

## 저분자량 폴리에틸렌이민을 이용한 유전자 송달 및 발현 유효성 연구

정길재 · 박귀례\* · 신지영 · 최한곤\*\* · 오유경†

포천중문 의과대학교, \*국립독성 연구원, \*\*영남대학교 약학대학  
(2004년 5월 20일 접수 · 2004년 6월 9일 승인)

### Cellular Uptake and Transfection Efficiency of Plasmid DNA Using Low Molecular Weight Polyethylenimine

Gil-Jae Jeong, Kui Lye Park\*, Ji Young Shin, Han-Gon Choi\*\* and Yu-Kyoung Oh†

College of Medicine, Pochon CHA University, Pochon, Kyonggi-do 487-800, Korea

\*National Institute of Toxicological Research, Seoul, Korea

\*\*College of Pharmacy, Yeungnam University, Seoul, Korea

(Received May 20, 2004 · Accepted June 9, 2004)

**ABSTRACT**—Branched and linear polyethylenimines (PEIs) have been studied as efficient and versatile agents for gene delivery *in vitro* and *in vivo*. PEIs exist in a linear or branched topology and are available in a wide range of molecular weight (Mw). Most studies have been done using PEIs with Mw higher than 10Kd. This study was aimed to test the transfection efficiency and the cell viability following gene delivery using PEI of Mw 2Kd, a relatively lower Mw cationic polymer. We used murine interleukin-2(mIL-2) plasmid DNA complexed with branched PEI 2Kd or 25Kd, and transfected them into a myoblast muscle cell line, C2C12. The cellular uptake of mIL-2 plasmid DNA was determined using quantitative polymerase chain reaction. RNA transcript levels were studied in the myoblast cells. Our results show that PEI 2Kd was as effective as PEI 25Kd in cellular gene delivery and transfection efficiency in C2C12 cells. Moreover, MTT assay indicated that PEI 2Kd/DNA complexes did not significantly reduce the cell viability regardless of N/P ratios. These results suggest that PEI of Mw 2Kd might play a role as effective and low toxic nonviral vector systems for muscular cell lines.

**Key words**—Polyethylenimine, Low molecular weight polymer, Cellular uptake, Transfection, Cell viability

유전자 치료법이란 유전자를 이용하여 필수 단백질의 생성을 유도하거나 불필요한 단백질의 생성을 억제함으로써 인간의 질병 치료를 목적으로 하는 것이다. 이를 위해서는 특정 질환에 대한 치료 활성을 나타내는 단백질을 발현하는 유전자를 효율적으로 송달할 수 있는 벡터의 개발이 시급한 실정이다. 유전자 벡터는 크게 바이러스성 벡터와 비바이러스성 벡터로 나눌 수 있다. 바이러스성 벡터의 경우, 유전자 발현 효율성이 높고 체내에서 유전자 발현이 장기적으로 일어난다는 장점을 가지고 있다. 바이러스성 벡터로 많이 연구되는 retrovirus, lentivirus, adeno-associated virus 등은 유전자 발현 효율면에서는 우수하나 면역반응과 독성반응이 일어날 수 있는 위험성을 가지고 있어서 안전성 면에서 보다 많은 연구가 필요하다. 또한, 바이러스를 이용하기 때문에 생체 내에서 체내 축적이 일어날 수 있고 다음 세대까지 바이러스 축적이 이어질 수 있다는 위험성을 가지고 있다.<sup>1,2)</sup> 반

면 비바이러스성 벡터의 경우, 바이러스성 벡터에 비하여 발현 효율성이 낮고 유전자 발현이 단기적으로 일어난다는 단점을 가지고 있지만, 바이러스성 벡터에 비하여 면역반응이 적게 일어나기 때문에 안전성이 보다 확보된 장점을 가진 것으로 인식되고 있다.<sup>3,4)</sup>

