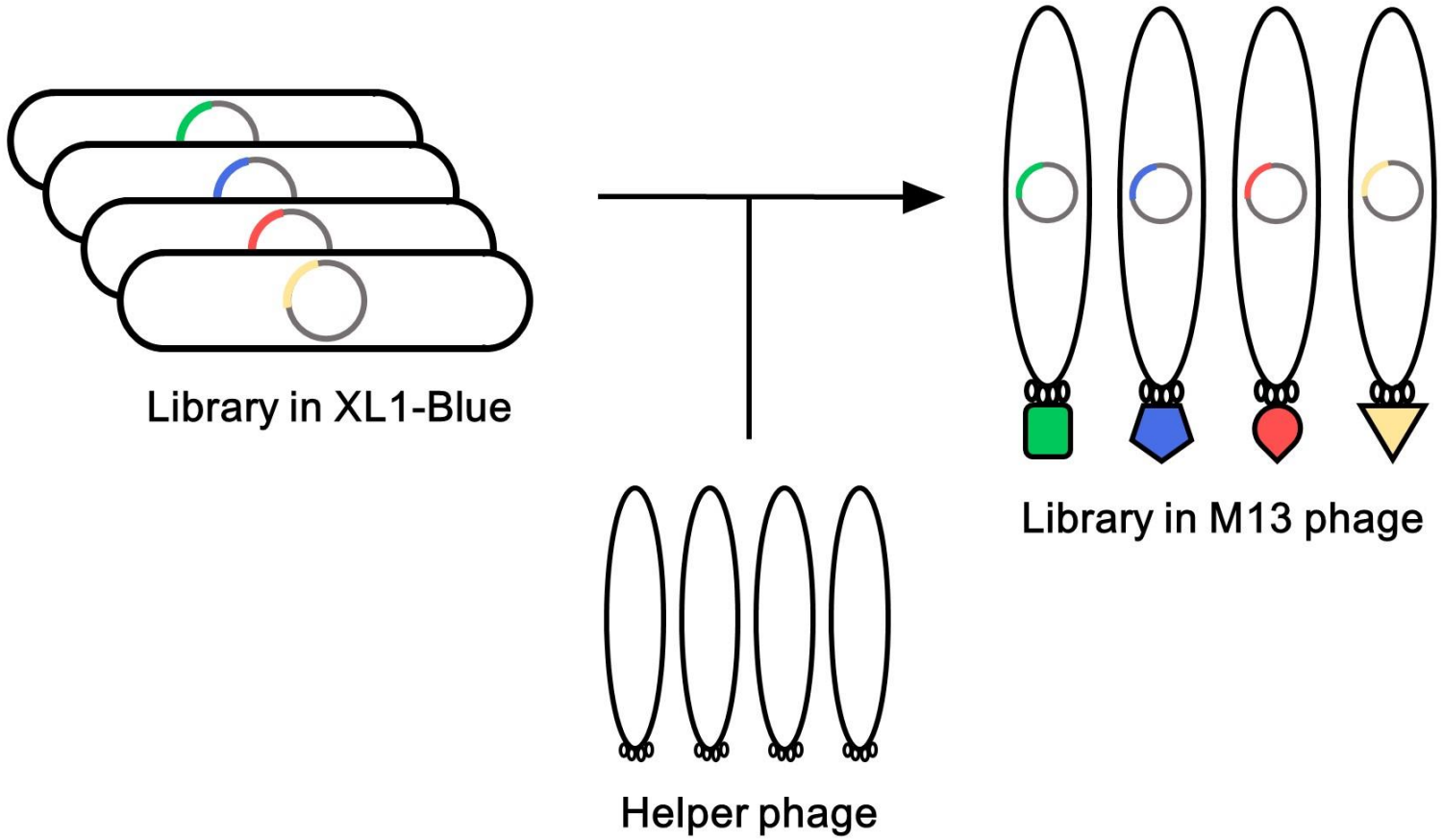
As a result of these study, we conformed construction and screening method of phage display library which is modified from amphipathic CPP could be useful for the development of cell selective CPP. Our study expected to contribute in the development of a variety of target cell-selective penetrating peptides. LK3 peptide in this study is highly selective to T cell and has drug delivery ability. It can be used in the development of T cell selective drug carrier.

