

## 레트로바이러스의 감염효율 향상을 위한 고분자 양이온의 역할

<sup>1,2</sup>강 승 현 · <sup>1,2</sup>김 승 철 · <sup>1,2</sup>이 선 구 · <sup>1,2</sup>†김 병 기

<sup>1</sup>서울대학교 유전공학연구소 및 <sup>2</sup>서울대학교 공과대학 응용화학부  
(접수 : 1999. 3. 15., 게재승인 : 1999. 7. 22.)

### Role of Polycation for Enhancing Infectivity of Retrovirus

Seung-Hyun Kang<sup>1,2</sup>, Seung-Chul Kim<sup>1,2</sup>, Sun-Gu Lee<sup>1,2</sup>, and Byung-Gee Kim<sup>1,2</sup>†

<sup>1</sup>Institute of Molecular Biology & Genetics and

<sup>2</sup>School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

(Received : 1999. 3. 15., Accepted : 1999. 7. 22.)

To verify enhancing effect of polycation on the retroviral infectivity, we directly measured the binding affinity of retroviruses to the target cells in the presence or in the absence of polybrene with R18 fluorescence assay and examined the effect of the polymers on the relationship between the host cell and the retroviral infectivity. There was no difference in the effect of the types of charge of the polymers on the binding affinity. However, polycations, in general, show effect on the retrovirus infectivity. This results suggest that the enhancing effect of polybrene and other polycations on the infectivity is not due to the binding step but due to the post-binding steps, especially the internalization step. With the result of the internalization of FITC-labeled poly-L-lysine into the host cells, it is suggested that the uptake of polycations into the host cells would play a crucial role in the internalization of retroviruses.

Key Words : Retrovirus, polycation, binding affinity, infectivity

### 서 론

유전자 요법이란 새로운 유전자를 환자의 세포 내에 주입시켜 유전자 결함을 교정시키거나 결핍된 기능을 추가시킴으로써 인체세포의 유전적 변형을 통하여 암, 감염성 질병, 유전적 질병을 치료하는 기법을 말한다.

이와 같은 유전자 치료법에서 가장 중요한 것이 유전자를 전달하는 수단이다. 유전자를 전달하는 운반체로는 리포솜(liposome), electroporation, receptor-mediated DNA transfer 등의 비바이러스 벡터와 retrovirus, adenovirus 등의 바이러스 벡터로 나눌 수 있다(1). 비바이러스 벡터의 경우 그의 안정성 때문에 빠른 속도로 개발이 진행되고는 있으나 감염율이 낮아, 현재 임상에서 시도되고 있는 유전자치료의 95%가 바이러스 운반체를 사용하고 있으며, 그 중 약 85%가 레트로바이러스를 사용하고 있다(2).

레트로바이러스의 감염은 일련의 과정들의 복합적인 완성으로 이루어진다. 배지 내에 존재하는 레트로바이러스 입자의 확산(diffusion)과 표적세포에 존재하는 수용체(receptor)와의 결합(binding)으로 감염과정이 시작되는데, 이러한 전체 결합과정

(binding process)은 느리고 효율이 낮다. 최근의 연구결과에 의하면 결합과정의 속도와 효율을 높임으로써 레트로바이러스의 감염효율(transduction efficiency)을 상당히 향상시킬 수 있음이 알려져 있다(3-7).

이러한 결합과정이 끝나면 레트로바이러스 입자는 세포막과의 융합(fusion)에 의해 세포 내로 들어가게 된다. 이러한 과정을 internalization이라 한다. Internalization 과정후 cytoplasm에 존재하는 레트로바이러스 입자는 여러 가지 lysozyme들에 의해 capsid protein이 분해되어 RNA와 역전사효소(reverse transcriptase), integrase 등이 cytoplasm에 노출된다. 이러한 과정을 uncoating이라 한다. 레트로바이러스의 RNA는 역전사효소에 의해 DNA로 복제되며, 이렇게 복제된 DNA는 세포핵으로 이동하여 integrase에 의해 표적세포의 DNA에 삽입(integration)된다. 지금까지의 일련의 과정들 즉, 확산(diffusion), 결합(binding), internalization, uncoating, integration 등을 레트로바이러스 감염의 초기과정(early steps)이라 할 수 있다.

레트로바이러스의 binding process는 envelope protein과 cellular receptor사이의 상호작용에 강하게 영향을 받지만, 온도, pH, 배지조성, 바이러스입자와 세포의 표면 전하농도 등의 많은 요소들에 의해 영향을 받는다. 그 중에서 고분자양이온(polycation)은 일반적으로 레트로바이러스의 감염과정 동안 배지 내에 첨가하여 transduction efficiency를 높여주게 된다. 지금까지 알려진 고분자 양이온의 주 영향은 바이러스의 표면과

† Corresponding Author : Institute of Molecular Biology & Genetics, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
Tel : 02-880-6774, Fax : 02-874-1206  
e-mail : byungkim@plaza.snu.ac.kr

세포의 표면이 모두 음전하를 띠고 있기 때문에 반발력이 작용하며, 이러한 정전기적 반발력을 고분자양이온이 감소시켜주어 binding efficiency를 높여주기 때문에 감염효율이 높아진다고 알려져 있지만 이 역시 가설일 뿐 정확한 원인과 polycation의 작용기작에 대해서는 알려져 있지 않다(8-10).

