



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](#)

공학석사학위논문

쥐의 혈액암 세포에서의

30Kc19 단백질과 절단가능한 링커를 이용한

아스파라기나아제의 활성 강화

Enhancement of L-Asparaginase Activity in L5178Y Mouse

Lymphoma Cells by Conjugating 30Kc19 Protein and L-

Asparaginase with Cleavable Linker

2016년 8월

서울대학교 대학원

화학생물공학부

양 성 재

## 요약 (국문초록)

L-asparaginase (ASNase)는 널리 쓰이는 급성 림프구성 백혈병 (Acute Lymphoblast Leukemia (ALL))의 단백질 치료제로 알려져 있다. 급성 림프구성 백혈병은 주로 2~5세 소아에게서 많이 발병하고 항암제를 정맥주사하여 치료하는 완전 관해 유도 치료방법이 있다. 하지만 소아의 경우 80%, 연령이 높아질수록 치료율이 낮아지며 60세 이상의 성인의 경우 10% 미만이 완치에 도달한다. 완전 관해 유도 요법의 치료제 중 L-asparaginase가 이용되는데 *E.coli*와 같은 외래종 유래의 단백질이기 때문에 과민성 쇼크가 일어나기도 하고 약물의 반감기가 짧아 격일 단위로 투여해야 하는 단점이 있다.

본 연구에서는 세포를 투과하고 효소를 안정화 시키는 특성이 있는 *Bombyx mori* 유래의 30Kc19 단백질을 L-asparaginase와 conjugation 하였다. 또한 암세포의 protease인 MMP-2 cleavable linker를 두 단백질 사이에 삽입하여 암세포에서 선택적으로 cleavage되게 하였다. 또한 두 단백질 사이의 물리적 거리를 둠으로써 효소의 steric hindrance를 줄이고 활성을 증가시켰다. 이를 위해 L-asparaginase-Cleavable linker-30Kc19 fusion protein을 대장균에서 생산한 후 정제를 진행했고 L-asparaginase의 효소 활성 강화효과와 fusion protein의 세포 침투성을 확인하였다. 또한 쥐의 혈액암 세포 L5178Y에서 cleavable linker가 있는 fusion protein이 cleavable linker가 없는 fusion protein보다 용량대비

10~100배 가량 효율적임을 확인하였다.

본 연구로 cleavable linker가 달린 fusion protein이 cleavable linker가 없는 fusion protein보다 효율적으로 암세포 치료에 이용될 수 있음을 입증하였고 향후 추가적인 *In vivo* 실험과 pegylation과 같은 modification을 통해 실제 백혈병 환자에게도 사용될 수 있을 것이라는 가능성을 제시하고 있다.

주요어: 백혈병, 완전 관해 유도요법, 30Kc19, L-asparaginase, cleavable linker, MMP-2,

학번: 2014-22611

# 목차

요약 .....	1
목차 .....	3
그림목차 .....	6
표 목차 .....	7
1. 서론 .....	8
1.1. L-asparaginase (ASNase)에 대한 선행 연구 .....	8
1.1.1. Acute lymphoblastic leukemia의 특징과 <i>E. coli</i> 유래의 L-asparaginase .....	8
1.1.2. <i>E. coli</i> 유래의 ASNase의 문제점과 해결책 .....	9
1.2. 30Kc19 단백질에 대한 선행 연구 .....	11
1.2.1. 누에 체액에서 30Kc19 단백질의 발견 .....	11
1.2.2. 30Kc19 단백질의 특성 .....	12
1.2.3. 30Kc19 단백질의 세포투과성 .....	12
1.2.4. 30Kc19 단백질의 효소 안정화 .....	13
1.3. Linker .....	14
1.3.1. Linker의 특징 .....	14
2. 실험 재료 및 방법 .....	15
2.1. Plasmid 제작 (pET23a/ <i>ASNase-PLGLAG-30Kc19</i> ) .....	15

2.2. ASNase-PLGLAG-30Kc19, ASNase-30Kc19 단백질의 발현 및 정제 .....	17
2.3. MMP-2 Cleavage assay .....	18
2.4. Enzyme Activity Assay .....	19
2.5. RT-PCR .....	20
2.6. CCK-8 Assay를 통한 ASNase-PLGLAG-30Kc19 단백질의 세포 내 독성 검사 .....	22
2.7. CCK-8 Assay를 통한 ASNase-30Kc19, ASNase-PLGLAG-30Kc19 단백질의 L5178Y cell line 독성 비교 .....	22
2.8. Immunocytochemistry (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM) .....	23
<b>3. 결과 및 고찰 .....</b>	<b>24</b>
3.1. Fusion protein의 크기 및 농도 확인 .....	24
3.2. <i>In vitro</i> MMP-2 cleavage assay .....	26
3.3. Direct nesslerization을 통한 효소 활성 측정 .....	28
3.4. RT-PCR을 통한 MMP 발현 확인 .....	30
3.5. ASNase-LK-30Kc19 단백질의 세포 투과성 .....	32
3.6. ASNase-30Kc19, ASNase-LK-30Kc19 단백질의 L5178Y cell line에서의 독성 .....	34
3.7. ASNase-LK-30Kc19 단백질의 FDC-P1, L5178Y cell line에서의 독성 비교 .....	36

4. 결론 .....	38
5. 참고문헌 .....	40
Abstract .....	46

## 그림 목차

Figure 1. pET23a/ASNase-PLGLAG-30Kc19의 구조 .....	16
Figure 2. Fusion protein의 크기 및 농도 확인 .....	25
Figure 3. ASNase-LK-30Kc19의 MMP-2 Cleavage assay .....	27
Figure 4. FDC-P1과 L5718Y 세포에서의 MMP-2,9 발현 확인 .....	31
Figure 5. ASNase-LK-30Kc19 단백질의 세포 투과성 .....	33
Figure 6. ASNase-30Kc19, ASNase-LK-30Kc19 단백질의 L5178Y cell line에서의 독성 .....	35
Figure 7. ASNase-LK-30Kc19 단백질의 FDC-P1, L5178Y cell line에서의 독성 비 교 .....	37



## 표 목차

Table 1. RT-PCR에 사용된 primer sequence ..... 21

Table 2. Direct nesslerization을 통한 Fusion protein의 enzyme activity .....

29

## 1. 서론

### 1.1. L-asparaginase (ASNase)에 대한 선행 연구

#### 1.1.1. Acute lymphoblastic leukemia의 특징과 *E. coli* 유래의 L-asparaginase

급성 림프구성 백혈병 (Acute lymphoblastic leukemia (ALL))이란 혈액 및 골수 내 림프구 계통 세포에서 발생하는 혈액암이다. 백혈병은 ‘하얀피’라는 뜻을 가진 그리스어에서 유래되었으며, 백혈병 환자의 혈액에는 정상인에 비해 다량의 백혈구가 포함되어 있기 때문에 상대적으로 하얗게 보이는 현상에 기인한 것으로 알려져 있다. 혈액 내 세포를 만들어내기 위한 조상세포를 조혈모세포라고 한다. 조혈모세포는 뼈 속의 골수에 위치한다. 백혈병은 조혈모세포가 혈액 세포로 증식, 분화, 성숙하는 일련의 과정에 장애가 생겨 발생하는 암을 의미한다. 림프구 계통의 혈액 세포에서 백혈병이 발생하고 급성의 경과를 보이는 경우를 급성 림프구성 백혈병이라고 한다. 주로 2~5세 소아에게서 많이 발병하고 현재의 관해 유도 요법으로는 소아의 경우 약 80%, 60세 이하 성인의 경우 약 35~40%, 60세 이상의 성인의 경우 10% 미만의 정도가 완전관해에 도달한다 [1].

이러한 급성 림프구성 백혈병 (ALL)의 1차 화학치료제로서 *E. coli* 유래의 L-asparaginase (ASNase)가 이용된다. ASNase는 L-asparagine (ASN)을 L-aspartic acid (ASP)와 암모니아로 분해하는 효소로서 1967년 처음 ALL의 치료에 이용되었다 [2].

