



이 학 석 사 학 위 논 문

Intracellular uptake of cyclic RGD peptides in integrin α_vβ₃ expressing tumor cells

인테그린 α_vβ₃ 발현 종양 세포에서 고리형 RGD 폡타이드의 세포 내 유입 연구

2021년 1월

서울대학교 융합과학기술대학원

융합과학부 방사선융합의생명전공

이 소 영

Intracellular uptake of cyclic RGD peptides

in integrin $\alpha_v \beta_3$ expressing tumor cells

지도교수 김 상 은

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

2021年 1月

서울대학교 융합과학기술대학원

융합과학부 방사선융합의생명전공

이 소 영

이소영의 이학석사 학위논문을 인준함

2021年 1月



Abstract

Intracellular uptake of cyclic RGD peptides in integrin $\alpha_v\beta_3$ -expressing tumor cells

Soyoung Lee

Program in Biomedical Radiation Sciences

Graduate School of Convergence Science and Technology Seoul National University

Introduction: The cyclic Arg-Gly-Asp (cyclic RGD) peptide is well-known as a binding molecule to the integrin $\alpha_v\beta_3$ recognition sequence within fibronectin. Although numerous results have been reported by usage of cyclic RGD peptidebased ligands for cancer diagnosis and therapy, but the distinct mechanisms and functions of cyclic RGD peptide-integrin binding to cancer cells are still being investigated. Particularly, in order to develop more efficient diagnostic probes and effective therapeutic drugs, there have been attempts to develop various cyclic RGD peptides that increase the efficiency of intracellular delivery. In this study, I evaluated the internalization efficacy of different types of cyclic RGD peptides (i.e., monomer-, dimer- and tetramer form) in integrin $\alpha_v\beta_3$ -overexpressing cancer cells.

Methods: Western blot and flow cytometric analysis were used to measure the expression of integrin $\alpha_v\beta_3$ in U87MG human glioblastoma (high-expression) and CT-26 mouse colon cancer (low-expression) cells. Cytotoxicity analysis was performed to determine the appropriate cyclic RGD concentration for use in the experiment. To compare the cellular internalization of different types of cyclic RGD peptides, confocal microscopy and transmission electron microscopy (TEM) imaging were performed with fluorescent dyes (FITC and TRITC) conjugated cyclic RGD peptides.

Results: Western blots showed that U87MG cells has integrin $\alpha_v\beta_3$ expression but CT-26 only has only integrin α_v expression. Flow cytometry analysis with an integrin $\alpha_v\beta_3$ recognizing antibody demonstrated that U87MG cells exhibited relatively high integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. In contrast, CT-26 did not show integrin $\alpha_v\beta_3$ expression. Cytotoxicity assay indicated that all cyclic RGD peptides (0-200 µM) had at least 70 - 80% of viability to U87MG cells. Through apoptosis analysis, it was confirmed that apoptosis did not happen even after 48 hours of treatment at the concentration of cyclic RGD peptide used in the experiment. Fluorescence images of cyclic RGD dimer peptides showed the highest cellular internalization compare to cyclic RGD monomer and tetramer peptide. TEM results clearly visualized the endocytic cellular internalization of integrin $\alpha_v\beta_3$ and correlated with confocal microscopic results. **Conclusion:** These in vitro data suggest that the cyclic RGD dimeric forms are expected to have an increased ability to internalize through integrin $\alpha_v\beta_3$ compared to their monomeric counterpart. These results support the rationale for the use of cyclic RGD dimer peptides for imaging, diagnosis, and therapy of integrin $\alpha_v\beta_3$ -rich glioblastoma.

Keywords: Cyclic RGD peptides, Integrin $\alpha_v\beta_3$, Intracellular uptake, Glioblastoma

Student number: 2018-23568

CONTENTS

ABSTRACT ·····	•••••i
CONTENTS	·····iv
LIST OF TABLES	·····vi
LIST OF FIGURES	·····vii

I. INTRODUCTION ······8		
1.	Integrin $\alpha_{v}\beta_{3}$	
2.	Cyclic RGD peptide9	
3.	Purposes ······12	

II. MATERIALS AND METHODS	
Cells and culture conditions	15
Western blot analysis	15
In vitro cytotoxicity	16
Clonogenic assay	17
Apoptosis assay	
Fluorescence cell imaging of cellula	r uptake·····18
Electronic microscopic imaging	
III. RESULTS AND DISCUSSION	21
Results	21
Discussion	24

IV. CONCLUSION ·····	38
V. REFERENCES ·····	39
국 문 초 록	43

LIST OF TABLES

Table 1. The analog for cyclic RGD peptides.37

LIST OF FIGURES

Figure 1. RGD peptide binding integrin $\alpha_v \beta_3 \cdots \cdots$
Figure 2. The structure of cyclic RGD peptides15
Figure 3. Protein expression level of integrin $\alpha_v\beta_3$ positive and negative cell
lines. (A) Western blot shows integrin $\alpha_v\beta_3$ expression level of
U87MG and CT-26. (B) Flow cytometric assay shows integrin $\alpha_v\beta_3$
expression level of U87MG and CT-26·····29
Figure 4. Comparison of cellular internalization among various cyclic RGD
peptide moieties in confocal imaging. Cell cytotoxicity assay of
various cyclic RGD peptides. (A) Proliferation assay. (B) Survival
assay (Clonogenic assay) (C) Apoptosis assay
Figure 5. Comparison of cellular internalization among various cyclic RGD
peptide moieties in confocal imaging32
Figure 6. Confocal imaging and flow cytometric assay of QD conjugated
antibody33
Figure 7. Visualization/Quantification of clustering and endocytosis of cyclic
RGD peptides bound integrin $\alpha_v \beta_3$

