

Technical Report

A Novel System Enabling High Efficiency Low Toxicity Transfection of Cells in 3D Culture

Anthony Lauer¹, Dan Maltman², Gyorgyi Talas², Stefan Przyborski², Scott Hayes¹ and Laura Juckem¹

¹ Mirus Bio, Madison, WI, USA, ² Reinnervate Ltd, Sedgfield Co Durham, UK

초록

3차원(3D)의 세포배양은 생물학 분야의 새로운 트렌드로 일반적으로 이용되고 있는 2차원 세포배양보다 생체 조직내 기작이나 생화학적 신호를 더 유사하게 모방한 다세포 기관을 형성한다. 그러나 2차원 세포 배양에 이용되는 유용한 기술인 트랜스펙션은 3차원 세포배양에 확대 적용하기 위해서는 좀더 발전이 되어야 한다.

본 연구에서는 3D 매트릭스에 배양하기 전 부유 세포에 트랜스펙션 해야 하는 기존의 3D 트랜스펙션 프로토콜과 달리, 지지체 scaffold내의 세포에 효과적으로 트랜스펙션할 수 있는 시스템을 구축했다. 3D 배양에서 다양한 트랜스펙션 시약에 대해 luciferase나 GFP 그리고 세포 독성 여부 등에 대해 실험하였다. 세포가 3D 배양에 잘 적응하고 최적의 트랜스펙션 효율을 얻기 위해 세포 밀도나 세포 seeding 후 적응 시간 등의 중요한 변수들을 미세하게 조정했다. 트랜스펙션 효율은 DNA 투여량이나 reagent 대 DNA의 비율 등의 조절을 통해 더 향상시킬 수 있다. 세포성장 조건과 트랜스펙션 변수의 최적화는 3D 세포배양에 특화된 높은 효율과 낮은 세포독성의 transfection system의 개발을 이끌었다.

결론적으로 transfection system을 alvetex polystyrene scaffold로 구성된 3차원 배양 plate와 3차원 배양 세포에 효과적으로 트랜스펙션 할 수 있는 트랜스펙션 시약으로 구성되어 있음을 보여준다.

3D cell culture의 장점

3D 배양은 실험실에서 최적의 성장, 분화, 기능을 할 수 있는 최적의 세포 성장 환경을 제공하는 것을 목표로 한다. Alvetex plate에서 3D 배양된 세포는 2D plate에서 배양된 것 보다 분화나 구조가 향상되어 인접세포와 더 긴밀한 상호작용을 하고 3차원적 형태를 더 잘 유지하는 것으로 나타났다.

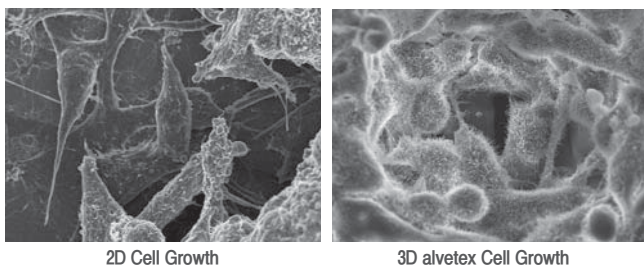


그림 1. Scanning electron microscopy images of HepG2 cells grown in 2D culture versus alvetex scaffold. Cells in alvetex grow more homogeneously and develop a 3D form characteristic of liver tissues in the body. Bokhari *et al.* *J Anat.* 2007, 211(4), 567-576

기존의 2D 배양과 비교했을 때 3D로 배양되는 세포가 기능적으로 향상되는 것을 볼 수 있으며 3D 기술에 대한 요구가 늘어남에 따라 3D 매트릭스에 적용할 수 있는 특화된 트랜스펙션과 같은 세포 관련 실험이나 분자생물학적 기술의 개발이 요구되고 있다. *in vivo* 조직 환경을 더 정확하게 모방한 *in vivo* 시스템에 대한 수요가 증가하고 있다.

