

Novel Cell Permeable Peptide Based on Multi Basic Furin–dependent Cleavage Site of Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein

Junhyung Cho^{1,3}, Hwajung Yi¹, Mi-Seon Lee^{1,4}, Chan Hee Lee³, Chun Kang^{2*} and Kisoan Kim^{1*}

¹Division of Viral Disease Research, Center for Infectious Diseases Research,
Korea National Institute of Health, Cheongju, Korea

²Division of Viral Diseases, Center for Laboratory Control of Infectious Diseases,
Korea Centers for Disease Control and Prevention, Cheongju, Korea

³Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

⁴Department of Life Science and Technology, Pai Chai University, Daejeon, Korea

Corresponding

Chun Kang

Division of Viral Diseases, Center for
Laboratory Control of Infectious Diseases,
Korea Centers for Disease Control and
Prevention, 187, Osongsaengmyeong2-ro,
Cheongju, Chungcheongbuk-do, 28159,
Korea.

Phone : +82-43-719-8190

Fax : +82-43-719-8219

E-mail : chunkang@korea.kr

Kisoan Kim

Division of Viral Disease Research, Center
for Infectious Diseases Research, Korea
National Institute of Health, 187,
Osongsaengmyeong2-ro, Cheongju,
Chungcheongbuk-do, 28159, Korea.

Phone : +82-43-719-8410

Fax : +82-43-719-8459

E-mail : tigerkis@nih.go.kr

Received : May 04, 2018

Revised : May 14, 2018

Accepted : May 23, 2018

No potential conflict of interest relevant to
this article was reported.

Copyright © 2018 Journal of Bacteriology
and Virology

©This is an Open Access article distributed
under the terms of the Creative Commons
Attribution Non-Commercial License
([http://creativecommons.org/
license/by-nc/3.0/](http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/)).

Cell permeable peptide (CPP) is able to transport itself or conjugated molecules such as nucleotides, peptides, and proteins into cells. Since short peptide of human immunodeficiency virus-1 Tat has been discovered as CPP, it has been continuously studied for their ability to transport heterologous cargoes into cells. In this study, we have focused on the fusion protein of respiratory syncytial virus (RSV), which has six basic amino acids in multi basic furin-dependent cleavage site (MBFCS) required to be cationic CPP. To develop more efficient CPP, the sequence, which linked two MBFCS, was synthesized (called RS-CPP). To assess cell permeable efficiency of RS-CPP or MBFCS, the peptides was conjugated with fluorescein isothiocyanate, and cell permeable efficiency was measured by fluorescence-activated cell sorting. Cell permeability of RS-CPP or MBFCS was increased in a dose-dependent manner, but RS-CPP showed more efficient cell permeability than MBFCS in MDCK, HeLa, Vero E6, and A549 cells. To evaluate whether RS-CPP can transport its conjugated functional peptide (VIVIT) in CD8+ T cell, it was confirmed that IL-2 and β -galactosidase expression were significantly inhibited through selective block of nuclear factor activated T-cell. To investigate endocytic pathways, Cre-mediated DNA recombination (loxP-STOP-loxP-LacZ reporter system) was investigated with divergent endocytosis inhibitors in TE671 cells, and RS-CPP endocytosis is occurred via binding cell surface glycosaminoglycan and clathrin-mediated endocytosis, or macropinocytosis. These results indicated that RS-CPP could be a novel cationic CPP, and it would help understanding for delivery of biologically functional molecules based on viral basic amino acids.

Key Words: Cell permeable peptide, Multi basic furin-dependent cleavage site, Respiratory syncytial virus

INTRODUCTION

세포 투과성 펩타이드(cell permeable peptide, CPP)는 그 자체뿐 아니라 이에 연결되어 있는 oligonucleotides, 펩타이드, 단백질 등의 물질들을 세포 내로 운반할 수 있는 기능을 가지고 있다 (1~4). 그러므로, CPP는 유전자 기반 치료, 펩타이드 또는 단백질을 이용한 치료 등에 필요한 물질들의 효과적인 세포 내 전달을 위해 지속적으로 연구되고 있다 (1, 4).

Table 1. Amino acid sequences of MBFCS and RS-CPP

Peptide	Sequence	Location of FITC
MBFCS	VSIS KKRKRRF	N-term FITC
RS-CPP	VSIS KKRKRRF VSIS KKRKRRF	N-term FITC

Bold letters represent multi basic furin-dependent cleavage site of fusion protein.

CPP는 type 1 인간면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency Virus-1, HIV-1)의 TAT 단백질에서 처음 발견되었는데, TAT 단백질의 짧은 양전하 펩타이드(RKKRRQRRR, 49-57, Tat) 부분이 세포 내 투과성을 갖는 것으로 알려졌다 (5~7). 이러한 사실이 밝혀진 후, 염기성 아미노산을 기반으로 하는 CPP에 대한 연구가 진행되었고, 고양이 허피스바이러스 외피(coat)단백, HIV-1 Rev 단백질, poly-arginine 등의 다양한 염기성 아미노산 기반의 CPP들이 개발되었다 (1, 2, 8, 9). 염기성 아미노산 기반 CPP의 구조적인 특징은 최소 6개의 아르기닌 또는 라이신 잔기를 가지고 있으며, 아르기닌의 숫자가 세포 투과성에 중요한 영향을 미치며, 길이는 약 10~30개 사이의 아미노산으로 이루어진 것으로 보고되어 있다 (8, 10).