INTRODUCTION

1. Integrin $\alpha_v \beta_3$

종양 유발 혈관 신생(tumor-induced angiogenesis)은 종양 및 간질 세포에서의 혈관 신생 펩타이드의 방출 또는 내인성 혈관 신생 억제제의 하향 조절에 의해 시작되며 세포외 기질(Extracellular Matrix, ECM)의 변형을 포함한다 (1-3). 여러 연구에 따르면, 세포외 기질을 통한 내피 세포 이동 및 침입은 세포 부착 수용체에 의해 조절된다 (4). 이런 세포 부착 수용체 중 하나인 인테그린(integrin)은 세포외기질과 세포 내 단백질 사이의 신호를 양방향으로 통합하는 막 횡단 수용체이며, 인테그린 그룹(integrin family)들은 세포 표면에서 25 개의 서로 다른 α 및 β 이종 이합체 조합으로 발현되고, 18 개의 α- 및 8 개의 β- 서브 유닛으로 구성된 막관통 당단백질(transmembrane glycoproteins) 그룹이다 (1,5-7). 이런 모든 인테그린 그룹 중에서 인테그린 α,β3는 신생 혈관과 공격적인 종양에 특이적인 발현을 보인다 (8).

2. Cyclic RGD peptides

아르기닌-글라이신-아스파르트산(Arg-Gly-Asp, RGD)

펩타이드는 세포외기질 성분인 vitronectin과 fibronectin 내에서 인테그린을 인식하는 서열로, 세포외 막단백질인 인테그린 ανβ3과 서로 결합한다(9-12). 인테그린 α_νβ₃와 RGD 펩타이드 간의 결합은 인테그린 ανβ3의 형태 변화를 초래하고, 인테그린과 세포 외 리간드 간 결합 친화도를 증가시키는 것으로 알려져 있다(12-14) (Figure 1). 여러 연구에서 보고된 인테그린 avb3와 RGD 펩타이드 간 높은 결합력으로 인해 RGD 펩타이드는 종양 표적 진단 및 치료를 위한 리간드로서 다양한 연구가 활발히 진행되었다 (14-16). 특히, RGD 펩타이드의 구조와 결합력에 관한 연구들에서 세 개 이상의 아미노산 서열로 이루어진 선형의 RGD 펩타이드(linear RGD peptide) 보다 고리형의 RGD 펩타이드(cyclic RGD, cRGD)가 체내 안정성 및 인테그린과의 결합친화도가 높은 것으로 보고되었으며(17). cRGD 펩타이드가 한 개인 단량체(monomer) 보다 두 개(dimer) 또는 그 이상의 다량체 (multimer)로 구성된 리간드가 체내에서 보다 높은 종양 섭취율 및 선택성을 보여주는 것으로 보고되었다(18). cRGD 펩타이드를 이용하여 형광염료, 진단용 방사성동위원소를 도입한 종양신생혈관 표적 진단 프로브뿐만 아니라 항암제, 나노 물질 및 치료용 방사성동위원소 등이 도입된 종양 표적용 리간드로 많이 진단 활용되었고 최근엔 및 치료가 동시에 가능한 동반진단치료제(theranostics)로서 cRGD 펩타이드를 활용한 사례가 보고되었다(16,19).

cRGD 펩타이드는 빠른 시간 내 종양에 대한 높은 섭취율을 보이며 종양에서 빠른 배출 속도를 보여줌으로써 조기 종양 영상 획득이 가능하여 이상적인 종양신생혈관 표적 영상 프로브로서 적합함이 보고되었으나(18, 20), 치료측면에서는 종양 조직에서의 빠른 배출 속도로 인해 치료의약품으로서는 한계를 보인다. 종양세포에서의 머무름을 증진시킬 수 있는 요인 중 하나로 세포 내 유입 능력을 고려해 볼 수 있으며 cRGD 펩타이드 또한 인테그린 α,β3을 통한 종양세포 내재화 가능성이 보고된 바 있으나(21) 자세한 실험결과가 보고된 문헌은 미미하다. 이에 본 연구에서는 cRGD가 포함된 다양한 형태로서, 다양한 단량체, 이량체 및 다량체 cRGD 펩타이드 (Table 1)에서 세포 수준의 세포 내 유입 능력을 비교 및 평가하고자 한다.



Figure 1. RGD peptide binding integrin $\alpha_v \beta_3$

3. Purposes

이 연구에서 사용되는 화합물인 cyclic RGD 펩타이드는 선행 연구를 참고하여 합성하여 준비했다 (22). 먼저 단량체인 c(RGDfK) 와 c(RGDyK), 그리고 이량체인 N₃-c(RGDfK)-c(RGDyK), ADIBO-[c(RGDfK)]₂ 이며, 사량체인 ADIBOT-[c(RGDfK)]₃-c(RGDyK) 가 있다. 이 연구에서 사용되는 cyclic RGD 이량체의 경우, 각각 N₃c(RGDfK)-c(RGDyK)를 1, ADIBO-[c(RGDfK)]₂ 는 3 라고 표기하고, 사량체인 ADIBOT-[c(RGDfK)]₃-c(RGDyK) 는 4 로 명명하였다. 또한 FITC-N₃-c(RGDfK)-c(RGDyK) 는 FITC-1, TRITC-ADIBO-[c(RGDfK)]₂ 는 TRITC-3, FITC-ADIBOT-TRITC-[c(RGDfK)]₃-c(RGDyK) 는 FT-4 (FITC, TRITC-4) 로 명명하였다(Table 1, Figure 2).