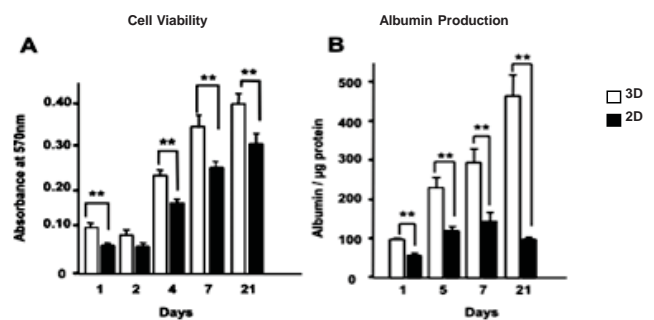


그림 2. Cell viability was determined using a MTT assay and showed greater numbers of viable HepG2 hepatocyte cells in alvetex than on 2D substrate. Secretion of albumin from 3D HepG2 cells was elevated compared to 2D culture. Data has been normalized to total protein to take into account differences in cell numbers.

3D 세포 배양 기술

Reinnervate사의 alvetex는 다공성의 scaffold 구조로 되어 있어 세포가 3차원적으로 성장 분화할 수 있는 이상적인 환경을 제공함으로써 일관되고 재현성 있는 3차원 세포 성장을 가능하게 한다. 또한 alvetex는 2D 배양에 사용되는 비활성 폴리에틸렌 재질의 플라스틱을 이용하기 때문에 2D배양에서 3D배양으로 쉽게 전환할 수 있으며 동일한 배양배지나 시약을 사용할 수 있다. 전형적인 *in vivo* 환경을 모방하여 설계된 alvetex는 두께가 200 µm 이기 때문에 질소나 가스로부터 100 µm 이상 떨어진 세포는 없다. 이것은 세포가 일반적으로 모세혈관으로부터 150-200 µm 이상 떨어지지 않는 생체 환경과 거의 유사하다. 또한 alvetex는 비활성의 매우 안정적인 구조를 제공하기 때문에 장기간 세포 배양이 나타날 수 있는 실험적인 변동의 가능성을 제거함으로써 장기간 연구에 더 적합하다.

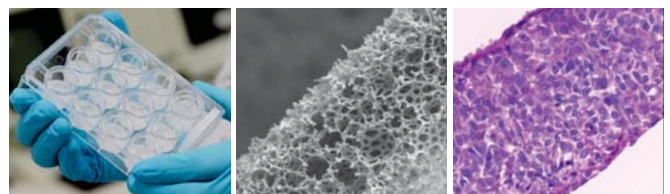


그림 3. Alvetex Scaffold for 3D Cell Culture. (A) Presentation of alvetex in a 12-well plate format. (B) Alvetex is a highly porous cross-linked polystyrene scaffold, which has been sectioned into 200 µm thick membranes. (C) Cross section of HaCaT cells grown for 3 days in submerged media conditions and 14 days at the air interface.

배양 및 형질전환 실험 개요

12 well alvetex 3D plate에 세포를 seeding한 다음 3D scaffold에 세포가 적응하는 기간을 준다. 트랜스펙션은 플라스미드 DNA와 트랜스펙션 시약을 Opti-MEM에 섞어준 다음, 15~30분간 반응을 한 후 세포가 배양되고 있는 scaffold로 첨가한다. 트랜스펙션 24시간 후에 세포를 취합하여 실험을 진행한다.

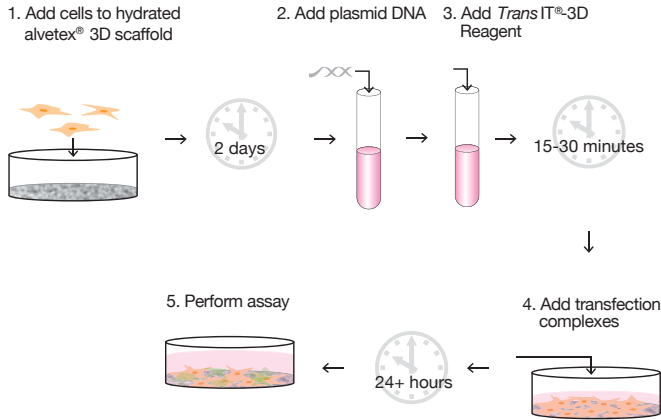


그림 4. 3D Transient Transfection Protocol. Using the 3D Transfection System, cells are quickly adapted to 3D culture in alvetex 12-well plates. Post-adaptation, the cells are transfected with high efficiency and minimal optimization using the TransIT-3D Transfection Reagent.