따라서, 최근 비바이러스성 벡터의 유전자 전달 효율성을 높이고 유전자 발현성을 지속시키고자 하는 방향으로 연구들이 진행되고 있다. 예를 들어 양이온성 폴리머나 리포솜과 같은 생체고분자를 이용하여<sup>5,6)</sup> DNA와의 복합체를 형성하는 경우 비바이러스성 벡터의 단점 중 하나인 전달 효율성이 낮다는 점<sup>7-9)</sup>을 개선하려는 연구가 시도되고 있다. 특히, 양이온성 고분자인 폴리에틸렌이민(polyethylenimine, PEI)의 경우 ethylenimine을 반복단위로 가지고 있어서 물에도 잘 녹는 성질을 지니고 있는 합성 고분자이며, PEI의 구조 중 매 3번째 원소가 질소(amino nitrogen)로서 높은 양전하를 띠고 있어 DNA와의 복합체 형성이 용이하다. Linear나 branched와 같은 여러 형태의 PEI와 여러 분자량의 PEI가 사용되고 있는데 그 중에서 특히 분자량 22Kd-

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 031)542-6671, E-mail : ohyk@cha.ac.kr

25Kd의 linear 혹은 branched PEI가 *in vitro* 뿐만 아니라 *in vivo* transfection에서도 뛰어난 효율을 나타내는 것으로 알려져 있다.<sup>10-14)</sup>

기존의 PEI 연구는 대부분이 PEI 10Kd 이상의 분자량을 대상으로 수행되었다. 저분자량 PEI의 경우 세포 독성이 낮은 것으로 인식되고 있으나 세포주를 대상으로 저분자량과 고분자량 PEI를 비교 실험한 연구는 많이 진행되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 branched PEI Mw 2Kd와 25Kd을 IL-2 plasmid와 복합체를 형성시켜 *in vitro*에서 유전자 전달을 시행하여 DNA level과 RNA level로 유전자 송달의 효율성을 알아보는 실험을 하였다. 본 연구에서는 PEI 분자량 2Kd가 근육 세포주에서 PEI 25Kd와 유전자 발현 효율성이 비슷한 경향을 나타내었을 뿐 아니라, 세포 독성 실험에서 세포의 성장성을 유지시킨 결과를 보고하고자 한다.

## 실험 방법

세포배양에 사용되는 배지인 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium), 우혈청, 페니실린, 스트렙토마이신은 GIBCO BRL(미국)로 부터 구입하였다. Trypsin-EDTA는 Gibco BRL(미국)로 부터 구입하였다. PEI 분자량 2Kd, 25Kd는 각각 Aldrich(미국)로 부터 구입하였다. 세포 배양용 무균 플라스크는 Nunc(미국)로 부터, 6-well plate는 SPL(한국)로 부터 구입하였다. Proteinase K(10 mg/ml), MTT(3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 Sigma(미국)에서 RNase(10 mg/ml)와  $\beta$ -mercaptoethanol은 Amresco(미국)에서 구입하였다. RNA 분리에 사용되는 TRIzol™ reagent는 Invitrogen(미국)으로 부터, RT-PreMix는 Bioneer(한국)로 부터 구입하였다. PCR은 MJ research사의 Peltier Thermal Cycler(PTC-100)를 사용하여 수행하였으며, Gel Doc image analyzer (Vilber Loumat, 프랑스) 및 Bio ID 이미지 분석 프로그램을 이용하여 전기영동 결과를 분석 및 정량화 하였다. 그 외에 모든 시약과 완충액은 증류수를 이용하여 제조하였고, 증류수는 Milli-Q(미국)를 통과시킨 것을 사용하였다.

### 플라스미드 유전자

플라스미드 유전자로서는 pVAX1 expression vector (Invitrogen, 미국)에 murine interleukin-2 유전자(mIL-2, 포항공대 성영철 박사팀에서 제공받음)를 삽입한 것을 사용하였다. pVAXmIL-2 플라스미드(3.5 kb)는 *E. coli* DH5a에서 증폭하였으며 Quiagen Plasmid Midi kit(Quiagen, 미국)를 사용하여 분리 정제하였다.

### Gel Retardation Assay

PEI 분자량 2Kd, 25Kd(branched type)를 이용하여 PEI/mIL-2 플라스미드 유전자 복합체를 N/P ratio 10/1로 고정하여 각각 제조한 다음, 0.7% agarose gel에 1kb plus ladder marker, naked DNA, PEI 2Kd/DNA 복합체, PEI 25Kd/DNA 복합체를 각각 가하고 100 V 전류에서 20분간 전기영동을 수행한 다음 ethidium bromide로 염색하고 유전자의 이동성을 관찰하였다.

