

Layer-by-Layer Assembly를 이용한 세포 피포화

Cell Encapsulation through Layer-by-Layer Assembly

양성호 | Sung Ho Yang

Department of Chemistry Education, Korea National University of Education,
San 7 Darakri, Gangnaemyeon, Cheongwongun, Chungbuk 363-791, Korea
E-mail: sunghoyang@knue.ac.kr

1. 서론: 세포 피포화 연구의 배경 및 다층박막적층법의 적용 배경

의학 및 바이오산업에 있어서 높은 응용성과 시장성을 가진 바이오센서, 바이오칩, 생반응기 등에 살아있는 세포를 적용하기 위해서, 미생물 및 동물세포를 하이드로겔 혹은 실리카겔 매질에 고정화하는 연구가 활발하게 진행되어 왔다.¹⁻⁵ 초기의 연구들은 세포가 고정된 매트릭스 자체에 관심이 있었을 뿐, 고정된 세포의 생물학적 변화에 대해서는 큰 관심이 없었다. 2002년, 글리세롤을 포함한 실리카겔 매트릭스에 고정된 대장균이 한 달이 지난 후에도 생존비율이 40%에 이른다는 결과가 발표되면서, 세포의 고정화가 세포의 안정성을 증가시킬 수 있다는 사실에 관심이 모아졌다(고정화하지 않은 경우에는 한 달 후의 생존비율이 10%에 불과했다).⁶ 2006년에는 효모를 지방산을 포함한 실리카겔 매트릭스에 고정화한 결과, 생존비율이 현저하게 증가했다는 사실이 밝혀졌다.¹ 솔-젤 합성법을 이용한 세포 고정화가 세포의 생존력을 증가시켜 장기적인 보존에 도움을 준다는 결과가 발표됨으로써, 그 응용적인 중요성뿐만 아니라 세포 대사 및 세포 간 신호 전달과 같은 기초 생물학 분야 연구에서의 중요성도 함께 부각되고 있다.^{6,7} 하지만 기존의 세포 고정화 방식은 주로 여러 개의 세포를 실리카겔 혹은 하이드로겔 매질에 불균일하게 고정화하는 방식이었다. 잘 제어된 형태의 세포 기반 바이오센서, 바이오회로, 바이오칩 등의 구현뿐 아니라, 궁극적인 세포생물학 연구를 위해서는 하나의 인공겔질에 세포가 하나씩 들어 있는 형태(단일세포@인공겔질)를 구현하는 기술의 개발이 필요하다(이 글에서는 어떤 재료에 피포화된 세포를 '세포@재료'와 같은 방식으로 표현할 것이다).

2000년 이후 많은 연구자들의 노력으로, 단일세포를 피포화할 수 있는 다양한 방법이 개발되었다.⁸⁻¹¹ 소수의 예외적인 방법을 제외하면, 거의 대부분의 연구가 다층박막적층법(Layer-by-Layer(LbL) assembly)을 기반으로 하고 있다. 다층박막적층법은 양전하를 가진 고분자와 음전하를 가진 고분자를 한 층씩 차례로 쌓아 올려서 고분자 박막을 만드는 기술이다. 고분자 다층박막의 형성은 코팅하고자 하는 기질을, 정전기적 인력으로 상호 작용하는 두 종류의 고분자가 각각 용해된 용액에 번갈아 담가줌으로써 진행된다.

다층박막적층법이 가지는 몇 가지 장점 때문에, 그 방법으로 살아있는 세포를 피포화하기에 적합하다. (1) 다층박막적층법은 표면의 다른 특성에는 크게 영향 받지 않고, 표면의 정전기적 성질, 즉 전하에만 영향을 받는다.

Author



양성호

2005 KAIST 화학과 (학사)
2010 KAIST 화학과 (박사)
2010-2011 KAIST 화학과 (Post-Doc.)
2011-2012 UC Berkeley (Post-Doc.)
2012-현재 한국교원대학교 화학교육과 조교수

따라서, 세포의 종류에 관계없이 표면 전하를 가지는 모든 세포의 피포화에 적용이 가능하다. (2) 적층 횟수를 조절하면, 나노미터 수준에서 박막의 두께를 손쉽게 조절할 수 있다. 때문에 세포와 같은 작은 기질의 표면에도 얇고 균일한 박막을 형성할 수 있다. (3) 매우 간단하고 적은 비용으로 균일한 박막을 형성할 수 있다. 수 많은 세포에 균일한 박막을 입히기 위해서는 효율성, 경제성, 확실성을 가진 방법이 요구되는데, 다층박막적층법은 이러한 요건을 잘 충족시킨다. (4) 이미 합성된 고분자를 이용하여 박막을 만들기 때문에 다양한 기능을 가지는 고분자를 합성할 수만 있으면, 그 고분자로 세포를 피포화하여 어떤 기능인든 세포 표면에 도입할 수 있다. 이를 통하여, 세포의 표면 개질 혹은 기능화에 있어서 다양성을 확보할 수 있다. (5) 무엇보다도 상온, 상압, 수용액 등의 생체친화적인 조건에서 박막을 형성할 수 있는 점에서 살아있는 세포에 그 방법을 응용하기에 적합하다. 살아있는 세포를 피포화하기 위해서는 세포를 피포화 하고자 하는 물질의 생체친화성뿐만 아니라, 피포화하는 모든 과정에서 생체친화성이 확보되어야만 한다. 연구자들은 세포에 대한 독성이 없는 고분자를 선택하고, 다층박막의 층 수, 층 당 고분자 적층 시간, 고분자 용액의 염 농도 등을 적절히 제어하여, 피포화 후에도 세포의 생존력을 유지시킨다. 이러한 성공적인 시연은 다층박막적층법이 세포 피포화에 매우 적합한 방법임을 입증하고 있다. 이 글에서는 다층박막적층법이 세포 피포화에 적용된 다양한 예를 개발된 역사적 순서와 피포화 재료물질의 종류에 따라서 소개하고, 그 연구의 의미를 기술할 것이다. 또한, 미래에 구현될 것으로 예상되는 피포화 방법 및 피포화 기술의 응용성에 대해서도 기술할 것이다.

