

줄기세포의 재프로그래밍부터 분화까지 transfection의 적용

서론

최근 몇 년 사이 줄기세포 분화와 재프로그래밍(reprogramming) 분야의 발전으로 균일한 세포를 이용한 테스트가 가능해지면서 신약 개발이 가속화되고 있다. 이러한 비약적인 발전 중 일부는 다양한 세포로 핵산을 도입하는데 바이러스를 이용하지 않는 transfection 방법을 사용하고 있기 때문이다. Mirus Bio에서는 이러한 분야에 적용되었던 고효율 핵산 도입 방법인 *TransIT* Transfection Reagents와 *Ingenio* Electroporation Kit를 공급하고 있다.

줄기세포 재프로그래밍을 위한 transfection

마우스와 인간 섬유아세포(human fibroblasts)와 같은 체세포의 재프로그래밍을 통해 iPS(induced pluripotent stem) 세포를 유도하는 방법은 다양한 조직 분화세포를 발생시킬 수 있는 균일하고 충분한 원재료 공급을 가능하게 하였다. 인간 iPS 세포를 사용하면 법적 분쟁이나 윤리적인 논쟁 없이 hESCs(human embryonic stem cells)를 대체할 수 있다.

또한 질병 모델이나 독성 실험과 같은 다양한 연구를 위해 특정한 유전적 환경에서 iPS 세포를 생성할 수 있다.

체세포를 iPS 세포로 재프로그래밍하기 위해서는 재조합바이러스, 소분자물질을 이용하거나, plasmid, protein, mRNA나 miRNA를 transfection하는 방법으로 핵심 transcription factor의 조합을 도입함으로써 이루어진다(그림 1). 이 transcription factor의 조합은 세포 종류에 따라 다양하다. 예를 들면, 마우스 세포의 재프로그래밍을 위해서는 Klf4, Sox2, c-Myc, Oct-3/4가 필요한 반면, 인간 체세포의 재프로그래밍²을 위해서는 SOX2, OCT4, NANOG, LIN28가 필요하다. 초기에는 이러한 재프로그래밍 요소를 레트로바이러스를 이용해 체세포로 도입하여 높은 형질도입 효율로 재프로그래밍의 재현성을 보였으나, 게놈으로 삽입되는 바이러스이기 때문에 종양을 유발하거나 면역반응을 유도할 수 있는 위험 부담이 있었다. 이와 같은 바이러스를 이용한 형질도입에서 나타나는 문제는 화학물질을 이용한 transfection이나 electroporation 방법으로 해결할 수 있다.

화학물질을 이용한 transfection은 DNA와 RNA를 효과적으로 도입할 수 있다. DNA 매개 재프로그래밍은 삽입 방법이나 비삽입 방법 모두 적용 가능하다. PiggyBac transposons^{3,4}이나 loxP sites⁵를 이용한 삽입 방법은 세포내 게놈으로 삽입되어야 한다. 그러나 생물학적 치료를 포함하여 주요 적용 분야에서는 후속 분화에 영향을 주거나 조직 기능을 변화시킬 수 있는 게놈 삽입 과정이 없는 iPS 세포주 제작을 원한다. 형질전환유전자 발현을 위한 비삽입 방법에는 transfection으로 도입하는 episome과 DNA minicircles이 있다. 바이러스를 이용하지 않는 발현 벡터의 형질전환은 게놈으로의 삽입 가능성을 줄인 반면, 재프로그래밍이 일어나기 위해서는 매우 높은 형질전환효율이 필요하다. Mirus의 *TransIT-X2* Dynamic Delivery system, *TransIT-2020*과 *TransIT-LT1*과 같은 고효율 저독성의 transfection 시약들이 DNA를 도입하는 대체 방법이 되고 있다. 고효율 DNA 도입을 위한 electroporation법에는 *Ingenio* Electroporation Solution을 이용할 수 있다. 새로운 줄기세포 재프로그래밍 접근법은 게놈 삽입에 대한 우려를 완벽하게 제거하였으며, 최근 몇 년 사이에는 iPS 세포 분화를 위해 변형된