keywords: Cell Penetrating Peptide(CPP),
Phage display technology, Biopanning, T cell
Student Number: 2016-21592

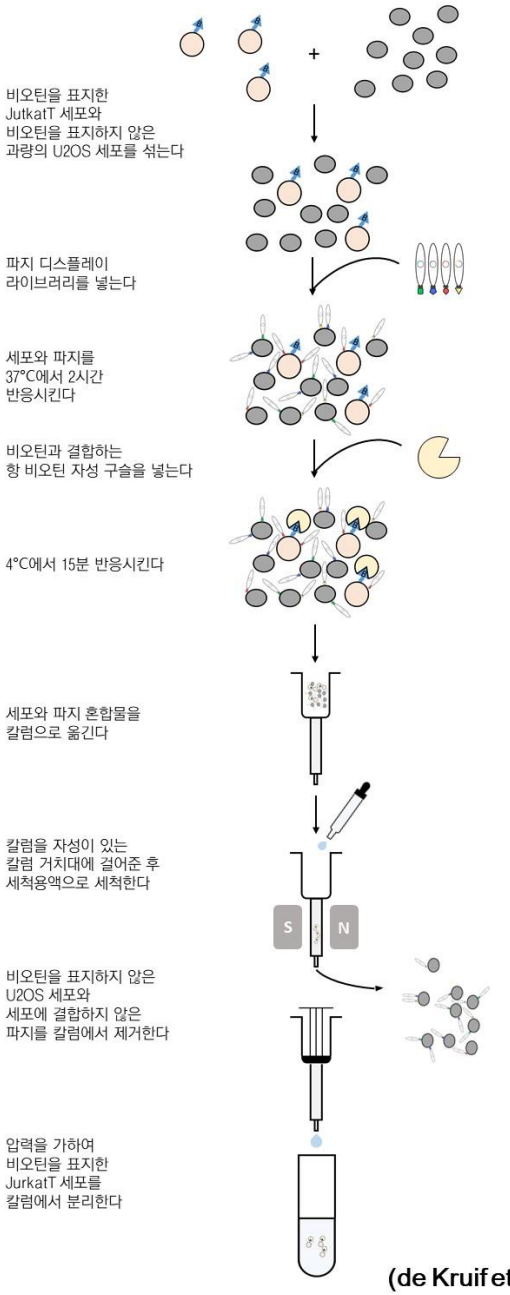

Oligonucleotide
Forward primer1
Reverse primer1
Forward primer2
Reverse primer2
Secretion Signal
Displayed Protein
Promoter
pIII coat protein
SfiI
SfiI
Selection marker Amp^r
Phagemid
Plasmid origin
Phage origin
E.coli
Helper phage
pIII

(Sidhu, 2001)