2. 세포를 주형으로 이용한 고분자 다층박막 마이크로캡슐

2000년대에 접어들면서, 세포를 피포화할 수 있는 다양한 방법들이 개발되었다. 그 중에서도 다층박막적층법은 가장 활발히 세포 피포화 연구에 적용되었다. 다층박막적층법을 이용한 초기의 세포 피포화 연구는 세포의 생존력이나 생물학적인 특성 변화보다는, 세포를 주형으로 사용하여 고분자 마이크로캡슐을 제조하는 것을 주된 목표로 하고 있다. Möhwald와 공동연구자들은 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)로 박제된 사람의 적혈구 세포(discocyte, echinocyte) 혹은 대장균(*Escherichia coli* (E. coli)), 효모(*Saccharomyces cerevisiae* (S. cerevisiae)) 등을 나노미터 수준의 고분자 다층박막으로 피포화한 후에 세포를 녹여냄으로써, 속이 비어 있는 마이크로캡슐을 만드는데 성공하였다(그림 1a, b).¹²⁻²¹ 다층박막 형성을 위한 양이온 고분자로 poly (allylamine hydrochloride) (PAH), poly(dimethyldiallylammonium chloride)(PDDA), poly ethyleneimine (PEI) 그리고 chitosan (CH) 등이 사용되

었으며, 음이온성 고분자로 poly (styrenesulfonate sodium salt)(PSS), poly(acrylate sodium salt)(PAA), dextran sulfate (DxSO₄), 그리고 sodium alginate (AL) 등이 사용되었다. 초기에 사용된 이 고분자들은 지금도 세포 피포화에 널리 사용되고 있다. 형성된 마이크로캡슐을 원자 힘 현미경(atomic force microscopy)으로 분석하여, 적층 횟수에 따라서 마이크로캡슐의 두께가 두꺼워짐을 확인하였고 다층박막의 표면 형태가 변화함을 보여주었다(그림 1c). 또한, 용액의 염 농도 혹은 마이크로캡슐에 싣고자 하는 물질의 극성 등에 따라서, 마이크로캡슐의 투과도가 달라짐을 확인하였다. 막의 투과도를 외부에서 제어할 수 있다는 사실은, 미래에 마이크로캡슐을 약물전달체로 사용할 수 있음을 시사한다. 세포를 주형으로 이용하여 마이크로캡슐을 만드는 일련의 연구들은 세포 자체보다는 다층박막에 그 초점이 맞추어져 있지만, 세포 표면에 다층박막 형성이 가능함을 보여주었다는 점에서 살아있는 세포 피포화 연구의 중요한 출발점이 되었다고 평가할 수 있다.

3. 살아있는 세포의 고분자 다층박막 피포화

3.1 최초의 세포 피포화 연구들

박제된 세포를 피포화하는 방법과 거의 유사한 방법으로

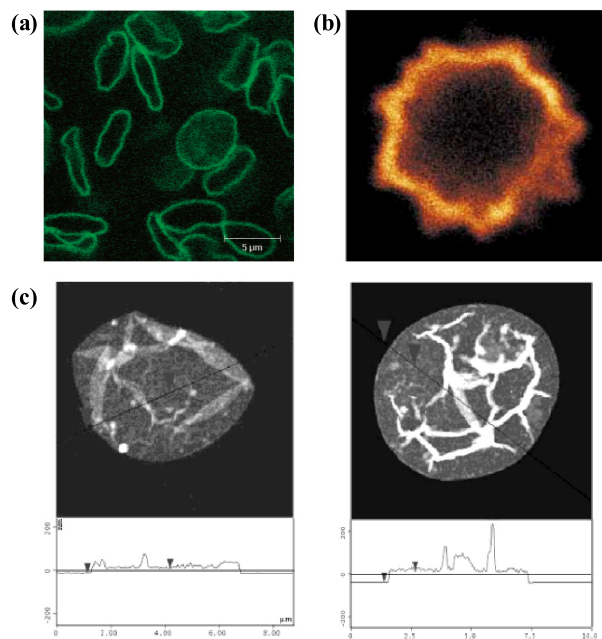


그림 1. (a) 1 mg/mL FITC-HAS의 NaCl/borate 완충용액(150 mM, pH 4) 속에서의 (PSS/PAH)_{2/2}PSS 마이크로캡슐의 공초점현미경 사진(ACS의 허가를 받아 게재함).¹⁷ (b) 극피적혈구 세포를 주형으로 만든(PSS/PAH)_{11/11} 마이크로캡슐의 공초점현미경 사진(Wiley의 허가를 받아 게재함).¹⁶ (c) 적혈구 세포를 주형으로 만든 마이크로캡슐의 원자 힘 현미경 사진과 그 단면 높이를 나타낸 그래프. 왼쪽은 (PSS/PAH)_{2/2}PSS, 오른쪽은 (PAH/PSS)₃ 마이크로캡슐(ACS의 허가를 받아 게재함).¹⁹

살아있는 세포를 고분자 다층박막으로 피포화한 후에 피포화된 세포의 생존을 확인함으로써, 세포 피포화 연구의 과학적 의미는 한 단계 더 발전하게 된다. 즉, 살아있는 세포를 화학적, 인위적 방식으로 수정 혹은 가공할 수 있는 방법을 마련한 것이다. 2002년, Lvov와 공동연구자들은 소의 혈소판(bovine thrombocyte)을 PDDA와 PSS로 구성된 다층박막으로 피포화하였을 뿐만 아니라, 형광 라텍스 나노입자, 실리카 나노입자, 그리고 면역글로불린 G 등을 적층 과정에 넣어 줌으로써, 기능화된 다층박막을 세포 표면에 도입할 수 있었다(그림 2a).²² 비록 피포화된 혈소판이 살아있는지를 확인하지는 않았지만, 기능화된 다층박막으로 세포를 피포화하면, 혈소판의 응집을 막을 수 있음을 보여주었다. 이러한 결과는 인공적인 방식인 피포화로 세포의 생물학적 특성을 제어할 수 있음을 증명한 것이다. 거의 유사한 방식으로 사람의 혈소판(human platelets)과 *Bacillus subtilis*의 포자를 PDDA와 PSS로 피포화한 결과가 발표되었으며, 다층박막의 두께에 따라서 박막의 물리적 성질이 달라짐을 원자 힘 현미경을 이용하여 확인하였다.²³

피포화된 세포의 생존을 확인한 연구는 Diaspro와 그의 공동연구자들에 의해서 2002년에 발표되었다.²⁴ 그들은 PAH와 PSS로 구성된 다층박막으로 효모를 피포화 하였고, 이산

화탄소의 발생과 세포의 분열 등을 확인함으로써 피포화된 세포가 대사 및 생식이 가능함을 보여주었다. 이들의 연구는 피포화된 세포가 생물학적으로 살아있다는 것을 보여준 최초의 연구였다. 형광을 부착한 고분자로 효모와 *Neurospora crassa*의 분생자를 피포화 함으로써, 세포를 감싸고 있는 다층박막의 존재를 시각화하여 확인할 수 있었을 뿐만 아니라, 세포의 분열을 직접 관찰할 수 있었다(그림 2b, c).²⁴⁻²⁹ 후속 연구에서 그들은 다층박막이 세포를 보호하는 역할을 할 수 있는지를 시험하였다.²⁶ 원생동물인 *Paramecium primaurelia*과 피포화된 효모를 함께 배양한 결과, 다층박막은 *Paramecium*에서 분비되는 분해효소로부터 효모를 보호하지 못하는 것으로 밝혀졌다. 이는 분해효소 정도 크기의 물질은 고분자 다층박막을 통과함을 의미한다. 더 나아가, PAH와 PSS로 피포화된 효모 세포를 반대 전하를 가지는 표면에 선택적으로 부착함으로써, 세포 피포화를 통해서 세포를 원하는 표면에 부착하여 세포-마이크로 패턴을 만들 수 있음을 보여주었다(그림 2d).²⁵ 초기의 연구들은 다층박막이 세포의 생존력 및 세포 분열에 영향을 거의 미치지 않는다는 사실을 확인함으로써, 다층박막 적층법이 생체친화적이며 세포 피포화에 적합한 방법임을 보여주었다. 더 나아가, 세포 피포화를 통하여 세포 표면의 물리적 혹은 생물학적 특성 변화시키려는 시도를 했음을 알 수 있다. 하지만 다른 한편으로 고분자 다층박막이 세포의 분열을 지연시키거나 외부 물질의 침입을 막지 못했다는 사실은 고분자 다층박막의 한계를 보여주는 것이기도 하다. 이러한 한계점은 후에 무기물을 이용한 세포 피포화로 극복된다.

