



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

비메틸화 CpG 첨가제와 OVA 항원이 도입된
dodecynyl modified 면역활성 DNA
나노입자의 제조



2016년 8월

부 경 대 학 교 대 학 원

화 학 과

박 해 인

이 학 석 사 학 위 논 문

비메틸화 CpG 첨가제와 OVA 항원이 도입된
dodecynyl modified 면역활성 DNA
나노입자의 제조

지도교수 곽민석

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2016년 8월

부경대학교대학원

화학과

박해인

박해인의 이학석사 학위논문을 인준함.

2016년 8월 26일



위 원 장 이학박사 박 선 주 (인)

위 원 이학박사 김 학 준 (인)

위 원 이학박사 곽 민 석 (인)

목차

목차	i
표 목록	iii
그림 목록	iv
요약 (한글)	vi
Abstract (English)	vii
I. 서론	1
1. 연구 배경	1
2. 연구 개요	2
3. 이론적 배경	4
3.1. CpG ODN & TLR-9	4
3.2. 수지상세포의 활성화	5
II. 실험 방법	7
1. DNA 나노입자의 제조	7
1.1. 지질 DNA의 합성	7
1.2. U4T, eCpG의 합성과 정제	9
1.3. U4T-eCpG 나노입자의 제조	14
1.4. Serum degradation 테스트	17
1.5. Td-CpG 비교	19
2. OVA가 추가된 U4T-eCpG-eOVA의 조제	20
2.1. azido-OVA	20

2.2. Hexynyl-cU4T의 합성	21
2.3. Click reaction	22
3. 동물 실험을 통한 면역 활성화 측정 방법	25
3.1. 동물 준비	25
3.2. 항체 준비	25
3.3. 수지상세포 전처리 및 유세포 분석	26
3.4. 사이토카인 분석	27
3.5. 비장세포 내 싸이토카인의 염색	28
3.6. BMDC 셀 테스트	28
III. 실험 결과 및 토의	29
1. U4T-eCpG 나노입자의 수지상세포 섭취	29
2. CpG 함량에 따른 면역활성 차이	31
3. 싸이토카인의 분비	33
4. eCpG 단일가닥과 U4T-eCpG 면역 활성화 비교	35
5. Td-CpG와 U4T-eCpG 면역 활성화 비교	36
6. BMDC 셀의 면역 활성화	37
IV. 결론	39
V. 참고문헌	41

표 목록

표 1. 각 TLR에 인식되는 리간드의 종류	5
표 2. DNA 합성 단계에 사용한 시약	12
표 3. 1q, 2q, 4q, 1q-Alexa의 조성	15
표 4. Td-CpG 올리고의 염기서열	20
표 5. 싸이토카인 PCR 프라이머의 염기서열	27



그림 목록

그림 1. 항원과 보조제가 포함된 백신의 면역 활성화 기능과 부작용	3
그림 2. 도데시닐 기가 치환된 우라실의 합성	8
그림 3. U4T의 IEX protocol	10
그림 3. U4T의 IEX elugram	10
그림 4. 정제된 U4T 올리고의 MALDI-TOF 질량분석 결과	11
그림 6. 합성한 eCpG의 reverse phase chromatography elugram	13
그림 7. 합성한 eCpG 올리고의 urea PAGE	14
그림 8. 1q, 2q, 4q U4T-eCpG의 모식도	16
그림 9. 1q-Alexa488 U4T-eCpG의 모식도	16
그림 10. 2q U4T-eCpG의 세럼 테스트 후 PAGE	18
그림 11. 2q U4T-eCpG의 세럼 테스트 결과의 imageJ 분석	18
그림 12. Td-CpG를 이용한 면역 활성화 세포 실험	19
그림 13. 합성한 azido-OVA(257-264)의 구조	21
그림 14. azido-OVA와 hexynyl-cU4T의 click reaction scheme	22
그림 15. azido-OVA와 hexynyl-cU4T의 click reaction 이후 생성물의 PAGE	23
그림 16. azido-OVA와 hexynyl-cU4T의 click reaction 실험 과정	24
그림 17. 1q-Alexa488을 적용한 비장세포의 유세포 분석과 공초점현미경 이미지	30
그림 18. 1q, 2q, 4q에 따른 수지상세포의 유세포 분석	31

그림 19. 1q, 2q, 4q에 따른 공통자극분자의 발현	32
그림 20. 2q 주사 후 (4시간) 비장세포의 싸이토카인 mRNA 발현	34
그림 21. 2q 주사 후 (24시간) 비장세포의 싸이토카인	34
그림 22. eCpG와 2q의 공통자극분자 발현과 싸이토카인	35
그림 23. Td-CpG와 1q, 2q에서의 공통자극분자 발현과 싸이토카인 ...	37



비메틸화 CpG 첨가제와 OVA 항원이 도입된
dodecynyl modified 면역활성 DNA 나노입자의 제조

박 해 인

부 경 대 학 교 대 학 원 화 학 과

요 약

염기서열에 지질을 합성한 DNA 단일가닥은 일정한 크기의 마이셀을 형성한다. 여기에 상보적인 서열을 가진 단일가닥에 면역활성 기능이 있는 것으로 알려진 CpG 올리고 가닥과 형광체가 달린 상보가닥을 이어붙여 자가조립하도록 하였다. 동물실험을 통해 이 나노입자가 수지상세포에 작용하는 것을 확인하고 표면분자의 발현과 싸이토카인 분비를 측정하여 면역활성을 관찰하였다.

Preparation of dodecynyl modified DNA nanoparticles
with unmethylated CpG adjuvant and ovalbumin
for immunostimulation

Haein Park

Department of Chemistry, The Graduate School,
Pukyong National University

Abstract

We introduce a versatile carrier system based on DNA nanoparticles (NPs). Incorporation of lipid-modified nucleobases to DNA strands enables formation of micelles in uniform size. In a single self-assembly step the micelles can be equipped with immune adjuvant (CpG ODN 1826) and fluorescent probe through Watson-Crick base-pairing. With the NPs we have investigated effect of the CpG concentration in immunostimulation. We observed dose dependent activation of TLR-9 resulting in DC maturation *in vivo*.

I. 서론

1. 연구 배경

Watson과 Crick에 의해 DNA의 이중나선 구조가 밝혀진 지 한세기가 지나지 않았음에도 불구하고 나노기술로서의 DNA는 짧은 시간 안에 넓은 범위에서 심도 있게 연구되었다. DNA의 구조와 염기서열을 분석하고 각각의 염기를 화학적으로 합성하여 원하는 서열의 고분자로 사용할 수 있게 되면서 이를 통해 나노 구조를 만들고 다른 재료들과 혼성하면서 보다 다양한 기능을 가진 나노 소재로 거듭나게 되었다.

A, C, G, T, 단지 4개의 부호로만 이루어진 DNA의 서열은 스스로 A-T, C-G라는 상보적인 염기쌍으로만 짝지으면서 다른 소재들에 비해 매우 세밀한 프로그래밍이 가능한 나노 구조를 만든다. 단지 단일가닥과 이중가닥으로만 존재하던 DNA는 Seeman,^[1] Rothemund^[2]에 의해 의도된 DNA 나노구조로 만들어지고 이를 응용해 보다 고차원적인 구조체를 조립하고 이를 조절하는 연구들이 발표되었다. 최근 들어서는 생체친화적이라는 더 큰 이점을 이용하여 약물을 전달하고 특정 위치를 표적하는 기능의 바이오 소재로서 각광받고 있다.

최근 연구되는 DNA 나노기술을 살펴보면, 순수하게 DNA만을 이용한 정교한 나노 구조체를 만드는 영역과, 다른 나노 소재와의 혼성을 통해 보다 다양한 기능을 가지면서 생체친화적인 나노 소재를 만드는 부분으로 볼 수 있다. 다른 재료와의 혼성은 그 영역을 경계 지을 수 없을 만큼 다양하다. 고분자 소재로는 주로 생체 소재로 쓰이는 PEG, PLGA 등을 사용하거나, 또는 PPO 같은 소수성 고분자에 결합시켜 양친매성으로 만들기도 한다. DNA 자체를 양친매성으로 만들기 위해 염기의 부분을 지질로 전환하기도 하고, 카이랄성이 다른 탄소 나노 튜브를 분리하기 위해 염기서열을 디자인하기도 하였다.^[3] 상보서열을 가지고 정교한 움직임을 만들 수 있으므로 탄소 나노 튜브를 DNA 오리가미 평면에 십자로 배열하는 시도도 있었다.^[4] 뿐만 아니라 DNA 가닥에 기능기를 도입하여 무기 나노입자와의 결합도 가능하다. 싸이올(thiol, -SH)기를 도입하여 금 나노입자와 결합하는 방법은 빈번히 사용되며, MOF (metal-organic framework)에 연결한 사례도 있다.^[5] 이러한 DNA 혼성 소재를 이용하여 약물 전달 로봇을 만들거나^[6] 특정 DNA를 검출할 수 있는 센서를 만드는 등의^[7] 바이오 응용 사례를 통해, 면역 활성화 기능을 가진 물질을 DNA 나노구조와 혼성하여 백신 치료의 보조제로 사용할 수 있는 방법에 대해 연구해 보기로 하였다.

2. 연구 개요

면역 치료에서 백신을 주사할 때, 항체를 생성할 목적으로 사용하는 항원

뿐만 아니라 내재적인 면역 활성을 유도하는 보조제를 함께 사용하게 된다. 만약 항원만을 주사하는 경우 부가적인 면역 활성이 부족하면 항원에 대한 내성만 생기게 될 가능성이 있다. 그러나 보조제에 의한 면역 활성화만 일어날 경우 자가면역질환과 같은 부작용이 일어나게 된다. 따라서 백신의 조제에 있어서 항원과 보조제의 조성이 매우 중요한 요소가 된다.(그림 1)

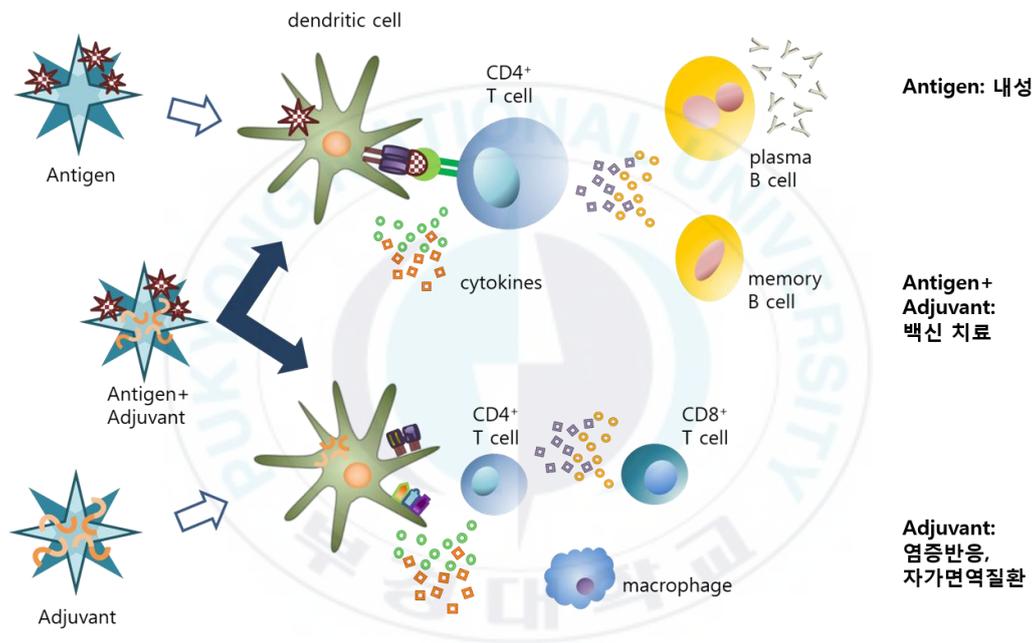


그림 1. 항원과 보조제가 포함된 백신의 면역 활성화 기능과 부작용

이 연구는 DNA 단일가닥의 한쪽 끝 부분에 지질을 도입하여 양친매성 분자로 만들어 미셀 구조의 나노입자를 형성하도록 한 다음, 상보적인 염기서열을 가진 가닥에 면역 활성이 있는 CpG 염기서열을 이어붙여 나노입자를 확장시켜 실제 쥐에 주입한 뒤, 면역 활성을 측정하는 방법으로 이루어졌다. 구형으로 뭉친 DNA 나노입자는 가닥 형태의 DNA에 비해 효소에

의한 분해가 느리고 세포에 효율적으로 섭취되는 것으로 알려져 있다.^[8] 때문에 단일가닥의 CpG 염기서열에 비해 면역 활성화의 효과가 뛰어날 것이다. 또한 상보서열에 OVA 항원을 결합하여 동시에 혼성화함으로써 항원과 보조제를 동시에 사용할 수 있는 약물 전달 물질로 사용하고자 하였다.