형질전환 조건 최적화

A. 새로운 트랜스펙션 시약 테스트

HepG2 세포에 4종류의 후보 트랜스펙션 시약으로 스크리닝을 실시하였다. 트랜스펙션 전 alvetex plate에 seeding한지 48시간 후 최적의 세포 밀도를 얻었다. Firefly luciferase 유전자를 발현하는 플라스미드와 트랜스펙션 시약을 지시된 비율에 따라 섞은 후 세포로 트랜스펙션하였다. Luciferase의 활성은 트랜스펙션 24시간 후에 측정하였다. 테스트한 시약 중 #2(TransIT-3D)가 가장 높은 유전자 발현과 시약 첨가 비율에 따른 차이가 가장 적었다.

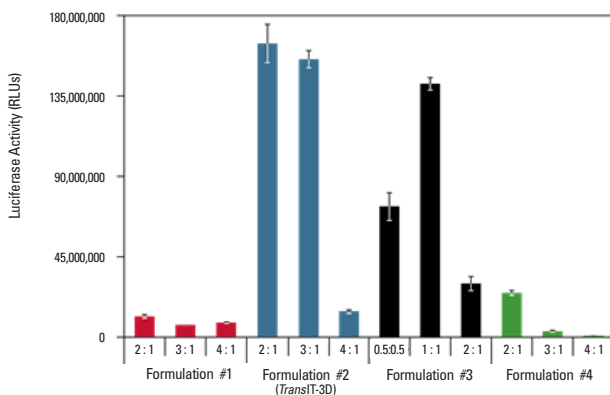


그림 5. Four potential transfection reagent formulations were screened in HepG2 cells.

B. 세포 seeding 할 때의 세포 밀도

HepG2, CHO-K1, NIH3T3 cell의 지정된 양(밀도)을 12 well alvetex 3D plate에 seeding한 후 48시간 동안 3D 배양했다. 48시간 배양 후 TransIT-3D와 firefly luciferase를 발현하는 플라스미드를 3:1로 섞은 후 세포로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 24시간 후에 luciferase의 활성을 측정했다. seeding 밀도가 유전자 발현에 영향을 끼치는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 세포마다 실험을 통해 최적화된 세포 밀도를 결정하는 것이 필요하다.

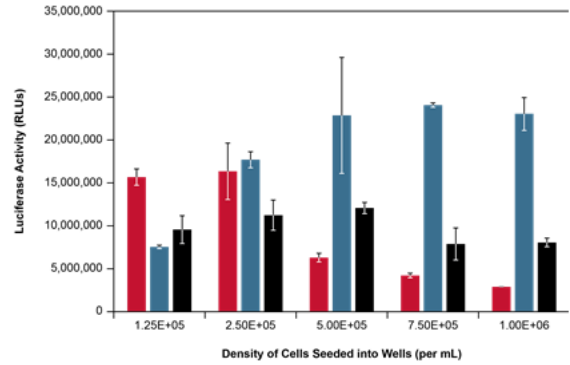


그림 6. Seed density affects expression levels and optimal density must be determined empirically for each cell line.

C. Seeding 후 적응 시간

NIH3T3 fibroblast cell을 alvetex 3D plate에 최적화된 세포 밀도로 seeding한 후 표기된 시간 동안 3D 배양에 적응시켰다. 적응 후 세포에 녹색 형광단백질을 발현하는 플라스미드를 TransIT-3D 시약으로 트랜스펙션시켰다. nuclear stain Hoechst 33342 (blue)로 세포를 염색하고 confocal microscopy으로 시각화하였다. 최적의 seeding 후 적응 기간은 48시간이었다.