3.2 다층박막으로 피포화된 미생물의 응용

살아있는 효모 세포를 고분자 다층박막으로 피포화한 이래로, 세포에 새로운 기능을 부여하기 위한 목적으로 다양한 종류의 다층박막이 세포 피포화에 사용되었다. 외부 환경 변화에 더 잘 견디는 성질 때문에, 피포화는 주로 미생물 세포를 대상으로 이루어졌다. Tabrizian과 그의 공동연구자는 살아있는 대장균 세포를 CH/AL 그리고 CH/hyaluronic acid (HA)로 피포화하였다.³⁰ 피포화 후에도 세포는 살아있었고, 세포 성장 및 분열이 정상적으로 유지되었다. 또한 CH/DNA 다층박막으로 피포화된 대장균이 상보적인 DNA 가닥을 인식할 수 있음을 보여주었다. 2011년에는 면역반응을 억제하는 다층박막으로 살아있는 적혈구를 피포화하여 항체가 적혈구에 결합하지 못 하게 함으로써, 세포 피포화로 혈액의 항원-항체 반응을 억제할 수 있음을 보여주었다.³¹ 다양한 다층박막을 시험한 체계적인 연구를 통하여, (AL/CH-graft-phosphorylcholine (PC))_{4/4} 박막 위에 (AL/poly-L-lysine(PLL)-graft-polyethylene glycol(PEG))_{3/2}을 적층한 다층박막이 적혈구의 면역반응 억제에 가장 효과적임을 밝혔다(그림 3a). 총 다층박막_{6/6}의 두께는 300 nm 정도임을 투과전자현미경으로 밝혔으며, 세포가

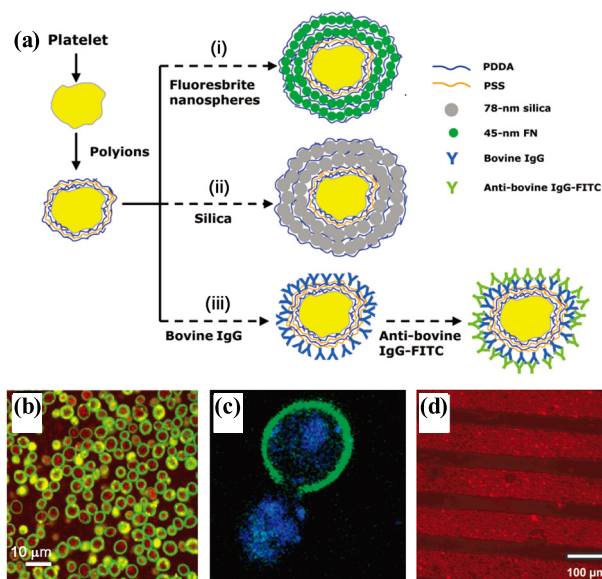


그림 2. (a) 혈소판을 다층박막을 도입하는 방법의 모식도, 혈소판을 먼저 PDPA/PSS/PDDA로 피포화한 후에 세 가지 다른 방법으로 다양한 물질을 도입함: (i) 형광 라텍스 나노입자(FN)를 (FN/PDDA)_{2/2}로 적층, (ii) 실리카 나노입자를(silica/PDDA)_{2/2}로 적층, (iii) 면역글로불린 G를 (PSS/IgG)_{2/2}로 적층한 후에 항체-항원 반응으로 인식함(ACS의 허가를 받아 게재함).²² (b) (FITC-PAH/PSS)_{2/2}로 피포화된 효모 세포의 공초점현미경 사진. (c) DAPI (파란색) 형광으로 염색한, (FITC-PAH/PSS)_{2/2}로 피포화된 효모세포의 출아 과정. 모세포는 녹색의 박막을 보이지만, 딸세포는 박막이 없음 (ACS의 허가를 받아 게재함).²⁴ (d) (PEI/PSS/RBITC-PAH)를 줄무늬로 코팅한 표면에 (PAH/PSS/Alexa(555)-PAH/PSS)로 피포화된 효모 세포를 선택적으로 흡착시킨 형광현미경 사진(ACS의 허가를 받아 게재함).²⁵

생물학적 활성을 보인다는 사실을 산소 소비와 용혈현상을 통해서 확인하였다. Lvov와 공동연구자들은 *Bacillus subtilis*의 포자를 (PDDA/PSS)_{4/4}나 (PLL/poly(glutamic acid)(PGA))_{4/4} 다층박막으로 피포화하였고, 피포화가 발아 속도에 큰 영향을 미치지 않음을 보여주었다.³²

Prange와 공동연구자들은 황을 흡수하는 박테리아인 *Allochrochromium vinosum*을 몇 종류의 양이온 고분자(PAH, PDDA)와 음이온 고분자(PSS, PGA, PAA)로 조합된 다양한 다층박막으로 피포화하여, 다층박막의 종류와 두께에 따른 황의 흡수 정도를 분석하였다.³³ 그 결과, 다층박막을 구성하는 고분자의 종류, 표면 전하, 적층 횟수에 따라서, 황의 흡수와 대사가 조절될 수 있다는 사실을 밝혔다. 이들의 연구는 다층박막을 이용하여 세포로의 외부 물질 유입을 조절할 수 있음을 시사한다. Tsukruk와 공동연구자들은 실크에 PPL

을 부착한 양이온성 고분자와 실크에 PGA를 부착한 음이온성 고분자를 효모 세포 표면에 적층함으로써, 효모 세포를 실크 다층박막으로 피포화하였다(그림 3b).³⁴ 생체고분자들로만 이루어진 다층박막의 생체친화성 덕분에 세포의 생존력이 약 97%에 이르렀으며, 일정 시간이 지나면 효모 세포가 실크 다층박막을 대사 과정을 통해서 분해한다는 사실을 발견하였다. 인공적으로 형성된 박막을 세포 스스로 분해하여 없앨 수 있다는 점에서, 다층박막에 대한 세포의 능동적 역할이 가능함을 보여주었다.