3. 이론적 배경

3.1. CpG ODN & TLR-9

바이러스나 곰팡이, 박테리아 같은 미생물에서 발현되는 병원균에는 포유류에는 없는 특정한 분자 패턴들이 관찰되는데 지질다당류 (LPS, lipopolysaccharide), CpG dinucleotide, dsRNA 등의 종류가 있다. 면역 체계는 이들의 모티프를 인식하는 패턴 인식 수용체 (PRR, pattern recognition receptor)에 의해 활성화되는데, PRR에는 대표적으로 Toll-유사 수용체 (TLR, toll-like receptor)가 있어 분자 패턴마다 각기 다른 여러 종류의 TLR들이 상호작용하며 면역 반응을 촉진하게 된다. 표 1에 각각의 TLR에 인식되는 종류들이 나타나 있다. CpG는 C와 G가 붙어있는 서열이 반복적으로 나타나는 단일가닥의 DNA 염기서열인데 TLR-9에 의해 인식되어 수지상세포가 공통자극분자 (costimulatory molecule)를 나

타내고 싸이토카인을 분비하도록 유도하면서 면역세포들의 활성을 개시하게 된다.^[9,10] 이 CpG ODN은 일종의 DNA 단일가닥이므로 DNA 나노 구조에 응용하는 데에 있어서 매우 쉽고 효율적이다.

표 1. 각 TLR에 인식되는 리간드의 종류

TLR	리간드
TLR1	triacylated lipoproteins
TLR2	lipoproteins, peptidoglucon, LPS
TLR3	dsRNA, polyinosinic-polycytidylic acid (poly I:C)
TLR4	LPS
TLR5	flagellin
TLR6	diacylated lipoproteins
TLR7	ssRNA, imidazoquinolins
TLR8	ssRNA, imidazoquinolins
TLR9	CpG DNA
TLR11	profilin-like proteins

3.2. 수지상세포의 활성화

CpG 올리고에 의한 면역 활성화는 비장의 수지상세포에서 일어나는 변화를

관찰함으로써 증명할 수 있다. 미성숙 수지상세포에 발현되는 PRR, 그 중에서도 TLR-9에 의해 CpG가 인식되면 MHC class II와 공통자극분자를 발현한다. MHC class II는 수지상세포가 CD4⁺ T 세포에 항원으로부터 나온 펩타이드를 확인하도록 하는, 항원제시세포 (APC, antigen presenting cell)로서의 역할을 보여준다. 수지상세포와 활성화된 CD4⁺ T 세포는 특정한 종류의 사이토카인을 분비하면서 CD8⁺ T 세포를 활성화하게 된다. 또한 2차적인 신호로서의 수지상세포 표면에 나타나는 공통자극분자가 CD4⁺ T 세포 표면의 분자와 쌍을 이루면서 MHC-TCR 상호작용을 돕게 되는데, 이를 통해 다음 단계의 면역 활성을 유도하게 된다. 따라서 비장 내의 MHC class와 공통자극분자의 발현, 사이토카인의 분비를 측정함으로써 CpG에 의한 면역 활성을 확인할 수 있다.

II. 실험 방법

1. DNA 나노입자의 제조

1.1. 지질 DNA의 합성

염기의 끝을 도데시닐로 치환한 4개의 우라실과 8개의 일반적인 뉴클레오티드로 구성된 U4T를 나노입자의 전구체로 사용하였다.(그림 2) 이 물질은 네덜란드 그로닝엔 대학 Andreas Hermann 연구실에서 합성하였으며, 다음의 합성 과정과 그 특성에 대해서는 곽민석 교수님의 2010년 <Virus-like Particles Templated by DNA Micelles: A General Method for Loading Virus Nanocarriers> *Journal of American Society* 논문을 인용하였다.

먼저 유리딘의 5번 탄소가 요오드로 치환된 5-Iodo-2'-deoxyuridine 5g과 DMT-Cl (4,4'-dimethoxytrityl chloride)을 80 ml 피리딘에 녹여 실온에서 하루동안 반응시킨다. 잔물을 50 ml 넣어 식힌 뒤 50 ml 디클로로메탄으로 두 번 추출한다. $MgSO_4$ 로 물기를 제거하고 진공건조한 후 헥산과 아세테이트를 1:1로 섞은 용매를 사용하여 실리카겔 컬럼으로 정제한다.

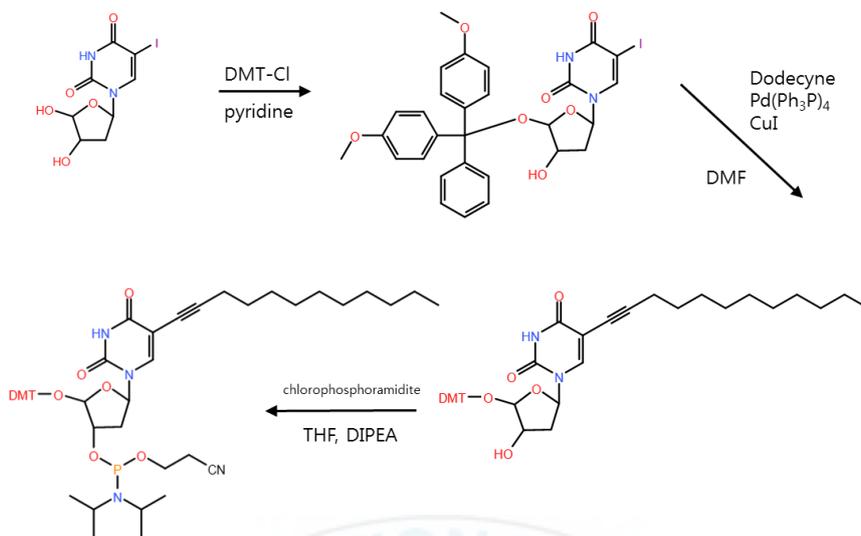


그림 2. 도데시닐 기가 치환된 우라실의 합성

이렇게 합성한 DMT로 보호된 5-Iodo-2'-deoxyuridine 8 g을 무수 디메틸포름아마이드 (DMF, dimethylformamide) 100 ml에 용해하여 Ar 가스를 10분간 불어준다. 팔라듐 촉매 ($\text{Pd}(\text{Ph}_3\text{P})_4$, Tetrakis (triphenylphosphine) palladium)를 1.41 g 넣고 다시 Ar 가스를 불어넣은 뒤 이온수지 Amberlite-IRA67를 20 g 넣는다. 도데신 (1-dodecyne) 6.1 g과 CuI 0.46 g을 넣어 빛이 없는 실온에서 18시간 반응시킨다. 여과한 고체를 메탄올과 디클로로메탄을 1:1로 섞어 세척하고 진공건조한 다음, 실리카겔 컬럼으로 정제한다.

DMT와 도데시닐이 붙어있는 디옥시우리딘 (5-[Dodec-1-ynyl]-5'-O-dimethoxytrityl-2'-deoxyuridine) 5.64 g을 무수 THF (tetrahydrofuran)에 녹여 무수 DIPEA (diisopropylethylamine)를 용매로 하

여 실온의 Ar 가스 환경에서 N-diisopropyl-2-cyanoethyl-chlorophosphoramidite 2.31 g과 3시간 반응시킨다. 반응 후 포화 Na₂CO₃ 용액에 붓고 물과 NaCl 수용액으로 세척한다. 유기층을 분리해 MgSO₄로 물기를 제거한 뒤 진공건조하고 DNA 합성을 위해 7 g을 아세토니트릴 (CH₃CN, acetonitrile) 52 ml에 용해한다.

1.2. U4T, eCpG의 합성과 정제

가. U4T 양친매성 DNA의 합성과 정제

위에서 인용한 도데시닐 기가 도입된 우라실을 뉴클레오티드 U로 하여 고체상으로 합성된 U4T (5'-UUU UGC GGA TTC-3')를 정제하였다. Deprotection 과정을 위해 CPG가 들어있는 15 ml 튜브에 암모니아수 5 ml 정도를 넣어 새지 않게 밀봉한 후 55℃에서 6시간 이상 방치하였다. 원심분리하여 상등액을 분리하고 50% 에탄올로 2-3회 세척하여 분리한 상등액에 합친 다음 용매를 증발시켜 농도를 높이고 FPLC 정제에 사용할 버퍼 용액에 재용해하였다. BioRad사의 NGC Quest 10에 GE Healthcare의 HiTrap Q-HP 컬럼을 사용하여 정제하였다. 약한 버퍼 용액으로 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)을 사용하고 강한 버퍼 용액으로 25 mM Tris-HCl (pH 8.0)에 1.0 M NaCl를 더하여 사용하였다. 강한 버퍼의 비율을 36 ml의 column volume 만큼 0-90%까지 변경하였다.(그림 3)

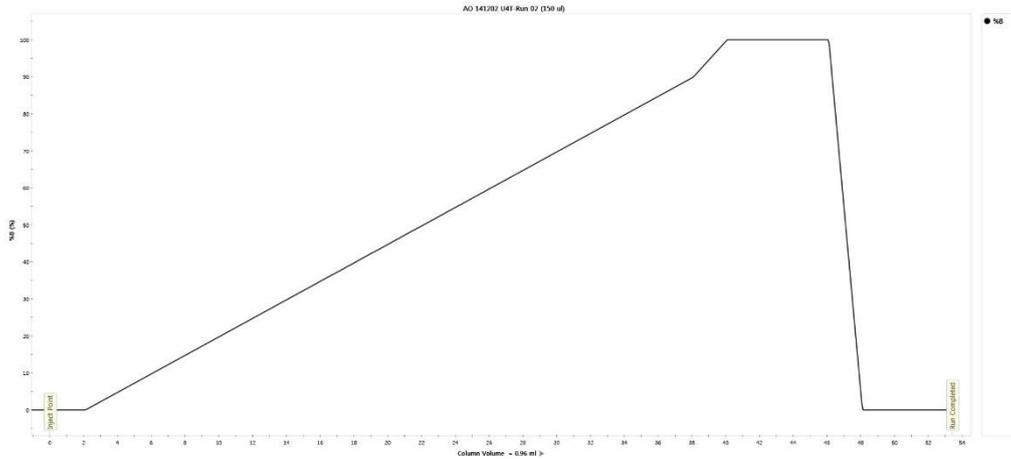


그림 3. U4T의 IEX protocol. 2 ml의 시료를 주입하고 0-90%의 36 ml gradient를 설정한 다음 세척과 평형 단계를 거치도록 하였다.

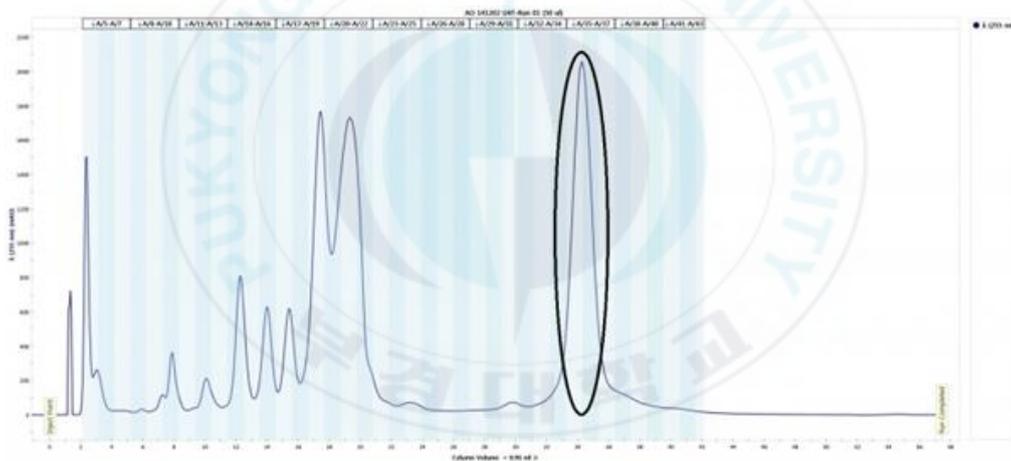


그림 4. U4T의 IEX elugram. 소수성 도데시닐 기가 도입되어 가장 나중에 분리되는 검은색 원으로 표시된 부분이 U4T 올리고이다.