위의 화합물들을 이용하여, 인테그린 α,β₃ 과발현하는 암 세포주, 특히 인간 유사 교모세포종인 U87MG 세포주에서 다양한 cyclic RGD 펩타이드의 세포 내 유입 효능을 평가했다 (19, 23-25). 먼저, 인테그린 α,β₃ 양성 및 음성 세포주에서 인테그린 α,β₃ 발현을 확인하고, 인테그린 α,β₃을 과발현하는 암 세포주에서 다양한 cyclic RGD 화합물들에 대해 세포 독성 분석을 수행하였다. 그리고 다양한 cyclic RGD 화합물들의 세포 유입 정도 비교를 위한 실험으로 공초점 현미경을 통해 이미지를 촬영하였다. 또한 cyclic RGD 펩타이드가 결합된 인테그린 α,β₃의 클러스터링 및 세포 내 이입의

시각화를 전자현미경으로 확인하였다.





c(RGDfK)

c(RGDyK)











TRITC-3



FT-4

Figure 2. The structure of cyclic RGD peptides (22)

MATERIALS AND METHODS

Cells and culture conditions

인간 유사 교모세포종인 U87MG은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD)에서 구입하였고 Minimum Essential Medium Eagle (MEM, Welgene)에서 배양했다. 쥐 대장 종양세포의 CT-26는 한국 세포주은행 (KCLB)에서 구매하여 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Welgene, Daegu, Korea)로 계대배양하여 키우고 있다. 모든 세포는 10% 의 소태아혈청 (Fetal bovine serum(FBS), Gibco) 및 1% 항생제-항진균제 용액 (mL 당 10,000 단위 페니실린, 10 mg 스트렙토마이신 및 25 µg 암포테리신 B 포함, Gibco, St. Louis, MO)이 보충된 완전한 배지에서 5% CO₂ 및 37℃ 조건으로 배양되었다.

Western blot anaylsis

Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) Protease 억제제 및 Phosphatase 억제제 (Cat # 11873580001, Sigma) 와 함께 Pierce ™ IP Lysis 버퍼 (Cat # 87787, Sigma)를 사용하여 세포에서 단백질을 추출하였다. 5 µg 단백질을 SDS-PAGE (10%)로 분리하고, PVDF

멤브레인에 블롯팅했다. 멤브레인을 5% 탈지유 또는 Bovine Serum Albumin(BSA) 를 함유하는 Tris 완충액 (TBS-T; 10mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween-20)을 함유하는 에서 60 분 동안 블로킹을 했다. 그 후, 멤브레인을 항-인테그린 α, 항체 (1: 5000, Cat # ab179475, Abcam) 또는 항-인테그린 β₃ (1: 2000, Cat # 13166, Cell Signaling) 또는 항-β-actin (1: 5000, A5441, Sigma)와 1 시간 동안 처리 후 멤브레인을 TBS-T에서 3 회 헹구었다. 그리고 1 시간 동안 항 토끼 IgG, HRP 연결 항체 (1: 2000, Cat # 7074S, Cell Signaling) 또는 항 마우스 IgG, HRP 연결 항체 (1: 3000, Cat # 7076S, Cell Signaling) 실온에서 1 시간 처리하고 TBS-T로 3 회 세척한 후, 면역 반응성 단백질 밴드를 검출하기 위해 Chemiluminescent Substrate (Cat#34578, Thermo Fisher Scientific, MA, USA)로 발색하여 ChemiDoc Imaging System(Bio-rad, CA, USA)으로 확인하였다.

In vitro Cytotoxicity

준비된 cRGD 화합물의 세포 독성을 확인하기 위해, CCK-8 (Dojindo, Japan)을 사용하여 세포증식능을 평가하였다. U87MG 세포(7 × 10³ cells/mL, 0.2 mL)를 96-well cell culture plate(SPL, South Korea)에서 24 시간 동안 배양하였다. 기존 배지를 버린 후, 0, 0.5, 5, 50, 100, 150, 200 및 500 μM의 cRGD 화합물을 포함하는 새로운 배지를 48 시간 동안 처리하였다. 세포 활성을 측정하기 위해, 100 µL의 CCK-8 용액(10% CCK-8 + 90% MEM 배지)을 각 well에 첨가한 뒤, 37℃에서 1 시간 동안 배양했다. 흡광도 (Optical Density, OD)는 450 nm에서 분광광도계 (PowerWaveTM XS Microplate Reader, BioTek Instruments, Inc., South Korea)로 측정하였다.