ASNase가 백혈병의 치료제로써 작용하는 원리는 정상세포와 암세포의 필수 아미노산인 ASN을 합성하는 능력 차이에 기인한다. 정상세포는 ASNase를 처리하여 ASN이 ASP와 암모니아로 분해된 상황에서도 자체적으로 asparagine synthetase (AS)를 가지고 있기 때문에 분해물인 ASP와 암모니아를 ASN으로 재합성할 수 있다. 하지만 급성 림프구성 백혈병이나 대부분의 암세포의 경우 AS의 발현양이 높지 않아 자체적으로 충분한 양의 ASN을 합성이 불가능하다. 따라서 암세포는 직접 혈액에서 순환하는 ASN을 얻어 세포 대사에 이용하는 방법에 의존한다 [3]. 그러므로 이러한 암세포에 ASNase를 처리해주게 되면 필수 아미노산인 ASN의 고갈로 암세포는 단백질 합성의 타격을 입고 DNA 및 RNA합성의 지연 [4], 암모니아의 apoptosis 유도로 세포사멸에 이르게 된다 [5].

### 1.1.2. *E. coli* 유래의 ASNase의 문제점과 해결책

*E. coli* 유래의 ASNase는 크게 두 가지의 문제점을 가지고 있다. 첫 번째는 *E. coli* 유래의 단백질이기 때문에 면역반응이 발생하게 된다. 따라서 환자에 투여하게 되면 잦은 빈도로 과민성 쇼크가 일어나 위독한 상황이 오기도 한다 [6].

이것을 해결하기 위하여 Erwinia 유래의 ASNase를 사용하는 방법이나 정맥주사였던 투여 경로를 피하주사 혹은 근육주사로 바꾸는 방법이 사용되고 있다 [7].

하지만 이는 외래종의 단백질이 노출된 형태로 사용되기 때문에 면역반응 발생에 대한 근본적인 해결책은 되지 못한다. 두 번째 문제점은 신장의 분획분자량 (Molecular weight cut off, MWCO)인 48kDa 보다 ASNase (37kDa)가 작기 때문에 신장을 통해 배출되어진다. 따라서 ASNase의 체내 반감기가 26시간 정도로 짧아 격일 단위의 투여가 필요하다 [8].

이러한 문제점들을 해결하기 위해 지금은 PEGylation (Polyethylene glycol(PEG)-conjugated)을 이용한 PEG-ASNase가 사용되고 있다. PEG가 ASNase를 감싸는 구조로 분자량과 hydrodynamic volume이 증가하여 신장을 통한 배출량을 현저히 감소시키고 체내 protease의 접근을 막아 ASNase의 degradation이 저해된다. 결과적으로 PEGylation은 약물동태학 (pharmacokinetics) 측면에서 약물의 체내 체류시간을 연장시킴으로써 약물 투여 빈도를 줄일 수 있다. 또한 항체 등의 접근을 막아 면역반응이 일어나는 것을 방지하여 과민성 쇼크에 대한 위험성이 줄어들게 된다. 이러한 이유로 박테리아 유래의 ASNase에 과민반응을 일으키는 환자에게는 PEG-ASNase 투여를 권고하고 있다 [9].

## 1.2. 30Kc19 단백질에 대한 선행연구

### 1.2.1. 누에 체액에서 30Kc19단백질의 발견

본 연구실은 지난 십 여년의 연구를 통해 *Bombyx mori*의 학명을 가지고 있는 누에의 체액으로부터 다양한 생물학적 특성을 연구해왔다. 곤충 세포-베쿨로바이러스(baculovirus) 시스템의 배지에 누에 체액을 첨가하였을 때 숙주 세포의 생존율이 증가되는 것을 확인하였고, 베쿨로 바이러스와 화학 유도제로부터 유도된 세포 사멸을 억제하는 것을 확인하였다 [10,11]. 또한 동물세포의 배지에 처리하였을 때 세포의 성장과 생산성 또한 향상되는 것을 발견하였다 [12, 13].

그리고 후속 연구를 통해 누에 체액으로부터 apoptosis 억제, 세포의 성장과 생산성을 향상시켜주는 단백질 성분을 분리하였다. 그 결과 약 30kDa의 유사한 크기를 갖는 단백질군인 30K 단백질을 찾아내었다 [14]. 30K 단백질군은 분자량뿐만 아니라 구조적으로도 유사하고 아미노산 서열이 비슷한 5개의 30K 단백질로 구성되어 있다 [15]. 그 중 30Kc19 단백질은 5개의 30K 단백질 중에서 가장 높은 비율을 차지하는 단백질이다.

### 1.2.2. 30Kc19 단백질의 특성

30Kc19 단백질을 곤충세포의 배지에 처리하였을 때 세포의 apoptosis 억제효과를 보였다[16]. 30Kc19 단백질을 CHO (Chinese hamster ovary) cell에 발현시키거나[17,18] 재조합 단백질의 형태로 첨가해줬을 때 [18] EPO (erythropoietin)의 생산량이 증가되고, 시알릴전달효소 (sialyl transferase)의 활성을 향상시킴으로써 당 단백질의 구성 성분에서 시알산 (sialyl acid) 함량을 높여 양질의 단백질 생산이 가능해진 것을 확인하였다. 또한 30Kc19 단백질을 효소와 함께 incubation 시켰을 때, BSA (Bovine serum albumin)와 유사하게 효소를 안정화 시키고 효소의 활성이 더 오래 지속될 수 있도록 도와준다는 것을 확인하였다 [19].

### 1.2.3. 30Kc19 단백질의 세포투과성

일반적으로 살아있는 생물의 세포막은 지질 이중층(lipid bilayer) 구조를 가지고 있고 소수성의 성질을 띄고 있기 때문에, 거대분자(macromolecule)라고 불리는 단백질, 뉴클레오타이드(nucleotide) 등은 세포막을 통과하는 것이 불가능하다. 하지만 예외적으로 인간 면역 결핍 바이러스-1(human immunodeficiency virus-1, HIV-1)로부터 유래된 TAT 단백질은 총 86개의 아미노산 사슬 중 11개의 아미노산

서열로 이루어진 펩타이드가 세포 투과 기능을 가진 것을 발견하였다 [20]. 유사하게 HSV-1 (herpes simplex virus-1)의 VP22 단백질[21]과 초파리(Drosophila) 유래의 Antp (Antennapedia) 단백질도 세포 투과 기능을 가지는 것으로 확인되었다 [22]. 이러한 연구 결과들을 바탕으로 인위적으로 합성한 양전하를 띠는 peptide도 세포 투과 성질을 갖고 있다고 밝혀졌다 [23]. 30Kc19 단백질도 하나의 세포 투과 단백질(cell-penetrating protein)로, 본 연구실에서 진행해온 연구로부터 in vitro system에서 세포 내 전달, in vivo system에서 조직 내로의 전달을 확인하였다 [24].

#### 1.2.4. 30Kc19 단백질의 효소 안정화

효소는 단백질로 만들어진 촉매로서 생물체의 거의 모든 대사작용에 관여하여 생명을 유지시켜주는 역할을 수행한다. 그러나 효소는 효소 각각의 최적 온도, pH 조건에서 안정하기 때문에 조그마한 외부 환경 변화에도 쉽게 활성을 잃어버린다. 따라서 효소의 안정성을 유지시키는 연구가 진행되기도 하였다 [25,26].

본 연구실에서는 30Kc19 단백질이 세포 투과 기능과 더불어 효소를 안정화시켜주는 작용도 하는 것을 발견하였다 [27]. 따라서 이 연구에서는 ASNase의 효소 활성을 유지시키기 위하여 30Kc19을 conjugation하여 재조합 단백질로 생산하게 되었다.

## 1.3. Linker

### 1.3.1. Linker의 특징

재조합 DNA 기술이 발전하면서, 재조합 단백질에 관한 연구도 광범위한 영역에서 활발히 진행되어 왔다. 또한 재조합 단백질의 domain을 연결시켜주는 linker의 기능이 발견되면서 [28] 근래에는 이상적인 재조합 단백질의 특성을 얻기 위하여 단백질 자체에 대한 연구와 함께 linker의 선정도 중요시 되었다 [29]. linker의 종류에는 크게 flexible, rigid, cleavable 3가지가 있다 [28]. 그 중 본 연구에서 사용된 cleavable linker는 특정 protease에 의하여 cleavage가 일어나는 linker로써 MMP-2 (Matrix Metalloprotease-2), Furin, Cathepsin B 등에 의하여 cleavage되는 linker가 알려져 있다 [30,31,32].