그림 4에 검은색 원으로 표시된 부분을 모아서 진공 농축하고 버퍼 용액에 사용된 염을 제거하기 위한 투석을 진행하였다. MWCO 2 kDa 셀룰로즈 반투막 (regenerated cellulose dialysis tube, SpectrumLab)을 사용하여 10회 정도 진행하였다. 투석 후에는 물을 증발시켜 농축하였다. 소량

을 취하여 Bioneer사에 MALDI-TOF 질량분석을 의뢰하여 그림 5와 같은 결과를 얻었다.

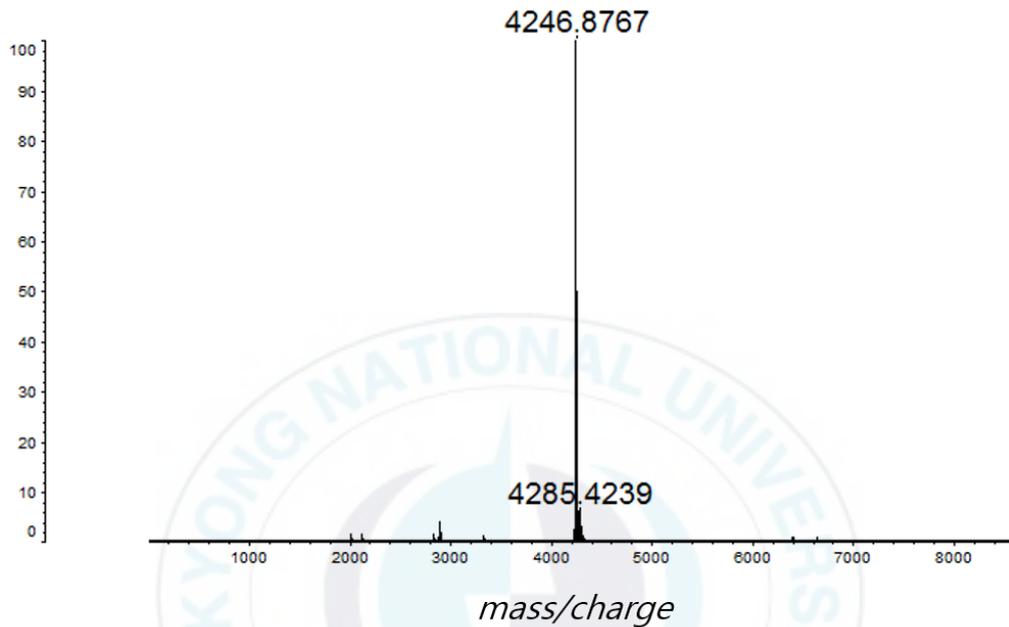


그림 5. 정제된 U4T 올리고의 MALDI-TOF 질량분석 결과. 계산된 U4T의 분자량 M+2H의 분석값을 얻었다.

나. CpG ODN의 합성과 정제

U4T 염기서열에 상보적인 cU4T (5'-GAA TCC GCA AAA-3')에 CpG ODN 1826 (5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TT-3')의 염기서열을 이어붙인 eCpG(5'-CpG-cU4T-3', 5'-TCC ATG ACG TTC CTG ACG TTG AAT CCG CAA AA-3') 올리고 DNA를 Expedite 8900을 사용하여 직접 합성하였다. 사용한 시약은 표 2와 같다.

표 2. DNA 합성 단계에 사용한 시약

Process	Reagent
Wash (solvent)	acetonitrile (AcCN)
Coupling (nucleotides)	dA,dC,dG,dT-phosphoramidite (0.1M in AcCN)
Activation	0.5 M tetrazole in AcCN
Capping (A)	acetic anhydride/pyridine/tetrahydrofuran (1:1:8)
Capping (B)	16% 1-methylimidazole in tetrahydrofuran
Oxidation	0.02 M iodide in pyridine/water/tetrahydrofuran (0.4:9:90.5)
Detritylation	3% Trichloroacetic acid (TCA) in dichloromethane

Proligo사의 Col CPG 1000A 컬럼을 사용하여 1 μ mol scale로 합성하고 합성 마지막 단계에 DMT를 남겨 reverse phase chromatography (RPC)로 정제하고자 하였다. U4T 올리고와 같은 방법으로 deprotection 과정을 거쳐 진공 농축한 다음 FPLC에 주입하였다. 컬럼은 Resource RPC (GE Healthcare)를 사용하였고 버퍼용액으로 0.1M TEAAc에 2.5-65% AcCN을 사용하였다. 그림 6에서 11-12 CV에 가장 큰 peak으로 나타난 부분을 DMT가 붙어있는 eCpG 올리고로 예상하여 분리하였다.

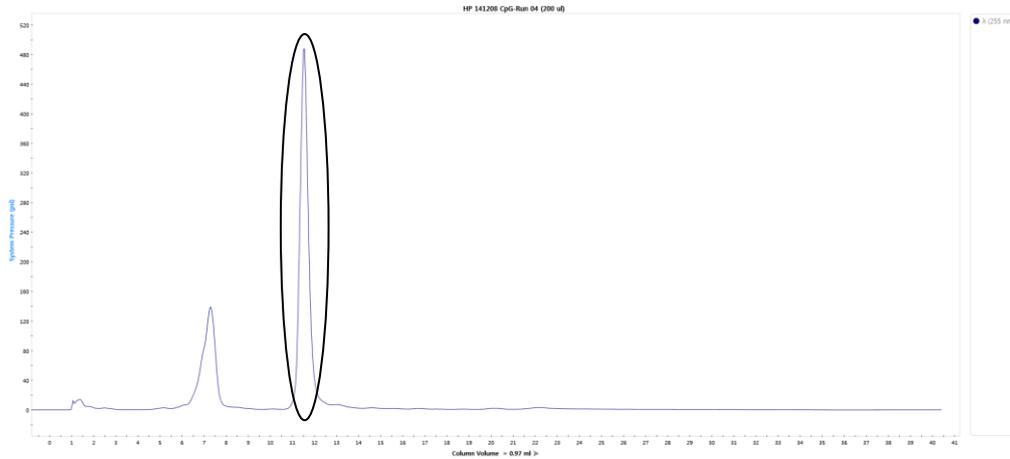


그림 6. 합성한 eCpG의 reverse phase chromatography elugram. 검은색 원으로 표시한 부분이 eCpG이다. RPC의 경우, DMT가 붙어있는 상태의 올리고를 쉽게 정제할 수 있다.

정제 후에는 용매를 제거하여 농축시키고 80% 아세트산을 넣어 DMT를 분리한 뒤 에탄올 침전법으로 정제하였다. 정제된 eCpG 올리고 DNA는 Bioneer에서 구매한 DNA와 PAGE에서 비교하였다.(그림 7) 세포 섭취 관찰을 위한 Alexa488 형광 표지된 cU4T 상보서열은 Bioneer에서 구매하였다.

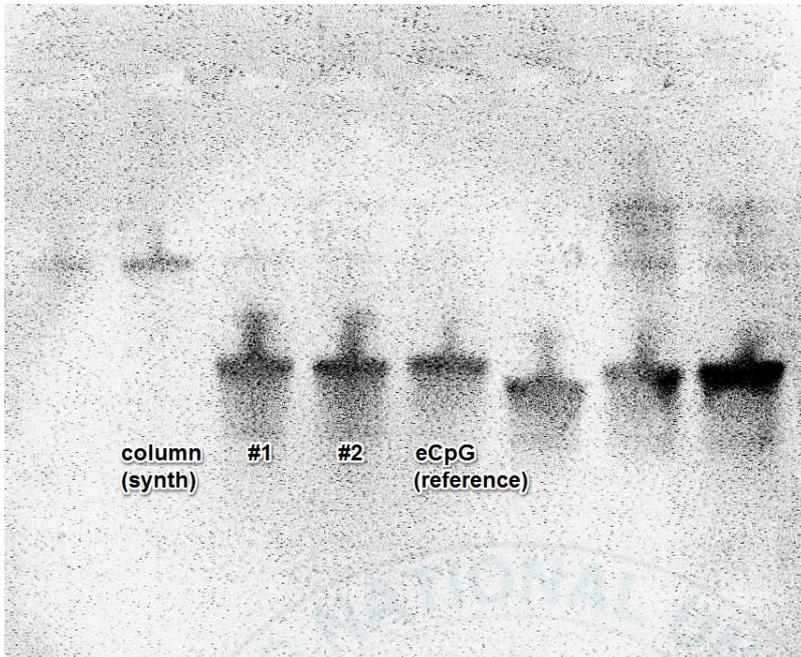


그림 7. 합성한 eCpG 올리고의 urea PAGE 15% (110V, 90 min) #1, #2로 표시한 열이 합성한 올리고, eCpG라고 표시한 열이 Bioneer사에서 구매한 올리고이다.

1.3. U4T-eCpG 나노입자의 제조

U4T가 마이셀 구조의 나노입자를 형성하도록 어닐링하였다. 100 μ M 농도로 희석한 시료를 Thermocycler에서 95 $^{\circ}$ C로 10분간 가열하였다가 실온까지 천천히 식혀 양친매성 분자가 마이셀 구조를 형성하도록 하였다.

U4T-eCpG의 이중나선 결합을 위해 TAE (40 mM Tris, 20 mM Acetic Acid, 2 mM EDTA)와 12.5 mM MgCl₂의 버퍼 용액을 사용하여 Thermocycler에서 어닐링하였다. 95 $^{\circ}$ C로 10분간 가열하였다가 16분마다

1℃씩 온도가 내려가도록 하여 4℃가 될 때까지 반복하였다.

가. 함량이 조절된 U4T-eCpG 나노입자의 제조

U4T와 eCpG 사이의 당량을 조절하여 eCpG의 함량에 따라 면역 활성화에 차이가 있는지 알아보았다. U4T의 농도를 80 μ M, 100 μ M로 일정하게 하고, eCpG의 당량을 각각 20, 40, 80 μ M가 되도록 하여 1q, 2q, 4q라고 명명하였다.(그림 8) 1q 샘플의 경우 비장의 수지상세포에 섭취 여부를 알아보기 위해 Alexa488이 표지된 cU4T 염기서열을 20 μ M 추가하여 1q-Alexa 샘플을 추가하였다.(그림 9)

표 3. 1q, 2q, 4q, 1q-Alexa의 조성 (PBS buffer 100 μ l)

	U4T (μ M)	eCpG (μ M)	Alexa488-cU4T (μ M)
1q	80	20	-
2q	80	40	-
4q	80	80	-
1q-Alexa	80	20	20

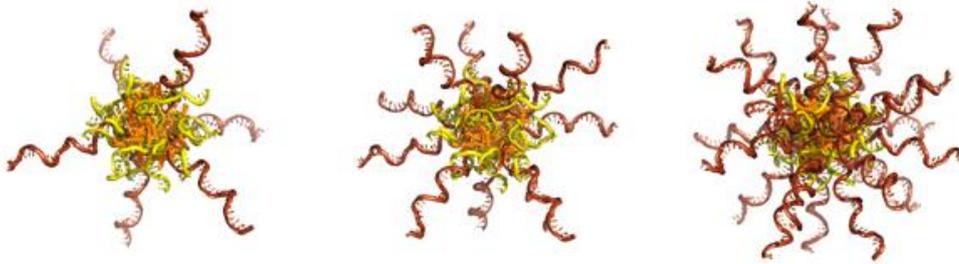


그림 8. 1q, 2q, 4q U4T-eCpG의 모식도. eCpG 함량이 높아질수록 나노입자의 표면에 CpG 염기서열이 배열된다.