호흡기 세포융합 바이러스(Respiratory syncytial virus, RSV)는 외막(envelop)을 가진 음성 가닥 RNA 바이러스로 *Paramyxoviridae* 과, *Pneumovirus* 속에 속한다. RSV는 attachment (G)와 fusion glycoprotein (F)의 두 개의 표면 단백질을 가지고 있고, 이들은 숙주 세포에의 부착 및 세포막과 바이러스의 융합 과정에 관여하는 것으로 알려져 있다 (11). 융합 단백질은 특히 감염 세포에서 RSV의 특징인 주변 세포와의 접합(syncytium)을 일으키는 역할을 하는데, 이를 위해서는 융합 단백질에 존재하는 multi basic furin-dependent cleavage site (KKRKRR, MBFCS)가 세포 내 존재하는 furin 단백질 절단 효소에 의해 절단되어야 한다 (12). MBFCS는 Arg-X-(Arg/Lys)-Arg (X is any amino acids) 서열을 포함하는 것으로 알려져 있는데 (13, 14), 이 부위는 다수의 아르기닌으로 이루어져 있기 때문에, 이 부분이 염기성 아미노산 기반의 새로운 CPP가 될 수 있을 것이라는 가설 하에 본 연구를 진행하였다. 또한, 염기성 기반의 CPP는 염기성 아미노산 잔기의 수에 따라 영향을 받기 때문에, MBFCS를 연결하여 합성한 2xMBFCS (RS-CPP)이 보다 높은 세포 투과성을 가질 수 있는지 확인하였다. 아울러, 제작된 RS-CPP의 세포 선택적 적용을 위해 세포 투과 방식 기전을 확인하였다.

MATERIALS AND METHODS

세포 배양

A549, HeLa, Vero-E6 세포(American Type Culture Collection, ATCC; Manassas, VA, USA)는 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS; Gibco, Waltham, MA, USA)와 1% (v/v) penicillin/streptomycin (PS; Gibco)이 함유된 DMEM (Gibco) 배지에서 배양하였다. B3Z CD8+ T 세포(Lonza, Basel, Switzerland)는 5% FBS와 1% PS이 함유된 RPMI 1640 (Gibco) 배지에서 배양하였다. JAWSII 세포(ATCC)는 20% FBS, 1% PS, and 5 µg mouse granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)이 함유된 MEM 배지에서 배양되었다. MDCK 세포(ATCC)는 10% FBS와 1% PS가 함유된 MEM (Gibco) 배지에서 배양하였다. 모든 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

펩타이드 합성

MBFCS, RS-CPP-FITC, RS-CPP-VIVIT, RS-CPP-VEET는 Fmoc chemistry를 이용한 solid-phase 방법(Anygen, Gwang-ju, Korea)으로 합성하였다. 합성된 펩타이드들은 C18 HPLC column을 이용하여 정제하였고, MALDI-TOF (Axiha-CFR, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용한 단백질 질량분석을 통해 펩타이드를 확인하였다. 이 실험에 사용한 펩타이드 서열은 Table 1, 2에 표시하였다.

MBFCS와 RS-CPP의 세포 투과

실험 전일 12 well-plate에 각각 2 x 10⁵개의 MDCK, HeLa, VERO-E6, A549 세포를 분주하여 12시간 배양하였다. 각각의 세포들은 PBS로 3회 세척한 후, FITC, FITC-MBFCS, FITC-RS-CPP 펩타이드를 각각 5, 10, 15 µM의 농도로 30분간 처리하였다. 세포 간의 분리를

Table 2. Amino acid sequences of RS-CPP and R11 conjugated with VIVIT and VEET

Peptide	Sequence
RS-CPP-VIVIT	VSIS KKRKRR RV VSISKKRKRR FMAGPHPVIVITGPHEE
RS-CPP-VEET	VSIS KKRKRR RV VSISKKRKRR FMAGPHPVEETGPHEE
R11-VIVIT	RRRRRRRRRRRMAGPHPVIVITGPHEE
R11-VEET	RRRRRRRRRRRMAGPHPVEETGPHEE

Bold letters represent multi basic furin-dependent cleavage site of fusion protein.

위하여, 0.05% trypsin-EDTA (Gibco)를 이용하여 5분간 배양하고 세포 표면과 FITC의 결합을 제거하기 위하여 0.05% trypsin-EDTA (Gibco)가 포함된 PBS로 세포들을 3회 세척하였다. 이 후, 세포들을 4% paraformaldehyde를 이용하여 10분간 고정시킨 후, PBS를 이용하여 3회 세척하였다. 각각의 세포들은 cytomics FC500 (Beckman Coulter Inc, Brea, CA, USA)를 이용하여, 세포주당 10,000개의 세포에서 발현되는 FITC의 평균형광강도(mean fluorescence intensity, MFI)를 분석하였다.

Interleukin-2와 β -galactosidase 발현

Ovalbumin (OVA, SIIFEKL 257-264)의 처리에 의해 T 세포활성인자(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)가 활성화 되는 수용체를 가진 B3Z T 세포와 B3Z T 세포와 동일 종으로 OVA 항원을 표출하는 세포인 JAWSII 세포를 함께 배양한 세포에 각각 RS-CPP에 VIVIT (MAGPHPVIVITGPHEE, OVA 처리에 의해 B3Z T 세포에서 NFAT의 활성을 억제시키는 펩타이드), 또는 RS-CPP에 VEET (MAGPHPVEETGPHEE, VIVIT 펩타이드에 대한 음성 대조군 펩타이드)를 부착하였다 (15). 세포 투과성을 가진 양성 대조군 펩타이드 R11에 VIVIT (R11-VIVIT) 또는 VEET (R11-VEET) 펩타이드를 붙이고, 각각의 펩타이드에 대해 15, 30, 50 μ M의 농도로 20분간 처리하였다. 이후, 세포들을 6-well plates에 분주한 후, 5 μ M의 OVA (InvivoGen, San Diego, CA, USA) 또는 OVA에 의해 활성화 되는 NFAT을 억제시키는 면역 억제제인 cyclosporine A (CYC A, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 100 nM 처리하여 12시간 배양하였다 (15). 배양 후, 상층액을 이용하여, B3Z T 세포에서 NFAT의 활성화에 의해 발현되는 IL-2의 양을 OptEIA IL-2 assay kit (BD, San Jose, CA, USA)를 이용하여 확인하였다. 또한, NFAT의 활성화에 의해 세포에서 발현되는 β -galactosidase 발현양은 β -galactosidase 효소 측정 방법(Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 측정하였다 (15~18).

Cre 단백질에 의한 DNA 재조합

Cre cDNA와 RS-CPP-Cre cDNA는 pET21 vector (Novagen, Madison, WI, USA)에 다음과 같은 프라이머를 이용하여 클로닝 하였다. 프라이머의 염기서열은 forward 5'-CCGCCGCTAGCCACCACCACCACCACGTGTCCCCAAGAAGAAGAGGAAGGTGTCCA-TGGCCAATTACTGACC-3', reverse 5'-CCGCCGCTCGAGTCATCATTGAGGACGACGACGTTGACGACGTTTTTTACGACCTTGAGG-ACGACGACGTTGACGACGTTTTTTACGACCACCACCACTACCACTCAGATCTTCTCAGAAATAAG-3'이다.