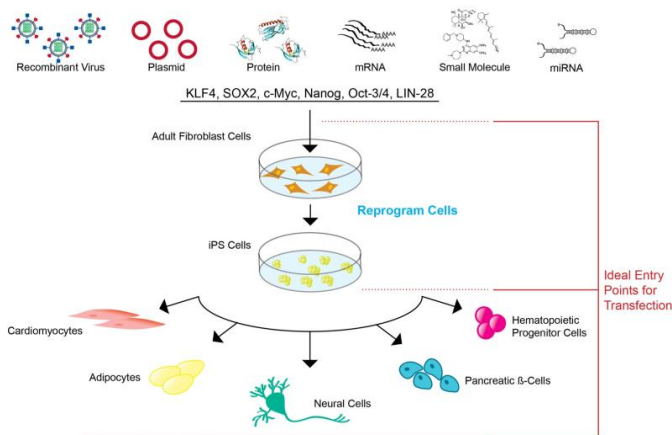


그림 1. Entry Points for Transfection. Adult fibroblast cells can be transfected or transduced via several methods (e.g. recombinant virus, plasmid, protein, mRNA, small molecule and miRNA) with a combination of transcription factors including KLF4, SOX2, c-MYC, NANOG, OCT-4 and LIN-28 to reprogram the cells to a pluripotent state. iPS cells can then be differentiated to a myriad of cell types through growth factor addition and/or transfection of selection markers driven by cell type specific promoters. Stem cell derived cell types such as cardiomyocytes, adipocytes, neural cells, pancreatic b-cells, and hematopoietic progenitor cells provide researchers with relevant models for their experiments.

염기를 가진 mRNA로 섬유아세포의 transfection까지 성공하였다.⁶ *In vitro* transcripts내에 pseudouridine과 5-methylcytosine과 같은 변형된 염기를 포함하는 것은 mRNA의 안정성을 증가시키고 동시에 형질 전환된 세포에서 면역반응은 감소하는 것으로 알려졌다.^{7,8} 이같은 변형된 mRNA의 반복적 도입은 계층 삽입 우려 없이 높은 재프로그래밍을 이끈다. 더구나 Mirus의 *TransIT*-mRNA Transfection Kit와 같은 저독성 RNA 형질도입 시약을 사용함으로써 반복적 transfection에 따른 세포독성이 경감되었다.^{9,10}

재프로그래밍에 일반적으로 사용되는 BJ와 MRC-5 fibroblast cell line의 transfection에 *TransIT* mRNA Transfection Kit을 사용하였다(그림 2). 이 실험에서 고효율로 형질전환되는지 확인하기 위해 pseudouridine과 5-methylcytosine으로 변형된 GFP 코딩 RNA transcripts를 transfection하였다. 추가로 propidium iodide 염색으로 transfection의 독성이 낮음을 확인하였다.