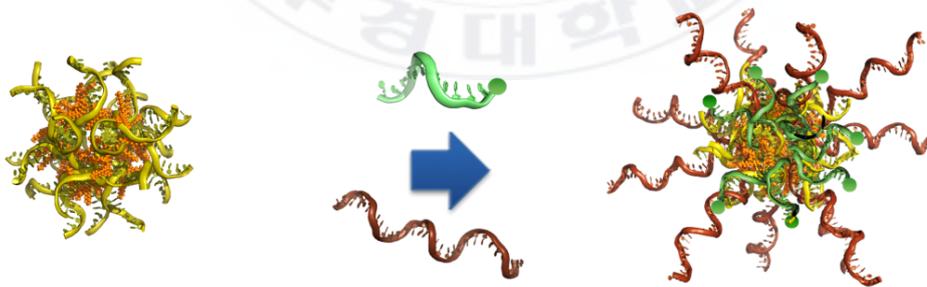


그림 9. 1q-Alexa488 U4T-eCpG의 모식도. cU4T의 끝에 Alexa488 형광을 붙여 U4T 마이셀에 결합하도록 하였다.

1.4. Serum degradation TEST

U4T-eCpG 나노입자의 안정성을 측정하기 위해 DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 배양액에 비활성화하지 않은 소태아 혈청 (FBS, fetal bovine serum)을 10% v/v 넣어 0-4시간까지 시간 간격을 두어 37°C에서 유지하였다.^[11] 각 시간마다 시료를 포름아마이드로 고정하고 PAGE로 분석하여 DNA 밴드가 사라진 정도를 imageJ를 사용하여 분석하였다.(그림 10, 11) 30분 지점에서 밴드가 50% 이상 분해된 것으로 보아 반감기를 30분이라고 할 때, 이 연구에 사용한 C57BL/6 쥐의 혈류 순환 주기 15초에 비해 120배 긴 시간으로 생체 내에 흡수되어 영향을 끼칠 수 있는 충분한 안정성을 가진다고 할 수 있다.^[12]

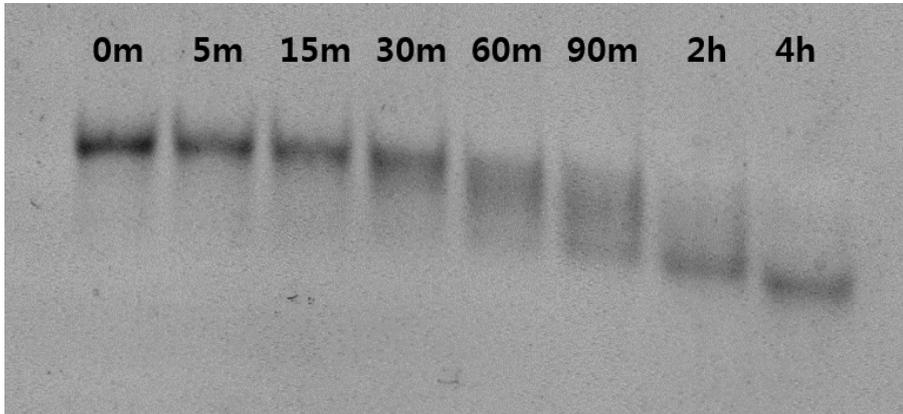


그림 10. 2q U4T-eCpG의 세럼 테스트 후 PAGE 15% (110 V, 70 min)

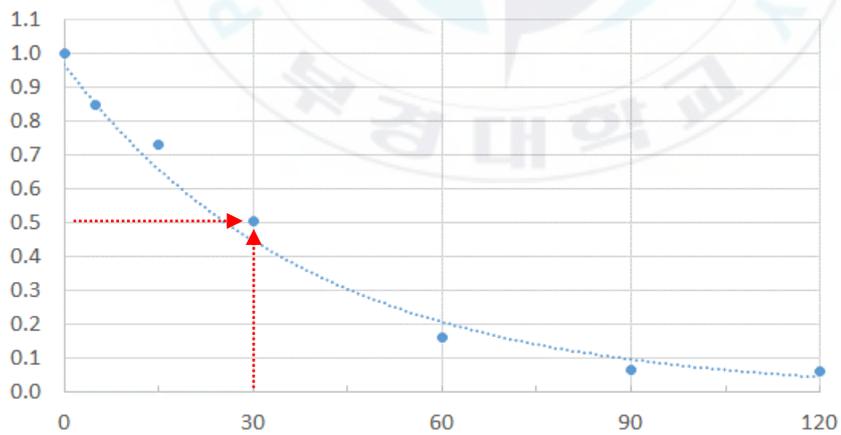


그림 11. 그림 10의 PAGE 결과에서 밴드의 degradation을 imageJ로 분석하여 외삽하였다. 30분 지점에서 50% 정도의 감소를 보인다.

1.5. Td-CpG 비교

비슷한 크기를 가진 DNA 나노구조로 2011년 Jiang Li가 발표한 논문의 정사면체와 비교하기로 하였다. 이 논문에서는 4개의 올리고 DNA를 이용하여 정사면체를 만들고 각 꼭지점에 CpG ODN을 달아 세포 실험으로 싸이토카인 분비를 관찰하였다.(그림 12)

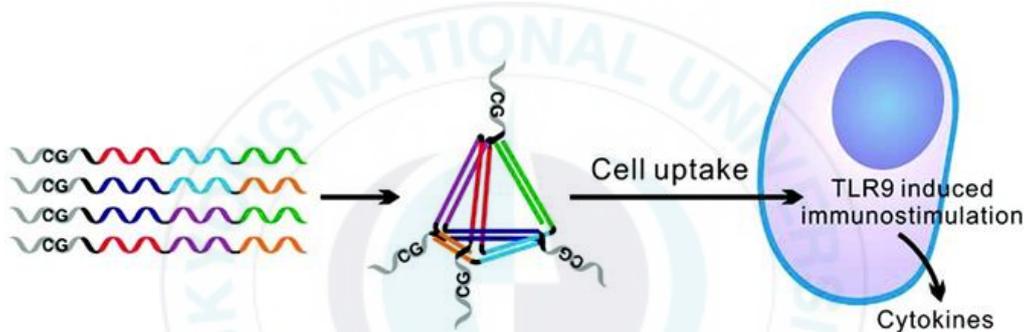


그림 12. Td-CpG를 이용한 면역 활성화 세포 실험 (Published in: Jiang Li; Hao Pei; Bing Zhu; Le Liang; Min Wei; Yao He; Nan Chen; Di Li; Qing Huang; Chunhai Fan; *ACS Nano* 2011, 5, 8783–8789.)

이 비교 실험을 위해 KIST 안대로 박사님 연구실에서 올리고를 제공받았다.(표 4) 한번이 20NT 길이의 정사면체 구조를 이루는 60NT 길이의 올리고 DNA 4개를 가지고, 정사면체의 꼭지점에 CpG 단일가닥이 이어지도록 염기서열을 확장하였다. 각 올리고를 10 μ M 농도가 되도록 하여 U4T-eCpG 이중나선 결합과 같은 조건으로 어닐링하였다.

표 4. Td-CpG 올리고의 염기서열

올리고 DNA	Sequence
Td-1	5' - <u>TCC ATG ACG TTC CTG ACG TTT</u> TTT TAC ATT CCT AAG TCT GAA ACA TTA CAG CTT GCT ACA CGA GAA GAG CCG CCA TAG TA-3'
Td-2	5' - <u>TCC ATG ACG TTC CTG ACG TTT</u> TTT TTA TCA CCA GGC AGT TGA CAG TGT AGC AAG CTG TAA TAG ATG CGA GGG TCC AAT AC-3'
Td-3	5' - <u>TCC ATG ACG TTC CTG ACG TTT</u> TTT TTC AAC TGC CTG GTG ATA AAA CGA CAC TAC GTG GGA ATC TAC TAT GGC GGC TCT TC-3'
Td-4	5' - <u>TCC ATG ACG TTC CTG ACG TTT</u> TTT TTT CAG ACT TAG GAA TGT GCT TCC CAC GTA GTG TCG TTT GTA TTG GAC CCT CGC AT-3'

2. OVA가 추가된 U4T-eCpG-eOVA의 조제

2.1. Azido-OVA

SIINFEKL 서열을 가진 OVA (257-264)의 N-말단에 azido (-N₃)기를 도입하였다.(그림 13) 이 물질은 UNIST 유자형 교수님 연구실에서 합성하여 제공하였다.

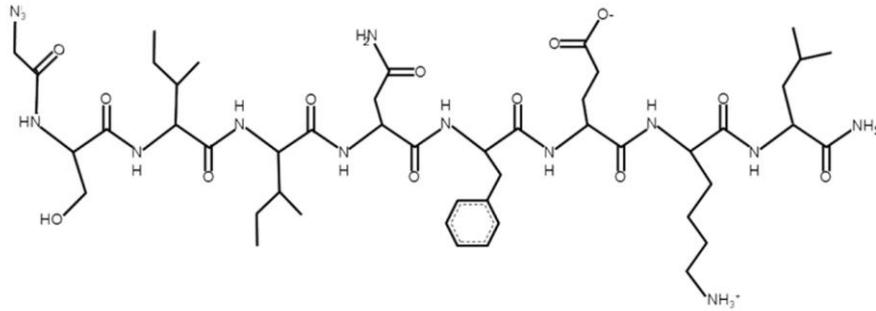


그림 13. 합성한 azido-OVA(257-264)의 구조

2.2. Hexynyl-cU4T

Expedite 8900으로 cU4T (5'-GAA TCC GCA AAA-3')를 합성하면서 5-Hexyn-1-yl-(2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropyl)-phosphoramidite를 덧붙여 합성하였다. Hexynyl phosphoramidite는 Glen Research에서 구입하였다.

2.3. Click reaction

OVA와 cU4T를 copper(I)-catalyzed azide-alkyne cycloaddition으로 연결하기 위해 1 μ mol 스케일로 합성한 Hexynyl cU4T를 CPG 상태 그대로 반응하였다.(그림 14) 이러한 solid-phase 방법은 반응 후에 남아있는 반응물과 용매를 제거하고 생성물의 순도를 높이는 데에 매우 유용하

다. 먼저 컬럼을 분해하여 CPG를 바이알에 담고, azido-OVA를 1 mg (약 1 μ mol) 넣은 다음 DMSO 1 ml를 용매로 추가하였다. 촉매는 CuI를 같은 당량으로 사용하였고 실온에서 24시간 반응한 후에 1.5 ml 튜브에 옮겨담아 원심분리하여 상등액을 제거하면서 CPG를 여러번 세척하였다. 세척 후에는 II.1.2.에서 언급한 것과 같은 방법으로 암모니아수를 사용하여 DNA를 분리하였다.(그림 15)

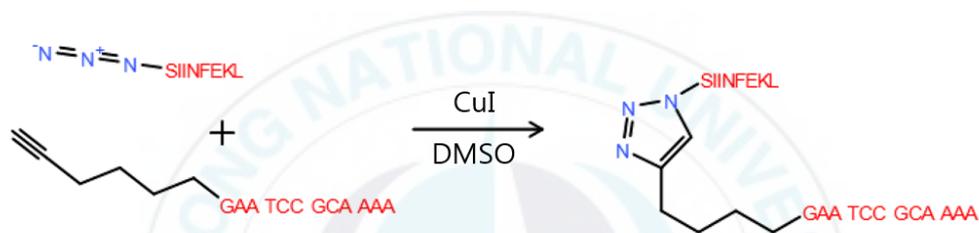


그림 14. Azido-OVA와 hexynyl-cU4T의 click reaction

그림 16에서와 같이 합성된 OVA-cU4T의 존재는 확인되었다. 그러나 반응의 수율이 매우 좋지 않아 azido-OVA와 반응하지 않은 hexynyl-cU4T가 남아 있다. 따라서 click 반응의 효율을 개선하고 두 물질을 효과적으로 분리할 수 있는 다른 방법이 필요한 것으로 보인다.