3.3 동물세포의 다층박막 피포화

미생물에 비하면 동물세포의 피포화는 훨씬 어려운 과제이다. 미생물은 단단한 세포벽 혹은 세포막을 가지고 있는 반면, 생체 조직에서 분리된 동물세포의 세포막은 매우 약하기 때문에, 동물세포는 작은 외부 환경 변화에도 쉽게 죽는다. 특히, 동물세포는 양이온성 고분자의 존재 하에서 생존력이 크게 떨어지기 때문에, 양이온성 고분자의 선택이 다층박막 피포화에 결정적인 영향을 미친다. Fournier와 공동연구자는 사람의 유방암 세포(breast cancer cells)를 PDDA/PSS 다층 박막으로 피포화하였고,³⁵ Lvov와 Mills는 쥐의 간충직 줄기세포(mouse mesenchymal stem cells)를 (PAH/PSS)_{2/2} (PLL/HA)_{3/3} 다층박막으로 피포화하였다.³⁶ 또한, 사람의 T-세포(human lymphocyte T-cell)는 avidin과 biotin의 특이적 결합을 통하여 PLL과 PEI로 구성된 다층박막으로 피포화되었다.^{37,38} 비록 단일세포는 아니지만, 사람의 이자세포섬(human pancreatic islet cell)을 (PDDA/PSS)_{3/3}이나 (PAH/PSS)_{3/3}으로 코팅하여 면역거부반응을 억제할 수 있음을 보여주었다.³⁹ 동물세포 피포화 연구에 있어서 가장 눈에 띄는 결과는 인체 내의 특이 결합을 다층박막 형성에 이용한 Akashi와 공동연구자들의 연구이다.⁴⁰ 양이온성 고분자가 세포의 생존력에 치명적이라는 사실 때문에 양이온성 고분자의 사용을 피하고 싶더라도, 정전기적인 인력에 의존하는 다층박막적층법의 특성 때문에 양이온성 고분자의 사용하지 않기는 실로 어렵다. 이러한 문제점을 극복하기 위해서 그들은 특이적으로 결합하는 생체고분자인 fibronectin (FN)과 gelatin(G)을 사용하였다. 두 고분자는 생리적 환경에서 모두 음전하를 나타내지만 FN과 G 간의 생체특이적 결합을 이용하여 사람의 섬유아 세포(human fibroblast cells), 사람의 배꼽 정맥 내피 세포(human umbilical vein endothelial cells), 사람의 간암세포(human hepatocellular carcinoma cells) 등을 FN/G 다층박막으로 피포화할 수 있었다(그림 3c).^{40,41} 또한 최외층이 FN으로 피포화된 세포와 G로 피포화된 세포를 적층하면, FN과 G의 특이적 결합 덕분에 피포화하지 않은 세포를 적층한 것에 비해서 밀도가 더 높은 삼차원 조직을 만들 수 있음을 보여주었다.

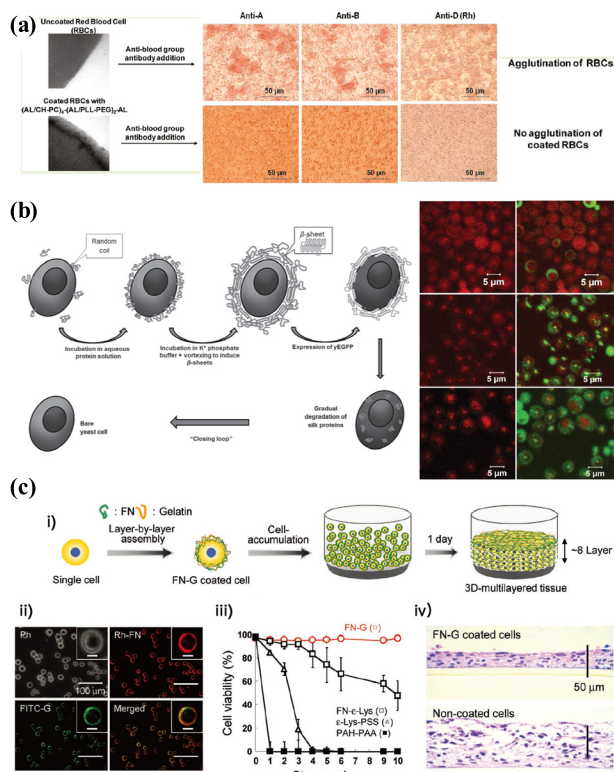


그림 3. (a) 대조군 적혈구와 (AL/CH-PC)_{4/4}/(AL/PLL-PEG)_{3/2}를 항A, 항B, 항Rh 혈청에서 담가두었을 때의 응고를 관찰한 현미경 사진. 대조군 적혈구는 응고를 일으킨 반면, 피포화된 적혈구는 응고작용이 없음(ACS의 허가를 받아 게재함).³¹ (b) 실크 다층박막으로 효모를 피포화하는 과정과 피포화된 효모 세포가 갈락토스에 의한 개시로 녹색형광단백질(GFP)을 발현하고 대사 과정을 통해서 실크 다층박막을 분해하는 과정을 나타낸 모식도. 그리고 18, 20, 25 시간(위에서 아래로)이 지남에 따라서 붉은색 형광이 붉은 실크 다층박막을 분해하는 효모세포(왼쪽)와 실크 다층박막을 분해하면서 동시에 GFP를 발현하는 효모세포(오른쪽)(Wiley의 허가를 받아 게재함).³⁴ (c) (i) FN과 G로 동물세포를 피포화하고, 3차원 조직을 형성하는 과정을 나타낸 모식도; (ii) (Rh-FN/FITC-G)_{3/3}로 피포화한 쥐의 섬유아 세포의 공초점현미경 사진. 삽입 그림의 축적은 10 μ m; (iii) 다양한 고분자로 구성된 3/3 다층박막으로 피포화된 쥐의 섬유아 세포의 생존력을 나타낸 그래프; (iv) (FN/G)_{3/3}으로 피포화된 사람의 섬유아 세포로 만든 3차원 조직(위)과 아무처리로 하지 않은 세포로 만든 3차원 조직(아래)(Wiley의 허가를 받아 게재함).⁴⁰

3.4 다층박막을 이용한 나노물질의 도입

양이온성 물질과 음이온성 물질의 정전기적 인력만으로 박막의 형성이 가능한 다층박막적층법의 원리를 응용하면, 다양한 종류의 나노물질을 세포 표면에 도입할 수 있다. 다층박막을 형성하는 과정에서 한 층 혹은 몇 층을 전하를 가지는 나노물질로 교체하면, 다양한 나노물질로 세포 표면을 쉽게 기능화할 수 있다. 예로서 금나노입자,⁴² 자성나노입자,⁴³ 실리카 나노입자,⁴⁴ 탄소나노튜브(CNT),⁴⁵ 풀러렌(C₆₀),³⁸ 할로 이사이트(halloysite),⁴⁶ 그리고 산화그래핀(graphene oxide)⁴⁷ 등으로 세포 표면을 기능화한 결과가 다수 발표되었다. 대부분이 고분자를 적층하는 과정에 적절한 표면 전하를 가진 나노물질을 이온성 고분자 대신 넣어주는 방식으로 이루어진다. 예외적으로 산화그래핀 피포화는 오직 산화그래핀만으로 효모 세포를 피포화하였다.⁴⁷ 산화그래핀을 화학적으로 변형하여, 양이온성과 음이온성의 그래핀을 합성한 후에, 두 산화그래핀 사이의 정전기적 인력으로 세포를 피포화하였다(그림 4a). 다른 한편으로, 효모가 탄소나노튜브로 기능화되면 효모의 전기화학적 특성이 달라진다는 점을 보여줌으로써, 피포화된 세포가 마이크로 전자기기나 세포 기반 바이오센서에 응용될 수 있음을 보여주었다(그림 4b).⁴⁵ 흥미롭게도 세포에 도입된 실리카 입자는 외부의 열적 스트레스에 대한 세포의 생존력을 높여주는 것으로 밝혀졌다.⁴⁴ 다양한 나