본 연구에서는 이와 같은 고분자양이온의 작용기작을 규명하기 위하여 X-gal staining assay와 R18(octadecylrhodamine B chloride) fluorescence assay를 사용하여 레트로바이러스의 감염효율(infectivity)과 binding affinity를 직·간접적으로 측정하였으며, FITC-labeled poly-L-lysine의 세포 내로의 유입을 형광현미경으로 관찰하였다. 이러한 실험을 통하여 본 논문에서는 고분자 양이온의 어떤 성질이 레트로바이러스의 감염성에 영향을 미치는가에 대한 연구를 수행하였으며 고분자양이온의 분자량, 즉 분자의 크기(molecular size)가 중요한 역할을 할 수 있음을 제시할 수 있었다.

### 재료 및 방법

#### 시 약

polybrene(PB), DEAE-dextran(DEAE), poly-L-lysine(PL1; MW 1000, PL2;MW 15,000-30,000, PL3;MW 70,000-150,000, PL4;MW >300,000), FITC-labeled poly-L-lysine(FITC-PL; MW 30,000~70,000), dextran sulfate(DS;MW 500,000), alginic acid(Alg), glycogen(Gly) 등은 미국 Sigma사에서 구입하였고, octadecylrhodamine B chloride(R18)은 Molecular Probes(Oregon, USA)사에서 구입하였다.

#### 세포배양 및 배양조건

레트로바이러스 생산세포로는 ΨCRIP/MFG-lacZ를 사용하였으며, 레트로바이러스의 정량을 위한 감염세포로는 NIH3T3를 사용하였다. 이들 세포들은 10%(v/v)의 calf serum이 포함된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지를 사용하여 습도가 조절되는 37°C CO<sub>2</sub> 배양기에서 약 3일 동안 배양한 후 계대를 하였다.

#### 레트로바이러스의 생산과 정량

ΨCRIP/MFG-lacZ를 10 cm dish에서 confluence 상태까지 배양한 후, 배지를 걷어내고 새로운 배지를 약 10 mL 넣은 후 24~72 hr 후에 수확하여 사용하였다. 레트로바이러스를 정량하기 위해서는 다음과 같은 방법을 사용하였다. 첫째날, NIH3T3 세포를 24 well plate에 2.4\*10<sup>4</sup> 만큼 접종한다. 둘째날, 배지를 제거한 후 원하는 만큼의 바이러스가 희석된 새 배지 0.5 mL을 새로 넣어준다. 이 때, 배지에는 polybrene을 8 µg/mL 되도록 섞어준다. 셋째날, 바이러스 감염 후 24시간이 지나면 배지를 제거하고 새 배지 0.5 mL을 넣어준다. 넷째날, 세포를 고정시키고 X-gal 용액으로 염색한다. 다섯째날, X-gal 용액을 제거하고 PBS용액을 넣은 후 현미경으로 염색된 세포수를 센다. 희석률을 고려하여 바이러스 titer (colony forming unit/mL)를 결정한다.

#### X-gal staining 분석

Polybrene의 binding에 대한 영향을 알아보는 실험은 다음과

같은 과정으로 수행하였다. NIH3T3 세포가 confluence한 상태로 있는 24 well dish에 고분자 양이온인 polybrene이 포함된 배지와 포함되지 않은 배지에 레트로바이러스를 넣고 얼음 위 4°C 이하에서 15-30 분간 binding을 시킨다. 이러한 온도에서는 세포막의 permeability가 떨어지기 때문에 binding 만 일어날 뿐 internalization은 되지 않는다고 알려져 있다(11). Binding 후 PBS 용액으로 2~3 번 세척을 해준 다음, polybrene이 포함되어 있지 않은 배지를 동일하게 넣어준다. 이러한 과정이 끝난 후 하루정도 배양한 다음 X-gal staining을 통해 binding affinity를 결정한다.

Polybrene의 internalization에 대한 영향을 알아보는 실험은 앞의 경우와 동일한 과정을 거치나, binding동안에는 polybrene이 포함되어있지 않은 배지를 넣어주고 binding된 바이러스를 internalization시키는 과정에서 각각 polybrene이 포함된 배지와 포함되어있지 않은 배지로 교환해준다. 이러한 과정이 끝난 다음 37 °C에서 하루정도 배양한 다음 X-gal staining을 통해 internalization efficiency를 결정한다.

#### R18 형광 분석

Figure 1에서 보듯이 바이러스의 지질 이중막에 R18 분자를 붙여 형광강도(fluorescence intensity)로 binding된 바이러스를 정량하는 분석방법이다. 바이러스 상등액 35 mL을 여과하여 cell debris를 제거한 다음 4°C에서 12시간동안 9,600 rpm으로 원심분리한다. 바이러스 침전물(1.6 µg viral protein/mL)을 1 mL PBS용액으로 녹인 후, 0.1 mg/mL R18 ethanoic stock solution 15 µL 를 넣어준다. 이 용액을 1 시간동안 어두운곳에서 방치한다. 이 과정이 끝난 후, free R18 과 virus bound R18을 분리하기 위하여 1.5 mL PBS에 희석시킨 다음 Eppendorf 원심분리기에서 30분간 원심분리한다. R18-labeled virus(R18/M-MuLV) 를 0.5 mL DMEM으로 녹인 다음, 4 °C에서 30분간 NIH3T3에 흡착시킨다. 흡착 시킨 후, binding되지 않은 바이러스는 PBS용액으로 세척하여 제거한다. 세포를 trypsinization한 다음 PBS용액과 0.5 mL Triton X-100(0.5% stock solution) 용액을 혼합하여 3 mL로 희석한 다음, 560 nm excitation, 590 nm emission에서 형광강도를 측정하여 binding affinity를 결정한다.