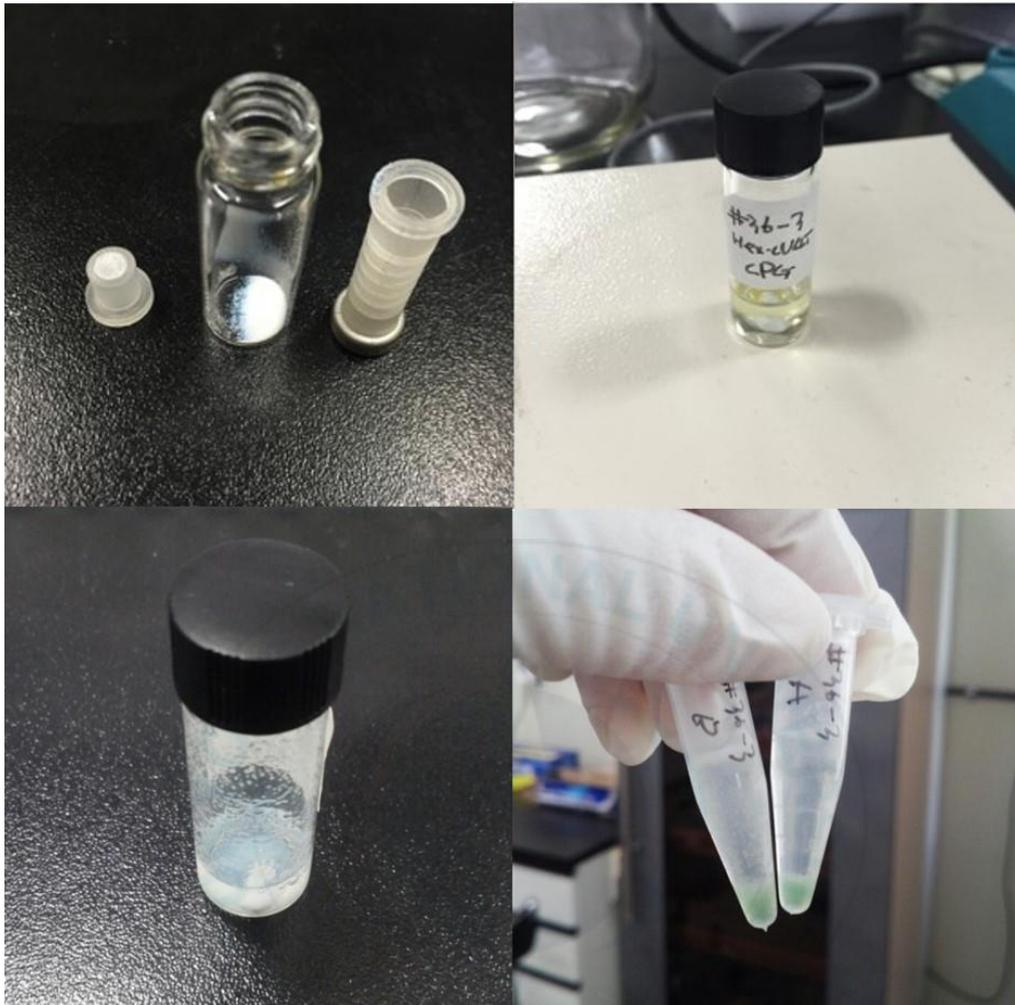


그림 15. azido-OVA와 hexynyl-cU4T의 click reaction 과정. (왼쪽 위) DNA 합성기에 사용한 컬럼에서 CPG를 분리한다. (오른쪽 위) 바이알에 반응물을 넣고 실온에서 24시간 교반한다. (왼쪽 아래) 반응 후 CPG가 섞여있는 상태. (오른쪽 아래) 튜브에 옮겨담아 원심분리한 상태.

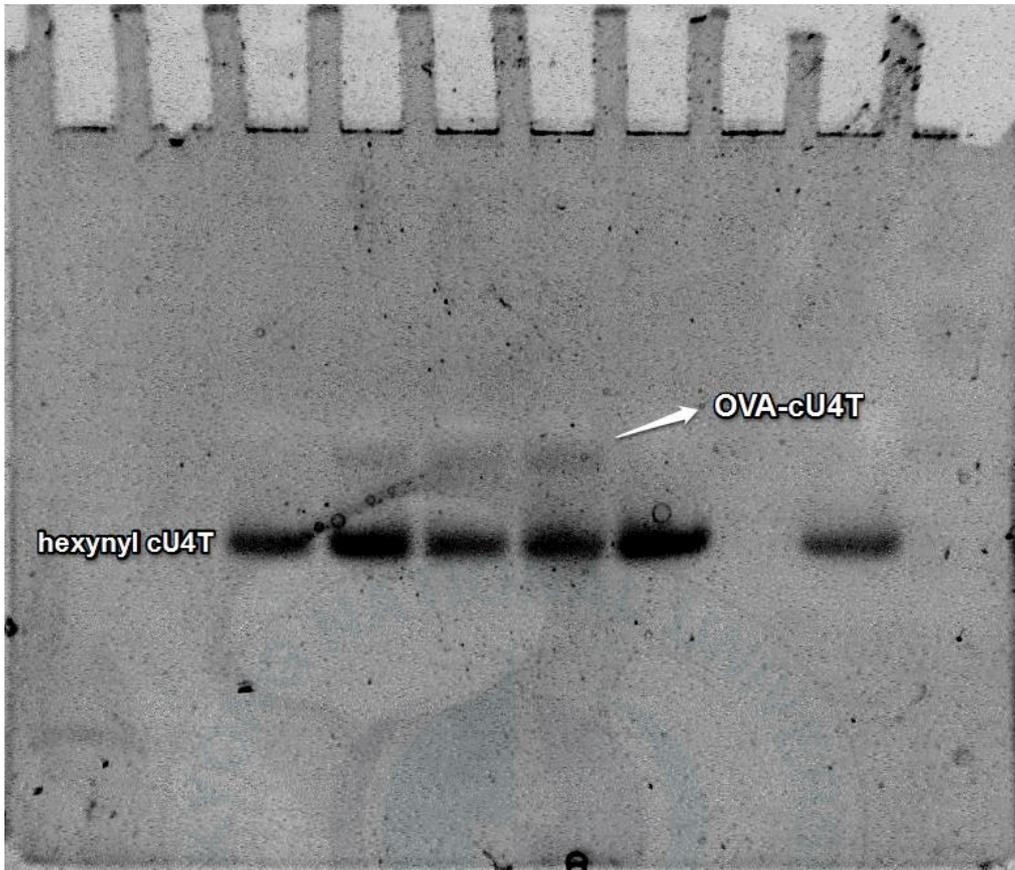


그림 16. azido-OVA와 hexynyl-cU4T의 click reaction 이후 생성물의 PAGE (10%, 110 V, 30 min)

3. 동물 실험을 통한 면역 활성화 실험

이 장에서 실행된 동물 실험은 중국 상하이 푸단대학교 공중 보건 임상 센터의 진준오 교수님과의 협업으로 진행되었다.

3.1. 동물 준비

C57BL/6 쥐(6주생)는 무균 조건 하에서 보관하였다. 모든 실험은 임상 기관 동물 관리 및 사용위원회의 지침에 따라 수행되었다. 프로토콜은 상하이 보건 임상 센터의 동물 실험 윤리위원회에 의해 승인되었다.

3.2. 항체 준비

동종 대조군 항체 (ABs) (IgG1, IgG2a 또는 IgG2b), anti-CD11c (N418), anti-CD40 (3/23), anti-CD80 (16-10A1), anti-CD86 (GL-1), anti-IL-6 (MP5-20F3) 및 anti-IL-12/23p40 (C17.8)는 BioLegend에서 구입하여 사용하였고, anti-MHC class I (AF6-88.5.3), anti-MHC class II (M5/114.15.2) 및 anti-TNF- α (MP6-XT22)는 eBioscience에서 구입하여 사용하였다.

3.3. 수지상세포의 전처리 및 유세포 분석

세포를 0.5% 소 혈청 알부민을 포함하는 PBS로 세척하고 비표지된 동종 대조군 ABs로 15분간 전처리한 뒤, 얼음에서 형광 표지된 ABs로 30분간 배양한 다음 PBS로 세척하였다. FACS Aria II (Becton Dickinson Biosciences)와 FlowJo 8.6 software (FlowJo LLC)로 분석하였다. 세포 파편은 순방향 산란 게이팅과 측면 산란 게이팅 분석에서 제외하였고, 사멸 세포 역시 7-아미노액티노마이신-D (7-aminoactinomycin D, 7AAD, BioLegend)으로 염색하고, 7AAD로 염색되지 않은 군을 게이팅 분석하였다.

비장 수지상세포는 다음과 같은 전처리를 거쳐 유세포 분석하였다.^[13] 조직을 작은 조각으로 절단하고, 상온에서 20분 동안 콜라게나제와 DNase I, 2% FBS를 함유하는 PBS에 침지하였다. 침지된 세포를 원심분리하여 세포 펠렛을 분리하고, 5 ml의 히스토파크 (Histopaque 1077, Sigma-Aldrich)에 재현탁시켰다. 다시 히스토파크 5 ml를 아래쪽에, 배지층을 위에 넣고 10분 동안 1700g로 원심분리하였다. 저밀도층($<1.077 \text{ g/cm}^3$)을 모아 20분 동안 FITC 또는 PE에 접합된 단일 클론 항체와 함께 배양하였다. 형광체에 접합된 단일 클론 항체(mABs)는 anti-CD3 (17A2), anti-Thy1.1 (OX-7), anti-B220 (RA3-6B2), anti-Gr-1 (RB68C5), anti-CD49b (DX5) 및 anti-TER-119 (TER-119)이다. 형광을 발현하지 않은 세포 중 CD11c를 높게 발현하는 세포를 비장 수지상세포로 정의하고 FACS Aria II (Becton Dickinson Biosciences)로 분석하였다.

3.4. 사이토카인 분석

혈청 내의 IL-6, IL-12p70 및 TNF- α 농도는 표준 효소 면역 분석 (ELISA, BioLegend) 키트를 사용하여 측정하였고, mRNA는 올리고(dT) 프라이머와 M-MLV 역전사 효소(Promega)를 이용하여 cDNA로 역전사 하고 LightCycler 480 Real-Time PCR System (Roche AG)를 사용하여 60 °C의 온도에서 40회 어닐링 반복하여 PCR 증폭하였다 (Qiagen AG). PCR에 사용한 프라이머의 염기서열을 표 5에 나타내었다.

표 5. PCR 프라이머의 염기서열

Primers	Sequence
β -Actin forward	5' -TGG ATG ACG ATA TCG CTG CG-3'
β -Actin reverse	5' -AGG GTC AGG ATA CCT CTC TT-3'
IL-6 forward	5' -AAC GAT GAT GCA CTT GCA GA-3'
IL-6 reverse	5' -GAG CAT TGG AAA TTG GGG TA-3'
IL-12p40 forward	5' -CAC ATC TGC TGC TCC ACA AG-3'
IL-12p40 reverse	5' -CCG TCC GGA GTA ATT TGG TG-3'
TNF- α forward	5' -CCT TTC ACT CAC TGG CCC AA-3'
TNF- α reverse	5' -AGT GCC TCT TCT GCC AGT TC-3'

3.5. 비장세포 내 싸이토카인의 염색^[14]

비장 내 세포를 취하여 50 ng/ml 농도의 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)와 1 μ M 아이오노마이신 (ionomycin)으로 4시간 가량 자극시킨 후 모넨신 (monensin) 용액을 더하여 2시간 동안 둔다. 먼저 표면 분자를 염색하고 Cytofix/Cytoperm (eBioscience) 용액으로 고정시킨다. 싸이토카인에 대한 항체가 포함된 완충용액으로 30분간 둔다. 동종 대조군 항체 IgG를 같은 조건에서 병행한다.

3.6. BMDC (bone marrow-derived dendritic cell) 테스트^[15]

쥐에서 취한 골수세포를 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 용액에서 배양하였다. 50 ng/ml의 GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)와 50 ng/ml의 IL-4 (interleukin-4)를 더하여 6일간 37°C, 10%의 CO₂ 환경에서 배양하고 신선한 배양액으로 씻어낸 뒤 유세포 분석으로 CD11c에 양성반응하는 세포들을 수지상세포로 정의하였다.

Ⅲ. 실험 결과 및 토의

1. U4T-eCpG 나노입자의 수지상세포 섭취

Alexa488이 표지된 cU4T와 eCpG가 같은 당량으로 결합된 1q-Alexa 시료를 쥐에 주사하고 2시간 후에 비장을 적출하여 비장세포를 Ⅱ.3.3.에서 언급한대로 전처리하여 분석한 결과, CD11c⁺ 세포에서 Alexa488의 검출이 크게 증가하였다.(그림 17) 유세포 분석뿐만 아니라 공초점현미경에서도 CD11c의 적색과 Alexa488의 녹색이 겹쳐진 영역에서 노란색으로 관찰된다. 이를 통해 U4T-eCpG 나노입자가 비장 내의 수지상세포 안에 효율적으로 섭취된다는 것을 알 수 있다.