Clonogenic assay

96-well cell culture plate(SPL, South Korea) 에 well 당 4 × 10⁴개의 U87MG 세포를 분주하고 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 기존 배지 제거 후, cRGD 화합물 0, 0.5, 5, 50, 100, 150, 200 및 500 µM 을 포함하는 새로운 배지를 37°C에서 24 시간 동안 처리하였다. 반응 종료 후, 200 µL DPBS로 2 회 세척하고 남은 액체를 제거하였다. 50 µL의 크리스탈 바이올렛 용액(0.5 g in 20% methanol 100 mL)을 각 well에 첨가하고, 실온에서 20 분 동안 교반하며 처리하였다. 증류수로 4 회 세척 후 실온에서 2 시간 동안 건조한 후, 사진 촬영 후 colony를 계수하였다. cRGD 미처리 대조군의 colony 개수를 100% 로 설정하고, 약물 처리 시험군의 colony 개수를 대조하였다 (26).

Apoptosis assay

24-well cell culture plate (SPL, South Korea)에 well 당 8×10³개의 U87MG 세포를 분주하고 37°C에서 24 시간 동안 배양하였다. 기존 배지 제거 후, c(RGDfK), c(RGDyK)은 400 µM, **1**, **3**은 200 µM, **4**는 100 µM 를 포함하는 새로운 배지를 37°C에서 48 시간 동안 처리하였다. 반응 종료 후, 세포를 모두 모아주고, 원심분리 과정을 통해 세포 펠렛을 가라앉혔다. 500 µL DPBS로 세포를 2 회 세척하고 1 X Binding Buffer(Cat# 51-66121E, BD) 100 µL로 세포를 풀어주어 5 mL의 FACS tube(Cat#352052, Corning) 로 각각 옮겨 담았다. 5 µL의 FITC Annexin V(Cat# 51-65874X, BD) 와 5 µL PI(Cat# 51-66211E, BD) 를 첨가하여 어둡게 15 분 동안 실온에서 교반하며 처리하였다. 각각의 튜브마다 400 µL 1 X Binding Buffer 를 첨가하고, 1 시간 이내로 유세포 분석기(BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer, BD, USA)로 분석하였다.

Fluorescence cell imaging of cellular uptake

U87MG 세포를 8-well plate (Cat # 30408, SPL)에 well 당 3 x 10⁴ 세포를 0.2 mL의 배지에 유지했다. 24 시간 동안 배양한 후, 각각 FITC-1, TRITC-3, FT-4 (FITC, TRITC-4) 를 200 μM, 200 μM, 100 μM 의 농도로 15 분, 30 분, 45 분 및 1 시간 동안 처리하였다. 세포를 DPBS로 세척하고 세포의 핵 염색이 가능한 DAPI가 들어있는 Prolong Gold Antifade Mountant (Cat # P36935, Invitrogen)를 처리하여 U87MG 세포의 핵을 염색했다. 염색된 U87MG 세포는 공초점현미경 (LSM 800, Carl Zeiss, Germany)을 통해 촬영하였다.

Electronic microscopic imaging

Electron Microscopy Using Quantum dot labeled antibody.

마우스 유래 항-사람 CD51 / CD61 (Integrin α_vβ₃) FITC (Cat # 11-0519-42, Invitrogen)에 Quantum dot Siteclick 항체 표지 키트 (Cat # S10453, Invitrogen)를 이용하여 전자현미경 관찰용 퀀텀닷 항체를 만들었다. 표지 된 항체의 기능을 확인하기 위해 U87MG 세포 및 CT-26 세포에 퀀텀닷이 표지된 항체를 처리하여 유세포 분석과 공초점현미경으로 촬영하였다. U87MG 세포를 6-well plate 에서 키워, cyclic RGD 화합물을 1 시간 동안 처리하고 퀀텀닷이 표지된 항체를 2 시간 동안 처리한 다음, 트립신을 처리하여 세포를 모아주고, 3 분 동안 세포를 원심분리하여 가라 앉혔다. 이후 세포를 글루타르알데히드(glutaraldehyde, 2% GAA. Cat#16537-15, EMS, USA) 용액에서 하루 동안 고정시켰다. 가라앉혀 고정시킨 세포 블록을 단면화하기 위해 절삭한 뒤, 단면을 투과 전자 현미경(Cat# JEM-1400, JEOL USA, Inc., USA)으로 촬영하였다.

RESULTS AND DISCUSSION

Results

인테그린 α,β₃의 발현 정도를 평가하기 위해 웨스턴 블롯으로 인테그린 α,β₃의 양성 세포(U87MG)와 음성 세포(CT-26)를 선별하여 실험하였다 (27, 28). 알려진 바와 같이, U87MG에서 인테그린 α, 가 발현되었고 CT-26에서도 인테그린 α, 가 발현되었다. 인테그린 β₃ 는 U87MG에서는 발현되었으나, CT-26에서는 발현 정도가 낮음으로 확인되었다 (Figure 3(A)). 추가로 세포 표면에 발현하는 막 단백질의 수준을 확인하기 위해, 유세포 분석을 통해 인테그린 α,β₃ 발현 양을 확인하였다. U87MG에서 인테그린 α,β₃ 발현율은 아무것도 처리하지 않은 대조군과 비교하여 93% 인 반면, 음성 세포인 CT-26에서는 인테그린 α,β₃의 발현율이 대조군에 비해 0.2%로 나타났다 (Figure 3(B)).