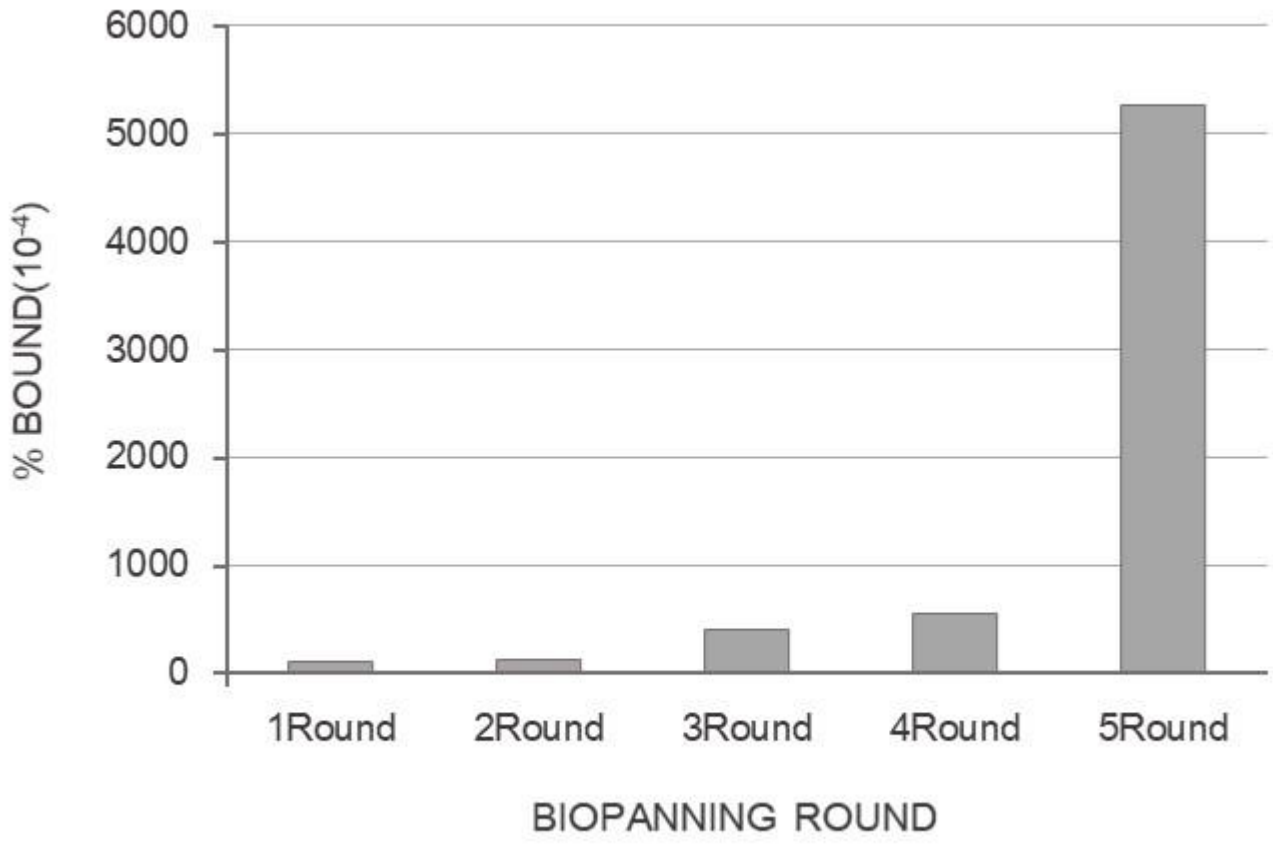

Oligonucleotide
ATGGCCGGATTAAAAAAACTTTTGAAACTTCTGAAAAAGCTC(NNK)8TTGAAGAAATTGCTCAAGCTGCTTAAGAAGTTA
CCGGCC
ATGGCCGGATTAAAAAAACTTTTG
FOR 1
REV 1
GCTCAAGCTGCTTAAGAAGTTA
GGCCCG
GAGGCCCAGCCGGCC
ATGGCCGGATTAA
FOR 2
REV 2
CTGCTTAAGAAGTTA
GGCCCGGGAGGCCAC
ATGAAA // TTACTC — GCG — GGCCNNNNNGGCC — GAG // CTG — GCGGCCGC — TCAAGCCGGACAG — GAGGGA // GAGTCT — STOP
pelB signal peptide
Sfi I site
Myc tag
Not I site
geneIII(aa230~406)