## 2. 실험 재료 및 방법

### 2.1. Plasmid 제작 (pET23a/ASNase-PLGLAG-30Kc19)

*E. coli* K-12 (DH5 $\alpha$ , Invitrogen)의 DNA로부터 PLGLAG-30Kc19의 유전자를 증폭시켰다. 사용된 primer는 다음과 같다.

(forward)5'GAATTCCCCTAGGCCTAGCCGGCGCAGATTCCGACGTCCCTAAC3'

(reverse)5'CTCGAGGAAAGCCTTTATACCCCAAGC3'

여기에 각각 EcoR1, Xho1의 제한효소절단위치 (밑줄)를 추가했다. 또한 forward primer에는 linker sequence를 추가하였다 (이탤릭). 이를 EcoR1과 Xho1으로 double digestion을 시키고 이전 논문에서 구축된 pET23a/ASNase-30Kc19 plasmid도 마찬가지로 30Kc19 vector 양단의 제한효소인 EcoR1, Xho1으로 double digestion하고 pET23a/ASNase vector에 삽입하여서 pET23a/ASNase-PLGLAG-30Kc19를 제작하였다. (Figure1.) 이 재조합 plasmid는 *E. coli* 상에서 발현을 위해 N말단에는 T7 tag이, 정제과정을 위해 C말단에는 6xHis tag이 삽입되었다. (Figure1.)

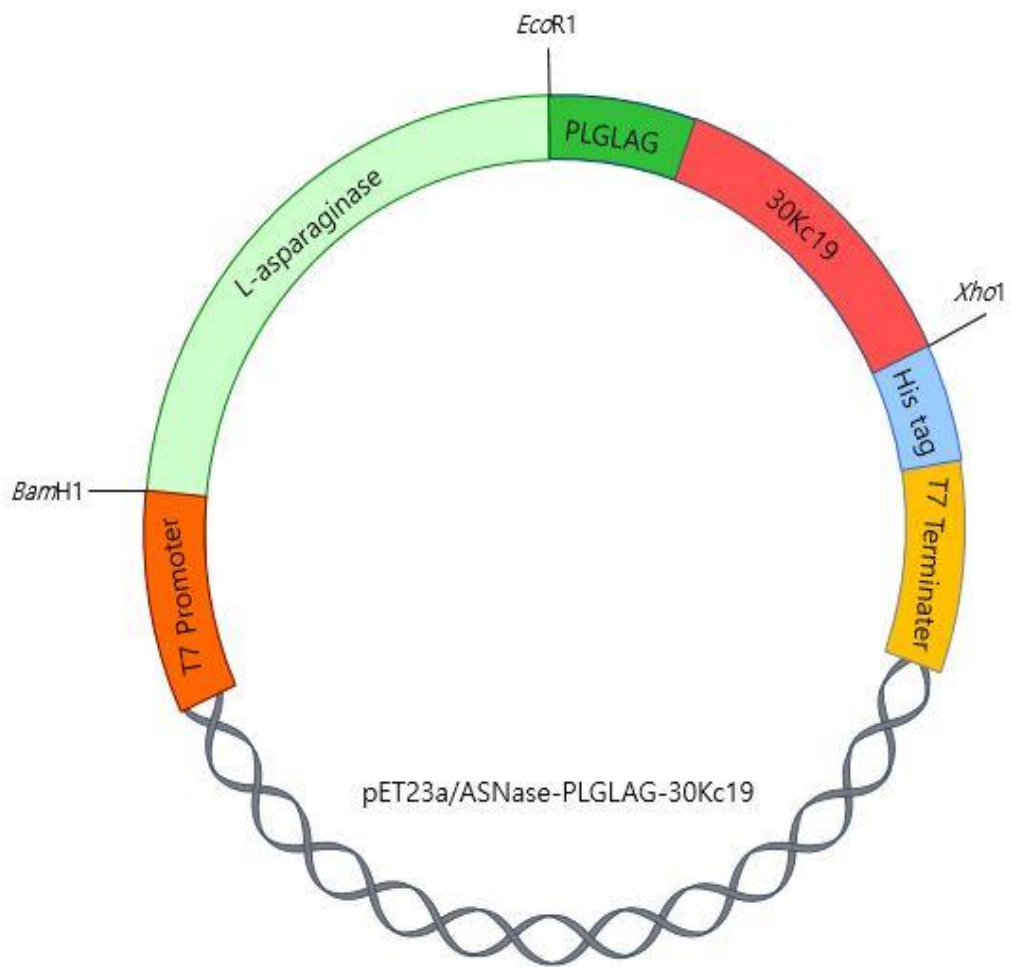


Figure 1. pET23a/ASNase-PLGLAG-30Kc19의 구조

## 2.2. ASNase-PLGLAG-30Kc19, ASNase-30Kc19 단백질의 발현 및 정제

위에서 제작한 Plasmid는 단백질 발현을 위해 E.coli BL21 strain에 각각 형질전환(transformation) 하였다. 이 E.coli들을 LB broth에서 37°C, 200 rpm 조건으로 키워주었다. OD600가 0.5에 도달할 때 isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (IPTG)를 첨가하여 1 mM로 농도를 맞추어 발현을 유도했다. 이후 4시간동안 추가로 배양시키고, 이를 원심분리 (7000 rpm, 4°C)를 통해 수거한 후 수거된 cell을 lysis buffer (20 mM Tris-HCL, 0.5 M NaCl, pH 8.0)로 재부유 (resuspension)시키고, 초음파파쇄 (ultrasonification)을 통해 분해하였다. 초음파파쇄 중 원심분리 (12000 rpm, 4°C, 30 min)를 통해 상등액을 수거하여 막여과시켰다. 고속 단백질 액체크로마토그래피 (Fast protein liquid chromatography, FPLC)를 통하여 Binding buffer(20 mM Tris - HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazole, pH 8.0)를 흘려서 평형상태로 만든 Histrap HP column (GE healthcare, Uppsala, Sweden)에 이 상등액을 흘려주었다. 이후 column에 washing buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 50 mM imidazole, pH 8.0)를 흘려줌으로써 불특정하게 붙은 단백질을 제거하였고, elution buffer (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 350 mM imidazole, pH 8.0)을 흘려서 목표한 단백질을 elution하였다. 20 mM Tris-HCl buffer (20 mM Tris-HCL, 0.5 M NaCl, pH 8.0)로 채워져 평형상태인 Histrap desalting column (GE

healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 앞서 얻은 단백질에서 salt를 제거한 후 단백질을 -70°C deep freezer에서 사용 전까지 보관하고, 사용 시 이 단백질들을 4°C 상에서 천천히 녹여서 사용하였다. 단백질의 정량분석은 Micro BCA kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, U.S.A.)를 통하여 수행하였다.

정제된 단백질의 크기를 확인하기 위하여 10% SDS 폴리아크릴아마이드 젤전기영동 (SDS-PAGE)을 통하여 분리하였다. 그리고 이를 Coomassie Brilliant Blue 염색을 통하여 시각화 하였다.

### 2.3. MMP-2 Cleavage Assay

MMP-2(Matrix Metalloprotease-2)에 의해 이론적으로 설계한 peptide sequence (PLGLAG)가 잘리는지 in vitro 분석을 진행하였다. MMP-2의 효소활성을 위해 MMP digestion buffer 1L를 제조하였다. (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM ZnSO<sub>4</sub>, 0.02 % NaN<sub>3</sub>, 0.05 % Brij35, pH 7.27) 그리고 앞서 정제한 2개의 단백질 샘플(ASNase-PLGLAG-30Kc19/ ASNase-30Kc19)을 Viva spin 500(MW: 10,000, Satorius stedim)을 이용하여 10배 농축시키고 그 중 50λ MMP digestion buffer 50λ와 섞어주었다. 총 100λ의 단백질 샘플을 6개의 EP tube(eppendorf)에 15λ씩 나누어 담았다.

2개의 EP tube는 MMP-2(Calbiochem)를 넣지 않고 각각 0시간, 6시간 37°C로 맞춰진 incubator(Bionex)에서 항온처리 하였다. 그리고 나머지 4개의 EP tube에

담겨진 샘플은 MMP-2를 0.5 $\lambda$ , 1.0 $\lambda$ , 1.5 $\lambda$ , 2.0 $\lambda$  넣고 37°C에서 6시간 incubation 을 하였다. 샘플의 cleavage를 확인하기 위하여 10% SDS 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(SDS-PAGE)을 통하여 분리한 후 이를 Coomassie Brilliant Blue 염색을 통하여 시각화 하였다.