다양한 cyclic RGD 펩타이드의 세포독성도는 U87MG 세포에서 48 시간 배양 후 두 가지 방식으로 평가되었다. 첫번째 방식은 세포증식분석(Proliferation assay)로 측정하였고, 다른 하나는 클론생성분석(Clonogenic assay)이였다. 세포증식분석의 세포생존력은 CCK-8 분석을 사용하여 측정하였다. 실험에 사용된 농도는 0, 0.5, 5, 50, 100, 150, 200, 500 μM 이었고, 단량체, 이량체 및 사량체 cyclic RGD 펩타이드 (c(RGDfK), c(RGDyK), **1**, **3** 및 **4**)의 각각 0 μM 농도에 비해 200 μM 농도에서 76.25%, 67.63%, 82.29%, 72.53% 및 54.24%의 세포생존율을 확인했다. 반대로 각 화합물 (c(RGDfK), c(RGDyK), **1**, **3** 및 **4**)에 대한 500 μM 농도에서의 세포생존율은 0 μM 농도에 비해 각각 73.45%, 45.91%, 63.81%, 38.36% 및 55.28% 인 것으로 나타났다 (Figure 4(A)). 70 % 이상의 세포생존력을 보이는 농도를 기준으로, RGD 펩타이드 몰수에 따라 cRGD 펩타이드의 농도를 단량체는 400 μM, 이량체는 200 μM, 사량체 기준 100 μM 으로 설정하여 이후 실험에 사용하였다.

클론 생성 분석은 각 화합물에 대해 동일한 농도에서 수행되었다. 200 μM 농도에서의 세포생존분석(클론 생성 분석)에서 단량체와 이량체 cyclic RGD (c(RGDfK), c(RGDyK), 1, 3) 펩타이드의 세포생존력은 각각 50.96%, 51.99%, 62.37%, 34.89% 이고, 사량체 cyclic RGD 펩타이드인 4 에 대한 세포생존력은 0 μM 농도에 비해 세포생존율이 13.38%임을 확인했다. 이는 사량체인 4 를 사용하면 앞선 다른 화합물들에 비해 세포생존율이 낮은 것으로 보여졌다(Figure 4(B)).

아폽토시스 분석을 통해 48 시간 동안 cRGD 펩타이드를 처리했을 때, 대조군에서는 95.8%, c(RGDfK)는 92.5%, c(RGDyK)는 94.3%, 1 는 96.5%, 3 은 95.4%, 4 는 93.9 %로 세포가 죽지 않음을 확인하였다.(Figure 4(C)).

FITC-1 화합물 처리 군 (Figure 2)에서는 공초점 현미경을 통해 FITC 채널로 확인했을 때, 세포 내에 cRGD 펩타이드가 유입되어 있음을 확인할 수 있다. TRITC-3 화합물 처리 군에서 cRGD 펩타이드가 마찬가지로 공초점 현미경을 통해 TRITC 채널에서 확인했을 때, U87MG 세포로 cRGD 펩타이드가 내재화 되었음을 알 수 있었다. FT-4 처리군에서는 공초점 현미경으로 TRITC 와 FITC 채널에서 모두 세포 내 유입 현상을 이미지로 확인할 수 있었지만, 세포 내 유입 현상이 FITC-1 이나 TRITC-3 보다 세포 내에서 덜한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 5).

________ 퀸텀닷을 표지한 항체의 기능을 확인하기 위해 양성 세포인 U87MG, 음성 세포인 CT-26 에서 공초점 현미경 이미지 및 유세포 분석을 통해 확인하였다. 공초점 현미경 이미지에서 U87MG 세포에서는 퀸텀닷을 표지한 항체 1 uL 처리시 대조군에 비해 형광 이미지를 Qdot 655 파장 및 FITC 파장에서 확인할 수 있었고, CT-26 의 경우 그렇지 않은 것으로 확인하였다 (Figure 6(A)). 유세포 분석의 경우에서도 양성세포인 U87MG 에서는 퀸텀닷을 표지 하지 않은 항체 그룹과 비교하여 퀸텀닷이 붙어있는 항체 처리 그룹과 유사하게 인테그린 α,β3 발현율이

높은 것을 확인하였다. 음성세포인 CT-26 의 경우 각각 3%, 0.4% 로 인테그린 α,β3 발현율이 낮은 것을 확인하였다 (Figure 6(B)).

전자현미경 촬영에서 c(RGDfK), c(RGDyK), 1, 3, 4 화합물 처리 후 퀀텀닷이 표지 된 항체를 처리한 그룹들 및 퀀텀닷이 표지 된 항체로만 처리된 그룹을 준비하고 전자 현미경으로 이미지를 촬영하였다. c(RGDfK), c(RGDyK), 4 와 비교하여 1 과 3 으로 처리한 군에서 퀸텀닷이 표지 된 항체가 세포 내부로 유입되어 있음을 확인하였다 (Figure 7).

Discussion

본 연구에서는 cRGD 펩타이드의 종양에서의 머무름을 증대하고 세포 내 유입을 증가시켜 치료용의약품으로서의 개발 가능성을 확인하고자, 인테그린 α_νβ₃ 과발현 세포주를 이용하여 다양한 타입의 cRGD 펩타이드의 세포 내 유입을 평가하였다.

웨스턴 블럿과 유세포 분석을 통해, 실험에 사용된 U87MG 인간 유사 교모세포종의 경우 인테그린 α_νβ₃ 이 CT-26 세포에 비해 많이 발현되어 있다는 것을 확인하였다. 또한 세포독성 평가를 통해 실험에 사용하기 적합한 세포생존율(> 70%)을 보인 cRGD 펩타이드의 적정 농도를 확인하였으며, 공초점현미경, 전자현미경 실험에 사용할 cRGD 펩타이드의 농도를 RGD 개수에 따라 각각 단량체 펩타이드는 400 μM, 이량체 펩타이드(1,3)는 200 μM, 사량체 펩타이드(4)는 100 μM 로 설정하였다.