R18-labeled virus와 세포분산액을 0.5 % Triton X-100으로 용해하여 얻은 값을 100 % 로 놓는다. 배경형광(background fluorescence)은 target cell을 0.5 % Triton X-100으로 용해하여 얻은 값으로 한다. 전체 넣어준 바이러스와 목적세포와 결합된 바이러스의 비를 binding affinity라 정의한다.

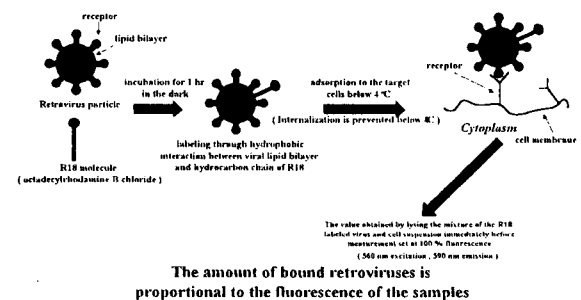


Figure 1. Schematic diagram of R18 fluorescence assay.

**Poly-L-lysine 의 세포내 유입**

0.5 mg/mL PL2 용액 300  $\mu$ L로 표면을 코팅한 커버글래스 위에 NIH3T3를 접종한다. FITC-PL을 PBS 용액에 5 mg/mL의 농도로 녹인다. 이러한 용액 25  $\mu$ L를 1mL의 배지에 넣은 뒤, NIH3T3와 함께 30분간 37  $^{\circ}$ C에서 방치하였다. 그런 다음, PBS용액으로 여러 번 세척하여 supernatant에 존재하는 FITC-PL을 제거한다. NIH3T3를 0.5 % glutaraldehyde 용액으로 고정시킨 후, 형광현미경으로 poly-L-lysine의 세포내 유입 여부를 관찰하였다(Figure 5).

**결 과**

**레트로바이러스의 binding과 internalization에 미치는 polybrene의 영향**

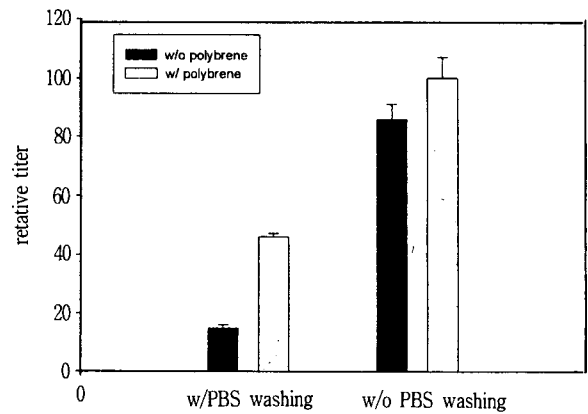
일반적으로 고분자양이온은 레트로바이러스 표면의 음전하와 목적세포 표면의 음전하사이의 정전기적 반발력을 상쇄시켜주기 때문에 레트로바이러스의 감염성을 향상시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 정확한 기작에 대해서는 알려져 있지 않으며, 감염 과정의 초기단계에 큰 영향을 미치고, 특히 binding 과정에 많은 영향을 미칠 것이라고 가정하고 있다(8-12).

레트로바이러스의 감염효율을 높여주는 것으로 알려진 고분자 양이온의 하나인 polybrene이 레트로바이러스의 NIH3T3 세포와의 binding에 미치는 영향과 binding후의 과정인 internalization에 미치는 영향을 X-gal staining 방법을 이용하여 알아보았다. Polybrene이 binding에 미치는 영향의 결과는 Figure 2(A)에서 볼 수 있다. 모든 binding 실험은, binding되지 않은 바이러스는 제거하기 위해 PBS로 2~3번 세척하였으며 수용체 외 부분의 흡착이 바이러스의 envelope protein과 수용체의 binding반응에 선행조건일 수 있으므로 PBS로 세척하지 않은 경우의 결과를 함께 비교하였다. PBS로 세척한 경우, 약 3배 정도의 차이를 보이고 있으며, PBS로 세척하지 않은 경우 큰 영향이 없음을 알 수 있다. 이러한 차이로 보아 polybrene의 첨가로 인해 레트로바이러스의 binding에 대한 polybrene의 영향이 없는 것은 아니나 감염성에 있어서 수십 배에서 수백 배의 향상효과가 있는 것과 비교해보면 큰 영향은 미치지 않는다고 할 수 있다. 다음으로 레트로바이러스의 internalization 단계에 대한 polybrene의 영향을 다시한번 검증해 본 결과 8  $\mu$ g/mL의 polybrene 농도를 사용했을 경우 30배 정도의 감염성 향상효과가 있음을 확인할 수 있었다(data not shown).