### 세포배양

근육세포주인 C2C12 세포주는 한국 생명공학연구원의 염영일 박사팀(대전, 한국)에서 분주받은 것을 사용하였으며, DMEM 배지에 10%의 우혈청 및 페니실린, 스트렙토마이신을 첨가하여 배양하였다.<sup>15)</sup> 세포주 계대 배양을 위하여서는 trypsin-EDTA(0.05% trypsin, 0.53 mM EDTA)를 사용하였다.

### 복합체 제조 및 세포내 수송량 측정

PEI 분자량 2Kd/유전자 복합체, 또는 PEI 분자량 25Kd/유전자 복합체는 mIL-2 플라스미드 DNA와 PEI를 각각 혼합한 다음 10초 정도 vortexing을 한 다음 15-30분 정도 실온에 방치하여 제조하였다. 세포내 수송량 및 발현효율 측정용 복합체 제조시 PEI와 유전자의 N/P ratio는 10:1로 제조한 것을 사용하였다. 배지에 PEI/mIL-2 플라스미드 유전자 복합체를 가한 다음 4시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에 방치하였다. 세포를 인산 완충액으로 3회 수세한 다음 세포를 TE 완충액(10 mM Tris-HCl + 1 mM EDTA, pH 8.0)에 분산시키고 lysis buffer(50 mM Tris-HCl + 10 mM EDTA + 1% SDS, pH 8.0),  $\beta$ -mercaptoethanol, proteinase K, RNase를 순차적으로 처리하여 세포에서 DNA를 분리하였다. DNA 분리에는 phenol, chloroform, isoamylalcohol의 혼합용액(25: 24:1 v/v)을 사용하였다. 세포의 DNA 중 mIL-2 외부 유전자를 정량하기 위하여 기제작된 pVAXdmIL-2 표준품 유전자<sup>12)</sup>를 넣고 정량성 PCR을 수행하였다.

### 정량성 연쇄효소중합반응 (Quantitative PCR) 분석

PCR 반응은 먼저 sense 및 antisense primer(10 pmol)를 각각 0.48  $\mu$ l씩, Taq polymerase(5 U/ $\mu$ l, Bioneer) 0.072  $\mu$ l, dNTP(각 dNTP 2.5 mM, Bioneer), 10X reaction buffer로 전체 반응 용량 약 6.24  $\mu$ l로 한 혼합액과 mIL-2 mimic, target이 되는 DNA를 넣어서 수행하였다. Sense primer(5'→3')는 ACG-ACT-CAC-TAT-AGG-GAG-ACC-C, Antisense primer(3'→5')는 CAA-CTA-GAA-GGC-ACA-GTC-GAG-G이며, PCR

조건은 95°C 40초: 56°C 30초: 72°C 30초로 33 cycle을 증폭하여 수행하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하였으며 Gel Doc Video Gel Documentation System을 사용하여 이미지를 저장하고 Bio ID software로 젤 밀도의 측정 및 정량화 분석을 수행하였다.<sup>12)</sup>

### RNA 분리

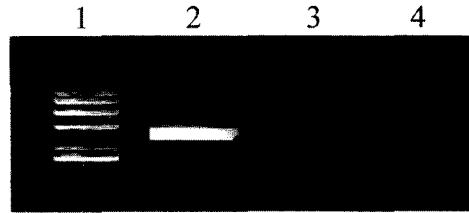
배지에 naked plasmid DNA, PEI/유전자 복합체를 각각 가한 다음 4시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에 방치하였다. 세포를 인산 완충액으로 3회 수세한 다음 세포 배양배지를 다시 첨가하고 24시간 동안 37°C CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 세포를 인산 완충액으로 수세한 다음 세포를 떼어내고 TRIzol™ reagent(Invitrogen, 미국)를 이용하여 RNA를 얻은 뒤, housekeeping 유전자인 GAPDH를 사용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다.

### Semiquantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 분석

cDNA 합성에는 RT-PreMix kit를 이용하였고, sense 및 antisense primer(10 pmol)를 각각 0.48 µl씩, Taq polymerase (5 U/µl, Bioneer) 0.072 µl, dNTP(각 dNTP 2.5 mM, Bioneer), 10X reaction buffer를 사용하여 총 용량 12 µl로 수행하였다. Sense primer(5'→3')는 GTC-AAC-AGC-GCA-CCC-ACT-TCA-AGC, antisense primer(3'→5')는 GCT-TGT-TGA-GAT-GAT-GCT-TTG-ACA이었으며, PCR 조건은 95°C 45초 : 60°C 2분 20초로 35 cycle을 증폭하여 수행하였다. 대조군으로는 housekeeping 유전자인 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)를 사용하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하였으며 Gel Doc Video Gel Documentation System, Bio ID로 젤 밀도의 측정 및 정량화 분석을 실시하였다.<sup>12)</sup>

### MTT (3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) Assay

C2C12 세포를 5 × 10<sup>4</sup> cells/well이 되도록 seeding하고 24시간 경과 후 PEI/유전자 복합체를 여러 가지 N/P ratio로 첨가하였다. 복합체를 처리하고 8, 24시간 경과 후 각각 MTT solution을 배지의 10%가 되도록 가하였다. 4시간 incubation한 다음 상층액을 제거하고 0.04 N HCl isopropanol 용액을 첨가한 후에 ELISA reader를 이용하여 590 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>16)</sup> 대조군으로는 PEI를 처리하지 않은 C2C12 세포가 사용되었다. 세포의 성장성은 다음과 같은 식으로 계산되었다.



**Figure 1**—Gel retardation of PEI/DNA complexes. Lane 1, 1kb ladder; lane 2, Naked DNA; lane 3, PEI Mw. 2Kd complexes; lane 4, PEI Mw. 25Kd complexes.

$$\text{Cell viability(\%)} = \text{OD}_{\text{sample}} / \text{OD}_{\text{control}} \times 100$$

## 결과 및 고찰

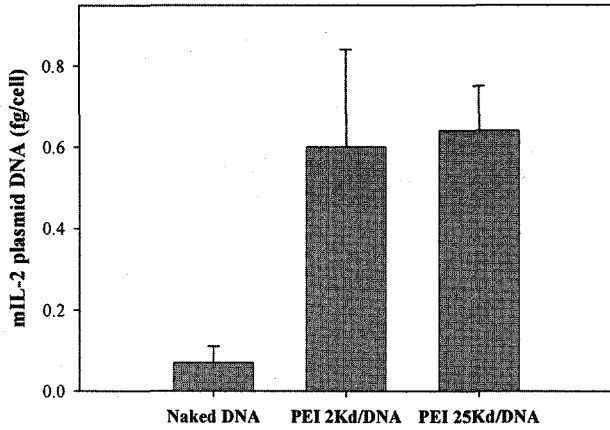
### 저분자량 PEI와 유전자의 복합체 형성

PEI 분자량 2Kd가 유전자와 복합체를 형성하였는지의 여부를 알아보기 위하여 gel retardation assay를 수행하였다. Figure 1에서 naked plasmid DNA는 원래 mL-2 plasmid가 가지는 크기인 3.5kb에서 밴드를 나타내었으나 PEI 분자량 2Kd/mL-2 플라스미드 유전자 복합체 및 PEI 25Kd/mL-2 플라스미드 유전자 복합체는 PEI의 양전하가 DNA를 감싸고 있으므로 naked DNA의 정상적인 이동성을 지연하여 mL-2 플라스미드 유전자의 크기인 3.5Kb에서 유전자 밴드가 소실되는 것을 관찰하였다. 이러한 유전자의 이동성 지연 현상은 PEI 분자량, N/P ratio에 따라 그 정도가 다르게 나타나는 것으로 보고되어 양이온성 고분자와 유전자의 복합체 형성 여부를 판별하는 방법으로 여러 연구에서 사용된 바 있으며, 본 연구에서도 PEI 2Kd가 mL-2 유전자와 복합체를 형성한 것을 확인할 수 있었다.