클론생성능 분석의 경우, 각각의 cRGD 펩타이드들을 처리 후, 세포생존율을 측정하는 방법인 세포증식능 분석과 측정법의 차이로 인한 대조적인 결과를 보였다. cRGD 펩타이드를 처리 시, 특정 농도 이상에서 세포 부착 단백질인 인테그린을 자극하여 세포가 플레이트에서 이탈하는 경향이 있어 세포 독성과는 별개로 클론생성능이 감소하는 결과를 나타내었다. 클론생성능과는 달리

세포증식분석에서는 cRGD 펩타이드 화합물에 대한 세포 자체의 독성에는 영향이 없다고 판단하였다.

이에 대한 정확한 분석을 위해 실제로 cRGD 펩타이드를 처리시 세포가 죽는지 확인하기 위해 아폽토시스 분석을 진행한 결과, 세포의 생존능이 대조군과 큰 차이가 없는 것으로 확인하여, 단량체 펩타이드는 400 μM, 이량체 펩타이드(1, 3)는 200 μM, 사량체 펩타이드(4)는 100 μM 로 설정하였다.

이어서 공초점현미경 및 전자현미경 이미지를 통해 형광이 도입된 다양한 형태의 cRGD 펩타이드가 인테그린 α_νβ₃ 에 결합하여 세포 내 유입됨을 비교 확인하였다. FITC-fluorescence intensity ratio 를 통해 이량체가 사량체에 비해 보다 높은 종양 세포 내 유입이 일어난 것을 확인하였으나, TRITC 의 fluorescence intensity 에서는 이량체, 사량체간의 차이를 확인할 수 없었다. 이는 FT-4 의 TRITC emission 파장 측정 시, FITC 에 의한 형광 방출에 의해 TRITC 가 여기 되는 형광공명에너지 전달(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 현상으로 인해 TRITC 의 fluorescence intensity 가 과측정되는 것으로 보여, 때문에 공초점현미경을 이용한 펩타이들 간의 정밀한 세포 내 유입에 대해 정량평가에는 한계가 있음을 확인할 수 있었다. 추가적으로 세포 내 유입 정도를 평가하기 위해, 다양한 cRGD 펩타이드를 결합시킨 뒤, 퀀텀닷-표지 항체를 처리하여 얻은

전자현미경 결과에서 cRGD 펩타이드의 종류와 RGD 개수에 따른 세포 내 유입 정도 차이와 세포질에서 관찰되는 퀀텀닷의 크기에서 차이가 있음을 정성적으로 확인하였다. 특이한 점으로는 단량체 펩타이드 c(RGDfK) 과 c(RGDyK) 의 전자 현미경 샘플에서 세포 내로 이입된 항체에 표지된 퀀텀닷의 형태 및 크기에 차이가 있었다. 먼저, 퀀텀닷의 크기를 전자 현미경으로 측정한 결과 단량체 펩타이드 c(RGDfK) 처리군에서 나노 입자의 크기는 동일하게 20 nm 사이즈였으나, 단량체 펩타이드 c(RGDvK) 처리군의 나노 입자 크기는 c(RGDfK) 처리군의 1.85 배인 37 nm 였다. 이러한 결과는 이량체와 사량체에서 Tyrosine (y)가 함유된 cRGD 펩타이드로 처리된 군에서 관찰되는데 이는 c(RGDyK)의 Tyrosine 기와 c(RGDfK)의 Phenylalanine 기는 알코올기 유무의 차이로 인해 상대적으로 극성을 나타낼 수 있고, 근접 인테그린 또는 근접 단백질과의 수소 결합으로 인한 밀집성이 형성됨이 아닐까 예상된다. 따라서 인테그린 ανβ3 에 서로 다른 cRGD 펩타이드가 결합 후, 다른 위치에서 항-인테그린 α,β, 항체는 인테그린 α,β, 과 결합하면서 세포 내 유입 양상이 다른 것으로 생각되며(29, 30), 후속 연구를 통해 검증하고자 한다. 더불어 본 실험에 사용된 샘플들은 추가적으로 향후 유도 결합 플라즈마 질량분광법(Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS)

분석을 통해 샘플 당 퀀텀닷의 카드뮴의 양을 계측하면 세포 내 유입의 정량적인 분석이 가능할 것으로 생각된다.





Figure 3. Protein expression level of integrin $\alpha_v\beta_3$ positive and negative cell lines. (A) Western blot shows integrin $\alpha_v\beta_3$ expression level of U87MG and CT-26. (B) Flow cytometric assay shows integrin $\alpha_v\beta_3$ expression level of U87MG and CT-26.



Figure 4. Cell cytotoxicity assay of various cyclic RGD peptides. (A) Proliferation assay. (B) Survival assay (Clonogenic assay). (C) Apoptosis assay





Figure 5. Comparison of cellular internalization among various cyclic RGD peptide moieties in confocal imaging.