## 2.4. Enzyme Activity Assay

먼저 실험한 MMP cleavage assay를 통해 얻은 결과를 토대로, 두 가지 단백질을 (ASNase-30Kc19, ASNase-PLGLAG-30Kc19)을 6시간동안 MMP-2 처리를 진행하였다. MMP-2 처리가 된 샘플들을 10% SDS-PAGE를 통하여 cleavage를 확인하였고 Coomassie Brilliant Blue 염색을 통하여 시각화 하였다.

ASNase activity는 반응에서 발생한 암모니아를 이용하는 반응인 direct nesslerization을 통해 생산한 단백질들의 활성을 측정하였다. ASNase에 기질인 ASN과 37°C, 50 mM Tris-HCl, pH 8.6 buffer에서 30분 간 함께 항온처리하고 1.5 M TCA (Trichloroacetic acid)를 처리하여 반응을 멈추게 했다. 그 동안 발생한 암모니아와 Nessler's reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)가 발광하는 정도를 436 nm 파장에서 분광광도계로 측정, ammonium sulfate 용액을 기준으로 삼아 활성을 확인하였다. 436 nm의 발색도로부터 Unit/ml 단위의 Enzyme activity 값을 얻고 좀 더 정량적인 분석을 위해 실험에 사용한 protein의 정량을 BSA Assay로 진행하여 Unit/nmole의 Enzyme activity값을 구하였다.

## 2.5. RT-PCR

쥐의 정상 Lymphoblast cell line인 FDC-P1과 ALL(Acute Lymphoblastic Leukemia)에 걸린 Lymphoblast cell line인 L5178Y 세포를 취하여 total RNA를 얻은 후 cDNA synthesis kit (enzymomics)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이렇게 얻어진 세포의 cDNA를 주형으로 하여 PCR Premix(Super Bio)을 첨가하여 총 35 cycle을 수행하였다. 각 프라이머는 (Table 1.) 과 같다. PCR 결과물은 1% agarose gel을 이용하여 전기영동을 통해 분리한 후, EtBr로 염색하여 세포에서의 발현을 확인하였다.

Primers		Sequence from 5' to 3' end
GAPDH	sense	GTCTTCACTACCATGGAGAAGG
	antisense	TCATGGATGACCTTGGCCAG
mMMP-2	sense	CAATACCTGAACACTTTCTATGG
	antisense	CTGTATGTGATCTGGTTCTTG
mMMP-9	sense	CCCAAAGACCTGAAAACCTCCAA
	antisense	CGACCACAACCTCGTCGTCG

Table 1. RT-PCR에 사용된 primer sequence

## 2.6. CCK-8 Assay를 통한 ASNase-PLGLAG-30Kc19 단백질의 FDC-P1 독성 검사

세포 내 독성 검사는 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Japan)을 이용하여 진행하였다. 96 well plate (Thermo Scientific, USA)에 FDC-P1과 L5178Y 세포를 seed culture 한 후, 단백질 샘플을 각기 다른 농도로 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 24시간 배양하였다. 단백질을 첨가하지 않은 대조군 FDC-P1은 10% FBS, 25% WEHI-3 culture sup, 0.05 mM 2-mercaptoethanol를 포함한 DMEM에, L5178Y 세포에 대해서는 10% FBS, 1% PS를 포함한 RPMI에 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 용액을 단백질 정제시 희석했던 비율로 혼합해 첨가해 주었다. WST-8 (Water-soluble Tetrazolium-8) 용액을 10 $\mu$ l씩 각 well에 넣고 3시간 동안 다시 배양한 후, 분광광도계를 이용하여 450 nm 파장에서 발색 정도를 측정하였다.

## 2.7. CCK-8 Assay를 통한 ASNase-30Kc19, ASNase-PLGLAG-30Kc19 단백질의 L5178Y cell line의 독성 비교

세포 내 독성 검사는 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories, Japan)을 이용하여 진행하였다. 96 well plate (Thermo Scientific, USA)에 L5178Y 세포를 seed culture 한 후, 두 가지 단백질 샘플을 각기 다른 농도로 처리하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 24시간 배양하였다. 단백질을 첨가하지 않은 대조군 L5178Y 세포



에 대해서는 10% FBS, 1% PS를 포함한 RPMI에 20 mM Tris-HCl(pH 8.0) 용액을 단백질 정제시 희석했던 비율로 혼합해 첨가해 주었다. WST-8(Water-soluble Tetrazolium-8) 용액을 10 $\mu$ L씩 각 well에 넣고 3시간 동안 다시 배양한 후, 분광광도계를 이용하여 450 nm 파장에서 발색 정도를 측정하였다.

## 2.8. Immunocytochemistry (Confocal Laser Scanning Microscope, CLSM)

ASNase-PLGLAG-30Kc19의 L5178Y 세포 투과성을 확인하기 위해서 immunocytochemistry 분석을 이용하였다. 6 well plate (Thermo Scientific, USA) 에서 L5178Y 세포를 seeding한 후, ASNase-PLGLAG-30Kc19을 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml 농도로 각각 4시간, 24시간 배양하였다. 배양한 세포를 dPBS로 세척한 후 4% formaldehyde로 15분동안 세포를 고정하여, 8 well glass chamber slide (Lab-Tek, USA) 부착하였다. 3% BSA 용액으로 blocking한 세포에 anti-30Kc19 primary 항체를 처리하고, 다시 Alexa Flour® 488 (Invitrogen, USA) 표지 되어 있는 secondary 항체를 처리하고 Hoechst 33342를 20분간 처리하여 핵을 염색해 주었다. 다시 dPBS로 washing한 후에, 공초점 레이저 현미경(Confocal laser scanning microscope, CLSM; Nikon, Japan)을 이용하여 단백질이 세포 내에 위치하는지 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. Fusion protein의 크기 및 농도 확인

Vector cloning 과정에서 ASNase와 ASNase-LK-30Kc19의 N-terminal에는 T7 tag이, C-terminal에는 6-His tag이 있는 구조를 가졌다. FPLC를 사용하여 정제한 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리과정을 거치고, Coomassie brilliant blue 염색을 통해 시각화하였다. 그리고 ASNase와 ASNase-LK-30Kc19 단백질들의 사이즈가 예상되었던 68kDa 정도의 위치에서 band가 나타나는 것을 확인하였다. 또 Standard BSA solution을 사용하여 정제된 단백질의 농도값을 얻었다 (Figure 2).