노입자 중에서도 자성입자가 도입된 세포는 자기장을 이용하여 세포를 원하는 곳으로 모으거나 이동시킬 수 있기 때문에, 바이오센서, 바이오반응기, 마이크로유체역학 등에 응용될 가능성이 높다. 이러한 높은 응용성 때문에 다양한 세포에 자성입자를 도입하는 연구가 진행되고 있다.⁴³ Fakhrullin과 공동연구자들은 세포의 생존력을 높이면서 자성입자를 세포 표면에 도입하기 위해서, PAH로 안정화시킨 자성나노입자를 효모 세포 표면에 직접 흡착하는 방식을 개발하였다.⁴⁸⁻⁵¹ 다층박막의 한 층을 나노입자로 대신하는 것보다는 PAH로 안정화된 자성나노입자를 세포 표면에 직접 도입하는 것이 세포의 생존력 증가에 도움이 됨을 밝혔다. 이와 같은 방법을 적용하여, 클로렐라 세포(*Chlorella pyrenoidosa*),^{52,53} 아시토네 박터 균(*Acinetobacter baylyi*),⁵⁴ 자궁경부암 세포(HeLa Cells),⁵⁵ 사람의 치조 상피 세포(human alveolar epithelial cells), 피부 섬유아 세포(skin fibroblast),⁵⁶ 예쁜 꼬마선충(*Caenorhabditis elegans*)⁵⁷ 등에 자성나노입자를 도입하였고, 자성을 가진 세포를 바이오센서, 마이크로칩, 마이크로유체역학기기 등에 사용 가능함을 시연함으로써, 피포화된 세포의 응용 범위를 한 층 넓혔다.

4. 무기물을 이용한 세포 피포화

4.1 생체친화적인 무기물 합성법

다층박막적층법을 이용하여 다양한 세포를 고분자박막으로 피포화할 수 있었고, 세포의 표면 성질을 제어할 수 있었다. 고분자 다층박막이 가지는 다양한 장점에도 불구하고, 이를 이용하여 피포화된 세포를 보호하거나 세포 분열을 제어할 수 있다는 연구는 2011년까지 보고되지 않았다. 이는 아마도 고분자 다층박막이 기계적으로 약하기 때문으로 추측된다. 고분자 박막의 약한 기계적 성질을 보완하기 위해서, 연성 물질인 고분자보다는 높은 강도를 가진 무기물로 세포를 피포화하려는 시도가 최근 5년간 꾸준히 진행되고 있다. 이미 합성된 고분자를 세포 표면에 부착하는 방식의 다층박막적층법으로는 무기물을 합성할 수 없다는 점 때문에, 무기물을 이용한 세포 피포화를 위해서는 다른 방법을 찾아야만 한다. 대부분의 무기물이 높은 온도, 극단적 pH, 부식성을 가진 시약의 존재 하에서 진행된다는 점을 고려하면, 세포 표면에서 직접 화학반응을 일으켜 무기물을 합성하는 것은 세포의 생존력 측면에서 매우 어렵다. 수많은 물질과 다양한 화학반응이 존재하지만, 생물체에 적용할 수 있는 물질과 반응은 생물체에 대한 독성 때문에 그 수가 매우 한정되어 있다. 대부분의 세포는 중성에 가까운 산성도, 상온, 상압, 적당한 염이 포함된 수용액 상태 등의 제한적인 조건에서만 생존이 가능하다. 세포를 피포화하는 과정은 세포가 생존에 필요한 많은 조건을 충족시켜야만 하기 때문에, 그 선택에 있어 깊은

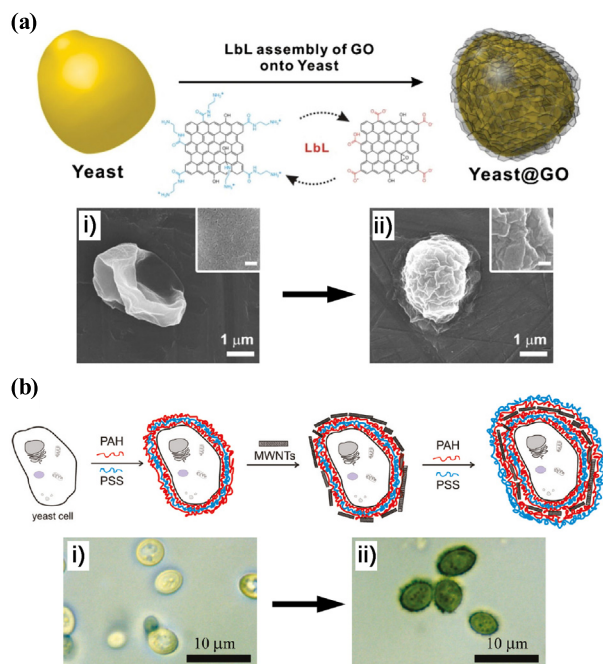


그림 4. (a) 탄소나노튜브를 다층박막적층법으로 효모세포 표면에 도입하는 방법을 보여주는 모식도 (i) 대조군 세포와 (ii) PAH/PSS/PAH/MWNTs/PAH/PSS로 피포화된 세포의 광학현미경 사진(ACS의 허가를 받아 게재함).⁴⁵ (b) 산화그래핀 다층박막으로 효모 세포를 피포화하는 과정을 보여주는 모식도, (i) 대조군 세포와 (ii) (GO⁺/GO⁻)_{3/2}로 피포화된 효모 세포의 전자현미경 사진. 삽입 그림의 축척은 100 nm(Wiley의 허가를 받아 게재함).⁴⁷

주의가 필요하다.

연구자들은 생물체에 적용 가능한 온화한 화학반응을 생물체에서 찾아내었다. 생물체는 자신의 몸을 지탱하거나 보호하기 위한 목적으로, 여러 형태의 생광물(biomineral)을 합성하여, 뼈, 껍질, 치아와 같은 조직을 단단하고 강하게 한다.⁵⁸⁻⁶⁰ 생물체는 계층적이고 복잡하며 기능적인 무기물 구조를 제어하는 능력을 가지고 있다. 또한 생물체가 제어하는 생광물화 반응(biomineralization)은 생체친화적인 조건에서 일어난다. 나노미터 수준의 규칙적인 구조, 우수한 기계적인 성질, 온화한 조건에서 일어나는 반응 등은 많은 연구자들에게 모방의 대상이었다.⁶¹⁻⁶³ 생광물이 가지는 다양한 장점과 생체친화적 반응 조건을 이용하기 위해서, 생광물화반응의 메커니즘을 모방하여 생체모방 합성법을 개발하였다. 생체모방 합성법은 생광물화반응의 가장 핵심적인 메커니즘을 모방하여 온화한 조건에서 인공적으로 무기물을 합성하고 제어하는 방법을 말한다. 생체모방을 통해서 확보된 온화한 화학 반응들은 생물체 혹은 생체물질에 적용하기에 적합하기 때문에, 무기물을 이용한 세포 피포화 연구에 큰 영감을 불어넣었다. 지난 5년간, 생체모방합성법을 이용하여, 살아있는 세포를 인산칼슘, 탄산칼슘, 실리카, 산화티타늄 등으로 피포화하는 데 성공하였다. 비록 연구의 초점이 단단한 인공 껍질의 재료인 무기물에 맞추어져 있지는 않지만, 다층박막 적층법이 실험 과정에서 완전히 배제된 것은 아니다. 무기물 인공 껍질에 관한 연구 결과들을 살펴보면, 무기물의 흡착을 돕거나 무기물의 합성을 촉진하는 고분자 다층박막으로 먼저 세포 표면을 피포화한 하는 경우가 대부분임을 알 수 있다. 비록 고분자 다층박막의 기계적 강도를 보완하기 위해서 무기물을 이용한 세포 피포화가 개발되었지만, 이러한 연구들도 실질적으로는 다층박막적층법에 의존하고 있다.