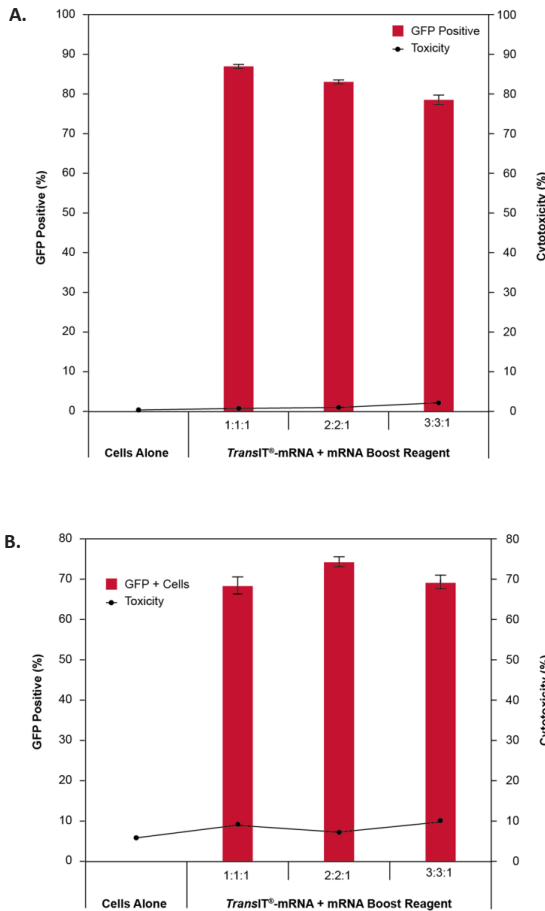


그림 2. Fibroblast Transfection with *TransIT*-mRNA. The *TransIT*-mRNA Transfection Kit was used to transfect BJ human neonatal foreskin fibroblasts (A) and MRC-5 human lung fibroblasts (B) with a pseudouridine and 5mC modified based GFP mRNA (Trilink Biotechnologies, Inc.). Transfections were performed in 12-well plates using 1-3 μ l of *TransIT*-mRNA Transfection Reagent and mRNA Boost Reagent to deliver 1 μ g of RNA (1:1:1, 2:2:1 and 3:3:1; reagent: boost: RNA ratio). Cells were assayed 18 hours post-transfection on a Guava HT easyCyte flow cytometer. Toxicity was measured using propidium iodide stain (black line).

iPS 세포 분화에 적용 가능한 transfection

재프로그래밍된 체세포에서 형성되는 iPS 세포는 다양한 조직에 적합한 세포로 분화된다. iPS 세포가 특정 세포로 분화될 때는 정해진 배양조건이 필요하며, 이 방법은 세포 종류에 특화된 프로모터에 의해 유도되는 선별마커를 transfection을 통해 도입함으로써 더 간소화하였다.

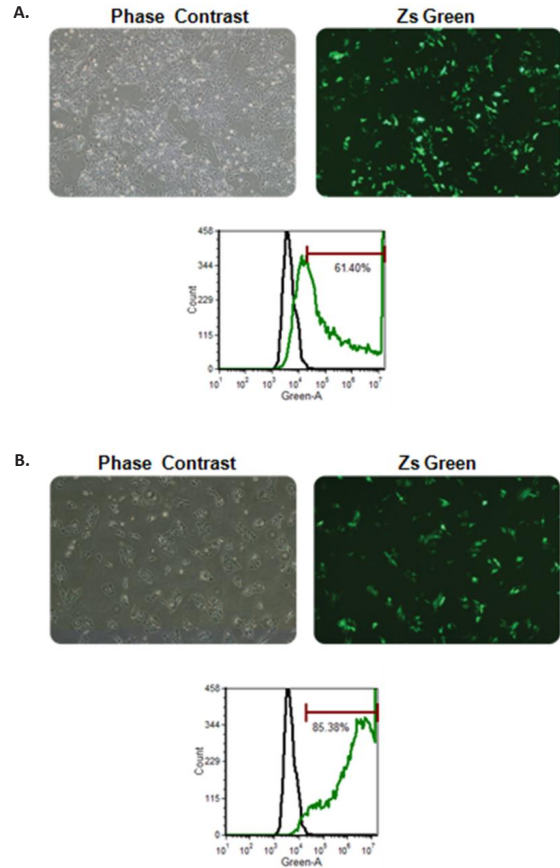


그림 3. High Efficiency Transfection and Electroporation of Human iPS Cells. The *TransIT*-2020 Transfection Reagent was used to transfect 0.5×10^6 iPS cells with a ZsGreen expression plasmid (Clontech) (A). Transfections were performed in 6-well plates using 7.5 μ l of *TransIT*-2020 Transfection Reagent to deliver 2.5 μ g of DNA (3:1; reagent: DNA). The Ingenio Electroporation Kit was used to transfect 2×10^6 iPS cells on the Amaxa Nucleofector II Device (B). Cells were electroporated with 8 μ g ZsGreen expressing plasmid (Clontech) in 100 μ l and plated in 6-well plates at 0.33×10^6 cells/well. Cells were visualized 24 hours post-transfection and imaged at 4X objective with an Olympus IX71 Inverted Microscope. Images were acquired using phase contrast and green fluorescence. Cells were assayed 24 hours post-transfection on an Accuri Cytometer. The histogram shows untransfected cells (black line) compared to cells transfected with plasmid (green line).