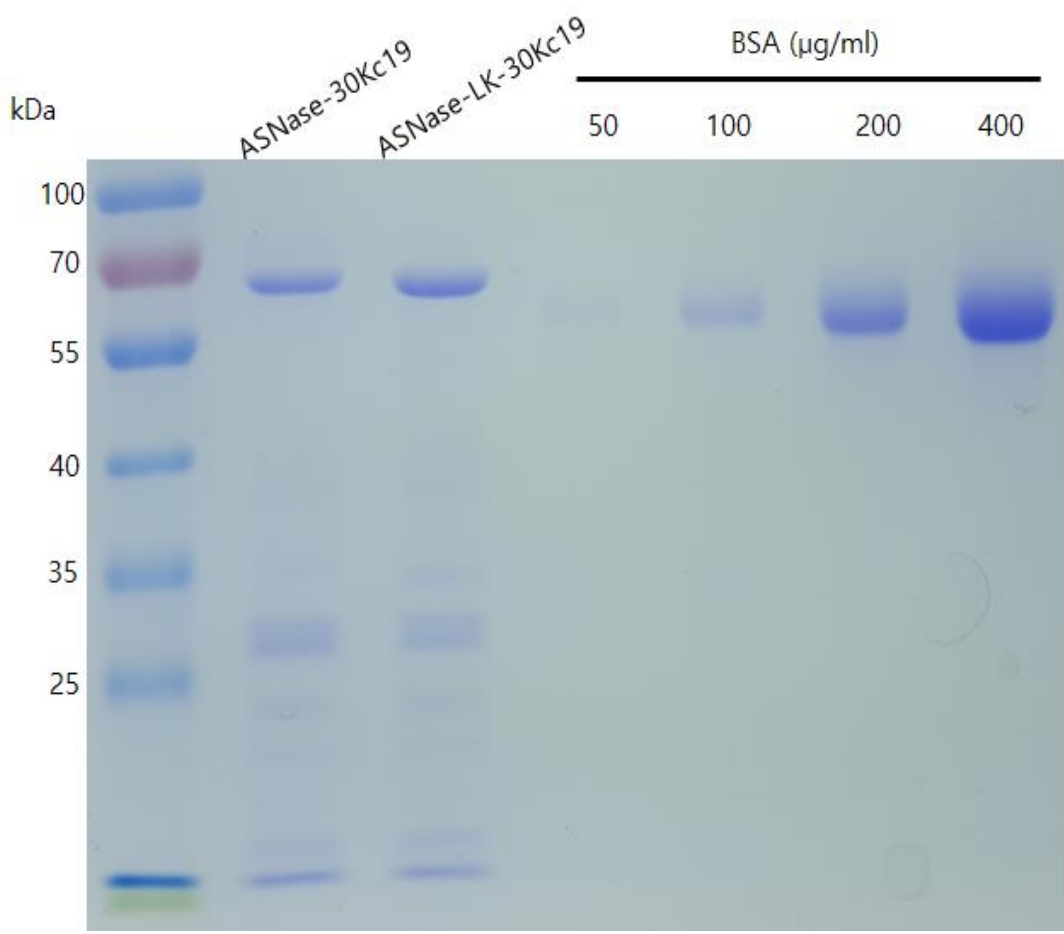


Figure 2. Fusion protein의 크기 및 농도 확인

### 3.2. *In vitro* MMP-2 Cleavage assay

암세포에서 발현되는 gelatinase인 MMP-2가 ASNase-PLGLAG-30Kc19 단백질에서 실제로 PLGLAG linker sequence를 cleavage하는지 *in vitro*상에서 확인해보았다. 각각 다른 농도의 MMP-2를 6시간 동안 처리한 후, 10% SDS-PAGE를 통하여 sample을 분리하고 Commassie brilliant blue 염색을 통해 시각화하였다. 30Kc19 단백질의 크기인 30 kDa 정도의 band가 나타나는 것으로 보아 linker가 잘렸음을 확인하였다. (Figure 3.)

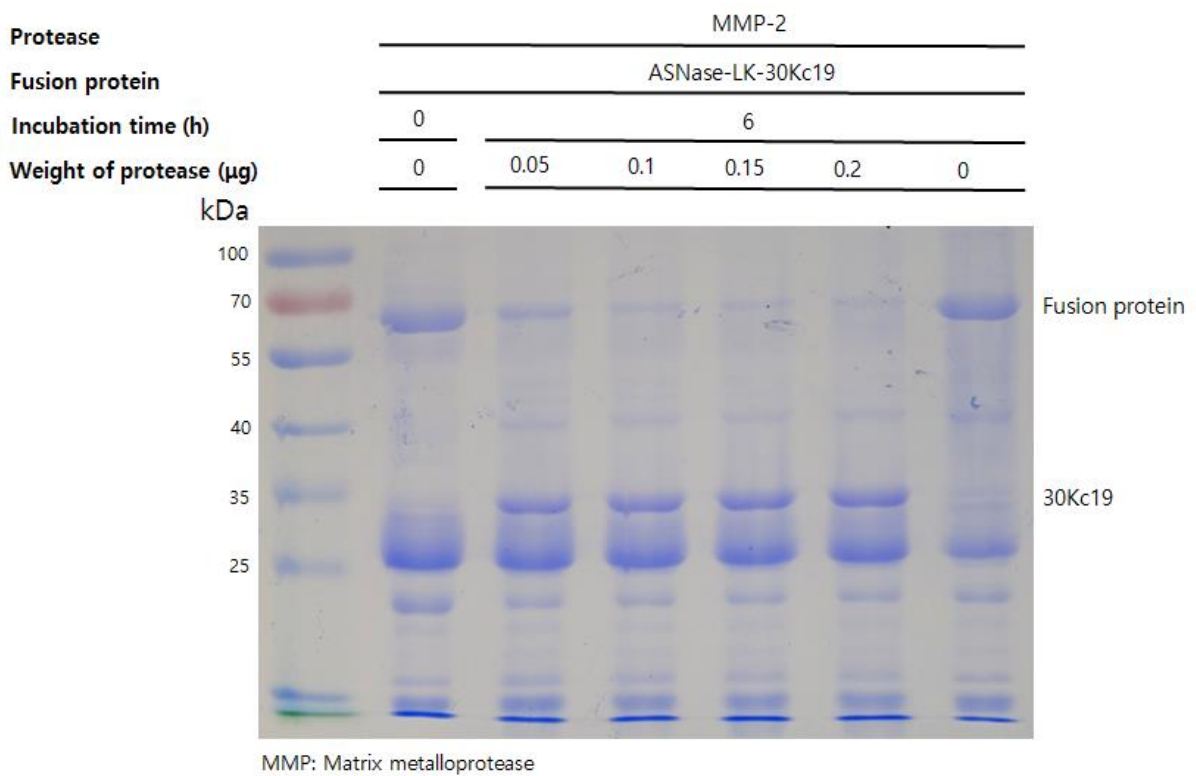


Figure 3. ASNase-LK-30Kc19의 MMP-2 Cleavage assay

### 3.3. Direct nesslerization을 이용한 효소 활성 측정

재조합 단백질인 ASNase-30Kc19과 ASNase-LK-30Kc19가 cleavage가 되어 ASNase만 존재할 때, ASNase의 효소 활성을 direct nesslerization을 통해 측정하였다. 먼저 두 가지 단백질 sample을 MMP-2와 incubation 한 후에 direct nesslerization을 실행하였다. 분자 활성 (molecular activity)을 비교하였을 때, ASNase-30Kc19보다 ASNase-LK-30Kc19의 cleavage 형태인 ASNase가 Unit/ml 에서는 57%. Unit/nmole 에서는 22% 정도 효소 활성이 올라갔음을 확인하였다. (Table 2.)

	ASNase-30Kc19	ASNase-LK-30Kc19
Unit/ml	7.27	11.43
Unit/nmole	3.53	4.31

Table 2. Direct nesslerization을 통한 Fusion protein의 enzyme activity

### 3.4. RT-PCR을 통한 MMP 발현 확인

Linker를 cleavage할 수 있는 cancer cell protease인 MMP-2와 MMP-9이 목적으로 하는 cell line에 발현이 되는지 MMP-2와 MMP-9 유전자에 대한 mRNA의 존재를 RT-PCR을 통해 확인하였다. 정상 쥐의 lymphoblast cell line인 FDC-P1 세포와 혈액암의 걸린 쥐의 lymphoblast cell line인 L5178Y 세포를 배양한 후, total RNA를 추출해 내고 cDNA를 합성한 후에 PCR을 통해 유전자를 증폭시켰다. 각 construct에 특이적인 프라이머를 사용하여 MMP-2와 MMP-9의 발현 여부를 DNA 전기영동 하여 확인하였다. house keeping gene으로는 GAPDH를 사용하였다. (Figure 4)에서 보는 바와 같이 FDC-P1은 MMP-2에 해당하는 band가, L5178Y는 MMP-2와 MMP-9에 해당하는 band가 관찰되었다 (Figure 4).