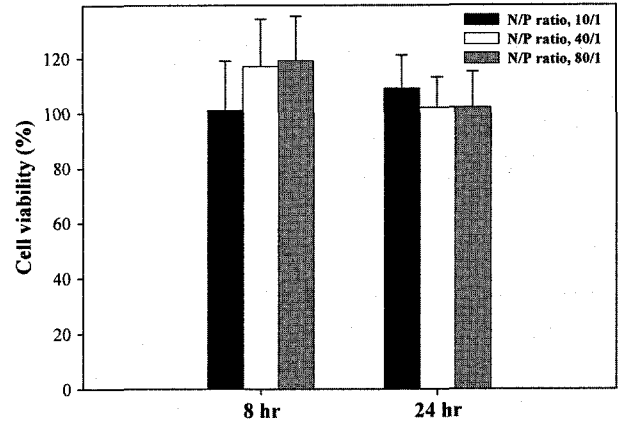
### 세포내 유전자 송달

C2C12 근육세포주에 대한 DNA 송달량을 평가하기 위하여 IL-2 표준품 유전자를 사용하여 정량성 PCR 분석을 실시하였다. Naked DNA에 비해 PEI 분자량 2Kd와 IL-2 DNA의 복합체는 세포내로의 유전자 송달량이 약 8.6배 높게 나타났고, PEI 분자량 25Kd/mL-2 플라스미드 유전자 복합체는 약 9.1배 높게 나타났다(Figure 2). 분자량이 다른 PEI 2Kd와 25Kd는 세포내 유전자 송달량 면에서는 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다(*t*-test, *p* > 0.05).

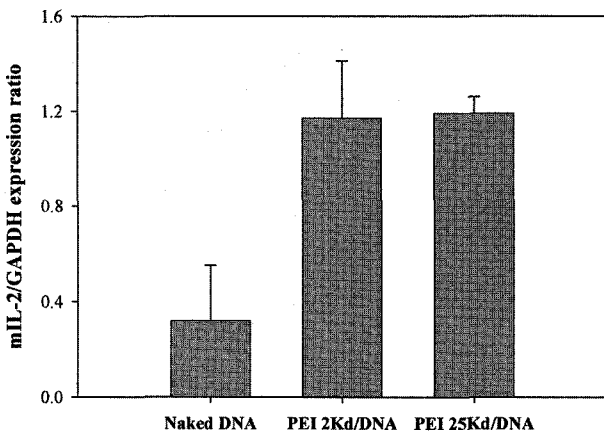
PEI가 naked 유전자 보다 높은 유전자 송달량을 나타내는 이유는 PEI의 구조 중 매 3번째 원소가 질소(amino nitrogen)로서 높은 (+) charge를 띠고 있어 DNA의 인(phosphate)의 (-) 전하와의 이온 상호작용을 통해 복합체를 형성하며 이리



**Figure 2**—Cellular DNA uptake of mIL-2 delivered in PEI complexes. The N/P ratio of PEI/DNA complexes was 10/1. The DNA uptake was measured in C2C12 cells.



**Figure 4**—Viability of C2C12 cells following exposure to PEI/mIL-2 plasmid DNA complexes.



**Figure 3**—RNA expression levels of mIL-2 delivered in PEI complexes. The N/P ratio of PEI/DNA complexes was 10/1. Expression levels were measured in C2C12 cells.

한 PEI의 성질로 인해 DNA가 condensation되어 세포내로 송달되기에 적합한 conformation을 형성하였기 때문으로 사료된다.

이제까지의 연구보고로는 저분자량 PEI는 유전자 발현 효율이 10Kd 이상의 PEI 보다 일반적으로 낮으며 이는 유전자의 세포내 송달이 낮은 것에도 일부 기인하는 것으로 인식되어 왔으나, 본 연구결과는 저분자량의 PEI도 세포주에 따라서 유전자를 송달하는 효율이 크게 저하되지 않는다는 것을 제시해 준다.