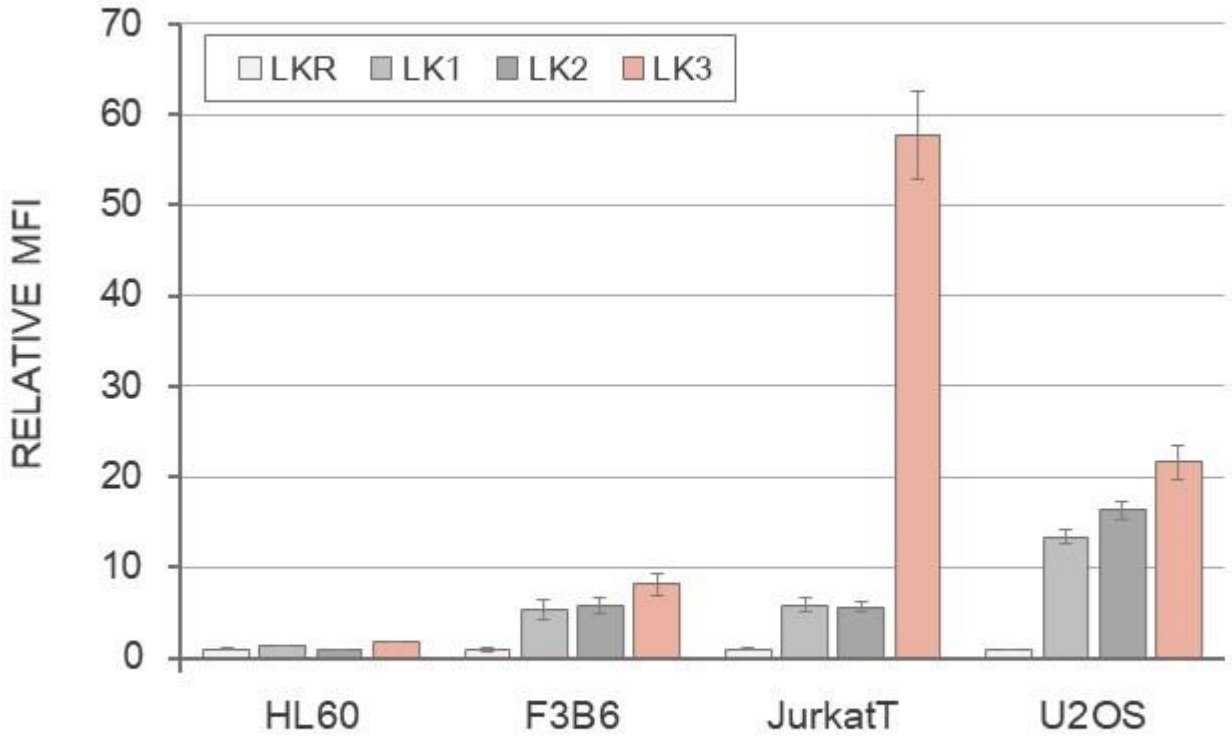


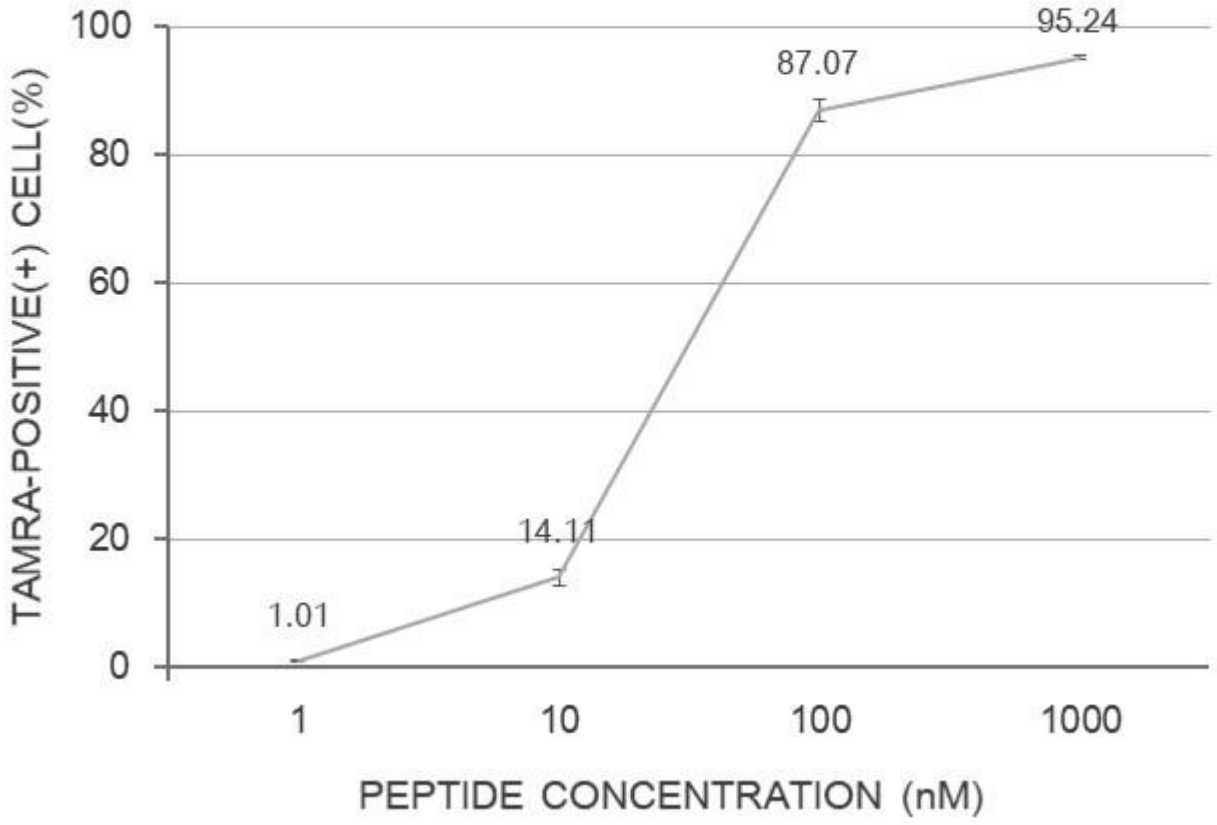
(Paschke, 2006)