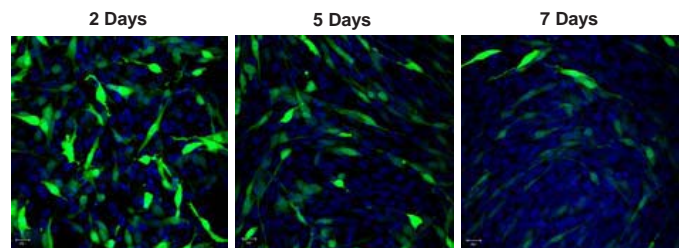


그림 7. NIH3T3 fibroblast cells were seeded at optimized cell density in alvetex 3D plates and adapted to 3D growth for the indicated time points.

3D 세포배양시 고발현이 가능한 트랜스펙션

5종류의 세포 각각의 최적화된 세포 밀도로 12well alvetex 3D plate에 seeding한 후 48 시간 동안 3D 배양에 적응시켰다. 적응 후 TransIT-3D를 이용해 firefly luciferase를 발현하는 플라스미드를 세포로 트랜스펙션시켰다. 트랜스펙션 후 24시간 뒤에 luciferase의 활성을 측정하였다. 세포에 따라 발현 수준은 다양하게 나타났으나 모두 성공적으로 트랜스펙션된 것을 확인할 수 있었다.

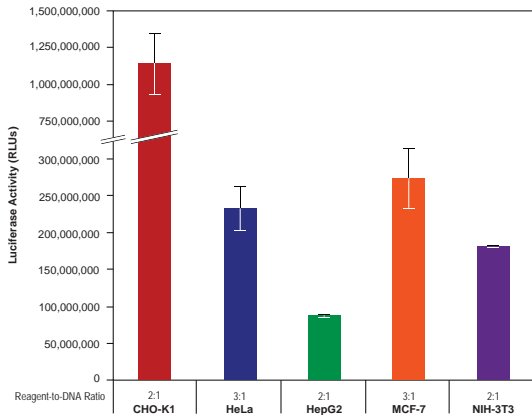


그림 8. 3D Transfection of Multiple Cell Types. In collaboration with Reinnervate, methods have been developed that enable the transfection of cells grown in 3D culture. Common cell types (HeLa, HepG2, MCF-7, NIH-3T3 and CHO-K1) were seeded at optimized cell densities in 12-well alvetex 3D plates and adapted to 3D culture conditions for 48 hours. After adaptation, cells were transfected with TransIT-3D Transfection Reagent combined with a plasmid encoding firefly luciferase at the reagent-to-DNA ratios indicated beneath the bars. Luciferase activity was measured 24 hours posttransfection using a conventional assay. High expression was detected in all cell types demonstrating the efficiency of TransIT-3D Transfection Reagent when used with alvetex 3D culture plates.

3D 세포배양시 고효율의 트랜스펙션 가능

A. Confocal microscopy를 통해 GFP 발현 검출

HepG2 세포를 alvetex 3D plate에 최적화된 세포 밀도로 seeding한 후 48시간 동안 배양했다. 48시간 배양 후 TransIT-3D를 이용해 녹색 형광단백질을 발현하는 플라스미드를 트랜스펙션했다. 세포는 nuclear stain Hoechst 33342 (blue)로 염색하고 confocal microscopy로 관찰했다. Scaffold내에서 트랜스펙션된 세포를 통해 TransIT-3D가 3D 매트릭스를 통과할 수 있음을 보여준다.