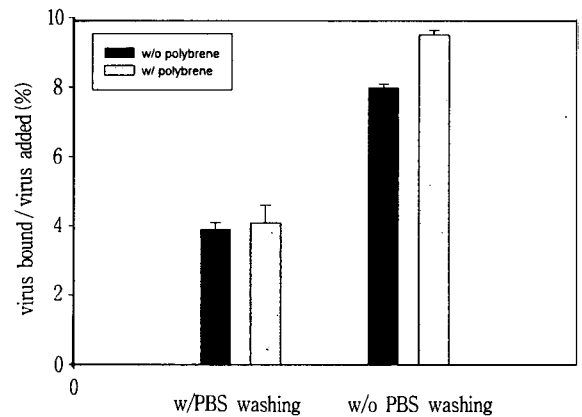
이상의 결과를 종합해보면, 지금까지 알려진 바와는 달리 고분자양이온은 레트로바이러스와 목적세포간의 정전기적 반발력을 상쇄시켜주기 때문에 binding affinity를 향상시켜 감염성을 높여주는 것이 아니라 internalization과 같은 binding 이후의 과정에 많은 영향을 미치기 때문에 감염성이 향상되는 것이라 생각할 수 있다.

**R18 형광 분석을 이용한 binding affinity 측정**

앞의 결과를 해석하는데 한가지 문제점은 X-gal staining을 통해 binding affinity를 결정하는 분석방법이 간접적이라는 것이다. 왜냐하면 레트로바이러스의 titer를 결정하기 위해서는 binding과정 후에도 binding 이후의 과정인 internalization 등의 과정이 따르기 때문에 직접적인 binding affinity 측정방법으



(a)



(b)

Figure 2. (a) Effect of polybrene on the binding step obtained with X-gal staining. (b) Effect of polybrene on the binding step obtained with R18 fluorescence assay. (8  $\mu$ g/ $\pi$ L of polybrene was used in this experiment)

로는 볼 수 없다. 다시 말하면, 측정된 레트로바이러스의 titer가 반드시 binding 과정에 대한 polybrene의 영향에 의해서만 결정되는 것이 아니라 binding 이후의 과정에 의해서도 어느 정도 영향을 받을 것이다. 따라서, 직접적인 binding affinity를 측정하기 위해 형광탐지물질(fluorescence probe)인 R18 을 사용하여 형광강도를 측정함으로써 binding affinity를 결정하였다. 형광 탐지물질을 이용한 측정방법은 X-gal staining 방법에서처럼 internalization 등의 과정을 거치지 않고 직접 binding 되어있는 레트로바이러스의 양을 형광강도를 통해 알 수 있기 때문에 직접적인 binding affinity 측정방법이라 할 수 있다.

이 분석 방법이 binding affinity 측정에 적절한지를 검증하기 위해 수용체가 envelope protein으로 포화되어 있는 세포(CRIP cell)에 R18이 붙은 바이러스(R18-labeled virus)를 binding 시켜 affinity를 측정하였다. 그 결과 수용체가 포화되어 있는 세포는 본 실험에서 사용된 감염세포에 비해 binding affinity가 1/5 이하로 떨어짐을 알 수 있었고, 이로부터 R18 형광분석방법이 바이러스의 binding을 측정할 수 있는 적절한 방법임을 확인하였다.

Figure 2(b)는 R18 형광측정의 결과인데 X-gal staining 분석방법의 결과와 비슷하게 polybrene의 첨가여부가 binding 과

정 후 레트로바이러스의 숙주세포 표면에서의 농도 변화에 거의 영향을 미치지 못함을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 이제까지 처음 관찰된 현상으로서 고분자양이온의 역할 규명 내지는 레트로바이러스의 정량이 매우 중요한 역할을 할 수 있음을 시사하고 있다.

**고분자들의 감염성과 binding affinity에 대한 영향**

고분자양이온인 polybrene이 레트로바이러스의 감염성을 매우 증대시키기는 하지만 binding affinity에는 큰 영향을 미치지 않는다는 앞 절의 결과들을 다른 이온성 및 중성 고분자의 경우와 비교하여 고분자의 전하가 과연 감염성, 혹은 binding affinity에 어떤 영향을 미치는가에 대한 연구를 수행하고자 하였다. 고분자양이온으로는 polybrene, DEAE-dextran, poly-L-lysine을, 고분자음이온으로는 dextran sulfate과 alginic acid를, 중성고분자로는 glycogen을 사용하였다. 이들이 선택된 이유는 고분자양이온 중 DEAE-dextran은 polybrene보다 약 2~3 배의 감염성 향상효과가 있는 것으로 알려져 있고(13,14), poly-L-lysine 또한 다른 바이러스의 경우 감염성에 상당한 향상효과가 있는 것으로 알려져 있으며(15,16), 고분자음이온 중 항생제로 사용되는 dextran sulfate는 바이러스의 감염성에 저해작용이 있음이 알려져 있기 때문이다(8,15,17). Figure 3은 다양한 고분자 이온들의 영향을 보여주는데, polybrene을 기준으로 했을 때 DEAE-dextran의 경우 약 2.5 배의 향상효과가 있으며, poly-L-lysine의 경우에는 분자량에 따라 차이는 있으나 평균적으로 약 2.5 배의 향상효과가 있음을 알 수 있다. 이에 반해 중성고분자인 glycogen 및 고분자음이온인 alginic acid, dextran sulfate는 모두 98 % 이상의 저해효과가 있음을 알 수 있다. 만약 고분자양이온의 감염성 향상효과나 고분자음이온과 중성고분자의 감염성 저해효과가 지금까지 알려진 대로 binding affinity에 대한 영향 때문이라면, 흡착된 레트로바이러스를 직접적으로 측정하는 R18분석방법을 통해 결정되는 binding affinity가 감염성의 변화와 비슷한 결과를 나타내야 할 것이다. 그러나 Figure 4에

