

Optical calcium sensors: development of a generic method for their introduction to the cell using conjugated cell penetrating peptides

김범상 (홍익대학교 화학공학과)

본 내용은 Abigail Webster, Steven J. Compton, and Jonathan W. Aylott, 'Optical calcium sensors: development of a generic method for their introduction to the cell using conjugated cell penetrating peptides', *The Analyst*, 130, 163-170 (2005)에서 발췌한 내용입니다.

세포 침투 펩타이드(cell penetrating peptides, CPP)란 외관상 에너지 독립적인 방식으로 세포막을 통과할 수 있는 최고 30개의 잔류기(residue)를 가진 펩타이드를 말한다. 많이 연구된 CPP는 *Bufo bufo gargarizans*의 buforin, *Drosophilla*의 penetratin, HIV 바이러스의 알지닌이 많은 펩타이드와 Tat 등이 있는데, 이러한 펩타이드들의 공통적인 특징은 세포막에 강하게 부착될 수 있는 양이온성을 나타낸다는 것이다. 1991년에 Frankel이 단백질 전달을 위한 매체로 Tat를 제시하였으나 1997년 Dowdy에 의해 실제적인 전달기술이 개발되어서야 그 가설이 입증되었다. 불침투성 시료의 세포막 통과를 위하여 전기 천공법(electroporation) 또는 리포솜을 이용한 transfection 방법 등이 이용되고 있지만, in vitro에서만 응용 가능하거나 세포에 예기치 못한 나쁜 영향을 주는 문제점이 있었다. 그러나 CPP는 단백질, 약물 그리고 나노입자를 세포에 나쁜 영향을 주지 않으면서 전달할 수 있다는 장점으로 인해 많은 관심의 대상이 되고 있다.

CPP의 세포 침투 방식은 펩타이드, 세포 그리고 전달매체의 종류에 따라

다르며 세포가 CPP를 받아들이는 메커니즘에 대해서는 아직도 논의가 활발히 진행 중이다. 그러나 최근 연구에 의하면 세포 표면에서 발생하는 이온 상호작용에 의한 엔도사이토시스(endocytosis)에 의해 세포가 CPP를 받아들인다는 것이 알려졌다. 전달매체에 적용하는 CPP가 갖는 장점은 세포에 대한 표적 지향성이 있고, 크기에 대한 제한이 적으며, 항원 또는 면역성에 대한 문제가 없고, 세포막에 대한 간섭이 적다는 것이다. 전달매체의 최종적인 세포 내 위치는 CPP, 전달매체, 그리고 CPP와 전달매체가 결합하는 방식에 의하여 결정된다. 특정한 세포소기관에 대한 표적 지향성을 부여하기 위하여 추가적인 개질을 할 수 있다.

칼슘은 세포 내부 또는 세포 간의 전달에 관련된 중요한 2차 전달물질 중의 하나이며, 생체의 다양한 작용을 조절하는데 필요한 신호 이온(signaling ion)이다. 자유 칼슘은 cytoplasm의 나노 몰부터 endoplasmic reticulum의 마이크로 몰까지 다양한 농도 범위에 걸쳐 존재한다. Endoplasmic reticulum에 존재하는 칼슘은 inositol-1,4,5-triphosphate의 조절을 받아 세포 칼슘의 대사와 세포 사이를 파동처럼 이동하는 칼슘의 신호전달을 가능하게 한다. 세포의 칼슘을 정량화하기 위하여 형광 염료를 이용한 많은 탐침들이 사용되고 있으며, 이러한 칼슘 감지용 염료에 대한 in vivo 그리고 in vitro에서의 많은 연구가 보고되었다. 그러나 자유 형광 염료를 사용하여 세포 내부의 칼슘을 모니터링 하는 데는 여러 가지 문제들이 있다. 첫째는 세포 내 칼슘 이외의 다른 이온 또는 염료에 대한 불특정 단백질 결합에 의해 염료의 형광 세기가 변화하는 것이다. 둘째는 형광 탐침을 세포 내부로 이식하기 위하여 acetoxymethyl(AM) ester를 형광 물질에 부착하는데 세포 내부로 이식된 형광 물질을 활성화시키기 위해서는 esterase 효소를 이용하여 형광 물질에 부착된 AM ester를 제거해야만 한다. 그러나 AM ester를 제거하는 과정에서 세포에 유독한 formaldehyde가 생성된다. 셋째는 세포로부터 염료가 배출되는 것을 방지하기 위하여 sulfapyrazone 등의 물질을 추가적으로