(A) Confocal microscopic assay

U87MG



CT-26



(B) Flow cytometric assay



CT-26



Figure 6. Confocal imaging and flow cytometric assay of QD conjugated antibody.



c(RGDyK) & QD Ab



1 & QD Ab

3 & QD Ab







QD Ab only



Figure 7. Visualization/Quantification of clustering and endocytosis of cyclic RGD peptides bound integrin $\alpha_v\beta_3$.

Table 1. The analog for cyclic RGD peptides.

Compound	Structure
c(RGDfK)	c(RGDfK)
c(RGDyK)	c(RGDyK)
1	N ₃ -c(RGDyK)-c(RGDfK)
3	ADIBO-[c(RGDfK)] ₂
4	ADIBOT-c(RGDyK)-[c(RGDfK)] ₃
FITC-1	FITC-N ₃ -c(RGDyK)-c(RGDfK)
TRITC-3	TRITC- ADIBO-[c(RGDfK)] ₂
FT- 4	FITC-ADIBOT-TRITC-c(RGDyK)-[c(RGDfK)] ₃

CONCLUSION

이러한 *in vitro* 데이터에서 cyclic RGD 펩타이드 다량체 형태가 단량체 화합물에 비해 인테그린 α_νβ₃를 통해 세포 내 유입되는 능력이 증가할 것으로 예상된다. 이러한 결과는 인테그린 α_νβ₃가 풍부한 인간 교모세포종의 영상화, 진단 및 치료를 위해 cyclic RGD 다량체 펩타이드를 사용하는 근거를 뒷받침한다. 또한 위와 같은 방식으로 치료용 동위원소를 표지한 cyclic RGD 펩타이드의 세포 내 유입 정도를 평가하는 방식으로 공초점 현미경 및 전자현미경을 이용, 추가로 유도 결합 플라즈마 질량분광법으로 정량적인 평가를 진행할 수 있을 것이라 판단한다.

REFERENCES

- Morse EM, Brahme NN, Calderwood DA. Integrin cytoplasmic tail interactions. *Biochemistry*. 2014;53:810-820.
- Gupta MK, Qin RY. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. World J Gastroenterol. 2003;9:1144-1155.
- LaFoya B, Munroe JA, Miyamoto A, et al. Beyond the Matrix: The Many Non-ECM Ligands for Integrins. *Int J Mol Sci.* 2018;19:449.
- Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb* Perspect Biol. 2011;3:a005074.
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. Integrins. *Cell Tissue Res.* 2010;339:269-280.
- 6. Calderwood DA. Integrin activation. J Cell Sci. 2004;117:657-666.
- Cooper J, Giancotti FG. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction, Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell*. 2019;35:347-367.
- Gasparini G, Brooks PC, Biganzoli E, et al. Vascular integrin alpha(v)beta3: a new prognostic indicator in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4:2625-2634.
- 9. Koivunen E, Wang B, Ruoslahti E. Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed

integrins. Biotechnology (NY). 1995;13:265-270.

- Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature*. 1984;309:30-33.
- Ruoslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science*. 1987;238:491-497.
- Nieberler M, Reuning U, Reichart F, et al. Exploring the Role of RGD-Recognizing Integrins in Cancer. *Cancers (Basel)*. 2017;9:116.
- Zhu J, Zhu J, Springer TA. Complete integrin headpiece opening in eight steps. *J Cell Biol.* 2013;201:1053-1068.
- 14. Van Agthoven JF, Xiong JP, Alonso JL, et al. Structural basis for pure antagonism of integrin $\alpha V\beta 3$ by a high-affinity form of fibronectin. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21:383-388.
- Zhou Y, Chakraborty S, Liu S. Radiolabeled Cyclic RGD Peptides as Radiotracers for Imaging Tumors and Thrombosis by SPECT. *Theranostics*. 2011;1:58-82.
- Danhier F, Le Breton A, Préat V. RGD-based strategies to target alpha(v) beta(3) integrin in cancer therapy and diagnosis. *Mol Pharm.* 2012;9:2961-2973.
- Fani M, Psimadas D, Zikos C, et al. Comparative evaluation of linear and cyclic 99mTc-RGD peptides for targeting of integrins in tumor angiogenesis. *Anticancer Res.* 2006;26:431-434.
- 18. Wu Z, Li ZB, Chen K, et al. microPET of tumor integrin alphavbeta3 expression using 18F-labeled PEGylated tetrameric RGD peptide (18F-

FPRGD4). J Nucl Med. 2007;48:1536-1544.

- 19. Desgrosellier JS, Cheresh DA. Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:9-22.
- 20. Lee BC, Moon BS, Kim JS, Jung JH, Park HS, Katzenellenbogen JA, Kim SE. Synthesis and biological evaluation of RGD peptides with the 99mTc/188Re chelated iminodiacetate core: highly enhanced uptake and excretion kinetics of theranostics against tumor angiogenesis. RSC Adv 2013;3:782-792.
- Sancey L, Garanger E, Foillard S, et al. Clustering and internalization of integrin alphavbeta3 with a tetrameric RGD-synthetic peptide. *Mol Ther.* 2009;17:837-843.
- 22. 최지영. Development of Novel Cell-internalizing Peptides Using in Vivo Intermolecular Conjugation as an Avenue for Enhancing the Effect of Antiangiogenic Therapy on Tumors / 최지영 (2019). Print.
- 23. Liu Z, Jia B, Zhao H, Chen X, Wang F. Specific targeting of human integrin α(v)β(3) with (111)In-labeled Abegrin[™] in nude mouse models. *Mol Imaging Biol.* 2011;13:112-120.
- 24. Wang H, Chen K, Cai W, et al. Integrin-targeted imaging and therapy with RGD4C-TNF fusion protein. Mol Cancer Ther. 2008;7:1044-1053.
- 25. Jin ZH, Furukawa T, Waki A, et al. Effect of multimerization of a linear Arg-Gly-Asp peptide on integrin binding affinity and specificity. *Biol Pharm Bull.* 2010;33:370-378.
- 26. Schilling R, Geserick P, Leverkus M. Characterization of the ripoptosome

and its components: implications for anti-inflammatory and cancer therapy. *Methods Enzymol.* 2014;545:83-102.