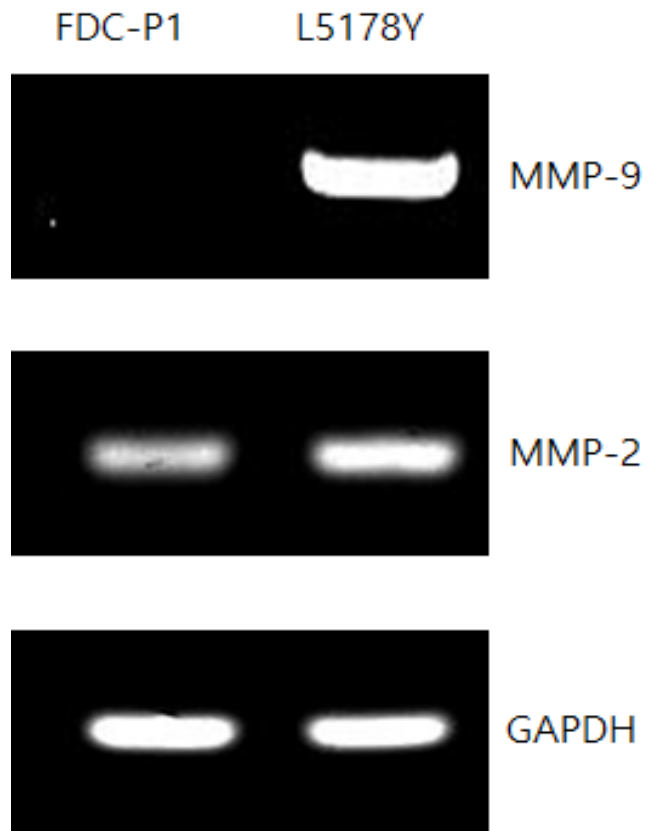


Figure 4. FDC-P1과 L5178Y 세포에  
서의 MMP-2,9 발현 확인

### 3.5. ASNase-LK-30Kc19 단백질의 세포 투과성

ASNase-LK-30Kc19 단백질이 세포 내부를 투과할 수 있는지 확인하기 위해 L5178Y 세포 배지에 단백질을 0.01 mg/ml 처리해 주었다. 단백질을 처리한 후 24 시간 동안 배양한 뒤 면역세포화학적 (immunocytochemical analysis) 분석을 수행하였다. 면역세포학적 분석은 공초점 레이저 현미경(Nikon, Japan)을 이용하여 수행하였다. 그 결과 L5178Y 배지에 단백질을 처리하지 않은 대조군의 세포 내부에서는 형광이 관측되지 않았다. 하지만 ASNase-LK-30Kc19을 첨가하였을 때는 세포 내부에서 형광을 관측할 수 있었다 (Figure 5).

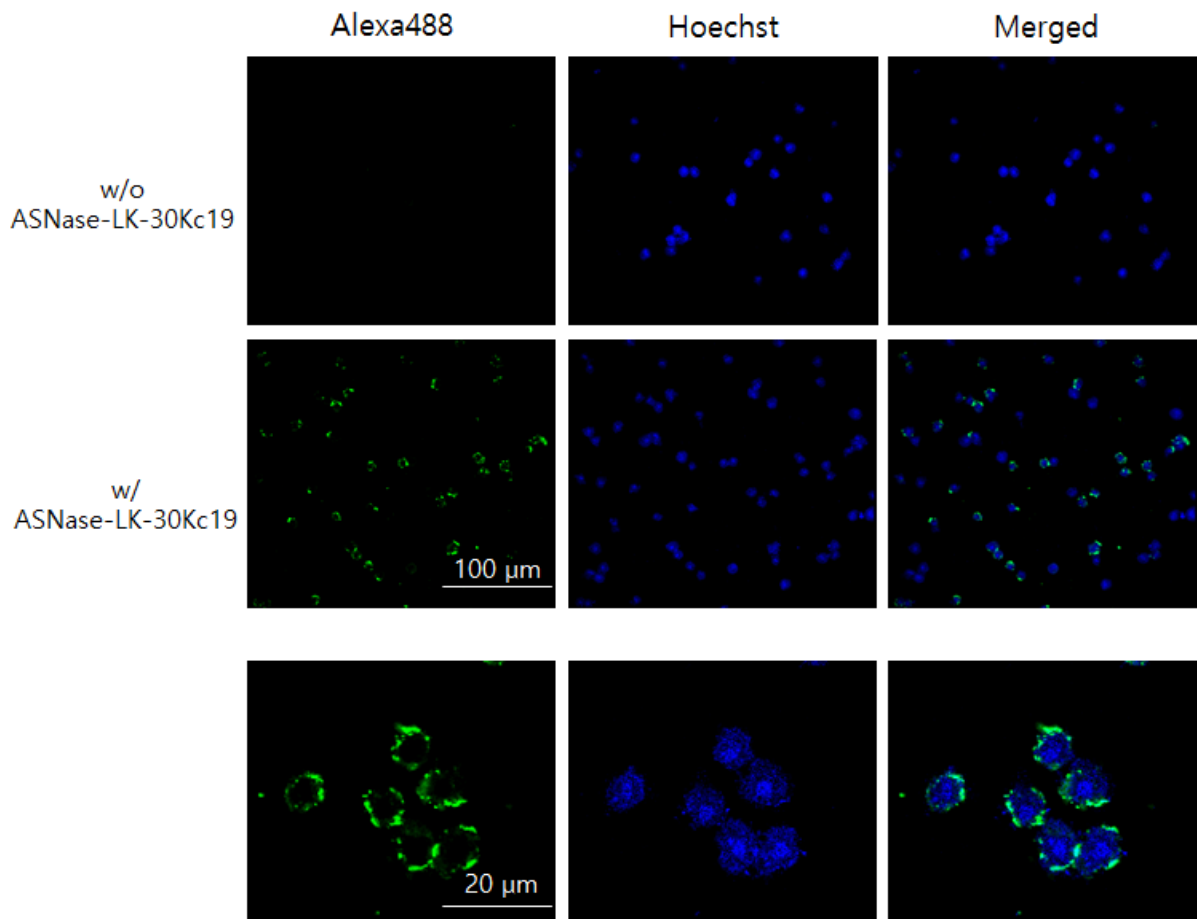


Figure 5. ASNase-LK-30Kc19 단백질의 세포 투과성

### 3.6. ASNase-30Kc19, ASNase-LK-30Kc19 단백질의 L5178Y cell line에서의 독성

L5178Y 세포는 ASN을 자체적으로 생산하지 못하기 때문에 ASNase에 독성을 가진다고 알려져있다. ASNase-LK-30Kc19 단백질이 실제 세포 내에서 독성을 가지는지 L5178Y 세포를 대상으로 세포독성을 조사하였다. 각기 다른 Unit 농도의 단백질을 세포에 처리하여 24시간 배양한 후 CCK-8 assay를 진행하였다. 흡광도를 측정하여 세포의 viability를 확인하였다. 그 결과 30% 이하의 cell viability에서, linker가 달려있는 ASNase-LK-30Kc19 단백질이 linker가 달려있지 않은 ASNase-30Kc19보다 약 10~100배 적은 용량으로 cell apoptosis를 일으켰음을 확인할 수 있었다. (Figure 6.)