iPS 세포로의 고효율 transfection은 Cellular Dynamics International(CDI - www.cellulardynamics.com)의 연구자에 의해 ZsGreen expressing plasmid(Clontech)를 iPS 세포에 transfection 시킨 데이터를 통해 확인하였다(그림 3). 실험 결과는 *TransIT*-2020 Transfection Reagent 또는 Ingenio Electroporation Kit를 이용한 electroporation법으로 iPS 세포가 효과적으로 형질전환된 것을 보여준다. 이 방법들은 효과적인 핵산 도입 방법을 선택하고 결정하는데 도움을 준다.

iPS 세포로부터 유도된 세포주

iPS 세포로부터 유도된 세포주는 무한증식세포주immortalized cell line 보다 생물학적으로 더 적합하다. 이 세포들은 특정 질병모델 연구, 약물 작용이나 독성스크리닝 등에 primary cell보다 더 균일하게 작용한다. iPS 세포유도체를 이용하면 비싼 동물실험을 인도적인 방법으로 대체할 수 있다. 또한 최근 iPS 세포에서 유도된 cardiomyocytes와 신경세포는 신약 개발이나 독성 테스트 적용에 관심을 받고 있다.¹¹

iPS 유래 세포를 화합물의 선별이나 유전자 발현을 knockdown시켜 pathway 분석 실험에 이용하고자 할 때 리포터를 도입하기 위해 transfection 방법을 이용할 수 있다. 두 실험 모두 CDI의 iCell Cardiomyocytes로 검증되었다. 그림 4에서는 iPS 세포에서 유도된 cardiomyocytes에 cardiomodulator로 알려진 isoproterenol에 즉각 대응하는 luciferase 시스템을 *TransIT-LT1* Transfection Reagent로 transfection시킨 결과를 보여준다. 또한 *TransIT-TKO* Transfection Reagent는 iCell cardiomyocytes내 housekeeping 유전자인 GAPDH의 발현을 억제시키는데 사용되었다(그림 5).

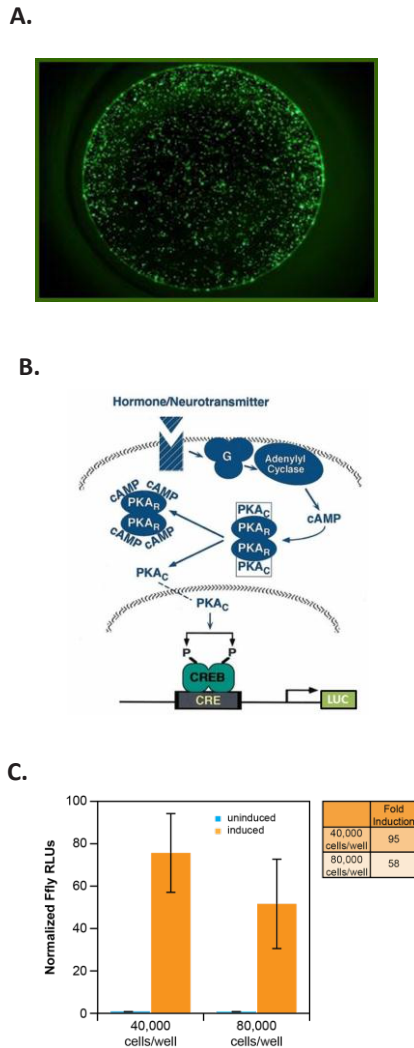


그림 4. Plasmid DNA Delivery to iCell Cardiomyocytes using *TransIT-LT1*. Panel A illustrates high efficiency transfection of a GFP encoding plasmid. iCell Cardiomyocytes were plated at 20,000 cells/well in a 96 well tissue culture plate coated with 0.1% gelatin.

After allowing the cells to recover from thaw, cells were transfected with 100 ng/well of pMAXGFP(Amaxa) using *TransIT-LT1* Transfection Reagent with a 2:1 (reagent:DNA) ratio according to the manufacturer's instructions. Fluorescent images were taken 3 days post transfection.