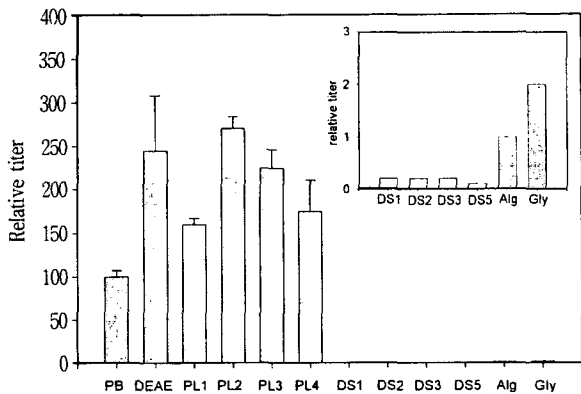


Figure 3. Effect of polymers on the infectivity obtained with X-gal staining. The relative titer was calculated by setting the titer in the presence of polybrene at 100. The virus inoculum was treated with 8 µg/mL PB, 10 µg/mL DEAE, 160 µg/mL PL1, 4 µg/mL PL2, 4 µg/mL PL3, 4 µg/mL PL4, 2 µg/mL DS (DS1), 4 µg/mL DS (DS2), 8 µg/mL DS (DS3), 50 µg/mL DS (DS5), 200 µg/mL Alg, and 200 µg/mL Gly, respectively.

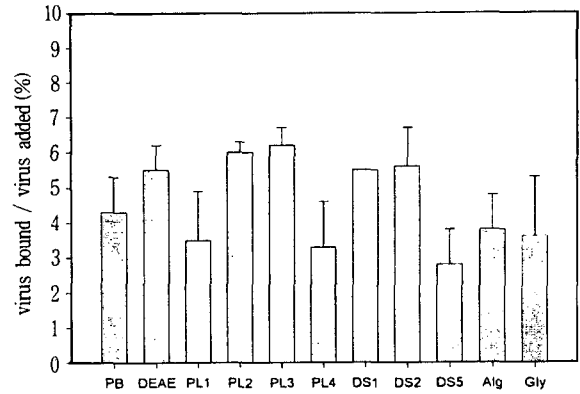


Figure 4. Effect of polymers on the specific binding affinity. The virus inoculum was treated with 8 µg/mL PB, 10 µg/mL DEAE, 160 µg/mL PL1, 4 µg/mL PL2, 4 µg/mL PL3, 4 µg/mL PL4, 2 µg/mL DS (DS1), 4 µg/mL DS (DS2), 50 µg/mL DS (DS5), 200 µg/mL Alg and 200 µg/mL Gly, respectively for 30 min at 4 °C. The binding affinity was measured with R18 fluorescence assay.

서 보듯이 binding affinity 측정결과에서는 이러한 큰 차이는 보이지 않음을 알 수 있다. 경향성을 살펴보면 고분자양이온의 경우에는 polybrene보다는 약간 높은 binding affinity를 보이며, 고분자음이온이나 중성고분자의 경우에는 약간 낮은 binding affinity를 보이고 있다. 그러나 이러한 고분자들이 레트로바이러스의 감염성에 미치는 영향과 비교하면, binding에 대한 영향은 그다지 크지 않음을 알 수 있다.

**Poly-L-lysine의 세포내 유입**

앞의 결과에서 볼 때, 고분자 양이온은 실제 레트로바이러스의 감염성에 약 30배 정도의 증대 효과를 주나 binding affinity에 큰 영향을 미치지 않기 때문에, 고분자 양이온은 오히려 binding 이후의 과정에 보다 더 큰 영향을 미치기 때문에 감염성을 향상시키는 것이라 생각할 수 있다. 레트로바이러스의 감염 경로 중 고분자양이온의 영향을 크게 받은 것으로 추측되는 것이 바로 internalization 단계이다.

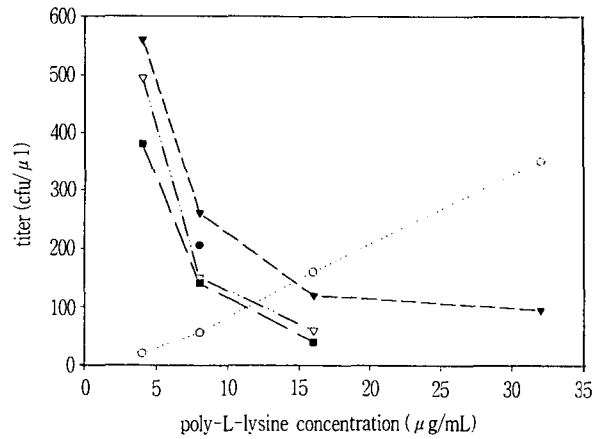
레트로바이러스가 세포 내로 internalization되는 경로는 크게 fusion process 와 endocytosis로 나눌 수 있다(18). 이렇게 두 가지로 대별되는 경로 중 어떤 경로를 택하더라도 고분자가 internalization에 영향을 주기 위해서는 고분자가 세포 내로 유입되거나 세포막에 영향을 주어야만 한다. 그러므로 고분자양이온의 하나인 poly-L-lysine을 NIH3T3세포와 함께 정지했을 때, poly-L-lysine이 주로 세포 내로 유입된다면 고분자양이온이 internalization 단계에 영향을 주기 때문에 레트로바이러스의 감염성에 큰 영향을 미치는 것이라 생각할 수 있다. 이와 같은 가정을 증명하기 위해 고분자 양이온의 세포로의 uptake 유무를 살펴봤는데, Figure 5는 고분자양이온의 하나인 poly-L-lysine이 세포 내로 internalization됨을 보여주고 있다. 따라서, 이러한 실험결과는 고분자양이온이 레트로바이러스의 binding 단계보다는 그 이후의 internalization 단계를 포함한 다른 초기과정에 보다 많은 영향을 미친다는 앞의 실험결과를 간접적으로 뒷받침하는 것이라 할 수 있다.