이들은 BL21 *Escherichia coli* (ThermoFisher, Waltham, MA, USA)에서 발현시켜, 6xHis-tag을 이용하여 Ni-NTA column과 ion exchange column (Enzymomics, Daejeon, Korea)을 이용하여 정제하였다. RS-CPP-Cre의 침투 기전을 확인하기 위해 loxP-STOP-loxP-LacZ 유전자를 포함하고 있는 TE671 세포(Allele Biotechnology, San Diego, CA, USA)를 Lab-Tek II 8 chamber slides (Sigma)에 12시간 배양하고, 세포 침투 저해제로는, chondroitin sulfate (CHN, 10 μ g/ml, Sigma), heparin (HEP, 10 μ g/ml, Sigma), cytochalasin D (CYD, 50 μ g/ml, Sigma), amiloride (AML, 10 μ M, Sigma), dynasore (DYN, 80 μ M, Sigma), chlorpromazine (CPZ, 10 μ g/ml, Sigma), nystatin (NYS, 50 μ g/ml, Sigma)를 각각 30분간 처리하였다(amiloride와 chlorpromazine은 15분간 처리). 이후, FBS가 포함되지 않은 DMEM 배지로 2회 세척 후, 2 μ M 농도의 RS-CPP-Cre를 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 세포들은 PBS로 2회 세척 후, β -galactosidase 염색 kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하여 염색하고 세포 수를 관찰하였다.

세포 활성 측정

실험에 사용된 펩타이드들과 세포 투과 저해제들은 각각 실험에 사용된 농도와 세포에서 Ez-cytox (DAEILLAB SERVICE Co., Seoul, Korea)

을 이용하여 세포 활성을 측정하였다. Melittin (5 μ M, Sigma)는 세포 독성에 대한 양성 대조군으로 사용하였다.

통계 분석

실험에 사용된 모든 결과들은 평균값 \pm 표준편차($n = 3$)로 나타내었다. 결과들은 student t -test을 이용한 비교를 통해, $p < 0.05$ 이하인 값에 대해 통계적인 유의성을 가지는 것으로 하였다.

RESULTS

MBFCS와 RS-CPP의 세포 투과성

RSV 융합 단백질의 MBFCS가 세포 투과성을 가지는 지와 염기성 아미노산 기반의 CPP로서의 보다 높은 세포 투과 효율성을 가질 수 있는지에 대한 확인을 위하여, MBFCS에 MBFCS를 병렬로 하나 더 연결한 2xMBFCS (RS-CPP)를 제작하였다. MBFCS와 RS-CPP의 세포 투과성을 특정하기 위하여 각각 펩타이드의 N-말단에 FITC를 붙이고(FITC-MBFCS, FITC-RS-CPP), 각각 5, 10, 15 μ M의 농도로 MDCK 세포에 처리하였다. 그 결과, FITC-RS-CPP의 세포 투과율은 FITC만 세포에 처리한 음성 대조군에 비해 각각 처리 농도에 따라 18-, 28-, 43배로 증가함을 보였고, FITC-MBFCS의 세포 투과율은 각각 1.7-, 2.3-, 2.7배가 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 1A). 또한, FITC-MBFCS와 FITC-RS-CPP가 다양한 세포를 투과할 수 있는지 확인하기 위하여, HeLa, VERO-E6, A549 세포에 각각 15 μ M의 FITC-MBFCS와 FITC-RS-CPP를 처리하였고, 그 결과 FITC-RS-CPP는 HeLa, VERO-E6, A549 세포에서 FITC만을 처리한 음성 대조군에 비해 각각 20-, 60-, 8배 높은 투과율을 보이는 것을 확인하였다. 반면, FITC-MBFCS의 경우 FITC-RS-CPP와는 달리 각각의 세포에서 3-, 8-, 2.5배의 투과율 상승이 확인되었다(Fig. 1B). FITC-MBFCS와 FITC-RS-CPP 펩타이드들에 대한 세포 독성을 MDCK 세포에서 확인하였다. 그 결과, 음성 대조군과 비교하였을 때, 25 μ M의 처리 농도까지 세포 활성이 약 95%를 넘는 것으로 확인되었다(Fig. 1C).

RS-CPP의 펩타이드 세포 내 수송

RS-CPP가 연결된 펩타이드를 세포 내로 효율적으로 수송할 수 있는지를 확인하고자, T 세포활성인자(nuclear factor of activated T-cells, NFAT)의 기능을 억제시키는 것으로 알려진 VIVIT 펩타이드(MAGPHPVIVITGPHEE)를 연결한 RS-CPP-VIVIT과 음성 대조군 펩타이드(VEET, MAGPHPVEETGPHEE)를 연결한 RS-CPP-VEET를 제작하였다 (15). 이들을 OVA 펩타이드 특이적 수용체를 가지는 CD8+ T 세포인 B3Z T 세포에 각각 처리하였다. B3Z T 세포는 OVA에 의해 NFAT이 활성화 되고, 그 결과로 IL-2를 발현하며, 세포 내에서는 β -galactosidase를 안정적으로 발현하는 특징을 가졌다 (16~18). 이 시스템을 이용하여 본 실험에서는 15, 30, 50 μ M의 RS-CPP-VIVIT 또는 -VEET을 전 처리하고, 5 μ M의 OVA를 처리하였을 때, IL-2 발현이 OVA만 처리한 양성 대조군에 비해 유의적으로 약 75% (15 μ M RS-CPP-VIVIT) 감소하는 결과를 확인하였다(Fig. 2A). 또한, 세포 내 β -galactosidase의 발현량은 15 μ M RS-CPP-VIVIT을 처리하였을 때 OVA만 처리한 양성 대조군에 비해, 약 45%의 발현량이 감소되는 결과를 보였다(Fig. 2B). 세포 내 펩타이드 전달 양성 대조군으로 사용된 R11-VIVIT 펩타이드는 15 μ M 농도에서 IL-2와 β -galactosidase의 발현을 약 50% 감소시키는 것으로 확인되었고, OVA에 의해 활성화된 NFAT의 억제제로 사용된 CYC A는 OVA만 처리한 그룹에 비교하여, 각각 IL-2의 발현량은 20%, β -galactosidase는 약 40% 정도로 감소 하였다(Fig. 2A and 2B). 이 실험에 사용된 펩타이드들의 세포 독성을 확인해 보았다. RS-CPP-VEET과 R11-VEET 펩타이드는 세포 독성을 거의 보이지 않았다. 하지만, B3Z T 세포의 NFAT 활성화 억제 물질인 CYC A와 RS-CPP-VIVIT, R11-VIVIT은 B3Z T 세포와 JAWSII를 같이 배양한 세포에서 독성이 있음을 확인하였다(Fig. 2C).