Panel B is a schematic of agonist binding inducing G protein (Gs) mediated activation of adenylyl cyclase which converts ATP to cAMP. The second messenger is able to bind to protein kinase A (PKA) and lead to phosphorylation of the cAMP response element-binding protein (CREB) protein. Upon translocation to the nucleus CREB is able to bind the cAMP response element (CRE) and initiate expression of the luciferase reporter.

Panel C illustrates cAMP induction measured via a luciferase reporter plasmid. iCell Cardiomyocytes were plated for 5 days and subsequently replated using 40,000 or 80,000 cells/well in a 96 well plate pre-coated with gelatin. Three days post-replating cells were transfected using *TransIT-LT1* and the CRE-luciferase reporter plasmid pGL4.29 (Promega). After 18 hours the cAMP pathway was induced using 10 mM isoproterenol for 6 hours. Luciferase activity was measured using the Promega Dual Glo Luciferase Assay. Data is normalized to the control reporter plasmid pGL4.75 (Promega).

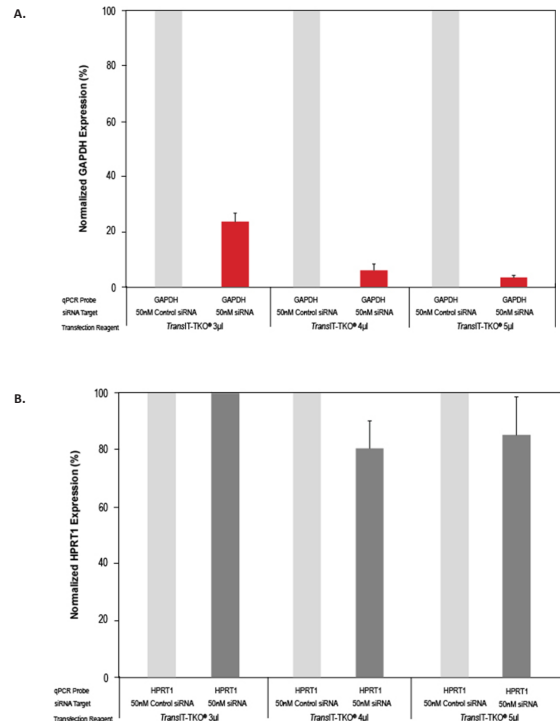


그림 5. Efficient siRNA-mediated Gene Silencing by *TransIT-TKO* in iCell Cardiomyocytes. Panels A and B show the effect of GAPDH-targeted siRNA on GAPDH (targeted) and HPRT1 (non-targeted) mRNA expression, respectively. iCell Cardiomyocytes were cultured for 7 days in a 12-well cell culture plate before transfection with either control (scrambled) or GAPDH siRNA (sense: GCUCAUUUCUGGUAUGACUU; antisense: GUCAUACCAGGAAAUGAGCUU) using *TransIT-TKO* (3 – 5 µl/well). 72 hours post-transfection the GAPDH and HPRT1 (non-targeted) mRNA levels were measured relative to 18s rRNA levels and normalized to the mRNA levels obtained following transfection of the control siRNA in each experiment. The bar graphs show the mean with standard error of the mean (SEM) of 3 independent transfection complexes

결론

줄기세포를 적용할수 있는 잠재적인 응용 분야는 지속적으로 증가하고 있으며, transgene의 삽입 없이 균일한 세포군을 생산할 수 있는 새로운 기술의 개발이 요구되고 있다.

화학물질을 이용하거나 electroporation으로 transfection하는 방법은

줄기세포나 iPS 세포 그리고 iPS 세포에서 유도된 세포를 유전적으로 조작하기 위한 강력한 방법으로 떠오르고 있다. Plasmid 도입은 비삽입된 세포주 선별이 어렵고, 변형된 mRNA transfection은 복수의 샘플로 반복적으로 진행해야 하기 때문에 시간이 많이 소요된다. 하지만 바이러스를 이용한 형질도입시 발생할 수 있는 심각한 장기적인 영향에 비해 매우 미미한 부분이다. 이러한 중요한 차이점 때문에 신약을 개발하고 세포 치료에 적용하는 분야에서 줄기세포 연구에 있어 transfection 방법이 선호되고 있다.