4.2 인산칼슘을 이용한 세포 피포화

인산칼슘은 척추 동물의 체내에서 뼈나 이를 구성하는 중요한 성분이다.⁶⁴ 인산칼슘은 주로 하이드록시아파타이드(hydroxyapatite)의 결정 구조로 존재하며, 조직에 물리적 강도를 증가시키는 역할을 한다. 2008년, Tang과 그의 공동 연구자들에 의해서 효모 세포를 인산칼슘으로 캡슐화한 연구가 발표되었다(그림 5a, b).⁶⁵ 기존의 연구에 의하면, 인산칼슘이나 탄산칼슘은 음전하를 가지는 표면 위에서 결정화가 잘 된다고 알려져 있다. 효모나 대장균의 표면이 음전하를 띠고 있기 때문에, 효모 표면에서 인산칼슘의 결정화가 잘 이루어질 것으로 예상할 수 있으나, 그들의 연구에 따르면 효모 표면의 음전하만으로는 인산칼슘을 결정화 하기에 충분하지 않았다.⁶⁶ 그들은 효모 표면에 충분한 음전하를 도입하기 위해서, 다층박막적층법을 사용하였다. 효모의 표면에 PDDA와 PAA를 번갈아 적층하고, PAA를 마지막 층으로 쌓아서

표면에 많은 양의 카르복실 산을 도입함으로써, 칼슘 이온과의 효모 표면의 결합력을 향상시켰다. 다층박막으로 피포화된 효모 세포를 염화칼슘 수용액에 담그고, 인산수소나트륨 수용액으로 적정함으로써, 효모@탄산칼슘 구조를 만들었다. 효모의 생존력을 시험하는 형광시약인 FUN1으로 염색한 결과, 피포화된 세포는 여전히 생존력을 유지하고 있었다(그림 5c). 인산칼슘으로 이루어진 단단한 껍질은 자이모라제(zymolyase)와 같은 분해 효소로부터 세포를 보호할 수 있었다(그림 5d). 또한, 영양분이 없는 순수한 물에 캡슐화된 세포를 한 달 동안 담가두어도, 세포의 생존률은 약 85%로 유지되었다. 같은 조건에서 아무런 처리도 하지 않은 대조군 세포의 생존률이 약 20%인 점을 감안하면, 인산칼슘 캡슐화가 세포가 장기간 생존하는데 긍정적인 역할을 하였다고 결론 내릴 수 있다. 더 나아가, 그들은 세포 분열이 인산칼슘 껍질에 의해서 제어될 수 있음을 보여주었다. 배양 조건 하에서도 단단한 껍질 때문에 효모@인산칼슘은 분열하지 못하지만, 산을 가하여 인산칼슘 껍질을 녹여내면 세포의 분열이 시작된다는 결과를 얻었다(그림 5e). 그들의 연구는 생광물로 구성된 단단한 껍질이 세포의 보호와 세포 분열의 제어에 도움

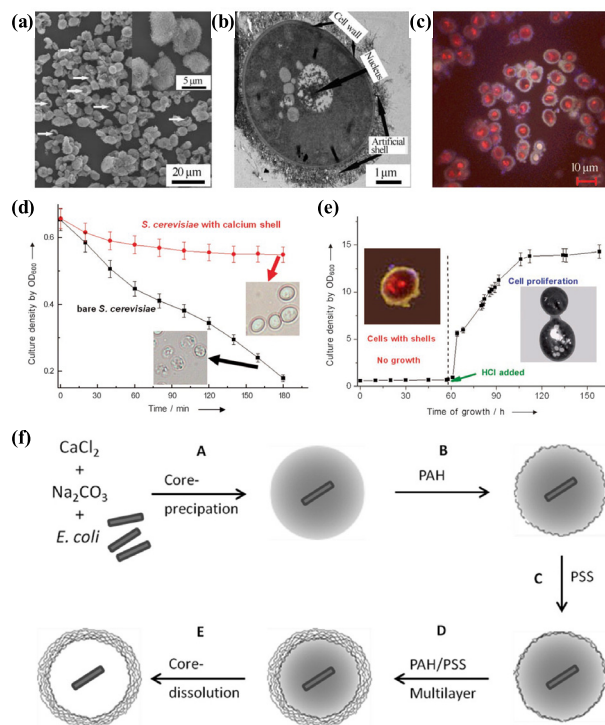


그림 5. 인산칼슘으로 피포화된 효모세포의 (a) 전자현미경 사진, (b) 전자투과현미경 사진, (c) 공초점현미경 사진(효모 세포질은 FUN1으로, 세포막은 fluorescent blue로, 인산칼슘 껍질은 tetracycline으로 염색함). (d) 분해효소에 노출되었을 때, 대조군 세포와 인산칼슘으로 피포화된 세포의 시간에 따른 흡광도 변화 그래프. (e) 배양 조건에서 대조군 세포와 인산칼슘으로 피포화된 세포의 시간에 따른 흡광도 변화 그래프. 60 시간되는 시점에 염산을 첨가하면, 세포의 분열이 시작되어 흡광도가 증가한다(Wiley의 허가를 얻어 게재함).⁶⁵ (f) 속이 빈 다층박막 고분자 마이크로캡슐에 세포를 피포화하는 방법을 나타낸 모식도(ACS의 허가를 받아 게재함).⁷⁶

을 줄 수 있음을 시연하였다. 거의 비슷한 방식을 적용하여, 인산칼슘 마이크로 캡슐을 만든 연구 결과도 발표되었다. Wang 교수와 그의 공동연구자들은 Tang 교수와 같은 방식으로 효모 세포를 인산 칼슘으로 피포화한 후에 효모 세포를 녹여냄으로써, 인산칼슘 마이크로캡슐을 제조하였다.⁶⁷

Tang과 그의 공동연구자들은 후속 연구에서, 생광물이 아닌, 생물체에 존재하지 않는 무기물로 제브라피쉬의 알을 피포화하였다.⁶⁸ (CH/PAA)_{3/3} 다층박막으로 제브라피쉬의 알을 피포화한 후에, 수용액 상에 존재하는 란타늄과 인산 이온을 표면 상에 결정화함으로써 세포를 인산란탄(LnPO₄)으로 캡슐화하였다. 인산란탄이 자외선을 흡수하는 성질을 이용하여,⁶⁹ 인산란탄 캡슐이 알을 자외선으로부터 보호할 수 있음을 보여주었다. 아무 처리도 하지 않은 알에 3일 동안 자외선을 조사한 결과, 7±2%만이 정상적으로 배아로 발생한 반면, 인산란탄 캡슐로 보호된 알은 같은 조건에서 51±11%가 정상적인 배아로 발생하였다.