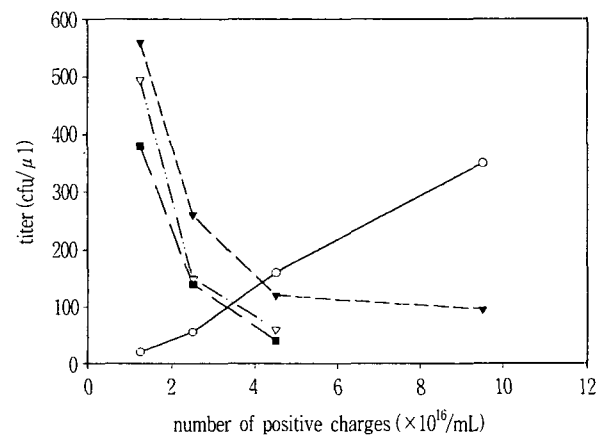
Figure 5. Internalization of FITC-labeled poly-L-lysine into the host cell.

**고분자양이온의 분자량(molecular weight) 또는 분자의 크기(molecular size)에 따른 감염효율의 변화**

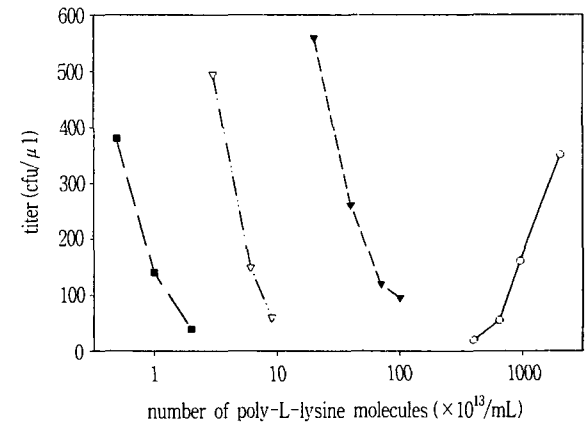
앞의 결과들에서 레트로바이러스의 감염성은 고분자양이온의 전하에 의한 binding affinity의 향상에 기인하기 보다는 internalization을 포함한 binding 단계이후의 과정에 큰 영향을 미침으로써 감염성을 향상시킨다는 것을 제시하였다. 고분자양이온이 binding 단계 이후의 과정에 영향을 준다면, 특히 internalization 과정에 큰 영향을 준다면, 그리고 고분자들이 세포 내로 유입된다면 고분자의 전하보다는 분자량(molecular weight) 즉 분자의 크기(molecular size)에 크게 영향을 받을 것이라 생각할 수 있다. 그래서, 여러 가지의 분자량 즉 분자 크기를 갖는 고분자인 poly-L-lysine을 이용하여 분자 크기가 레트로바이러스의 감염성에 어떤 영향을 미치는지 고찰하여 보았다. 다양한 분자량을 갖는 poly-L-lysine의 농도에 따른 감염성을 측정하였을 때 최적농도가 존재한다는 것과 분자량에 따라 감염성의 향상 정도가 크게 다름을 알 수 있었다. Figure 6(A)에서 볼 수 있듯이, PL2의 경우에 가장 높은 감염성 향상효과를 보였으며 PL2보다 분자량이 높은 PL3, PL4의 경우에는 PL2보다 낮은 감염성 향상효과를 보였다. 또한, 가장 분자량이 낮은 PL1의 경우에는 농도가 증가함에 따라 감염성이 계속 향상되지만 이 역시 160 µg/mL가 최적농도이며 PL2와 PL3, PL4는 모두 4 µg/mL이 최적 농도임을 알 수 있었다(data not shown). Figure 6(B)는 이러한 실험결과를 배지 내에 존재하는 고분자양이온의 전체 전하의 개수에 대해 나타난 그래프이다. 여기에서는 첨가된 고분자의 총 양전하의 개수가 같더라도 감염성은 poly-L-lysine의 분자량에 따라 크게 다른 것을 볼 수 있다. 즉, 배지 내에 존재하는 고분자양이온의 전체 전하의 개수는 감염성의 향상에 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있는 결과이며 앞의 결과 즉 고분자양이온이 binding affinity 증가에 큰 영향을 미치지 못하는 것과 어느 면에서 비슷한 의미를 나타낸다고 할 수 있다. Figure 6(C)는 이를 다시 배지 내에 존재하는 분자의 개수로 나타낸 것인데, 고분자의 분자수가 달라짐에 따라 레트로바이러스의 감염성 향상 정도는 크게 달라짐을 알 수 있다. 다시 말하면, 각각 다른 분자량을 갖는 PL1과 PL2, PL3, PL4에 있어서 분자의 수가 달라지면 감염효율의 향상 경향이 크게 다를 수 있다. 이와 같은 결과는 앞 절에서 poly-L-lysine의 세포내 유입이 레트로바이러스 감염성 향상에 영향을 미친다는



(a)



(b)



(c)

Figure 6. (A) Retrovirus infectivity according to the concentration of poly-L-lysines with different molecular weights. 8 µg/mL of PB(●) was used as a control. (B) Retrovirus infectivity according to the total number of positive charges in the retrovirus inoculum. (C) Retrovirus infectivity according to the total number of poly-L-lysine molecules in the retrovirus inoculum. Indicated amounts of PL1(○), PL2(▼), PL3(▽) and PL4(■) were added in the medium, respectively.