Reference

1. Takahashi and Yamanaka. *Cell* 126: 663-676 (2006)
2. Yu, J. *et al. Science* 318: 1917-1920 (2007)
3. Woltjen, K. *et al. Nature* 458: 766-770 (2009).
4. Yusa, K. *et al. Nature Methods* 6: 363-369 (2009)
5. Kaji, K. *et al. Nature* 458: 771-774 (2009)
6. Warren, L. *et al. Cell Stem Cell* 7: 618-630 (2010)
7. Kariko K. *et al. Immunity* 23: 165-175 (2005)
8. Kariko K. *et al. Mol Ther.* 15: 1833-184 (2008)
9. Angel and Yanik. *PLoS one* 5: e11756 (2010)
10. Kariko, K. *et al. Nucl. Acids Res.* 39: e142 (2011)
11. Ebert and Svendsen. *Nature Reviews Drug Discovery* 9: 367-372 (2010)

관련제품

Code	제품명	용량
MIR 6000	TransIT-X2 Dynamic Delivery System	1.5 ml
MIR 2300	TransIT-LT1 Transfection Reagent	1 ml
MIR 5400	TransIT-2020 Transfection Reagent	1 ml
MIR 2150	TransIT-TKO Transfection Reagent	1.5 ml
MIR 2250	TransIT-mRNA Transfection Kit	1.0 ml
MIR 50111	Ingenio Electroporation Solution	25 회용

License Notice [www.mirusbio.com 참조]


The Transfection Experts

Transfection의 혁신

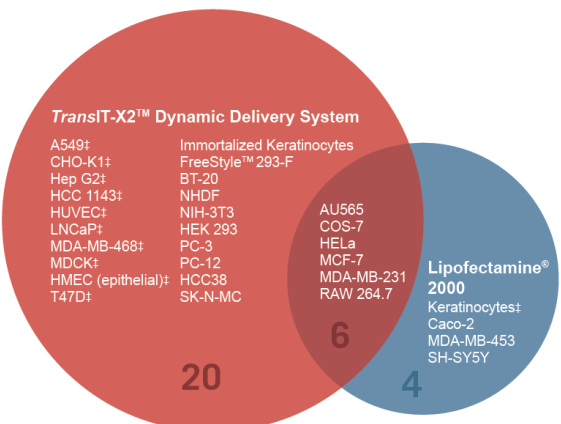
TransIT-X2™ Dynamic Delivery System

Versatility – Plasmid DNA와 siRNA에 적용 가능

Efficiency – 광범위한 세포에 고효율로 도입 가능

Technology – Polymeric Delivery 방식으로 낮은 세포 독성

Code	제품명	용량
MIR 6003		0.3 ml
MIR 6004		0.75 ml
MIR 6000	TransIT-X2 Dynamic Delivery System	1.5 ml
MIR 6005		1.5 ml×5
MIR 6006		1.5 ml×10



TransIT-X2™ Dynamic Delivery System

- A549†
- CHO-K1†
- Hep G2†
- HCC 1143†
- HUVEC†
- LNCaP†
- MDA-MB-468†
- MDCK†
- HMEC (epithelial)†
- T47D†
- Immortalized Keratinocytes
- FreeStyle™ 293-F
- BT-20
- NHDF
- NIH-3T3
- HEK 293
- PC-3
- PC-12
- HCC38
- SK-N-MC

Lipofectamine® 2000

- Keratinocytest
- Caco-2
- MDA-MB-453
- SH-SY5Y

6 (Overlap)

그림 1. TransIT-X2™ Dynamic Delivery System

Enables superior gene expression in a variety of cell types. The TransIT-X2™ Dynamic Delivery System and Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent were used to transfect plasmid DNA encoding luciferase into 30 different cell types at three reagent-to-DNA ratios. Luciferase expression was compared at 24 hours post-transfection using a standard luciferase assay. Head-to-head comparisons illustrate superior or equal luciferase expression using TransIT-X2 in 26 of 30 cell types; 11 cell types had expression levels 2-fold higher than Lipofectamine 2000 (denoted with †).

† Cell types with >2-fold luciferase expression in head-to-head comparisons.