4.3 탄산칼슘을 이용한 세포 피포화

탄산칼슘은 자연 상에 가장 많이 존재하는 생광물로 생물체의 뼈와 껍질을 구성하는 중요한 성분이다. 또한, 유공충(foraminifera)이나 코콜리스(coccoliths)와 같은 단세포 생물은 탄산칼슘으로 이루어진 껍질을 가지고 있어서, 인공적으로 탄산칼슘으로 캡슐화한 세포와 외형적으로 매우 닮아 있다.^{58,70,71} Fakhruddin과 Minullina는 효모 세포의 표면에 탄산칼슘을 결정화함으로써, 효모@탄산칼슘 구조를 만드는 데 성공하였다.⁷² 인산칼슘 피포화 방식과는 달리, 이들은 다층박막 피포화 없이 세포 표면의 음전하만으로 탄산칼슘의 결정화를 유도하였다. 탄산칼슘 형성에 전구체로 알려진 비결정 탄산칼슘(amorphous CaCO₃)의 표면이 양전하를 나타내기 때문에, 효모 표면의 음전하만으로도 결정화를 충분히 유도할 수 있었을 것으로 추측한다.⁷³⁻⁷⁵ 탄산칼슘으로 피포화된 세포는 몇 달동안이나 생존력을 유지한 채로 보관될 수 있었으며, ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt (EDTA)으로 탄산칼슘을 녹임으로써 껍질이 없는 효모로 다시 되돌릴 수 있었다. 탄산칼슘 피포화와 관련하여 고분자 다층박막을 이용한 연구는 Sieber와 공동연구자들에 의해서 이루어졌다.⁷⁶ 그들은 대장균@탄산칼슘 구조를 만든 후에, 탄산칼슘 껍질 표면 위에 PAH/PSS 혹은 protamine/PSS로 다층박막을 형성하였다. EDTA로 탄산칼슘을 녹여냄으로써, 텅 빈 고분자 다층박막 마이크로캡슐 속에 대장균 세포가 들어있는 구조를 만들었다(그림 5f). 비록 3분의 1 정도의 고분자 캡슐만이 대장균 세포를 포함하고 있어서 피포화 효율이 높지는 않았지만, 마이크로캡슐이 세포 분열을 지연시킬 수 있음을 보여주었다. 이는 고분자 캡슐이 세포에 영양분 공급을 늦추었기 때문으로 추측할 수 있다.

4.4 실리카를 이용한 세포 피포화

유리스펀지(glass sponge)와 같은 다세포생물, 혹은 규조류(diatoms), radiolarian, synurophytes와 같은 단세포생물은 단단하면서도 계층적이고 정교한 구조를 가진 실리카 껍질을 가지고 있다.⁷⁷⁻⁷⁹ 반면, 대부분의 세포는 단단한 무기물 껍질을 가지고 있지 않아서, 외부 환경에 그대로 노출되어 있다. 생화학자들은 규조류의 실리카 껍질 형성에 단백질 혹은 펩타이드가 결정적인 역할을 수행한다는 것을 알아내었다. 그들은 규조류의 실리카 외골격으로부터 실라핀(silaffin)이라는 펩타이드를 추출해내었다. 추출된 실라핀은 생체 밖에서도 여전히 실리카를 합성할 수 있음을 보여주었다. 실라핀은 유전자 발현 후 수정된 펩타이드로 라이신 잔기에 수 많은 아민 결합자가 붙어 있고, 세린 잔기는 인산작용기가 붙어있는 형태를 가지고 있다.^{80,81} 규조류에서 일어나는 생체실리카합성(biosilicification)은 양전하를 가진 펩타이드와 규산 유도체의 상호작용에 의해서 이루어진다고 알려져 있다.⁸² 이러한 생체실리카합성에서 영감을 얻어서, 실라핀을 모방한 합성고분자 혹은 합성펩타이드로 온화한 조건에서 실리카를 합성한 결과들이 발표되었다.⁸³⁻⁸⁴ 실험실 내에서의 생체모방 실리카합성(biomimetic silica formation)은 PLL,⁸⁵ poly-L-histidine,⁸⁶ poly-L-arginine,⁸⁷ PAH,⁸⁸⁻⁹⁰ amine-terminated dendrimers(PPI and PAMAM),^{91,92} poly(2-(dimethylamino) ethyl methacrylate)(PDMAEMA),⁹³⁻⁹⁸ PDDAC,⁹⁹⁻¹⁰¹ 그리고 PEI¹⁰²와 같이 아민 작용기를 많이 포함한 고분자를 규산 유도체와 반응시킴으로써 이루어졌다.

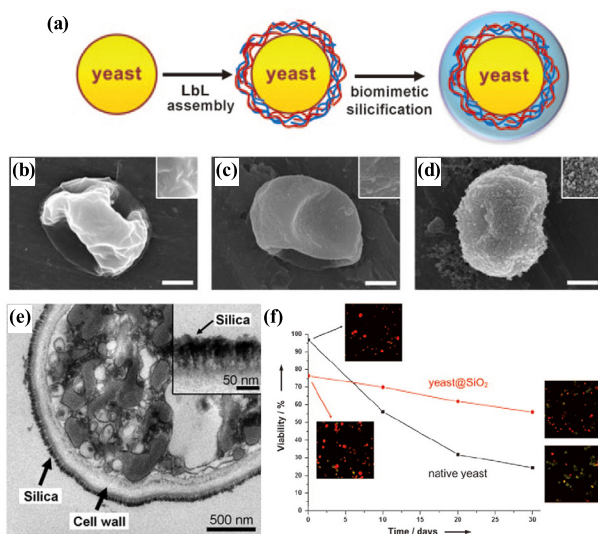


그림 6. (a) 효모 세포에 다층박막적층법과 생체모방 실리카 합성법을 적용하여, 실리카 캡슐로 피포화하는 방법을 나타낸 모식도, (b) 자연 상의 효모, (c) 다층박막으로 피포화한 효모, (d) 실리카 껍질로 캡슐화한 효모의 전자현미경 사진(축척은 1 μm), 삽입그림은 효모의 표면을 확대한 사진. (e) 실리카로 캡슐화된 세포의 투과전자현미경 사진. 삽입 그림은 실리카 껍질을 확대한 사진. (f) 대장균 세포와 효모@실리카의 시간에 따른 생존력을 시험한 그래프. 세포의 생존력은 FUN1 시약으로 염색하여 확인하였으며, 붉은색은 살아있는 세포이고, 녹색은 죽어있는 세포이다(Wiley의 허가를 받아 게재함).¹⁰⁶