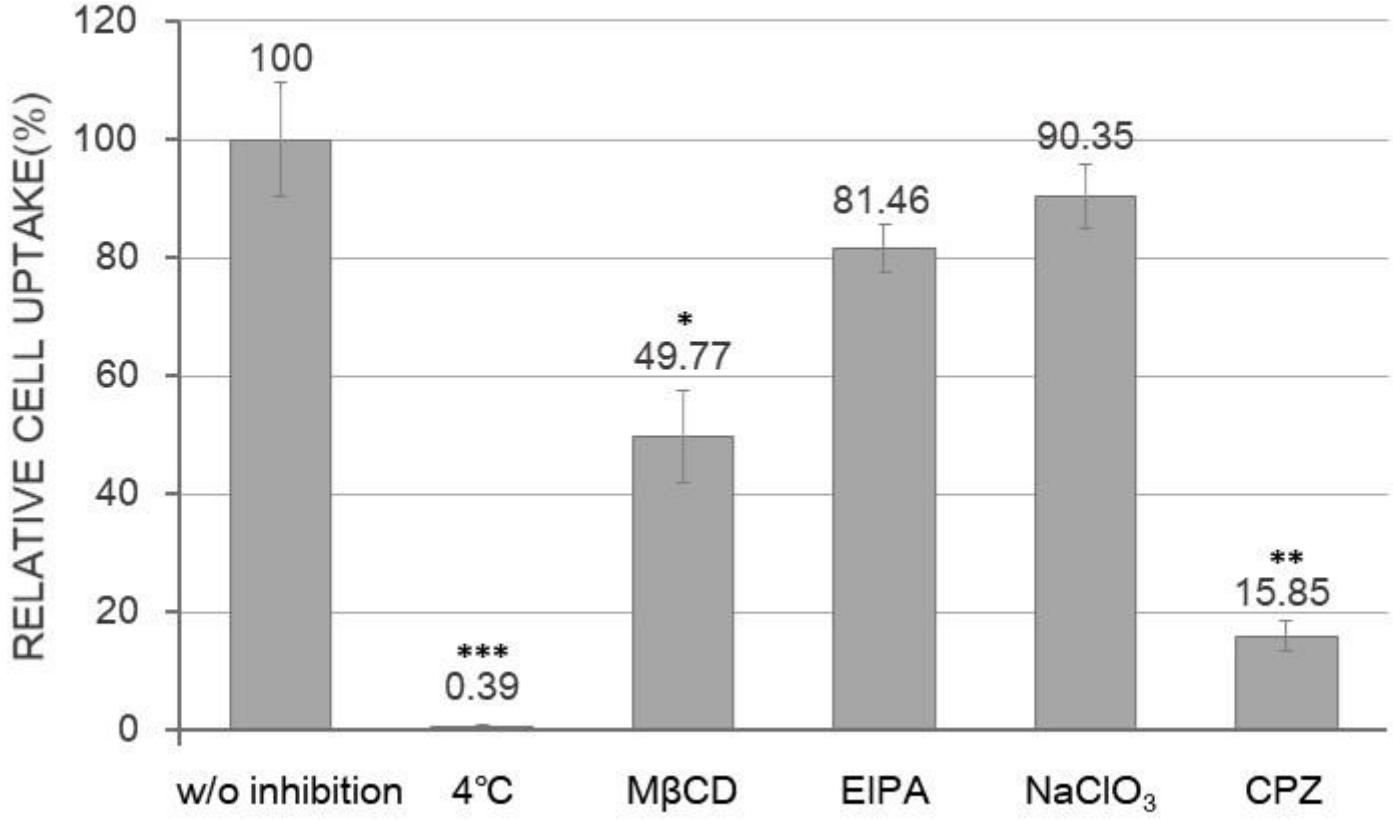
(de Kruif et al., 1995)