RS-CPP의 Cre 단백질 전달과 세포 투과 방식

RS-CPP의 단백질 수송 능력과 세포 투과 방식을 확인하기 위하여, RS-CPP에 Cre 단백질을 붙여, loxP-STOP-loxP-LacZ 발현 유전자가 들어있는 TE671 세포에 처리하였다. 이 세포는 Cre 단백질이 들어가면, STOP 서열을 둘러싸고 있는 loxP 유전자를 Cre 단백질이 파괴하여 STOP 서열을 제거하게 되고, 세포에서 표지 단백질인 LacZ가 발현이 되는 특징을 가지고 있다(Fig. 3A) (19, 20). 따라서, RS-CPP-Cre를 TE671 세포에 처리하고, 다양한 세포 투과 저해제들을 함께 처리하여 RS-CPP의 단백질 전달 능력과 세포 투과 방식을 LacZ가 발현된 세포의 수를 통해 확인하였다. 2 μ M의 RS-CPP-Cre 또는 음성 대조군인 Cre만을 처리한 결과 RS-CPP가 세포 내로 Cre 단백질을 수송할 수 있음을 확인하였다(Fig. 3B의 a, 3B의 b). RS-CPP의 세포 투과 기전을 분석하기 위하여 세포 표면의 glycosaminoglycan (GAG)들의 결합 저해제로 알려진 heparin과 chondroitin sulfate의 처리 결과 90% 이상의 RS-CPP-Cre의 투과 억제현상이 나타남을 확인하였