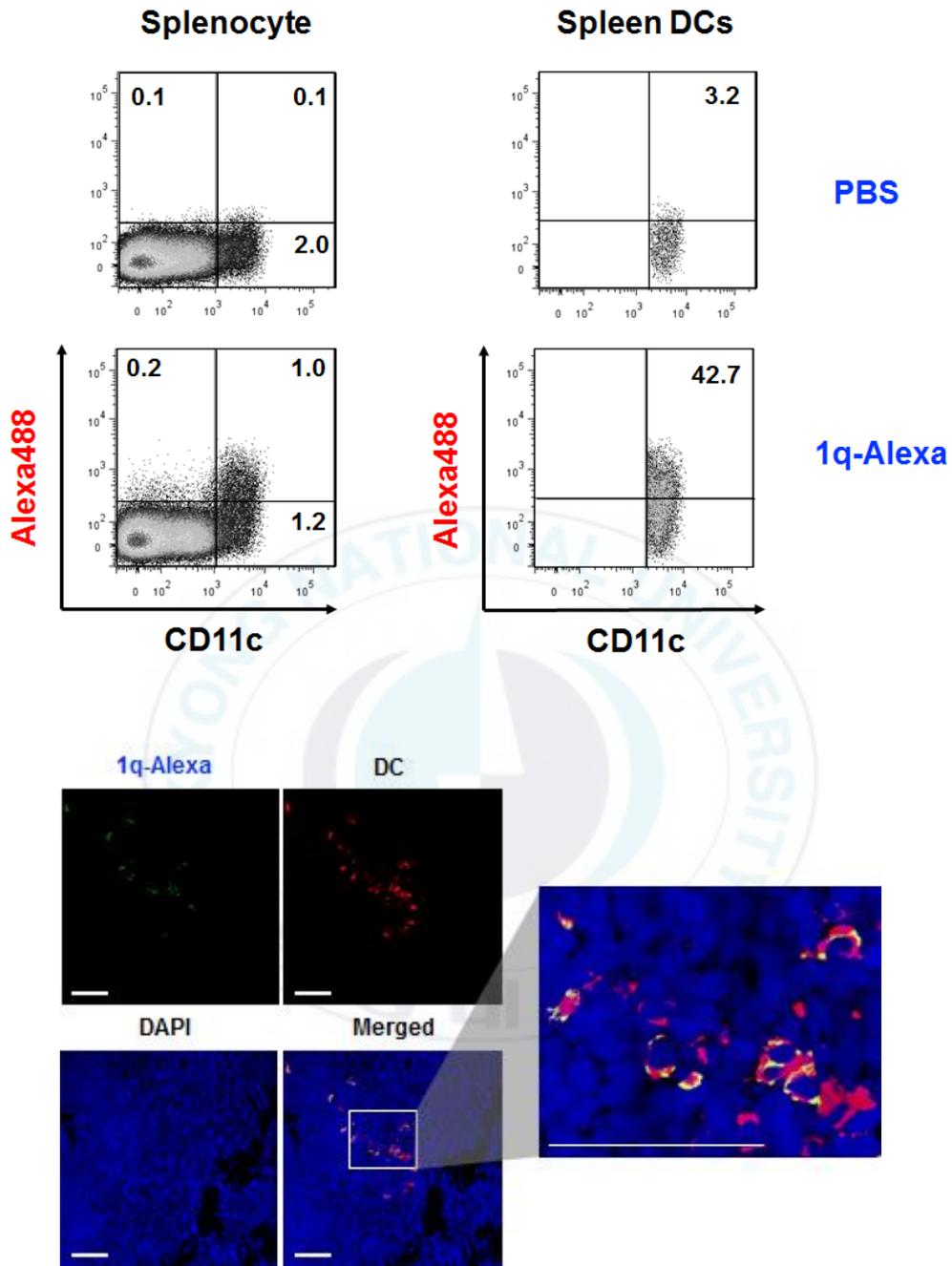


그림 17. 1q-Alexa488을 적용한 비장세포의 유세포 분석(위), 공초점현미경 (아래). 흰색 스케일은 200 μm 를 나타낸다.

2. CpG 함량에 따른 면역활성 차이

2.1.3.절의 표에서 언급하였듯이 U4T의 농도에 대해 1/4, 2/4, 4/4의 당량이 되도록 eCpG의 양을 조절하여 1q, 2q, 4q의 샘플을 조제하였다. PBS와 U4T를 대조군으로 하였다. 각각을 쥐에 주사한 후 24시간 후에 비장세포를 취하여 수지상세포의 공통자극분자 CD40, CD80, CD86과 MHC class I, II를 측정하였다.

먼저 lineage (CD3, Thy1.1, B220, Gr1, CD49b, Ter-119 계통)에는 음성이고 CD11c에 양성인 세포를 수지상세포로 볼 때, PBS와 U4T만을 주사했을 경우에 비해 1q, 2q, 4q에서 그 수가 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.(그림 18) 또한 수지상세포의 표면에 발현되는 공통자극분자 CD40, 80, 86와 MHC class I, II의 신호가 모두 증가하는 것으로 관찰되었다.(그림 19)

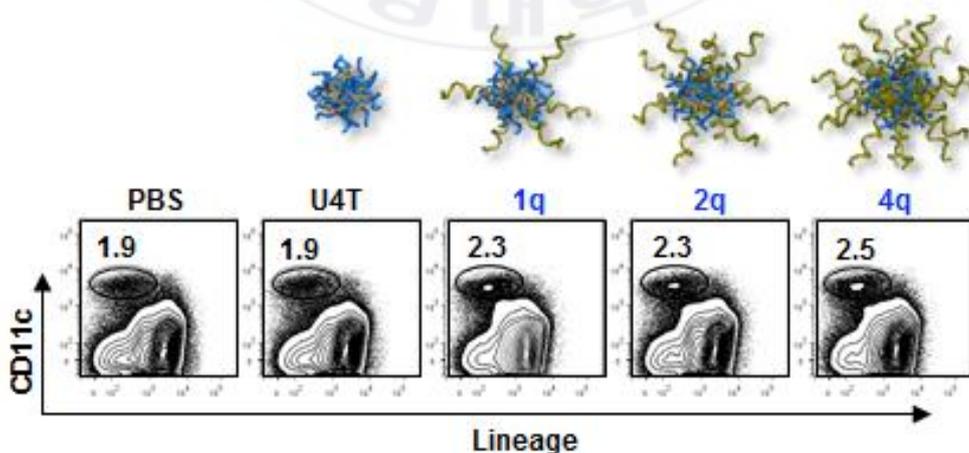


그림 18. 1q, 2q, 4q에 따른 수지상세포의 유세포 분석

이 때 1q, 2q, 4q에 들어있는 eCpG 함량에 따라 서로 다른 결과가 나타났는데, 공통자극분자의 경우는 1q에서는 그 영향이 미미하였으나 2q와 4q에서는 1q와 구별되는 뚜렷한 증가가 있었다. 그런데 2q와 4q 사이에는 2배수 만큼의 증가가 나타나지는 않았다. MHC class의 경우에는 1q, 2q, 4q 모두 뚜렷한 활성이 있었고 함량이 높아짐에 따라 조금씩 영향이 커지는 양상을 보였다. 이를 통해 수지상세포를 활성화하는 데에 CpG의 함량이 영향을 끼친다고 가정하고, 이후에 진행된 실험에서는 eCpG의 함량을 2q 기준으로 정하여 비교하기로 하였다.

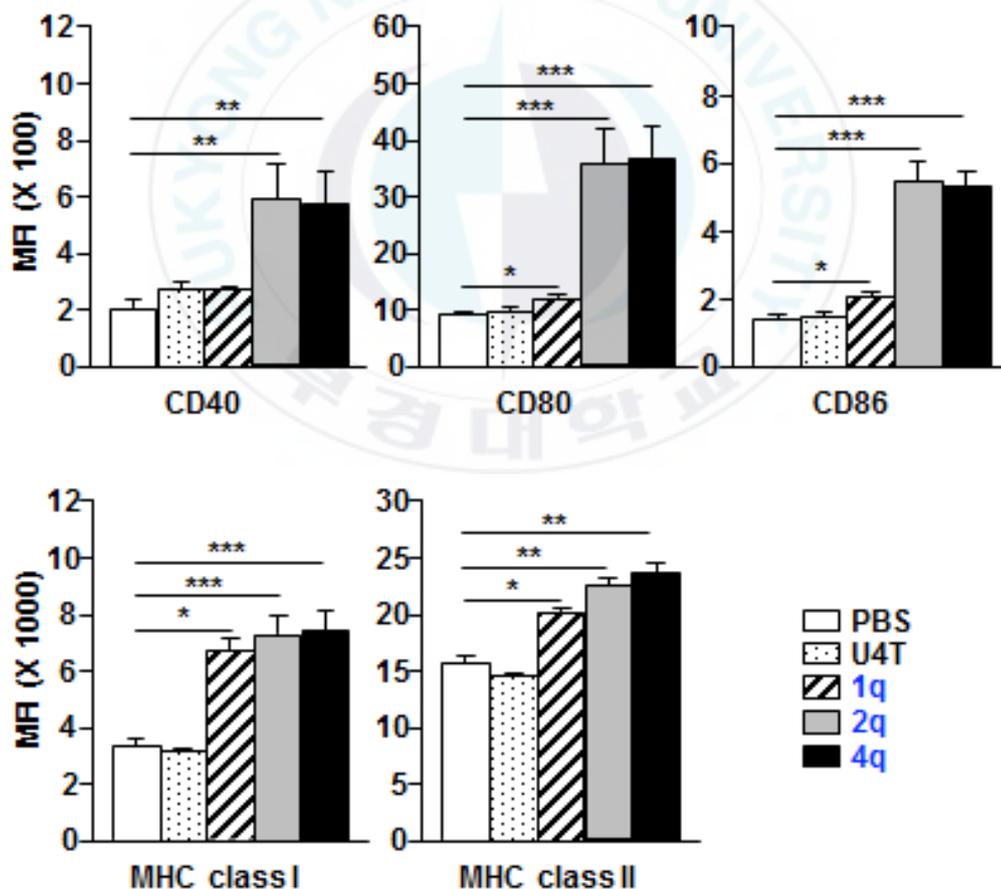
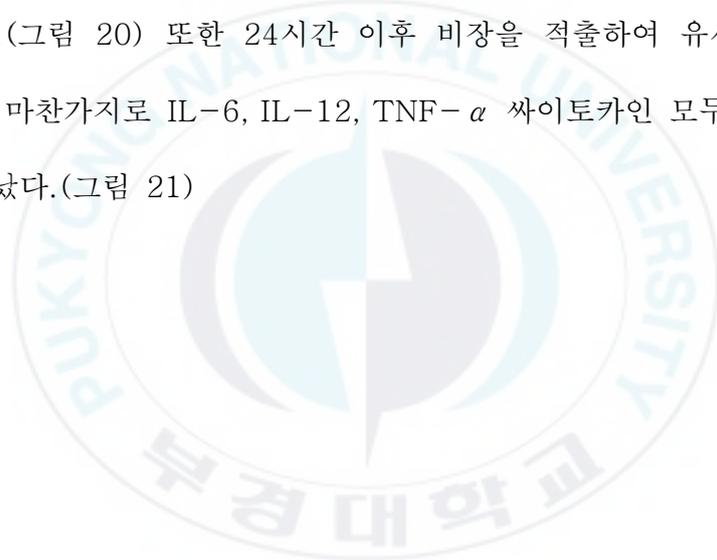


그림 19. 1q, 2q, 4q에 따른 공통자극분자 발현의 유세포 분석

3. 싸이토카인의 분비

앞서 eCpG 함량에 따른 수지상세포의 공통자극분자 발현에 대한 결과를 토대로 2q 샘플을 이용하여 싸이토카인 IL-6, IL-12, TNF- α 에 대해 분석하였다.