**유전자 발현 효율**

근육세포주인 C2C12 세포에 대한 유전자 발현 효율을 평가하기 위하여 housekeeping 유전자인 GAPDH를 이용하여 semi-quantitative RT-PCR을 수행하였다. 전기영동 사진으로 이미지의 정량 밀도 분석을 수행하여 GAPDH의 일정 발현

양에 대한 mIL-2 유전자의 발현 비율을 비교 평가한 결과 naked DNA에 비해 PEI 분자량 2Kd 복합체는 약 3.65배 높게 나타났고, PEI 분자량 25Kd 복합체는 약 3.7배 높은 발현 효율을 나타내었다(Figure 3).

본 결과는 PEI 분자량 2Kd 복합체 형태로 투여된 유전자가 naked DNA 보다 발현 효율이 유의성 있게 증가되며 PEI 분자량 25Kd와 복합체 형태로 투여된 유전자와는 유사한 발현 효율을 보인다는 것을 나타내고 있다. PEI와 복합체로 투여된 mIL-2 유전자의 발현 효율 증가는 세포 내의 여러 barriers로부터 핵 내로 수송되는 기전에 기인하는 것으로 분석된다. 또한 PEI 2Kd와 25Kd 사이에 발현 효율이 유의성 있는 차이를 보이지 않은 것은 세포내 유전자 송달 양에서 2Kd와 25Kd 사이에 차이를 나타내지 않았기 때문인 것으로 사료된다(Figure 2).

본 연구에서는 N/P ratio를 10/1로 고정하여서 발현 효율을 측정하였으나 분자량 2Kd의 PEI에서 N/P ratio에 따라 발현 효율이 더 증가할 가능성도 충분할 것으로 사료된다. 인간 혈액줄기세포주인 TF-1 세포주에서는 N/P ratio에 따라서 PEI 2Kd의 발현 효율이 영향을 받는 것이 관찰되었다 (data not shown). 분자량에 따른 PEI의 발현 효율 차이는 Godbey 등에 의하여 보고된 바 있다. 본 연구결과에서는 근육 세포주인 C2C12 세포주를 사용하여 저 분자량의 PEI가 25Kd의 PEI와 유사한 발현 효율을 보이는 것이 관찰된 반면, Godbey 등은 endothelial cell 유래의 세포주인 EA.hy 926을 사용하여 PEI의 분자량이 600에서 70000으로 증가됨에 따라서 발현 효율이 증가된다는 것을 보고한 바 있다.<sup>17)</sup> 이러한 연구결과는 PEI의 분자량 차이에 따른 발현 효율이 세포주에 따라 영향을 받을 수 있다는 것을 의미하는 것으로 해석된다.

### 세포 독성

C2C12 세포주를 대상으로 PEI 2Kd/mL-2 플라스미드 유전자 복합체를 처리한 다음 복합체에의 세포 노출시간 및 복합체의 N/P ratio를 변화시키면서 PEI 2Kd가 C2C12 세포의 독성에 미치는 영향을 연구하였다. PEI 분자량 2Kd/유전자 복합체는 세포 노출 시간이 8시간, 24시간인 경우 유의성 있는 세포 성장성의 감소를 나타내지 않았다. 또한, 복합체를 미처리한 세포 대조군에 비하여 N/P ratio가 10:1, 40:1, 80:1로 증가한 경우에도 세포 성장성의 감소를 나타내지 않았다. 본 연구는 저분자량의 PEI가 낮은 독성을 나타낸다는 연구 보고<sup>18)</sup>와 일치하는 것으로 사료된다.

### 결론

분자량 2Kd인 PEI는 근육세포주에서 분자량 25Kd인 PEI와 유사한 세포내 송달 및 발현 효율을 나타내었다. 또한 N/P ratio의 증가에도 세포 성장성을 저해하지 않았다. 이러한 저분자량 PEI의 낮은 독성 및 기존의 25Kd PEI와 유사한 발현 효율은 PEI 분자량 2Kd가 C2C12 근육세포주 등에 안전성이 개선된 비바이러스성 유전자 벡터로 사용될 가능성이 있음을 제시한다.