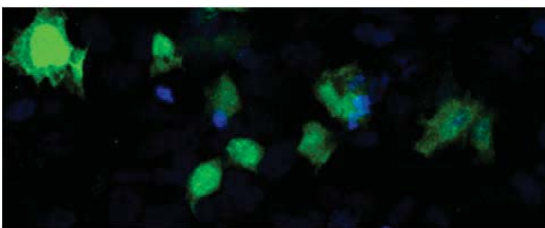


그림 9. TransIT-3D successfully transfects fibroblasts grown using 3D alvetex scaffold technology. Fibroblasts were transfected using TransIT-3D Transfection Reagent and a GFP expressing plasmid (3:1 reagent-to-DNA ratio). Cells were seeded at 48 hours prior to transfection, and the cultures were fixed 24 hours post-transfection. Cells were imaged using a confocal microscope (Zeiss LSM510). The data shows a 40 micron integrated stack of multiple images as viewed from above the intact 3D culture. The position of all the cell nuclei are visualized with Hoechst 33342 (blue), and the positively transfected cells express GFP (green).

B. Flow cytometry로 트랜스펙션 효율 측정

Alvetex 3D plate에 최적화된 세포 밀도로 seeding한 후 48시간 동안 배양한 후 TransIT-3D에 GFP 발현 플라스미드의 비율을 2:1, 3:1, 4:1로 트랜스펙션시켰다.

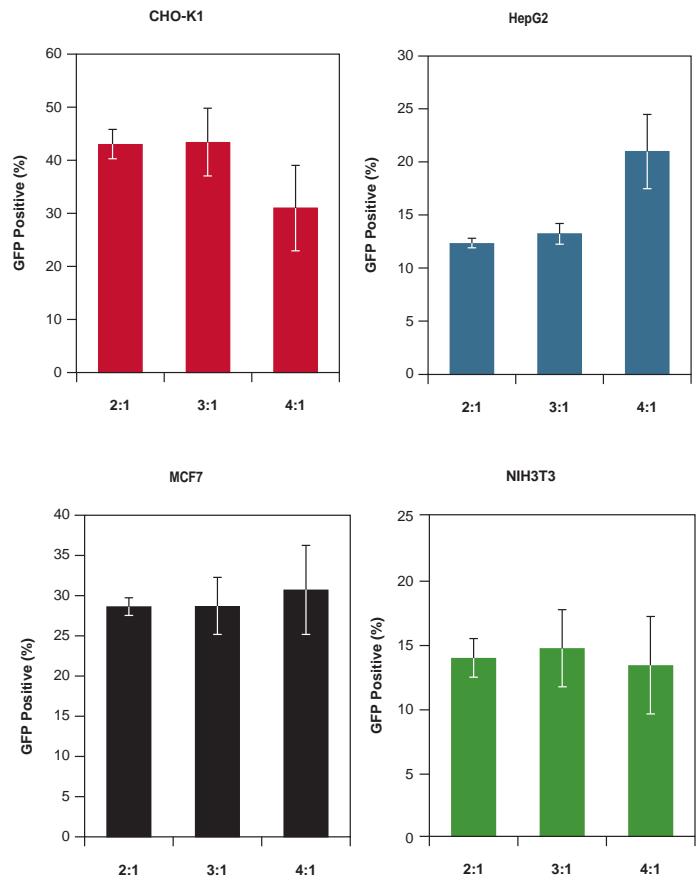


그림 10. Transfection efficiency measured by flow cytometry. Cells were seeded at optimized cell densities in 12-well alvetex 3D plates and adapted to 3D culture conditions for 48 hours. After adaptation, cells were transfected with TransIT-3D combined with a plasmid encoding Green Fluorescent Protein at the reagent-to-DNA ratios indicated. Efficiency of delivery was measured 24 hours later (CHO-K1 and NIH3T3) or 48 hours later (MCF7 and HepG2) using a BD LSRII flow cytometer.

결론

- 3D 조건으로 배양한 다양한 포유류 세포에 적용할 수 있는 새로운 트랜스펙션 시약을 개발하였다.
- TransIT-3D는 3D 배양 세포에서 높은 트랜스펙션 효율과 높은 단백질 발현을 얻을 수 있었다.
- Alvetex scaffold에서 배양된 세포가 2D plate에서 자란 세포보다 더 생체 환경과 유사하게 배양되었다.
- 효과적인 트랜스펙션을 위해 시약과 DNA의 최적화 과정을 최소화하였다.