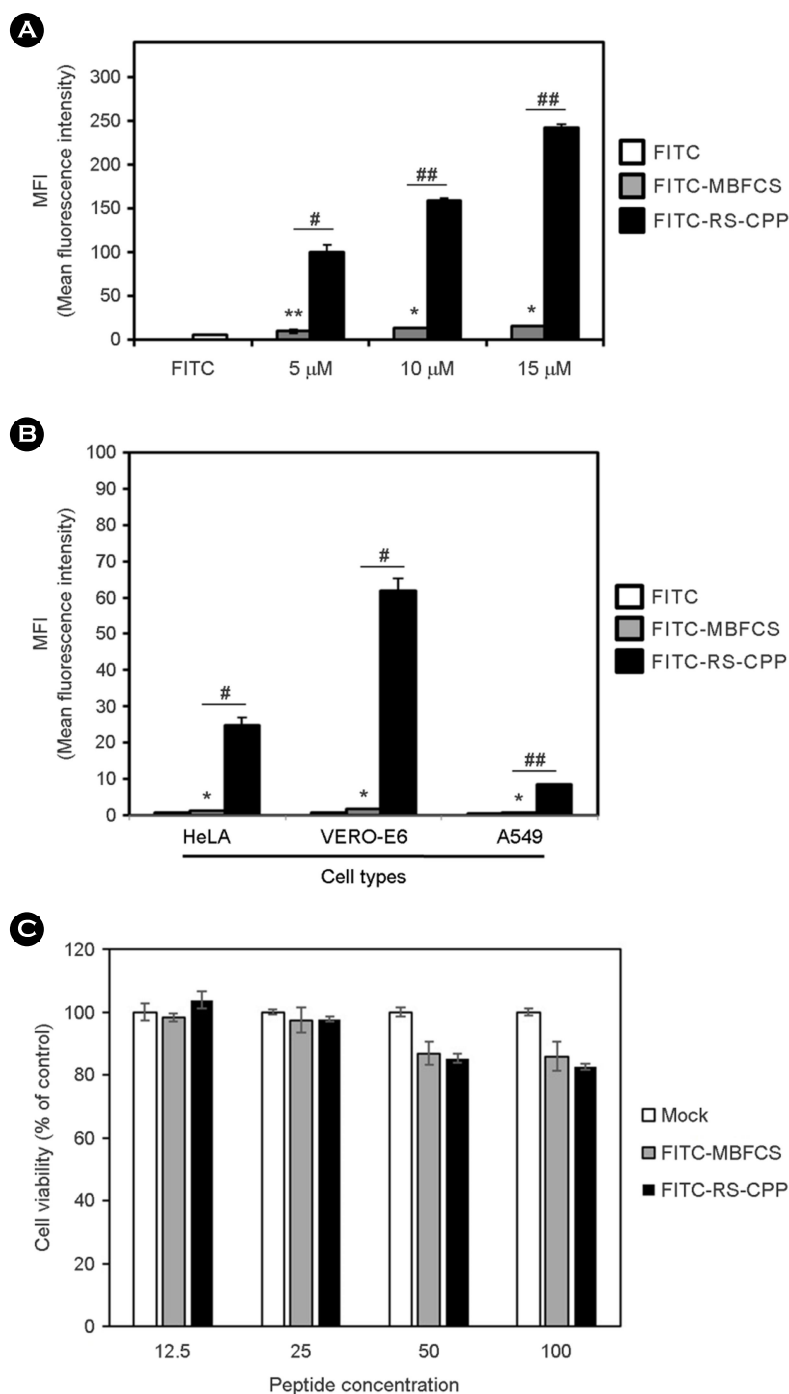


Figure 1. Cell permeability of MBFCS and RS-CPP in various cells. (A) Cell permeability of FITC-MBFCS or FITC-RS-CPP in MDCK cells. MDCK cells were treated with indicated concentration of FITC-MBFCS (gray bar) or FITC-RS-CPP (black bar) for 30 m. After incubation, the cells were washed three times with PBS, and mean fluorescence intensity (MFI) was measured by FACS. (B) Cell permeability of FITC-MBFCS or FITC-RS-CPP in HeLa, VERO-E6, and A549 cells. 15 μ M of FITC-MBFCS or FITC-RS-CPP were treated in HeLa, VERO-E6, and A549 cells, respectively, for 30 m, and the cells were washed three times with PBS. MFI was measured by FACS. The MFI of FITC (open bar) is individually set to 1, and the rest were plotted relative to that value. Error bars represent \pm SD. Statistically significant different values between FITC and FITC-MBFCS represented as $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ and between FITC-MBFCS and FITC-RS-CPP as $#p < 0.05$ and $##p < 0.01$. (C) Cell viability measurement in MDCK cells. MDCK cells were treated with indicated concentrations (serial diluted from 100 μ M to 12.5 μ M) of FITC-MBFCS or FITC-RS-CPP, respectively, and incubated for 30 m. Cell viability was measured using an Ez-cytox kit, according to manufacturer's protocol. The O.D. value of mock was set to 100% and all other values were plotted as relative values.

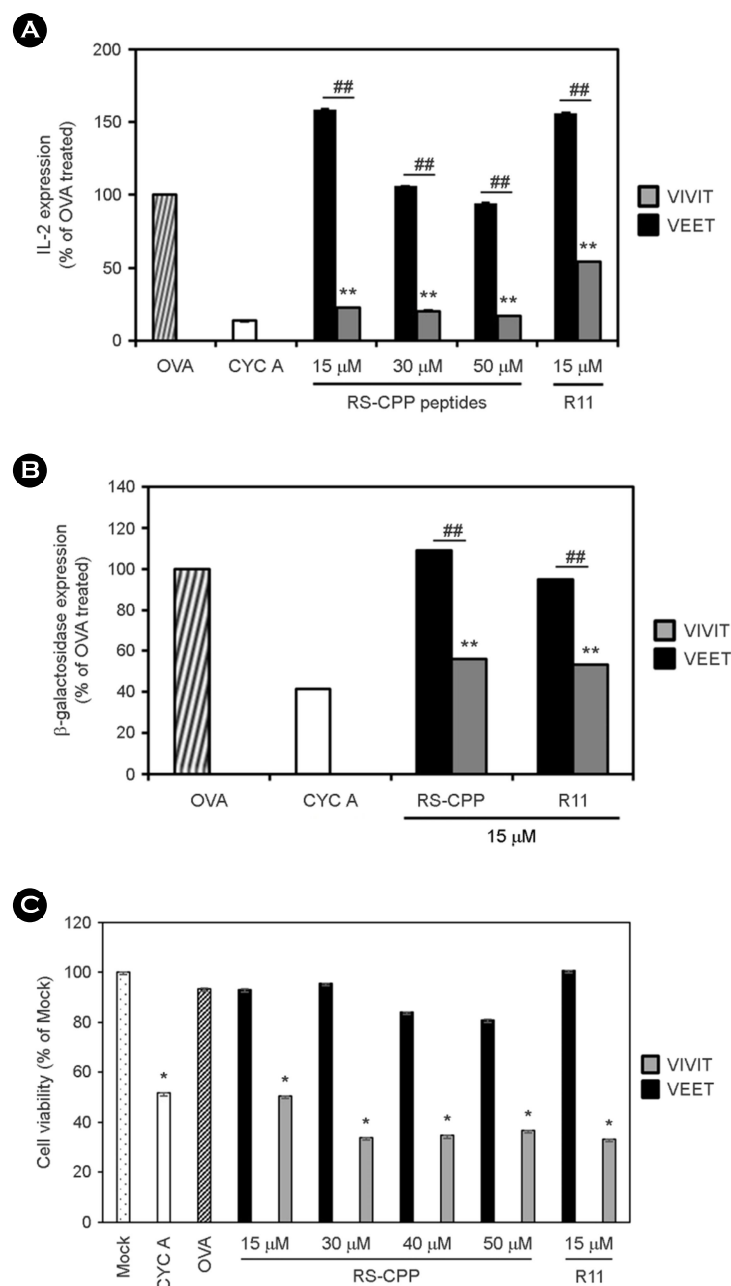


Figure 2. Cell permeability of RS-CPP with VIVIT peptide. Expression of (A) IL-2 or (B) β -galactosidase by the treatment of indicated concentration of RS-CPP or R11 conjugated with VIVIT or VEET peptide. Co-cultured B3Z (CD8+ T cells bearing OVA-peptide specific TCR stimulation) and JAWSII (syngenic antigen presenting cell for B3Z) cells were treated with indicated concentration of RS-CPP-VIVIT (gray bars) or -VEET (black bars) peptide, respectively, for 30 m. Subsequently, the cells were incubated for 12 h under presence of 5 μ M OVA-peptide (stripe bar), and expression level of IL-2 or β -galactosidase was measured by optical density. Cyclosporin A (CYC A, open bar) was used as an inhibitor of T cell activation, and OVA-peptide was used as an activator of NFAT in B3Z T cell. R11 was used as a cell penetrating vehicle. Error bars represent \pm SD. The IL-2 or β -galactosidase expression level of OVA was set to 100%, respectively, and the rest were plotted relative to that value. Error bars represent \pm SD. Statically significant different values between OVA and RS-CPP-VIVIT represented as $**p < 0.01$ and between RS-CPP-VEET and RS-CPP-VIVIT as $##p < 0.01$. (C) Cell viability measurement with RS-CPP-VIVIT and -VEET peptides in Co-cultured B3Z and JAWSII cells. The co-cultured cells were treated with indicated concentrations of RS-CPP-VIVIT, RS-CPP-VEET, R11-VIVIT, and R11-VEET peptide, respectively, and incubated for 30 m. Cell viability was measured using a cell viability test kit (Ez-cytox), according to manufacturer's protocol. The O.D. value of mock was set to 100% and all other values were plotted as relative values. Statically significant different values between Mock and RS-CPP-VIVIT $**p < 0.01$. Asterisk represented statistically significantly differences compared with mock ($*p < 0.05$).