6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
% BOUND(10^{-4})
1Round
2Round
3Round
4Round
5Round
BIOPANNING ROUND

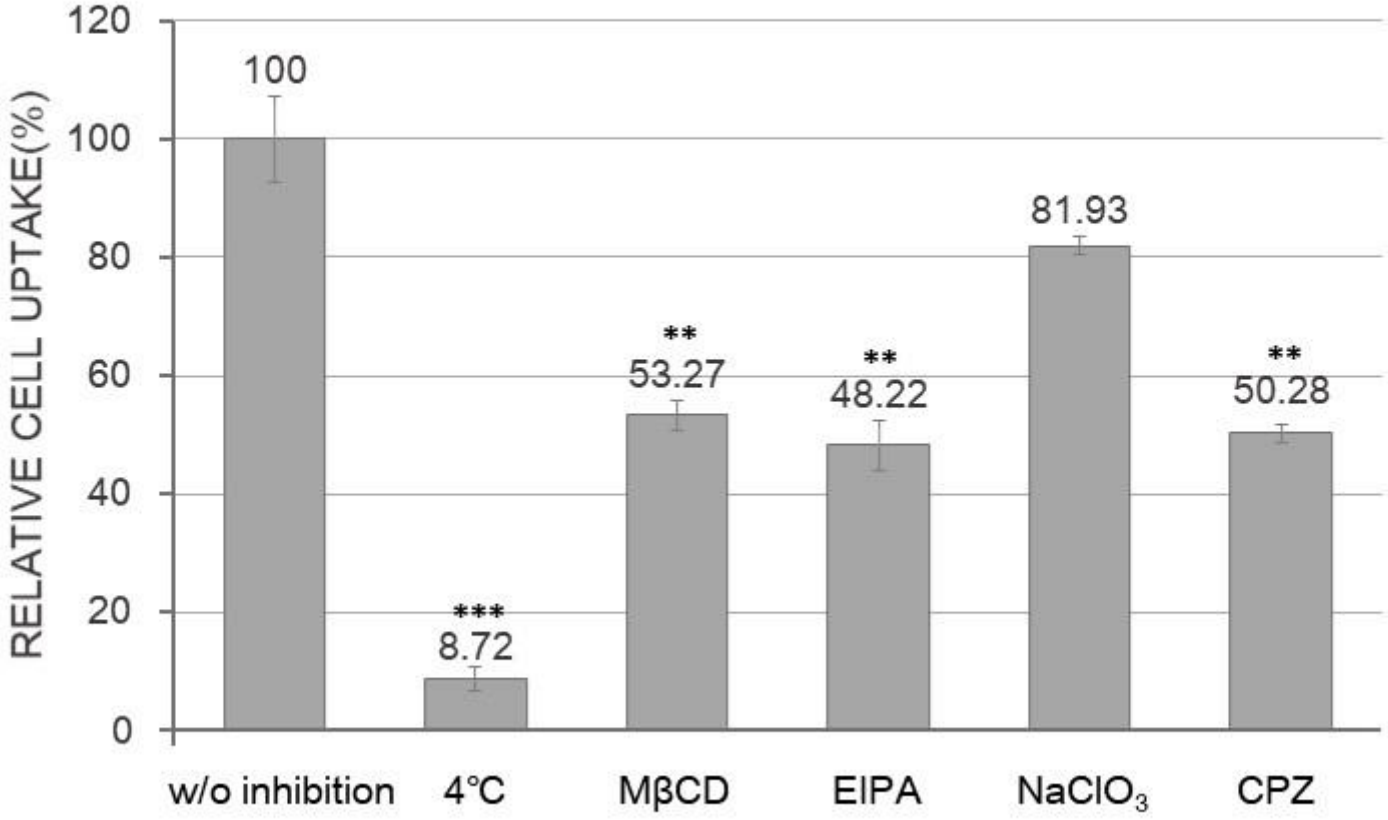

70
60
50
40
30
20
10
0
RELATIVE MFI
LKR
LK1
LK2
LK3
HL60
F3B6
JurkatT
U2OS

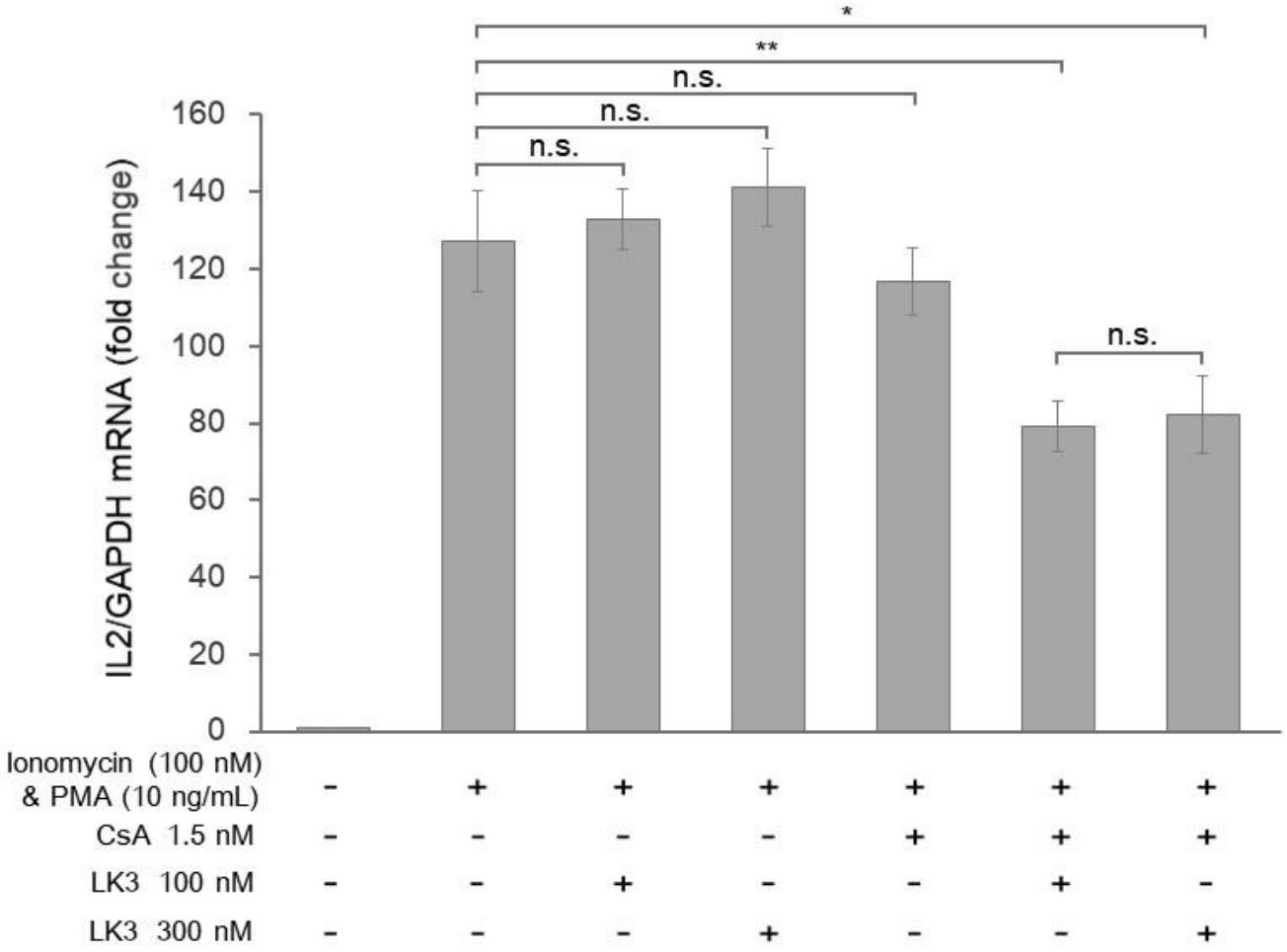

100
80
60
40
20
0
TAMRA-POSITIVE(+) CELL(%)
95.24
87.07
14.11
1.01
1
10
100
1000
PEPTIDE CONCENTRATION (nM)

A


RELATIVE CELL UPTAKE(%)
120
100
80
60
40
20
0
100
***
0.39
*
49.77
81.46
90.35
**
15.85
w/o inhibition
4℃
MβCD
EIPA
NaClO3
CPZ

B


RELATIVE CELL UPTAKE(%)
120
100
80
60
40
20
0
100
***
8.72
**
53.27
**
48.22
81.93
**
50.28
w/o inhibition
4°C
MβCD
EIPA
NaClO3
CPZ


*
**
n.s.
n.s.
n.s.
n.s.
IL2/GAPDH mRNA (fold change)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Ionomycin (100 nM)