가설을 또한 뒷받침 할 수 있는 결과라고 생각된다. 레트로바이러스가 목적세포내로 internalization되는 과정에서 분자의 크기 (molecular size) 및 이의 농도는 큰 영향을 줄 것으로 예상된다. 고분자양이온은 목적세포 세포막의 permeability에 변화를 줄 수 있으며, 레트로바이러스와 함께 co-internalization되는 경우 이미 목적세포의 세포질 내에 존재하는 레트로바이러스의 안정성에 대해서도 많은 영향을 미칠 것으로 추측할 수 있으며, 이 경우에 있어서 가장 중요한 요인이 배지 내에 첨가해주는 고분자양이온의 분자량(molecular weight) 즉 분자의 크기 (molecular size) 및 농도가 아닐까 추측된다.

## 고 찰

고분자양이온은 레트로바이러스의 감염성을 높여주는 것으로 알려져 있으며, 이는 앞의 실험결과에서도 보여주었다. 지금까지의 가설은 고분자양이온이 세포의 표면에 binding 하여 레트로바이러스가 세포의 수용체에 보다 쉽게 결합할 수 있도록 세포 표면과 레트로바이러스 표면의 정전기적 반발력을 상쇄시켜준다는 것이었다. 그러나, 이는 단지 실험결과에서 유추된 가설일 뿐 그 정확한 기작은 알려져있지 않으며, 정확한 기작이 어떤 것일 지라도 바이러스 감염과정 중 초기과정에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

우리는 고분자양이온의 하나인 polybrene이 레트로바이러스의 초기과정 중 binding보다는 internalization에 크게 영향을 미친다는 것을 간접적인 방법인 X-gal staining과 보다 직접적인 방법인 R18 형광분석방법을 통하여 보여주었다. 앞의 Figure 2에서 볼 수 있듯이 polybrene은 레트로바이러스의 binding과정에 큰 영향을 미치지 않는다. 이러한 결과는 지금까지 알려진 바와 같이 고분자양이온이 레트로바이러스와 세포표면간의 정전기적 반발력을 상쇄시켜주기 때문에 감염성을 향상시켜주는 것은 아니라는 것을 의미한다.

이와 같은 새로운 관찰을 더욱 확실하게 증명하기 위해서 polybrene이외의 고분자양이온과 고분자음이온, 중성고분자들이 레트로바이러스의 감염성과 binding affinity에 어떤 영향을 미치는지에 대해 고찰하여 보았다. 고분자양이온으로는 polybrene, DEAE-dextran, poly-L-lysine을 사용하였으며, poly-L-lysine의 경우에는 서로 다른 분자량을 사용하여 분자량에 따른 감염성 변화에 대해서도 알아보았다. 고분자음이온으로는 dextran sulfate와 alginic acid를 사용하였으며, 중성고분자로는 glycogen을 사용하였다. 레트로바이러스의 감염성에 대한 영향에 있어서는 Figure 3에서 볼 수 있듯이 고분자양이온들은 polybrene보다는 2배이상의 향상효과가 있음을 알 수 있다. 특히, poly-L-lysine의 경우에는 분자량에 따라 감염성 향상 효과가 다르며, 최적 농도의 변화가 있음을 알 수 있었다. PL1과 PL2, P3 및 PL4 간에는 감염성 향상경향이 완전히 반대인 결과로 이루어 보아 고분자 분자량에 따라 크게 차이를 알 수 있었다. 고분자음이온 dextran sulfate, alginic acid나 중성고분자인 glycogen의 경우 감염성 저해효과가 있음을 알 수 있다. 이러한 감염성 향상효과나 저해효과가 레트로바이러스의 binding에 대한 영향인지에 대해 알아보기 위해 직접적인 양을 형광분석법을 사용하여 비교해 본 결과 binding에는 큰 영향이 없음을 알 수 있었다. 이는 앞에서 이야기한 polybrene의 감염성 향상에 미치

는 영향이 binding affinity 향상에 의한 것이 아님을 다시 한번 증명해주는 결과이다.

고분자양이온이 binding에 크게 영향을 미치지 않는다고 가정했을 때는 그 다음 과정인 internalization 과 cytoplasm내에서 일어나는 uncoating, integration 등의 과정이 영향을 받을 것이라고 예상할 수 있다. 다시 말해 고분자양이온인 poly-L-lysine이 세포내로 유입되면서 세포막의 permeability에 영향을 줄 수도 있을 것이며, 세포 내로 유입되는 poly-L-lysine과 레트로바이러스 입자가 complex를 이루어 세포 내로의 바이러스입자의 internalization이 보다 쉽게 일어날 수 있을 것으로 가정할 수 있다. 이와 같은 가능성을 고분자 양이온인 poly-L-lysine의 세포내 유입 현상으로 증명하였다(Figure 5). 이 결과는 또한 상기한 결론들을 다시한번 확인할 수 있는 결과를 제시한다는 점에서 의의가 있다고 하겠다.