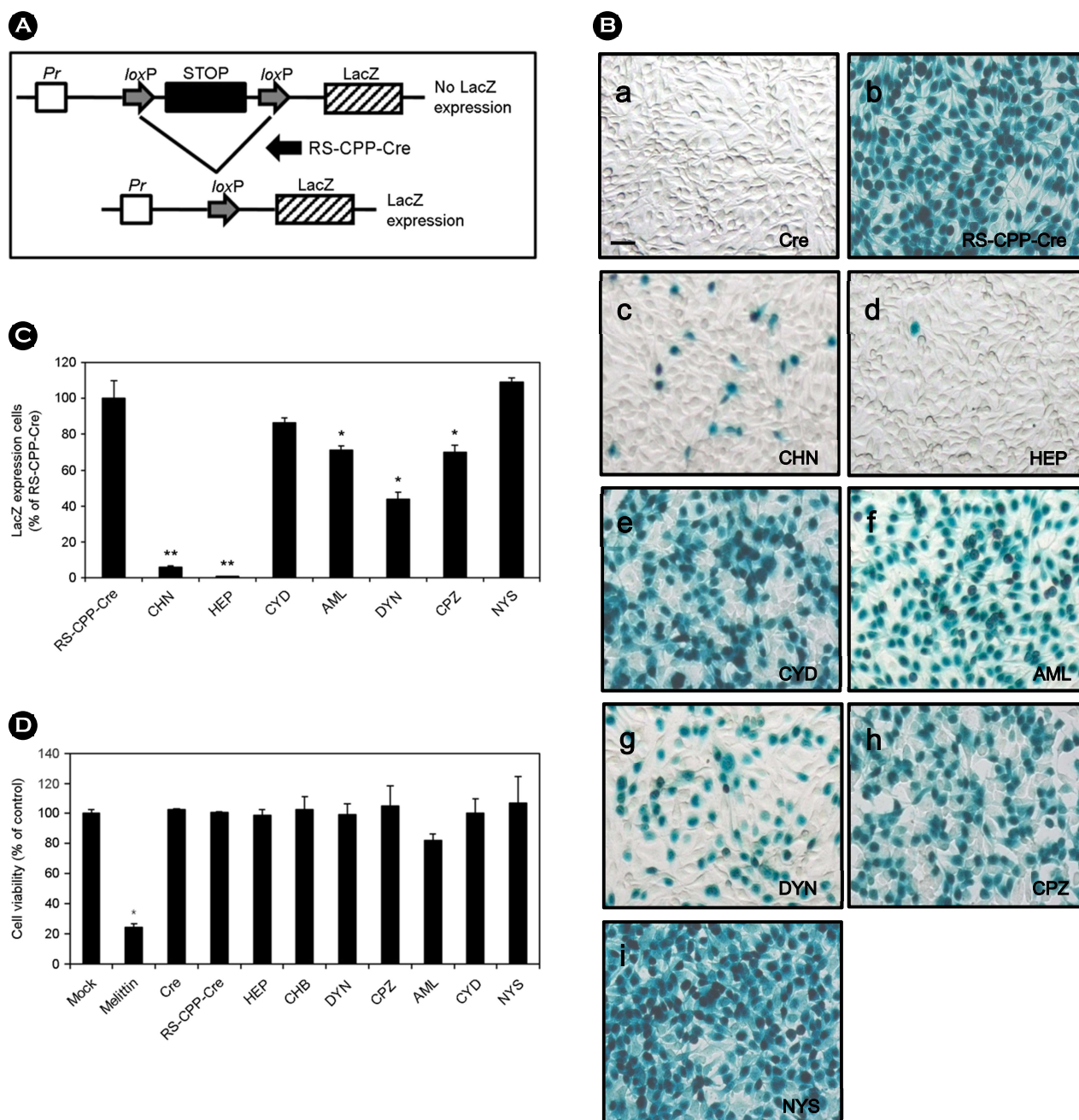


Figure 3. RS-CPP mediated DNA recombination. (A) Schematic illustration of loxP-STOP-loxP-LacZ expression system in TE671 cells. Internalization of RS-CPP-Cre (DNA recombinase) eliminates the STOP region flanked by loxP sites, resulting in LacZ expression in TE671 cells. (B) Light microscopy images of LacZ expression in TE671 cells by treating (a) 2 μ M of Cre, (b) RS-CPP-Cre, or (c-i) RS-CPP-Cre with indicated endocytic inhibitors. TE671 cells were pretreated with indicated inhibitors for 30 m and incubated under presence of 2 μ M of RS-CPP-Cre for 48 h. Subsequently, LacZ expression was examined by X-gal staining under light microscope. Scale bar represents 20 μ M. (C) Relative % values of LacZ expression cells between RS-CPP-Cre and the other inhibitor treated cells. LacZ expression cells of RS-CPP-Cre were set to 100%, and the rests were shown as relative value. The cells were counted from three different fields of each sample (Magnification; 200x). Values significantly different from RS-CPP-Cre were represented as * p < 0.05 and ** p < 0.01. (D) Cell viability measurement with RS-CPP-Cre and endocytic inhibitors in TE671 cells. TE671 cells were treated with 2 μ M of Cre and RS-CPP-Cre, or RS-CPP-Cre with indicated endocytic inhibitors, respectively, for 30 m (AML and CPZ for 15 m). 5 μ M of melittin was used as a cytotoxicity control. Cell viability was measured a cell viability test kit (Ez-cytox), according to manufacturer's protocol. The O.D. value of mock was set to 100% and all other values were plotted as relative values. Statistically significant different values between control and the endocytic inhibitors were represented as * p < 0.05.