& PMA (10 ng/mL)
CsA 1.5 nM
LK3 100 nM
LK3 300 nM
- + + + + + +
- - - - + + +
- - + - - + -
- - - + - - +

	1 Round	2 Round	3 Round	4 Round	5 Round
JurkatT Cell	10^6	10^5	10^5	10^5	10^5
U2OS Cell	10^7	10^7	10^7	10^7	10^7
Input phage	4.69×10^{10}	6.06×10^{8}	8.10×10^{6}	3.58×10^{5}	3.85×10^{5}
Output phage	5.47×10^{6}	7.98×10^{4}	3.33×10^{3}	2.00×10^{2}	2.03×10^{3}
% Bound(10^{-4})	116.63	131.68	411.11	558.66	5272.73
Enrichment	-	1.13	3.12	1.36	9.44

Peptide	Sequence of peptide	Frequency
LK1	LKKLLKLLKKL LSATSSRA LKKLLKLLKKL	5 (20.8%)
LK2	LKKLLKLLKKL SSWSLWSG LKKLLKLLKKL	3 (12.5%)
LK3	LKKLLKLLKKL ICRWPSSR LKKLLKLLKKL	2 (8.3%)
LK4	LKKLLKLLKKL LLGMKLPY LKKLLKLLKKL	2 (8.3%)
LK5	LKKLLKLLKKL ACVINYIF LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK6	LKKLLKLLKKL DSAVICCQ LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK7	LKKLLKLLKKL FGFPALLV LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK8	LKKLLKLLKKL LLGGARPP LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK9	LKKLLKLLKKL LRNGRPLR LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK10	LKKLLKLLKKL PIWMSCVA LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK11	LKKLLKLLKKL PTIACVLD LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK12	LKKLLKLLKKL RRFPKSHR LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK13	LKKLLKLLKKL SLWLGMDL LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK14	LKKLLKLLKKL SVFRFWLF LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK15	LKKLLKLLKKL TRVSMQKH LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)
LK16	LKKLLKLLKKL WSWDRRAS LKKLLKLLKKL	1 (4.2%)