샘플을 쥐에 주사한 뒤 4시간 후에 비장과 혈액을 채취하여 mRNA PCR과 ELISA 분석을 한 결과 각각의 싸이토카인 분비가 증가한 것을 확인할 수 있었다.(그림 20) 또한 24시간 이후 비장을 적출하여 유세포 분석을 한 결과도 마찬가지로 IL-6, IL-12, TNF- α 싸이토카인 모두 증가된 것으로 나타났다.(그림 21)



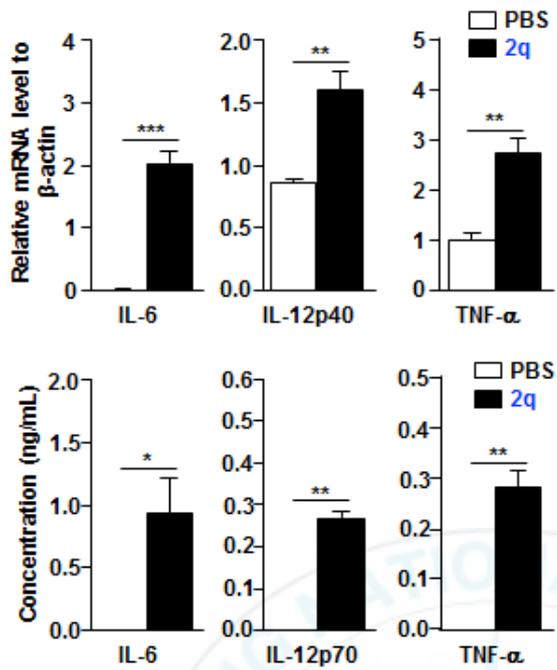


그림 20. 2q를 주사한 쥐의 4시간 후 비장세포의 싸이토카인 mRNA 발현과 (위) 혈청 속의 싸이토카인 농도 (아래)

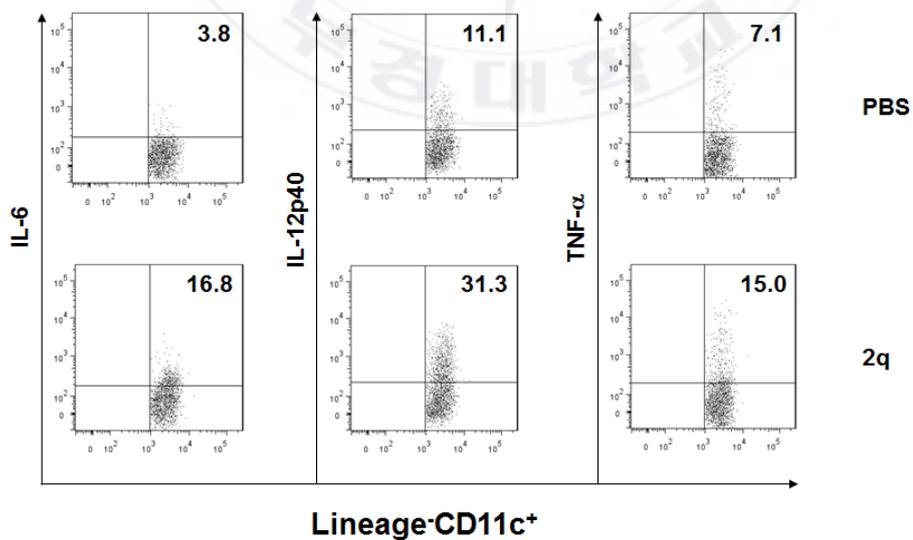


그림 21. 2q를 주사한 쥐의 24시간 후 비장세포의 싸이토카인

4. eCpG 단일가닥과 U4T-eCpG 면역 활성화 비교

실험방법 II.1.4.에서 U4T-eCpG 나노입자가 10% FBS 환경에서 반감되는 데에 30분이 소요되는 것으로 확인하였다. 따라서 단일가닥 DNA에 비해 구형의 나노입자가 면역 활성화에 유리한지 확인하기 위해 eCpG를 2q 농도와 같도록 하여 비교하였다.

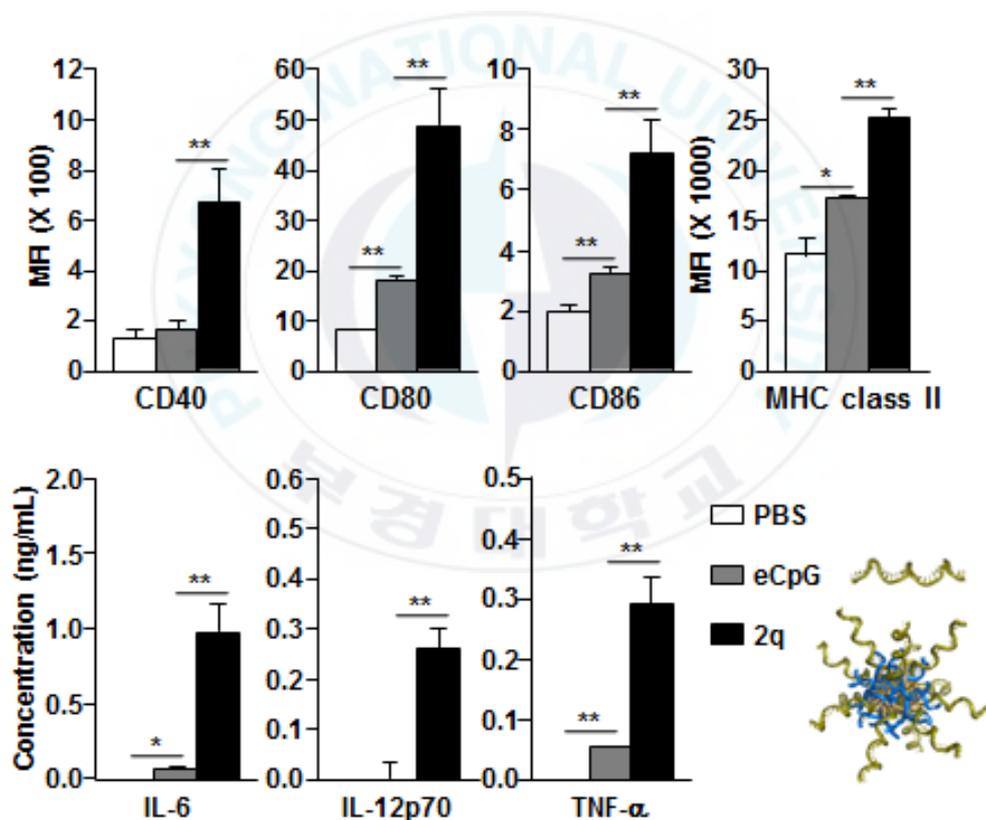


그림 22. eCpG와 2q를 주사한 쥐의 비장세포의 공통자극분자 발현과 싸이토키인 분비

PBS, eCpG, 2q를 주사하고 24시간 후에 비장내 수지상세포의 공통자극분자와 싸이토카인 분비를 측정하였다.(그림 22) eCpG의 경우에도 PBS와 비교하여 약간의 면역 활성화는 있었지만 같은 농도의 U4T-eCpG 나노입자에 비해 현저히 효과가 떨어지는 것으로 나타났다.

5. Td-CpG와 U4T-eCpG 면역 활성화 비교

KIST 안대로 박사님 연구실에서 같은 염기서열의 올리고 DNA를 제공받아 사용하였다. 이 구조의 경우 고농도에서 연속적인 자가조립으로 뭉치는 현상이 있어 U4T-eCpG의 2q와 같은 농도를 사용하지 못했다. 즉 한 종류의 올리고 DNA로 이루어진 구형의 나노입자에 비해 eCpG의 함량을 조절할 수 없는 단점이 있다. 따라서 PBS, Td-CpG, 1q, 2q의 공통자극분자와 싸이토카인 분비를 측정하였고 그 결과는 예상한대로 eCpG의 함량이 같은 Td-CpG와 1q의 면역 활성화가 비슷하게 나타났다.(그림 23)

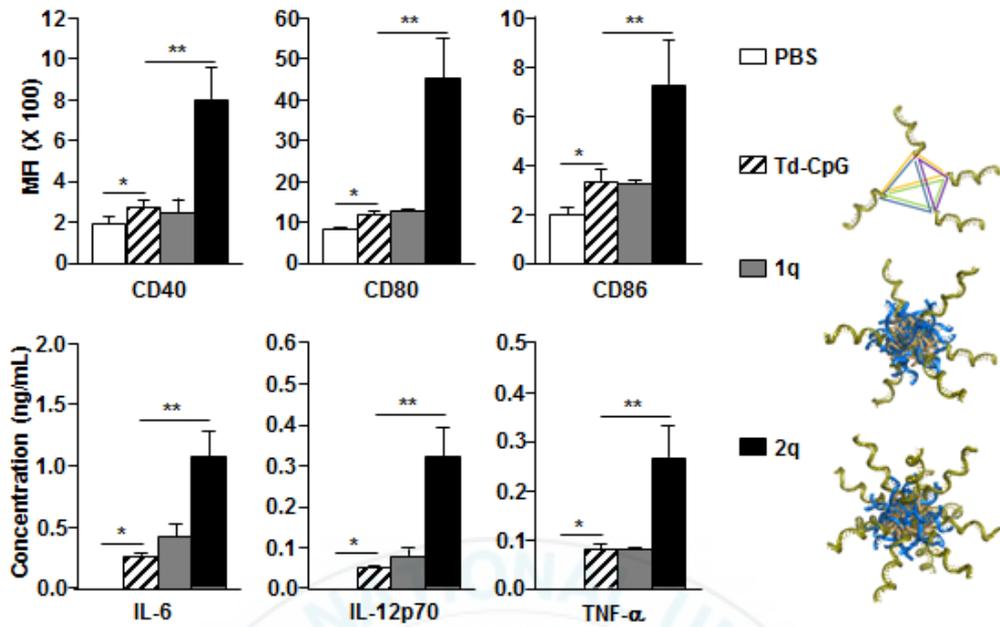


그림 23. Td-CpG와 1q, 2q에서의 공통자극분자 발현과 싸이토카인 분비

6. BMDC 테스트

앞서 II.3.6.에서 언급한 BMDC에 U4T, 1, 10, 50 μ l의 2q 시료, eCpG 단일가닥을 각각 더하여 24시간 처리하였다. 그리고 동물 실험과 같은 방법으로 공통자극분자와 MHC class, 싸이토카인의 mRNA 발현과 배양액의 싸이토카인 농도를 측정하였다.

먼저 셀 표면의 성상을 현미경으로 관찰했을 때, 10, 50 μ l의 2q를 처리한 경우 눈에 띄게 달라진 것을 알 수 있었다. 공통자극분자와 MHC class의 발현도 10, 50 μ l의 2q에서 가장 높게 나타났다. 1 μ l의 2q를 처리한

경우에는 오히려 eCpG 단일가닥을 처리했을 때보다 변화가 없는 것으로 보아 동물 실험에서도 언급된 것처럼 수지상세포가 활성화되는 최소의 농도와 최대의 농도가 정해져 있을 것으로 예상된다. 또한 동물 실험과 달리 셀 테스트에서는 eCpG 단일가닥의 경우에도 수지상세포 활성이 크게 나타났는데, 이는 체내 유입되어 혈액을 지나 수지상세포로 들어가는 경로 없이 셀에 직접 작용함에 기인한 것으로 보인다. 따라서 셀 테스트에서 면역 활성화 효과가 있다 하더라도 동물 실험의 체내 안정성 여부에 따라 같은 효과가 있는지 확인해야 할 필요가 있다.

더불어 싸이토카인의 분비를 확인하기 위해 10 μ l의 2q를 처리한 셀과 eCpG 단일가닥을 처리한 셀의 mRNA 발현과 싸이토카인 농도를 측정하였다. 앞서 공통자극분자와 MHC class의 결과와 마찬가지로, 2q의 경우 가장 높은 싸이토카인 분비를 보였고, eCpG의 경우는 그에 비해 조금 못 미치는 상태로 나타났다.

IV. 결론

DNA의 한쪽 끝에 소수성 기능을 합성하여 양친매성 분자를 만들고, 마이셀 구조를 이루게 한 다음 상보적인 염기서열을 이용하여 표면에 면역 활성이 있는 CpG ODN이 배열된 나노입자를 만들었다. 이를 쥐에 주사하여 면역 분석을 실시한 결과 수지상세포의 TLR-9에 인식되어 수지상세포의 수가 증가하고 공통자극분자가 발현되며 싸이토카인 분비가 증가하여 면역 반응이 활성화됨을 확인하였다. 또한 CpG의 함량을 조절하여 면역 활성화에 효과적인 함량을 찾아낼 수 있었으며, 형광 표지된 상보서열을 더 하여 세포 내 섭취를 직접적으로 관찰하였다. 체내의 환경에 대하여 CpG 단일가닥에 비해 안정한 구조로 면역 활성화에 유리할 뿐만 아니라 기존에 연구된 Td 나노구조에 비해 고농도로 조절이 가능하다는 장점을 알아내었다. 이를 통해 면역 활성을 위한 보조제로서의 효과와 형광 표지된 상보서열을 응용한 생체 이미징 기술을 기대해 볼 수 있다.