다(Fig. 3B의 c, 3B의 d). 또한, clathrin 매개 세포 투과를 억제하는 제제인 dynasore (DYN)과 chlorpromazine (CPZ)를 처리하였을 경우, 각각 60%와 30%의 투과 억제가 확인되었고(Fig. 3B의 g, 3B의 h), macropinocytosis의 저해제인 amiloride (AML)와 cytochalasin D (CYD)는 각각 약 30%와 16%의 투과 억제를 나타내었다(Fig. 3B의 e, 3B의 f). 반면, caveolar-mediated endocytosis 저해제인 nystatin (NYS)을 처리한 경우에는 RS-CPP-Cre에 의한 LacZ의 발현이 억제되지 않는 것을 확인하였다(Fig. 3B의 i). RS-CPP-Cre만을 처리한 그룹의 β -galactosidase가 발현된 세포 수를 기준으로, 여러 가지 세포 투과 저해제를 처리한 그룹들의 세포 수를 상대적으로 비교하여 나타내었다(Fig. 3C). 또한, 본 실험에서 사용한 RS-CPP-Cre와 세포 투과 저해제들이 TE671 세포에서 독성을 가지고 있는지를 확인해 보았다. 그 결과, 세포 독성에 대한 양성 대조군으로 사용된 멜리탄을 제외한 실험에 사용된 모든 세포 투과 저해제들이 실험에 사용된 농도에서 세포 독성을 나타내지 않음을 확인 하였다(Fig. 3D).

DISCUSSION

본 연구에서는 RSV 융합 단백질의 MBFCS를 기반으로 하는 새로운 RS-CPP를 개발하였다. RS-CPP는 HeLA, VERO-E6, MDCK, A549, B3Z, TE671 세포와 같은 다양한 세포에서 RS-CPP에 연결된 펩타이드 및 단백질을 효율적으로 세포 내로 전달할 수 있음을 확인하였다. 또한, RS-CPP는 세포 표면의 heparan, chondroitin sulfate 등의 GAG와 결합하여 clathrin 매개 세포 투과와 macropinocytosis 방식을 이용하여 세포를 투과하는 것을 확인하였다.

본 연구에서 표적으로 한 RSV 융합 단백질의 MBFCS는 3개의 아르기닌과 3개의 라이신으로 구성되어 있다. 이들은 그 자체만으로도 세포 투과성을 보였으며, 이는 염기성 아미노산 기반의 CPP는 최소 6개의 염기성 아미노산이 있으면 세포 투과가 가능하다는 보고와 일치한다 (10). 하지만, 기존에 보고된 CPP보다 좋은 투과 효율을 나타내는 염기성 아미노산 기반의 CPP를 개발하기 위해 MBFCS를 병렬로 연결하여(RS-CPP) 아르기닌 6개와 라이신 6개를 포함하는 RS-CPP를 합성하였다. RS-CPP는 MBFCS를 단독으로 사용할 경우보다 다양한 세포에서의 투과 효율을 약 10배 이상 증가시킬 수 있는 것을 확인하였다. 이 결과는 폴리아르기닌 기반의 CPP가 아르기닌이 8에서 11개를 포함할 때, 최대의 세포 투과 효율을 보인다는 Futaki와 Hsieh 등의 결과와 일치한다 (8, 9). 따라서, 본 연구에서 개발한 RS-CPP는 염기성 아미노산 기반의 CPP 특성을 가진다는 것을 의미한다.

CPP로서 가장 중요한 세포 내 물질 전달 능력을 확인하기 위하여, T 세포활성인자(NFAT)의 발현을 세포질 내에서 억제할 수 있는 VIVIT 펩타이드 및 Cre 단백질에 의해 세포 핵 내에서 유전자 재조합에 의해 전사가 활성화 되는 loxP-STOP-loxP-LacZ 리porter 시스템을 이용하였다 (15, 20). 세포 투과성 펩타이드로 사용되고 있는 폴리아르기닌 펩타이드(R11)를 양성 대조군으로 비교하였을 때, RS-CPP의 세포 내 물질 전달의 효율은 R11과 유사한 효율을 가진 것으로 확인되었다(Fig. 2A, B). 또한, RS-CPP가 사용되기 위해 필요한 세포 활성 실험 결과는 MBFCS와 RS-CPP 모두 세포 투과 효율이 좋은 농도인 15 μ M에서 독성이 없는 것으로 확인되었다. 하지만, Fig. 2C의 결과에서는 RS-CPP-VIVIT의 처리에 의해 생존율이 음성 대조군에 비해 약 40% 정도 낮은 것이 확인되었다. 하지만, 이 결과는 VIVIT 펩타이드에 의해 B3Z T 세포의 NFAT이 억제되어 일어나는 현상으로 생각된다. RS-CPP-VEET 펩타이드와 R11-VEET에서는 세포 독성을 나타내지 않았고, 현재 면역 억제제로 사용되고 있는 NFAT 저해제인 CYC A에서는 오히려 RS-CPP-VIVIT보다 더 높은 세포 독성 확인되었다. 따라서, Fig. 2C의 세포 독성 결과는 RS-CPP에 의한 것이 아니라 VIVIT 펩타이드에 의한 것으로 생각된다.

최근 개발되고 있는 CPP들은 세포 특이적인 선택적 투과 기능을 가질 수 있도록 고안되고 있다. 이들은 특정 세포의 선택적 치료 등의 목적으로 사용되기 때문에 세포 선택적인 투과의 필요성이 중요하다 (21, 22). 일반적으로 CPP는 다양한 세포 투과 방식을 이용하는 것으로 알려져 있으므로 개발된 CPP를 선택적으로 활용하기 위해서는 세포 투과 기작의 확인 과정이 필수적이다. 그 예로, 염기성 아미노산 기반의 대표적인 CPP인 HIV-1 Tat는 macropinocytosis 방식을 이용하여 세포를 투과하는 것으로 보고되어 있다 (5). 하지만, 다른 연구에서는 Tat에 결합되어 있는 물질의 특성에 따라 clathrin을 매개로 하여 세포를 투과하는 결과들도 보고되었다 (23, 24). 본 연구에서 확인한 RS-CPP의 세포 투과 방식은 세포 표면의 heparan, chondroitin sulfate 등의 GAG들과 결합한 후, clathrin을 매개로 하여 세포를 투과하는 방식과 macropinocytosis를 이용하는 투과 방식을 모두 사용한다는 것을 확인하였으나, nystatin (NYS)을 처리 유무에 따른 세포 투과 기능에는 변화가 없는 것으로 보아 caveolar 매개 세포 투과 방식은 사용하지 않는 것으로 생각된다.