### 감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구사업(과제번호 R01-2002-000-00024-0) 및 국립독성연구원에서 시행한 유전자 치료제 안전성 관리 사업(KFDA-04122-유치안-062)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

- 1) R.S. Kevin, Gene therapy : theoretical and bioethical concepts, *Gene Ther.*, **34**, 247-268 (2003).
- 2) E. Marshall, Gene therapy's growing pains, *Science*, **269**, 1050-1055 (1995).
- 3) T. Niidome and L. Huang, Gene therapy progress and prospects : nonviral vectors, *Gene Ther.*, **9**, 1647-1652 (2002).
- 4) D.A. Treco and R.F. Selden, Non-viral gene therapy, *Mol. Med. Today*, **1**, 314-321 (1995).
- 5) B. Pitard, H. Pollard, O. Agbulut, O. Lambert, J.T. Vilquin, Y. Cherel, J. Abadie, J.L. Samuel, J.L. Rigaud, S. Menoret, I. Anegon and D.A. Escande, Nonionic amphiphile agent promotes gene delivery *in vivo* to skeletal and cardiac muscles, *Hum. Gene Ther.*, **13**, 1767-1775 (2002).
- 6) H. Pollard, J.S. Remy, G. Loussouarn, S. Demolombe, J.P. Behr and D. Escande, Polyethylenimine but not cationic lipids promotes transgene delivery to the nucleus in mammalian cells, *Biol. Chem. J.*, **273**, 7507-7511 (1998).
- 7) C. Plank, K. Mechtler, F.C.J. Szoka and E. Wagner, Activation of the complement system by synthetic DNA complexes: a potential barrier for intravenous gene delivery, *Hum. Gene Ther.*, **7**, 1437-1446 (1996).
- 8) P. Erbacher, J.S. Remy and J.P. Behr, Gene transfer with synthetic virus-like particles via the integrin-mediated endocytosis pathway, *Gene Ther.*, **6**, 138-145 (1999).
- 9) D. Lechardeur, K.J. Sohn, M. Haardt, P.B. Joshi, M. Monck, R.W. Graham, B. Beatty, J. Squire, H. O'Brodovich and G.L. Lukacs, Metabolic instability of plasmid DNA in the cytosol : A potential barrier to gene transfer, *Gene Ther.*, **6**, 482-497 (1999).
- 10) C.H. Ahn, S.Y. Chae, Y.H. Bae and S.W. Kim, Biodegradable poly(ethylenimine) for plasmid DNA delivery, *J. Controlled Rel.*, **80**, 273-282 (2002).
- 11) Y.K. Oh, J.P. Kim, H. Yoon, J.M. Kim, J.S. Yang and C.K. Kim, Prolonged organ retention and safety of plasmid DNA administered in polyethylenimine complexes, *Gene Ther.*, **8**, 1587-1592 (2001).
- 12) Y.K. Oh, D. Suh, J.M. Kim, H.G. Choi, K. Shin and J.J. Ko, Polyethylenimine-mediated cellular uptake, nucleus trafficking and expression of cytokine plasmid DNA, *Gene Ther.*, **9**, 1627-1632 (2002).
- 13) A.R. Klemm, D. Young and J.B. Lloyd, Effects of polyethylenimine on endocytosis and lysosome stability, *Biochem. Pharmacol.*, **56**, 41-46 (1998).
- 14) W.T. Godbey, K.K. Wu and A.G. Mikos, Poly(ethylenimine)-mediated gene delivery affects endothelial cell function and viability, *Biomaterials*, **22**, 471-480 (2001).
- 15) C.A. Josephine, S. Brian and L. Jack, Muskelin, a novel intracellular mediator of cell adhesive and cytoskeletal responses to thrombospondin-1, *EMBO J.*, **17**, 4964-4974 (1998).
- 16) F. Denizot and R. Lang, Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *J. Immunol. Methods*, **89**, 271-277 (1986).
- 17) W.T. Godbey, K.K. Wu and A.G. Mikos, Size matters : Molecular weight affects the efficiency of poly(ethylenimine) as a gene delivery vehicle, *J. Biomed. Mater. Res.*, **45**, 268-275 (1999).
- 18) W.T. Godbey, K.K. Wu and A.G. Mikos, Poly(ethylenimine) and its role in gene delivery, *J. Control Release*, **60**, 149-160 (1999).