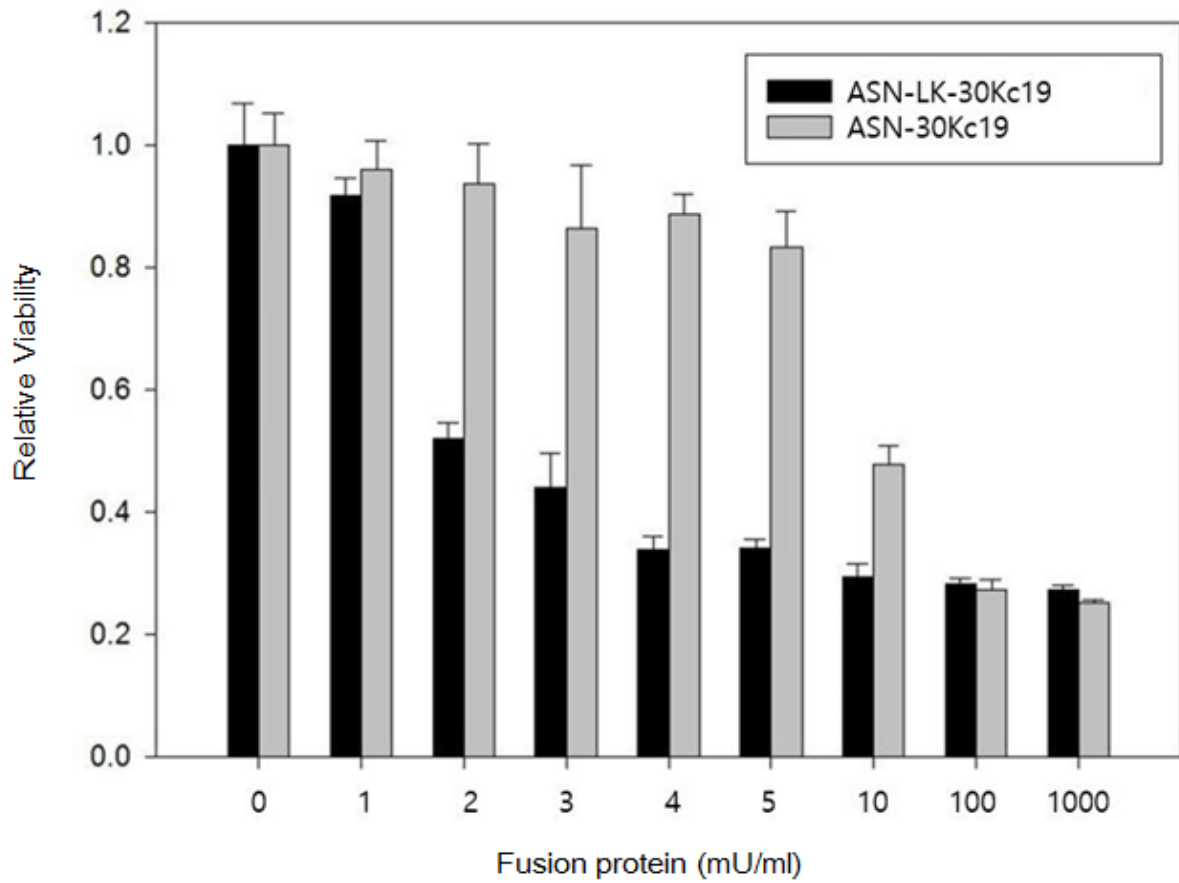


Figure 6. ASNase-30Kc19, ASNase-LK-30Kc19 단백질의 L5178Y cell line에서의 독성

### 3.7. ASNase-LK-30Kc19 단백질의 FDC-P1, L5178Y cell line 에서의 독성 비교

ASNase-LK-30Kc19 단백질이 정상 lymphoblast cell line인 FDC-P1 세포 내에서도 독성을 가지는지 L5178Y 세포와 함께 세포독성을 조사하였다. FDC-P1과 L5178Y에 각기 다른 Unit 농도의 단백질을 처리하여주고 24 시간 배양 후 CCK-8 assay를 진행하였다. 그리고 흡광도를 측정하여 세포의 viability를 확인하였다. 그 결과 FDC-P1 세포는 ASNase-LK-30Kc19에 대해 L5178Y보다 세포사멸율에 대해서 덜 민감한 것을 확인할 수 있었다. 이는 L-asparaginase 자체에 대한 독성이 정상 lymphoblast cell은 cancer cell보다 없기 때문이라고 결론지을 수 있었다. (Figure 7.)

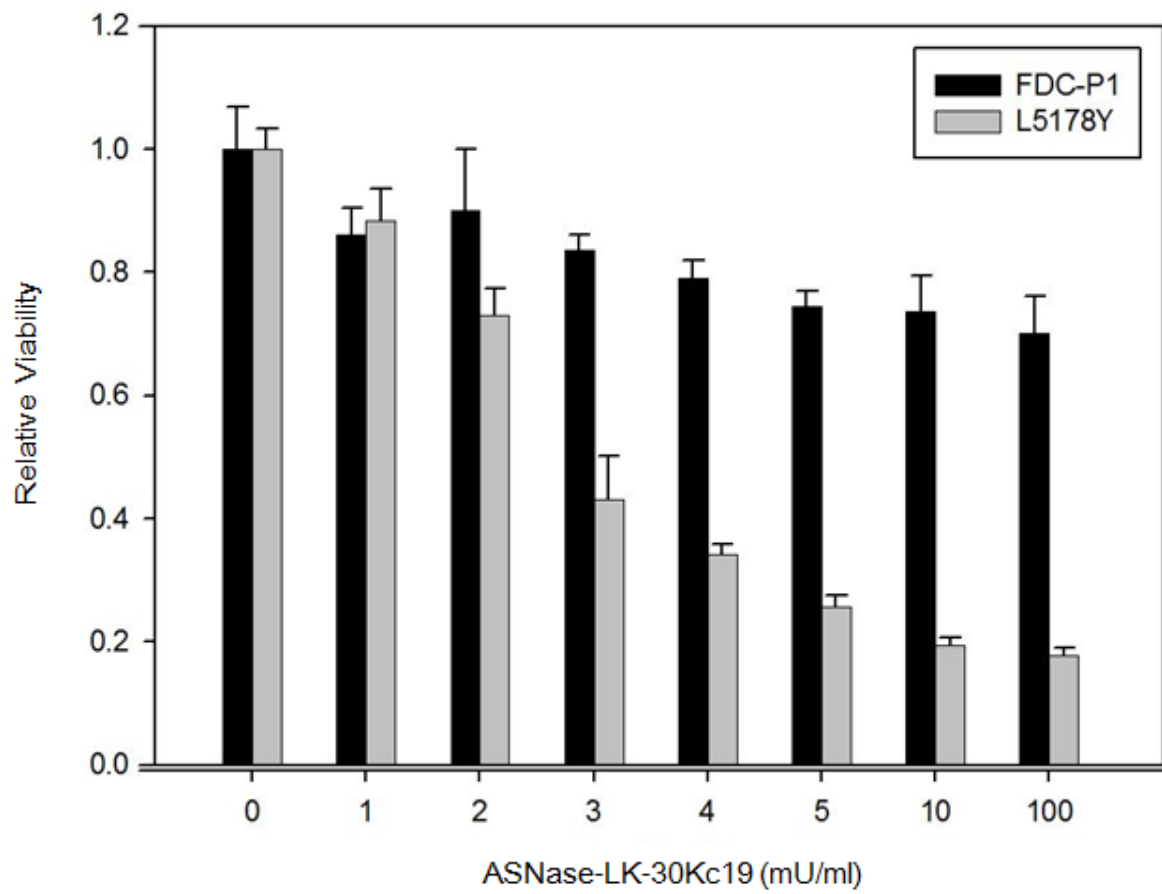


Figure 7. ASNase-LK-30Kc19 단백질의 FDC-P1, L5178Y cell line에서의 독성 비교

## 4. 결론

기존의 *E.coli* 유래 L-asparaginase 치료제는 과민성 쇼크반응이나 enzyme의 짧은 반감기로 격일 단위로 투여해야하는 불편함이 있었다. 이를 해결하기 위하여 *Erwinia* 유래의 L-asparaginase와 pegylation과 같은 대안이 제시되었지만 근본적인 해결책을 제시하지는 못하였다. 따라서 효소를 안정화하여 반감기를 늘리고, 적은 투여량으로 효과적인 치료를 할 수 있는 modification이 필요했다.

본 연구에서는 세포 투과성과 효소 안정화 특성이 있는 *Bombyx mori* 유래의 30Kc19 단백질을 cleavable linker를 사용하여 L-asparaginase와 conjugation하였다. 30Kc19 단백질을 사용하였기 때문에 세포의 투과성과 효소의 안정화 효과를 유도할 수 있었고 cleavable linker로 인하여 암세포에 선택적으로 L-asparaginase가 release되어 링커가 없는 fusion protein보다 훨씬 적은 양으로 암세포의 사멸을 확인하였다. In vitro 실험을 통해서 fusion protein의 링커가 cleavage 됐을 때, cleavage 되지 않은 fusion protein보다 효소의 활성이 약 20% 가량 증가함을 확인하였고 본 연구에 사용된 2가지의 암세포에서도 MMP-2,9의 발현을 확인하였다. 또한 30Kc19에 의한 세포투과성도 Immunocytochemistry를 통하여 확인할 수 있었다.

본 연구에서 개발한 ASNase-PLGLAG-30Kc19 fusion protein은 추가적인 in vivo 실험과 pegylation과 같은 modifying을 통하여 ALL 환자들에게 유용하게 사용될 수 있을 것이다.



덧붙여, 본 연구에서 사용된 30Kc19 단백질과 MMP-2 cleavable linker는 효과적인 drug modification method임을 입증할 수 있었다.