- 27. Borza CM, Pozzi A, Borza DB, et al. Integrin alpha3beta1, a novel receptor for alpha3(IV) noncollagenous domain and a trans-dominant Inhibitor for integrin alphavbeta3. *J Biol Chem.* 2006;281:20932-20939.
- Yao B, He QM, Tian L, et al. Enhanced antitumor effect of the combination of tumstatin gene therapy and gemcitabine in murine models. *Hum Gene Ther.* 2005;16:1075-1086.
- 29. Kamata T, Handa M, Takakuwa S, et al. Epitope mapping for monoclonal antibody reveals the activation mechanism for $\alpha V\beta 3$ integrin. *PLoS One*. 2013;8:e66096.
- Bridgewater RE, Norman JC, Caswell PT. Integrin trafficking at a glance. J Cell Sci. 2012;125:3695-3701.

국문 초록

인테그린 α_vβ₃ 발현 종양 세포에서 고리형 RGD 펩타이드의 세포 내 유입 연구

고리형 Arg-Gly-Asp (RGD) 펩타이드는 피브로넥틴 내의 인테그 린(integrin) α_vβ₃ 인식 서열에 대한 결합 분자로 잘 알려져 있다. 암 진단 및 치료를 위해 고리형 RGD 펩타이드 기반 리간드를 사용 하여 수많은 결과가 보고되었지만, 암세포에 결합하는 고리형 RGD-인테그린의 뚜렷한 메커니즘과 기능은 여전히 연구 중이다. 특히, 보다 효율적인 진단 프로브와 효과적인 치료제 개발을 위해 세포 내 전달 효율을 높이는 다양한 고리형 RGD 펩타이드 개발이 시도되고 있다. 이 연구에서 우리는 인테그린 α_vβ₃ 과발현 암 세 포에서 다양한 유형의 고리형 RGD 펩타이드 (즉, 단량체, 이량체 및 사량체 형태)의 세포 내 유입 효능을 평가하고자 한다.

실험 방법: 웨스턴블롯 및 유세포분석을 사용하여 U87MG 인간 교 모세포종 (인테그린 α_νβ₃ 고발현) 및 CT-26 마우스 결장암 (인 테그린 α_νβ₃ 저발현) 세포에서 인테그린 α_νβ₃의 발현을 측정했 다. 실험에 사용하기 적절한 cyclic RGD 농도를 확인하기 위해 여 러 방식으로 세포 독성 분석을 진행했다. 다양한 유형의 cyclic RGD 펩타이드의 세포 내 유입을 비교하기 위해 형광 염료 (FITC 및 TRITC)로 표지된 cyclic RGD 펩타이드 및 cyclic RGD 펩타이 드로 공초점 및 투과 전자 현미경 (TEM) 촬영을 수행했다.

실험 결과: 웨스턴블롯은 U87MG 세포가 인테그린 α_vβ₃ 발현을 가지고 있지만 CT-26은 인테그린 α_v 발현 만을 가지고 있음을 보여주었다. 인테그린 α_vβ₃ 인식 항체를 사용한 유세포분석을 통 해 U87MG 세포가 CT-26 세포에 비해 상대적으로 높은 인테그린 α_vβ₃ 발현을 나타냈다. 세포 독성 분석으로 모든 cyclic RGD 펩타 이드 (0-200 μM)가 U87MG 세포에 대해 적어도 70-80%의 생 존력을 가졌다는 것을 확인했다. 아폽토시스 분석을 통해 실험에 사 용하는 cyclic RGD 펩타이드 농도에서는 48시간 처리하여도 세포 사멸이 일어나지 않음을 확인하였다. Cyclic RGD 이량체 펩타이드 의 형광 이미지는 cyclic RGD 단량체 및 사량체 펩타이드에 비해 가장 높은 세포 내 유입을 보여 주었다. 투과 전자 현미경 결과는 cyclic RGD-인테그린의 세포 내 유입을 명확하게 시각화하였고, 공 초점 현미경 결과와 상관 관계가 있다고 확인하였다.

결론: 이러한 in vitro 데이터에서 고리형 RGD 다량체 형태가 단량체 화합물에 비해 인테그린 ανβ3를 통해 세포 내 유입되는 능력이 증

가할 것으로 예상됨을 시사한다. 이러한 결과는 인테그린 α_vβ₃ 가 풍부한 교모세포종의 영상화, 진단 및 치료를 위해 고리형 RGD 다 량체 펩타이드를 사용하는 근거를 뒷받침한다.

중심단어: 고리형 RGD 펩타이드, 인테그린 α_νβ₃, 세포 내 유입, 교모세포종

학번: 2018-23568