본 연구에서 새롭게 개발한 RS-CPP는 다양한 세포에서 FITC 등의 표지 물질로부터 기능성 펩타이드와 단백질에 이르는 다양한 물질들을 세포질과 핵 내로 효율적으로 수송할 수 있음을 확인하였다. 또한, 여러 가지 세포 침투 저해제를 사용하여 RS-CPP의 세포 투과 기작을 규명함으로써, 선택적인 물질 수송에 적용할 수 있는 가능성을 확인하였다. 본 연구는 RSV의 융합 단백질에 존재하는 MBFCS (RS-CPP)가 세포 투과 기능이 있음을 최초로 확인하였다는 것에 의의가 있으며, 추후 인플루엔자바이러스 등의 다중 염기성 아미노산을 가

진 바이러스 단백질 유래 CPP의 개발과 이를 이용한 치료 전달 물질 개발에 도움이 될 것이라 생각한다.

ACKNOWLEDGEMENT

This research was supported by intramural grants from the Korea National Institute of Health 2011-N43001-00 and 2016-NI43001-00.

REFERENCES

- 1) Heitz F, Morris MC, Divita G. Twenty years of cell-penetrating peptides: from molecular mechanisms to therapeutics. *Br J Pharmacol* 2009;157:195-206.
- 2) Milletti F. Cell-penetrating peptides: classes, origin, and current landscape. *Drug Discov Today* 2012;17:850-60.
- 3) Mäe M, Langel Ü. Cell-penetrating peptides as vectors for peptide, protein and oligonucleotide delivery. *Curr Opin Pharmacol* 2006;6:509-14.
- 4) Rizzuti M, Nizzardo M, Zanetta C, Ramirez A, Corti S. Therapeutic applications of the cell-penetrating HIV-1 Tat peptide. *Drug Discov Today* 2015;20:76-85.
- 5) Wadia JS, Stan RV, Dowdy SF. Transducible TAT-HA fusogenic peptide enhances escape of TAT-fusion proteins after lipid raft macropinocytosis. *Nat Med* 2004;10:310-5.
- 6) Vivès E, Brodin P, Lebleu B. A truncated HIV-1 Tat protein basic domain rapidly translocates through the plasma membrane and accumulates in the cell nucleus. *J Biol Chem* 1997;272:16010-7.
- 7) Joliot A, Prochiantz A. Transduction peptides: from technology to physiology. *Nat Cell Biol* 2004;6:189-96.
- 8) Futaki S, Suzuki T, Ohashi W, Yagami T, Tanaka S, Ueda K, *et al*. Arginine-rich peptides An abundant source of membrane-permeable peptides having potential as carriers for intracellular protein delivery. *J Biol Chem* 2001;276:5836-40.
- 9) Hsieh JT, Zhou J, Gore C, Zimmern P. R11, a novel cell-permeable peptide, as an intravesical delivery vehicle. *BJU Int* 2011;108:1666-71.
- 10) Tünnemann G, Ter-Avetisyan G, Martin RM, Stöckl M, Herrmann A, Cardoso MC. Live-cell analysis of cell penetration ability and toxicity of oligo-arginines. *J Pept Sci* 2008;14:469-76.
- 11) McLellan JS, Ray WC, Peeples ME. Structure and function of respiratory syncytial virus surface glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2013;372:83-104.
- 12) González-Reyes L, Ruiz-Argüello MB, García-Barreno B, Calder L, López JA, Albar JP, *et al*. Cleavage of the human respiratory syncytial virus fusion protein at two distinct sites is required for activation of membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9859-64.
- 13) Klimstra WB, Heidner HW, Johnston RE. The furin protease cleavage recognition sequence of Sindbis virus PE2 can mediate virion attachment to cell surface heparan sulfate. *J Virol* 1999;73:6299-306.

- 14) Rawling J, Cano O, Garcin D, Kolakofsky D, Melero JA. Recombinant Sendai viruses expressing fusion proteins with two furin cleavage sites mimic the syncytial and receptor-independent infection properties of respiratory syncytial virus. *J Virol* 2011;85:2771-80.
- 15) Noguchi H, Matsushita M, Okitsu T, Moriwaki A, Tomizawa K, Kang S, *et al.* A new cell-permeable peptide allows successful allogeneic islet transplantation in mice. *Nat Med* 2004;10:305-9.
- 16) Karttunen J, Sanderson S, Shastri N. Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:6020-4.
- 17) Fiering S, Northrop JP, Nolan GP, Mattila PS, Crabtree GR, Herzenberg LA. Single cell assay of a transcription factor reveals a threshold in transcription activated by signals emanating from the T-cell antigen receptor. *Genes Dev* 1990;4:1823-34.
- 18) Chow CW, Rincón M, Davis RJ. Requirement for transcription factor NFAT in interleukin-2 expression. *Mol Cell Biol* 1999; 19:2300-7.
- 19) Xu Y, Liu S, Yu G, Chen J, Chen J, Xu X, *et al.* Excision of selectable genes from transgenic goat cells by a protein transducible TAT-Cre recombinase. *Gene* 2008;419:70-4.
- 20) Peitz M, Pfannkuche K, Rajewsky K, Edenhofer F. Ability of the hydrophobic FGF and basic TAT peptides to promote cellular uptake of recombinant Cre recombinase: a tool for efficient genetic engineering of mammalian genomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:4489-94.
- 21) Montrose K, Yang Y, Sun X, Wiles S, Krissansen GW. Xentry, a new class of cell-penetrating peptide uniquely equipped for delivery of drugs. *Sci Rep* 2013;3:1661.
- 22) Fang SL, Fan TC, Fu HW, Chen CJ, Hwang CS, Hung TJ, *et al.* A novel cell-penetrating peptide derived from human eosinophil cationic protein. *PLoS One* 2013;8:e57318.
- 23) Hakansson S, Jacobs A, Caffrey M. Heparin binding by the HIV-1 tat protein transduction domain. *Protein Sci* 2001;10: 2138-9.
- 24) Richard JP, Melikov K, Brooks H, Prevot P, Lebleu B, Chernomordik LV. Cellular uptake of unconjugated TAT peptide involves clathrin-dependent endocytosis and heparan sulfate receptors. *J Biol Chem* 2005;280:15300-6.