최근까지 발전해 온 DNA 나노기술은 2011년 발표된 Shawn M. Douglas의 나노로봇처럼^[6] 정교한 DNA 구조를 이용하여 효과적인 약물 전달을 의도할 수도 있다. 그러나 DNA 소재의 특성 상, 복잡하고 정교할수록 올리고 합성과 자가조립의 수율이 크게 저하되기 때문에 그 활용을 기대하기가 어렵다. 이에 반해 양친매성 DNA 나노입자의 경우 한가지 서열의 올리고 DNA를 사용하여 균일한 구형이 만들어진다는 점, 그리고 단순한 마

이셀 나노입자로 그치지 않고 상보서열에 다른 물질을 합성하여 혼성을 통해 그 함량과 조성을 조절할 수 있다는 점에서 복잡하고 수율이 떨어지는 DNA 나노구조들에 비해 여러 분야에 쉽게 응용할 수 있을 것으로 보인다. 또한 이 연구에서 사용한 특정 DNA 서열이나 펩티드 항원을 넘어서서 단백질이나 무기입자 등을 유도할 가능성도 열려 있다.

다만 부족한 것은 항원을 합성한 OVA-cU4T 물질을 합성 수율과 정제의 문제점 때문에 eCpG와 동시에 혼성한 나노입자를 준비하지 못해 동물 실험을 적용하지 못한 점이다. 따라서 연구 초반에 목적인 항원과 보조제가 같이 들어있어 항원특이적인 면역 활성을 유도하는 나노입자를 제조하려던 의도는 미완성된 채로 남아 있다. 그러나 앞으로 지속된 연구 활동을 통해 click 반응의 촉매 물질의 종류를 다양하게 하고 hexynyl-cU4T 합성 스케일과 조건을 개선함으로써 문제를 해결할 수 있을 것으로 기대한다.

V. 참고문헌

- [1] Seeman, N. C. Nucleic acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* **1982**, *99*, 237–47.
- [2] Rothemund, P. W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature* **2006**, *440*, 297–302.
- [3] Tu, X.; Manohar, S.; Jagota, A.; Zheng, M. DNA sequence motifs for structure-specific recognition and separation of carbon nanotubes. *Nature* **2009**, *460*, 250–3.
- [4] Maune, H. T.; Han, S. P.; Barish, R. D.; Bockrath, M.; Goddard, I. I. A.; RothemundPaul, W. K.; Winfree, E. Self-assembly of carbon nanotubes into two-dimensional geometries using DNA origami templates. *Nat. Nanotechnol.* **2010**, *5*, 61–66.
- [5] Morris, W.; Briley, W. E.; Auyeung, E.; Cabezas, M. D.; Mirkin, C. A. Nucleic acid-metal organic framework (MOF) nanoparticle conjugates. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 7261–4.
- [6] Douglas, S. M.; Bachelet, I.; Church, G. M. A logic-gated nanorobot for targeted transport of molecular payloads. *Science* **2012**, *335*, 831–4.

- [7] Liu, C.; Jiang, D.; Xiang, G.; Liu, L.; Liu, F.; Pu, X. An electrochemical DNA biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis*, based on signal amplification of graphene and a gold nanoparticle–polyaniline nanocomposite. *The Analyst* **2014**, *139*, 5460–5.
- [8] Tørring, T.; Voigt, N. V.; Nangreave, J.; Yan, H.; Gothelf, K. V. DNA Origami: A Quantum Leap for Self–Assembly of Complex Structures. *Chem. Sci.* **2011**, *40*, 5636–5646.
- [9] Kwiat, M.; Elnathan, R.; Kwak, M.; de Vries, J. W.; Pevzner, A.; Engel, Y.; Burstein, L.; Khatchtourints, A.; Lichtenstein, A.; Flaxer, E.; Herrmann, A.; Patolsky, F. Non–Covalent Monolayer–Piercing Anchoring of Lipophilic Nucleic Acids: Preparation, Characterization, and Sensing Applications. *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 280–292.
- [10] Liu, K.; Zheng, L.; Liu, Q.; de Vries, J. W.; Gerasimov, J. Y.; Herrmann, A. Nucleic Acid Chemistry in the Organic Phase: From Functionalized Oligonucleotides to DNA Side Chain Polymers. *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, *136*, 14255–14262.
- [11] Conway, J. W.; McLaughlin, C. K.; Castor, K. J.; Sleiman, H. DNA Nanostructure Serum Stability: Greater than the Sum of Its Parts. *Chem. Commun.* **2013**, *49*, 1172–1173.
- [12] Welsher, K.; Sherlock, S. P.; Dai, H. Deep–Tissue Anatomical

- Imaging of Mice Using Carbon Nanotube Fluorophores in the Second Near-Infrared Window. *P. Natl. Acad. Sci. Usa.* **2011**, *108*, 8943–8948.
- [13] Muraoka, D.; Harada, N.; Hayashi, T.; Tahara, Y.; Momose, F.; Sawada, S.; Mukai, S.; Akiyoshi, K.; Shiku, H. Nanogel-Based Immunologically Stealth Vaccine Targets Macrophages in the Medulla of Lymph Node and Induces Potent Antitumor Immunity. *ACS Nano* **2014**, *8*, 9209–9218.
- [14] Zhang, W.; Cho, S. Y.; Xiang, G.; Min, K. J.; Yu, Q.; Jin, J. O. Ginseng Berry Extract Promotes Maturation of Mouse Dendritic Cells. *PLoS One* **2015**, *10*, e0130926.
- [15] Zhang, W.; Du, J. Y.; Jiang, Z.; Okimura, T.; Oda, T.; Yu, Q.; Jin, J. O. Ascophyllan Purified from *Ascophyllum Nodosum* Induces Th1 and Tc1 Immune Responses by Promoting Dendritic Cell Maturation. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 4148–4164.
- [16] Stulz, E.; Clever, G.; Shionoya, M.; Mao, C. DNA in a Modern World. *Chem. Sci.* **2011**, *40*, 5633–5635.
- [17] Kwak, M.; Gao, J.; Prusty, D.; Musser, A.; Markov, V.; Tombros, N.; Stuart, M.; Browne, W.; Boekema, E.; ten Brinke, G.; Jonkman, H.; van Wees, B.; Loi, M.; Herrmann, A. DNA Block Copolymer Doing It DNA Block Copolymer Doing It All: From Selection to Self-Assembly of Semiconducting

- Carbon Nanotubes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 3206–3210.
- [18] Chien, M.; Rush, A. M.; Thompson, M. P.; Gianneschi, N. C. Programmable Shape–Shifting Micelles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2010**, *49*, 5076–5080.
- [19] Alemdaroglu, F. E.; Alemdaroglu, N. C.; Langguth, P.; Herrmann, A. Cellular Uptake of DNA Block Copolymer Micelles with Different Shapes. *Macromol. Rapid. Comm.* **2008**, *29*, 326–329.
- [20] Alemdaroglu, F. E.; Alemdaroglu, N. C.; Langguth, P.; Herrmann, A. DNA Block Copolymer Micelles – a Combinatorial Tool for Cancer Nanotechnology. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 899–902.
- [21] Kwak, M.; Gao, J.; Prusty, D.; Musser, A.; Markov, V.; Tombros, N.; Stuart, M.; Browne, W.; Boekema, E.; ten Brinke, G.; Jonkman, H.; van Wees, B.; Loi, M.; Herrmann, A. DNA Block Copolymer Doing It All: From Selection to Self–Assembly of Semiconducting Carbon Nanotubes. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2011**, *50*, 3206–3210.
- [22] Rodriguez–Pulido, A.; Kondrachuk, A. I.; Prusty, D. K.; Gao, J.; Loi, M. A.; Herrmann, A. Light–Triggered Sequence–Specific Cargo Release from DNA Block Copolymer–Lipid

- Vesicles. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2012**, *52*, 1008–1012.
- [23] Banchereau, J.; Palucka, A. K. Dendritic Cells as Therapeutic Vaccines against Cancer. *Nat. Rev. Immunol.* **2005**, *5*, 296–306.
- [24] Banchereau, J.; Steinman, R. M. Dendritic Cells and the Control of Immunity. *Nature* **1998**, *392*, 245–252.
- [25] Jin, J. O.; Park, H. Y.; Xu, Q.; Park, J. I.; Zvyagintseva, T.; Stonik, V. A.; Kwak, J. Y. Ligand of Scavenger Receptor Class a Indirectly Induces Maturation of Human Blood Dendritic Cells via Production of Tumor Necrosis Factor-Alpha. *Blood* **2009**, *113*, 5839–5847.
- [26] Li, J.; Pei, H.; Zhu, B.; Liang, L.; Wei, M.; He, Y.; Chen, N.; Li, D.; Huang, Q.; Fan, C. Self-Assembled Multivalent DNA Nanostructures for Noninvasive Intracellular Delivery of Immunostimulatory CpG Oligonucleotides. *ACS Nano* **2011**, *5*, 8783–8789.
- [27] Schuller, V. J.; Heidegger, S.; Sandholzer, N.; Nickels, P. C.; Suhartha, N. A.; Endres, S.; Bourquin, C.; Liedl, T. Cellular Immunostimulation by CpG-Sequence-Coated DNA Origami Structures. *ACS Nano* **2011**, *5*, 9696–9702.
- [28] Anaya, M.; Kwak, M.; Musser, A. J.; Mullen, K.; Herrmann, A. Tunable Hydrophobicity in DNA Micelles: Design, Synthesis,

and Characterization of a New Family of DNA Amphiphiles.

Chem. Eur. J. **2010**, *16*, 12852–12859.

- [29] Kwak, M.; Minten, I.; Anaya, D.–M.; Musser, A.; Brasch, M.; Nolte, R.; Mullen, K.; Cornelissen, J.; Herrmann, A. Virus–Like Particles Templated by DNA Micelles: A General Method for Loading Virus Nanocarriers. *J. Am. Chem. Soc.* **2010**, *132*, 7834–7835.

- [30] Chockalingam, A.; Brooks, J. C.; Cameron, J. L.; Blum, L. K.; Leifer, C. A. TLR9 Traffics through the Golgi Complex to Localize to Endolysosomes and Respond to CpG DNA. *Immunol. Cell Biol.* **2009**, *87*, 209–217.

감사의 글

먼저 이 석사 과정과 학위 논문의 시작과 끝을 책임져 주신 광민석 지도 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 처음 대학원 생활을 시작할 때 고민하고 망설이던 제게 용기를 주시고 여기까지 오도록 이끌어 주셨던 기억이 납니다. 기대하셨던 만큼 많은 성과를 내지 못해 죄송스런 마음도 큼니다. 비록 2년의 짧은 시간을 보내고 졸업을 하게 되었지만 부족한 제게 다시 공부할 수 있는 기회를 주시고 많은 지식과 경험을 전해 주신 데 대해 늘 감사한 마음을 갖고 살겠습니다.

또한 미지의 세계였던 면역학에 한발 다가갈 수 있도록 도와주신 진준오 교수님께도 감사드립니다. 상해의 연구실을 직접 가보지 못해 늘 아쉬웠습니다. 앞으로 상해에 갈 기회가 생긴다면 꼭 한번 찾아뵙도록 하겠습니다.

그리고 실험에 도움을 주신 Andreas Herrmann 교수님, UNIST 유자형 교수님, KIST 안대로 박사님께도 감사드리며, 바쁜 시간에 심사에 응해주신 박선주 교수님, 김학준 교수님께도 다시 한번 감사의 말씀을 드립니다. 면역학 수업을 듣도록 허락해 주신 미생물학과 최태진 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

갑작스럽게 시작한 석사 과정과 낯선 부산에서의 삶을 함께 해 준 인도네시아 친구들 Listiana와 Andry, Wahyu에게도 고맙다는 말을 전하고 싶고 (Terima Kasih!) 소소한 취미를 이어갈 수 있게 해준 PKNUO에게도 작은 감사를 전합니다. 학업과 연구뿐만 아니라 일상 전체를 공유했던 실험실 동생들, 김미진, 황주영, 강민경, 김해주에게 특별한 감사와 애정을 표합니다. 마지막으로 주말마다 부산에 오느라 고생했던 반려자에게 미안하고 고마운 마음을 남깁니다.

2016년 부산의 계절, 5423B에서
HP 박 해 인