결론적으로 말하면, 고분자양이온의 레트로바이러스 감염성 향상효과는 지금까지 알려진 바와 같이 레트로바이러스의 binding에 대한 영향 때문이 아니라 binding 이후의 과정에 영향을 미치기 때문이며 poly-L-lysine과 같은 고분자양이온의 세포 내로 유입 시 세포막의 permeability에 영향을 미치거나 세포 내에서 uncoating되는 과정이나 그 이후의 과정에 영향을 미치기 때문에 레트로바이러스의 감염성이 향상된다고 할 수 있으며, 이러한 영향을 미치는데 있어서 고분자양이온의 분자량 (molecular weight) 즉 분자크기(molecular size)가 중요한 역할을 할 수 있음을 가설로서 제시하였다.

## 요 약

유전자 전달 수단으로 사용되는 레트로바이러스의 감염 효율을 증대시키는 고분자양이온의 역할을 알아보기 위해 R18 형광 물질을 이용해 고분자 양이온 중 하나인 polybrene의 유무에 따른 레트로바이러스와 세포간의 binding affinity를 직접적으로 측정하였으며 그 외의 여러 고분자물질이 레트로바이러스의 감염에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. 그 결과 고분자의 전하는 레트로바이러스와 세포간의 binding affinity에는 영향을 미치지 않았으나 감염효율을 증대시키는 것은 고분자양이온 뿐이었다. 이는 고분자양이온이 레트로바이러스의 감염시 binding 과정이 아닌 그 이후의 과정, 특히 internalization 과정에 영향을 미치는 것을 나타낸다. FITC가 부착된 poly-L-lysine이 세포안으로 들어가는 사실을 통해 고분자양이온의 세포안으로의 유입이 바이러스의 internalization과정에 중대한 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 분자량이 다른 poly-L-lysine을 이용해 고분자양이온의 경우 그 분자량에 따라 최적농도가 다를 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Morgan, R. A. and W. F. Anderson (1993), Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 62, 191-217.
2. Hudgson, C. P. (1995), The vector void in gene therapy. *Bio/Technol.* 13, 222-225.
3. Anderson, K. B. and B. A. Nexø (1983), Entry of murine retrovirus into mouse fibroblast. *Virology* 125, 85-98.

4. Bahnson, A. B., J. T. Dunigan, B. E. Baysal, T. Mohney, R. W. Atchison, M. T. Nimgaonkar, E. D. Ball, and J. A. Barranger (1995), Centrifugal enhancement of retroviral mediated gene transfer. *J. Virol. Methods* **54**, 131-143.
5. Kotani, H., P. B. Newton III, S. Zhang, Y. L. Chiang, E. Otto, L. Weaver, R. M. Blaese, W. F. Anderson, and G. J. McGarrity (1994), Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Hum. Gene Ther.* **5**, 19-28.
6. Morgan, J. R., J. M. Le Doux, R. G. Snow, R. G. Tompkins, and M. L. Yarmush (1995), Retrovirus infection: effect of time and target cell number. *J. Virol.* **69**, 6994-7000.
7. Wang, H., R. Paul, R. E. Burgeson, D. R. Keene, and D. Kabat (1991), Plasma membrane receptors for ecotropic murine retroviruses require limiting accessory factor. *J. Virol.* **352**, 6468-6477.
8. Kaplan, M. M., T. J. Wiktor, R. F. Maes, J. B. Campbell, and H. Koprowski (1967), Effect of polyions on the infectivity of rabies virus in tissue culture: Construction of a single-cycle growth curve. *J. Virol.* **1**, 145-151.
9. Kumao, T. and P. K. Vogt (1969), Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* **38**, 414-426.
10. Duc-Nguyen, H. (1968), Enhancing effect of diethylaminoethyl-dextran on the focus-forming titer of a murine sarcoma virus (Harvey Strain). *J. Virol.* **2**, 643-644.
11. Collier, B. (1980), Polybrene-induced platelet agglutination and reduction in electrophoretic mobility: enhancement by von Willebrand factor and inhibition by vancomycin. *Blood* **55**, 276-281.
12. Coelen, R., D. Jose, and J. May (1983), The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of primate retroviruses SSV1/SSAV1 and BaEV. *Arch. Virol.* **75**, 307-311.
13. Jarue, S. M., A. J. Hackett, and B. D. Jr. Norman (1971). Effect of polycations and on sensitivity of BALB/3T3 cells to murine leukemia and sarcoma virus infectivity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 1162-1163.
14. Lee, S. G., S. Kim, P. D. Robbins, and B. G. Kim (1996), Optimization of environmental factors for the production and handling of recombinant retrovirus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 477-483.
15. Kumao, T. and K. V. Peter (1969), Enhancement and inhibition of avian sarcoma viruses by polycations and polyanions. *Virology* **38**, 414-426.
16. Nina, L., J. M. Lindsey, H. Holm, and H. Lars (1988), Interaction of polylysine with the cellular receptor for herpes simplex virus type 1. *J. Gen. Virol.* **69**, 1137-1145.
17. Maria, G. P., M. Antonella, G. Carmela, P. Silver, S. Lucilla, and C. Fernanda (1997), In vitro effect of natural and semi-synthetic carbohydrate polymers on Chlamydia trachomatis infection. *Chemotherapy* **43**, 211-217.
18. Lenard, J. and K. D. Miller (1982), Uncoating of enveloped viruses. *Cell* **28**, 5-6.