사용하여야 한다. 이러한 문제들 때문에 세포 내부의 칼슘을 장기적으로 모니터링하는 데는 문제가 있으며 in vitro에서 만들어진 보정곡선이 in vivo에서는 맞지 않는 문제도 있다.

이상에서 언급한 자유 염료를 사용하는 데서 오는 문제점은 형광 염료를 매트릭스 내부에 고정된 PEBBLE 센서를 사용함으로써 해결할 수 있다. 센서 매트릭스는 세포 단백질에 의한 불특정 결합과 같은 세포의 간섭으로부터 형광 염료를 보호해 주고, 센서 매트릭스를 이용하여 염료를 세포 내부에 이식하기 때문에 AM ester 등을 사용할 필요가 없으며, 염료가 직접 세포 환경에 노출되지 않으므로 염료 때문에 발생할 수 있는 유독성을 방지할 수 있다. 그리고 센서의 작은 크기는 세포 소기관에 의한 염료의 고립을 막아준다. 또한 PEBBLE 센서는 ratiometric 측정 방법을 가능하게 하는데, 본 연구에서는 칼슘 감지 염료로 fluo-4, 그리고 기준 염료로 alexa fluor 568을 사용하였다. Ratiometric 측정 방법은 온도변화, 초점변화에 의한 형광의 이동, 그리고 빛에 의한 형광의 변색 (photobleaching) 등에 의한 형광 신호의 왜곡 문제를 해결하여 준다. 그리고 PEBBLE을 만드는 과정에서 염료들을 센서 내부에 균일하게 분산시킬 수 있으므로 공간적인 해상도와 in vitro에서 ratiometric 측정에 의한 연속성을 가능하게 한다. 세포 내부의 측정을 위한 센서를 제작함에 있어서 가장 중요한 것은 센서의 크기인데, 센서가 너무 커서 세포에 대한 물리적인 손상을 줄 경우 세포는 파괴되기 때문이다. PEBBLE은 20~300 nm의 크기를 가지고 있기 때문에 세포나 세포막에 손상을 주지 않을 정도로 작다. 그리고 PEBBLE을 이용하면 매트릭스 내부에 여러 가지의 감응 소자를 동시에 포함시킨 복잡한 센서를 제작할 수 있다. 예를 들면 glucose oxidase와 산소 감지 형광물질을 하나의 PEBBLE안에 고정시키는 경우, 글루코스와 산소가 1:1로 반응하기 때문에 산소 감지 형광물질인 ruthenium의 형광 세기를 분석하여 글루코스의 함량을 정량화할 수도 있다.

PEBBEL 센서의 사용에 있어서 중요한 또 다른 부분은 세포막에 손상을 주지 않고 PEBBLE을 세포 내부로 이식하는 방법이다. PEBBEL을 세포 내부로 이식하는 대표적인 방법은 gene gun, 리포솜을 이용한 이식, 마이크로피펫, 그리고 phagocytosis를 이용한 이식 등이 있다. 그러나 본 연구에서는 PEBBLE의 이식 방법에 대한 범위를 넓히기 위해 간단한 배양을 이용한 DNA 전달 방식을 적용하였다. 즉 칼슘 감지 PEBBLE 센서의 매트릭스인 polyacrylamide 표면에 합성 CPP를 도입하였다. 여기서 사용한 CPP는 HIV Tat를 기초로 한 11개의 잔류기를 가진 합성 CPP이다. 본 연구결과 CPP가 도입된 PEBBEL 센서가 포유류 세포 내부로 이식되었고 세포에 아무런 나쁜 영향을 주지 않고 세포 내부의 칼슘을 성공적으로 측정할 수 있었다.