## 5. 참고문헌

- [1] Schrappe M, A. Reiter, WD. Ludwig, Improved outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia despite reduced use of anthracyclines and cranial radiotherapy: results of trial ALL BFM90: German-Austrian Swiss ALL BFM Study Group. *Blood*, 2000. 95: p. 3310-3322.
- [2] Hill, J.M, J. Roberts, E. Loeb, A. Khan, A. MacLellan, L-asparaginase therapy for leukemia and other malignant neoplasms. *JAMA: the journal of the American Medical Association*, 1967. 202(9): p. 882-888.
- [3] Cooney, D. and R. Handschumacher, L-asparaginase and L-asparagine metabolism. *Annual review of pharmacology*, 1970. 10(1): p. 421-440.
- [4] Capizzi, R, J. Bertino, and R. Handschumacher, L-asparaginase. *Annual Review of Medicine*, 1970. 21(1): p. 433-444.
- [5] Bai G, KV. Rama, CRK. Murthy, Ammonia induces the mitochondrial permeability transition in primary cultures of rat astrocytes. *J Neurosci Res*, 2001. 66(5): p981-991.
- [6] Shepherd, G.M, Hypersensitivity reactions to chemotherapeutic drugs. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 2003. 24(3): p. 253-262.
- [7] Evans, W.E, D. Pharm, T. Anastasios et al., Anaphylactoid reactions to

Escherichia coli and Erwinia asparaginase in children with leukemia and lymphoma. Cancer, 1982. 49(7): p. 1378-1383

[8] Avramis, V.I, S. Sencer, AP. Periclou, H. Sather, A randomized comparison of native Escherichia coli asparaginase and polyethylene glycol conjugated asparaginase for treatment of children with newly diagnosed standard-risk acute lymphoblastic leukemia: a Children's Cancer Group Study. Blood, 2002. 99(6): p. 1986-1994.

[9] Michael J. Keating, R. Holmes, S. Lerner, DH. Ho, L-Asparaginase and PEG Asparaginase-Past, Present, and Future, Leukemia & Lymphoma, 1993. 10(1): p. 153-157.

[10] Rhee, W.J., E.J. Kim, and TH. Park, Kinetic Effect of Silkworm Hemolymph on the Delayed Host Cell Death in an Insect Cell : Baculovirus System. Biotechnology progress, 1999. 15(6): p. 1028-1032.)

[11] Rhee, W.J., and TH Park, Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2000. 271(1): p. 186-190.

[12] Choi, S.S., WJ. Rhee, and TH. Park, Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. Biotechnology progress, 2002. 18(4): p. 874-878.

[13] Choi, S.S., WJ. Rhee, and TH. Park, Beneficial effect of silkworm hemolymph on a CHO cell system: Inhibition of apoptosis and increase of

EPO production. *Biotechnology and bioengineering*, 2005. 91(7): p. 793-800.

[14] Kim, E.J., WJ, Rhee, and TH. Park, Isolation and Characterization of an Apoptosis-Inhibiting Component from the Hemolymph of *Bombyx mori*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001. 285(2): p. 224-228.

[15] Sakai, N., S. Mori, S. Izumi, and K. Haino, Structures and expression of mRNAs coding for major plasma protein of *Bombyx mori*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1998. 949(2): p. 224-232.

[16] Rhee, W.J., EH. Lee, and TH, Park, Expression of *Bombyx mori* 30Kc19 protein in *Escherichia coli* and its anti-apoptotic effect in Sf9 cell. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2009. 14(5): p. 645-650.

[17] Wang, Z., et al., Enhancement of recombinant human EPO production and sialylation in Chinese hamster ovary cells through *Bombyx mori* 30Kc19 gene expression. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011. 108(7): p. 1634-1642.

[18] Park, J.H., et al., Enhancement of recombinant human EPO production and glycosylation in serum-free suspension culture of CHO cells through expression and supplementation of 30Kc19. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012. 96(3): p. 671-683.

- [19] Park, J.H., et al., Stabilization of enzymes by the recombinant 30Kc19 protein. *Process Biochemistry*, 2012. 47(1): p. 164-169.
- [20] Fawell. S, J. Seery, Y. Daikh, C. Moore, L.L. Chen, B. Pepinsky, and J. Barsoum, Tat-mediated delivery of heterologous proteins into cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994. 91(2): p. 664-668.
- [21] Elliotte. G, P.O' Hare, Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein. *Cell*, 1997. 88(2): p. 223-233.
- [22] Schwarze. S. R, K.A. Hruska, and S.F. Dowdy, Protein transduction: unrestricted delivery into all cells?. *Trends in Cell Biology*, 2000. 10(7): p. 290-295.
- [23] Laus. R, T.J. Graddis, I, Hakim, and D. Vidovic, Enhanced major histocompatibility complex class I-dependent presentation of antigens modified with cationic and fusogenic peptides. *Nature Biotechnology*, 2000. 18(12): p. 1269-1272.
- [24] Park, J.H., et al., A protein delivery system using 30Kc19 cell-penetrating protein originating from silkworm. *Biomaterials*, 2012. 33(35): p. 9127-9134.
- [25] Renugopalakrishnan. V, R. Garduno-Juarez, G. Narasimhan, C.S. Verma, X. Wei, and P. Li, Rational design of thermally stable proteins: relevance to bionanotechnology. *Journal of Nanoscience and*

Nanotechnology, 2005. 5(11): p. 1759-1767.

[26] Hult, K, and P. Berglund, Engineered enzymes for improved organic synthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003. 14(4): p. 395-400.

[27] Park, J. H., H.H. Park, S.S. Choi, and T.H. Park, Stabilization of enzymes by the recombinant 30Kc19 protein. *Process Biochemistry*, 2012. 47(1): p. 164-169.

[28] X. Chen, J.L. Zaro, W. Shen, Fusion protein linkers: Property, design and functionality, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2013. 65(4): p. 1357-1369.

[29] H. Zhao, X. Yao, C. Xue, Y. Wang, X. Xioang, and Z. Liu, Increasing the homogeneity, stability and activity of human serum albumin and interferon-alpha2b fusion protein by linker engineering, *Protein Expression and Purification*, 2008. 61(2): p. 73-77.

[30] T. Xia, K. Akers, A.Z. Eisen, J.L. Seltzer, Comparison of cleavage site specificity of gelatinases A and B using collagenous peptides, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1996. 1293(2): p. 259-266.

[31] H.L, Zhao, C. Xue, J.L. Du, M. Ren, S. Xia, and Z.M. Liu, Balancing the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Interferon-alpha2b and Human Serum Albumin Fusion Protein by Proteolytic or Reductive Cleavage Increases Its in vivo Therapeutic Efficacy, *molecular pharmaceuticals*, 2012, 9(3): p. 664-670.

[32] B. Schmid, D. Chung, A. Warnecke, I. Fichtner, and F. Kratz, Albumin-Binding Prodrugs of Camptothecin and Doxorubicin with an Ala-Leu-Ala-Leu-Linker That are cleaved by cathepsin B: Synthesis and Antitumor Efficacy, 2007. 18(3): p. 702-716.

## Abstract

# Enhancement of L-Asparaginase Activity in L5178Y Mouse Lymphoma Cells by Conjugating 30Kc19 Protein and L- Asparaginase with Cleavable Linker

Sung Jae Yang

School of Chemical and Biological Engineering

The Graduate School

Seoul National University

L-asparaginase (ASNase) is widely used protein drug for ALL (Acute Lymphoblast Leukemia). ALL commonly occurred to aged 2-5 years children and its treatment is called 'Complete remission induction method' which administrates anti-cancer drug by intravenous injection. Ratio of full recovery of ALL is 80% to 2-5 years old children. But age become older, the number of people who become cured drops quickly up to less than 10% in case of over 60 years old people. One of the anti-cancer drug which is used for remission induction is ASNase. But since it originated from *E. coli*, there is possibility for hypersensitive shock. And because of short half life of ASNase, it needs to be administrated every other day. In this study, we



conjugated 30Kc19 cell-penetrating protein from *Bombyx mori* with ASNase to enhance stability of enzyme as well as penetrate the cell.

Also we conjugated cleavable linker which is sequenced as PLGLAG between ASNase and 30Kc19. We expected that cleavable linker helps fusion protein to target cancer cells and increase enzyme activity by reducing steric hindrance. In order to this experiments, we purified ASNase-cleavable linker-30Kc19 fusion protein from *E. coli*. And we verified enhanced enzyme activity and cell-penetration effect of fusion proteins. In terms of dosage, ASNase-PLGLAG-30Kc19 reached same cell death ratio more effectively about 10~100 times in comparison with ASNase-30Kc19 under the same conditions of incubation time.

This strategy demonstrated that 30Kc19 protein and cleavable linker can be used for drug modification effectively. And it shows the possibility that it can be treated towards to ALL patients by additional experiments like in vivo or pegylation.

Keywords : Acute Lymphoblast Leukemia, Complete remission induction method, 30Kc19, L-asparaginase, cleavable linker, MMP-2,

Student Number : 2014-22611