연구자들은 살아있는 세포를 실리카로 캡슐화하기 위해서, 중성에 가까운 산도, 수용액, 상온, 상압, 낮은 규산 농도 등의 온화한 조건에서 실리카를 합성할 수 있는 생체모방 실리카합성법에 관심을 기울였다.¹⁰³⁻¹⁰⁵ 최인성 교수와 공동연구자들은 생체친화적인 조건에서 일어나는 다층박막적층법과 생체모방 실리카합성법을 세포에 연속적으로 적용하여, 살아있는 효모를 피포화하는데 성공하였다(그림 6a-e). 먼저, 그들은 실리카를 유도할 수 있는 촉매 고분자를 다층박막적층법을 이용하여 세포 표면에 도입하였다.¹⁰⁶ 3차 혹은 4차 아민 작용기를 포함한 합성고분자들이 온화한 조건에서 생체모방 실리카합성의 촉매로 작용한다는 기존 연구에 근거하여,^{93-96,99-101} 4차 아민을 포함한 고분자인 PDDA를 PSS와 짝을 이루어 세포 표면에 다층박막을 형성하였다. 촉매 박막으로 피포화한 효모 세포를 50 mM의 규산 수용액(pH 5.5)에 담가 줌으로써, 효모 표면에서 실리카를 합성하였다. 인공적으로 도입된 실리카 껍질이 세포의 생존력 향상에 도움이 된다는 사실을 대조군 세포와 효모@실리카를 4 °C의 순수한 물 속에서 30일간 보관함으로써 확인하였다(그림 6f). 실험 시작 전, 대조군 세포의 생존률은 약 97%였고 효모@실리카의 생존률은 약 77%였다. 효모@실리카의 낮아진 생존률은 아마도 다층박막 형성 과정에 포함된 원심분리에 의한 물리적 스트레스와 고분자와 규산으로부터 발생한 화학적 스트레스가 그 원인일 것으로 추측된다. 하지만, 30일이 지난 후에는 정반대의 경향을 나타내어, 효모@실리카의 생존률이 약 56%인 반면, 대조군 세포의 생존률은 약 24%였다. 이 실험 결과는 실리카 껍질이 세포의 장기 생존력을 높이는데 도움이 됨을 보여준다. 더 나아가, 대조군 세포와 효모@실리카를 배양한 결과, 실리카 껍질이 세포 분열 제어에 도움이 된다는 사실을 확인하였다. 배양조건에서 대조군 세포는 4시간 후에 세포 분열이 시작된 반면, 효모@실리카는 세포 분열이 20시간 넘게 지연되었다. 이러한 결과들은 다층박막을 주형으로 실리카를 합성함으로써, 인공껍질의 물리적 강도가 증가했음을 증거한다. 이 연구 결과는 공유결합으로 만들어진 최초의 인공껍질이라는 점에서 큰 의미를 가진다. 대부분의 공유결합이 세포가 생존하기에 적합하지 않은 조건에서 이루어진다는 점에 비추어보면, 온화한 조건에서도 공유결합을 만들 수 있는 생체모방 실리카 합성법은 세포 피포화 연구에 있어 중요한 방법론을 제시하였다고 평가할 수 있다.

세포 표면 기능화는 주로 대사공학 혹은 유전공학과 같은 복잡한 방법을 통해서, 작용기를 세포막에 도입함으로써 이루어진다.¹⁰⁷⁻¹¹² 생물공학을 이용한 방식이 더욱 생체친화적인 방식으로 발전되고 있는 것이 사실이지만, 화학적 작용기를 직접적으로 세포 표면에 도입한다는 점에서 세포막에 손상을 끼칠 가능성을 여전히 내포하고 있다. 그런 의미에서 고분자 다층박막 피포화는 세포의 표면을 간접적으로 기능화

할 수 있는 좋은 대안으로 여겨지고 있다.⁸⁻¹¹ 이미 이전 장에서 알아보았듯, 다양한 고분자 박막으로 세포 표면을 기능화한 예가 많이 있었음을 알 수 있다. 고분자 박막으로 쉽고 간단하게 세포 표면을 기능화할 수 있는 것은 사실이지만, 세포를 보호하거나 세포 분열을 제어하는 효과는 미미하다는 점에서, 세포의 기능화와 세포의 보호/제어를 동시에 충족시키는 무기물 껍질을 이용한 세포 피포화 방법의 개발이 필요하다. 무기물 껍질이 가지는 기계적인 단단함과 화학적인 안정성은 세포의 보호에 있어서 큰 장점이었지만, 세포 표면의 기능화 관점에서 보면, 이러한 장점은 오히려 심각한 장애물이 된다. 예를 들면, 인산칼슘이나 탄산칼슘 껍질은 화학적 안정성 때문에 기능화하기가 어렵다.¹¹³ 실리카 껍질의 경우는 극한의 산도, 높은 온도, 해로운 용매 등의 조건에서 화학 반응을 일으킬 수 있기 때문에 세포의 생존에 적합하지 않다.¹¹⁴ 최인성 교수와 공동연구자들은 생체모방 실리카합성법을 적용하여, 실리카 껍질의 형성과 그것의 기능화를 동시에 이룸으로써, 온화한 조건에서 실리카 껍질을 기능화하는 방법을 개발하였다.¹¹⁵ 먼저, 촉매 주형인 PEI를 PSS와 짝을 지어 효모를 다층박막을 피포화한 후에, 규산과 황화수소 작용기를 가진 규산 유도체인 (3-mercaptopropyl)trimethoxysilane(MPTMS)을 pH 7.4의 수용액 상에서 동시에 축합함으로써, 황화수소 작용기로 기능화된 실리카 껍질을 만들 수 있었다. 황화수소 작용기를 포함한 실리카 껍질의 도입 후에도 세포의 생존력은 높은 수준으로 유지되었다. 그들은 황화수소 작용기가 말레이미드(maleimide)와 pH 7.4의 온화한 조건에서 반응한다는 사실을 이용하여, 실리카 껍질을 한 층 더 기능화할 수 있었다(그림 7a-c). fluorescein 형광이나 바이오틴(biotin)이 연결된 말레이미드 유도체를 실리카 껍질의 황화수소 작용기와 반응시킴으로써, 형광이나 화학적 작용기를 실리카 표면에 도입할 수 있었다. 바이오틴으로 기능화된 실리카 껍질을 스트렙타비딘(streptavidin)과 결합시킴으로써, 단백질 또한 인공 껍질에 도입될 수 있음을 보여주었다. 다른 한편으로, 바이오틴으로 기능화된 세포는 아비딘이 붙어있는 표면에만 선택적으로 부착된다는 사실을 보여줌으로써, 인공껍질을 이용하면 세포의 표면 선택적 고정화가 가능함을 보여주었다(그림 7d, e). 세포의 선택적 표면 고정화는 세포 기반 바이오센서나 랩-온-어-칩(lab-on-a-chip)의 구현에 중요한 첫 단계로 여겨지고 있다. 그들의 연구는 단단한 실리카 껍질의 세포 보호 효과를 그대로 유지한 채로, 세포 표면을 간접적으로 기능화했다는 점에서 기존의 피포화 연구에서 진일보한 것으로 평가할 수 있다.

4.5 산화티타늄을 이용한 세포 피포화

무기물을 이용한 세포 캡슐화는 주로 생광물에 그 기반을 두고 있다. 생체 내에 존재하기에 당연히 생체친화적일 것으

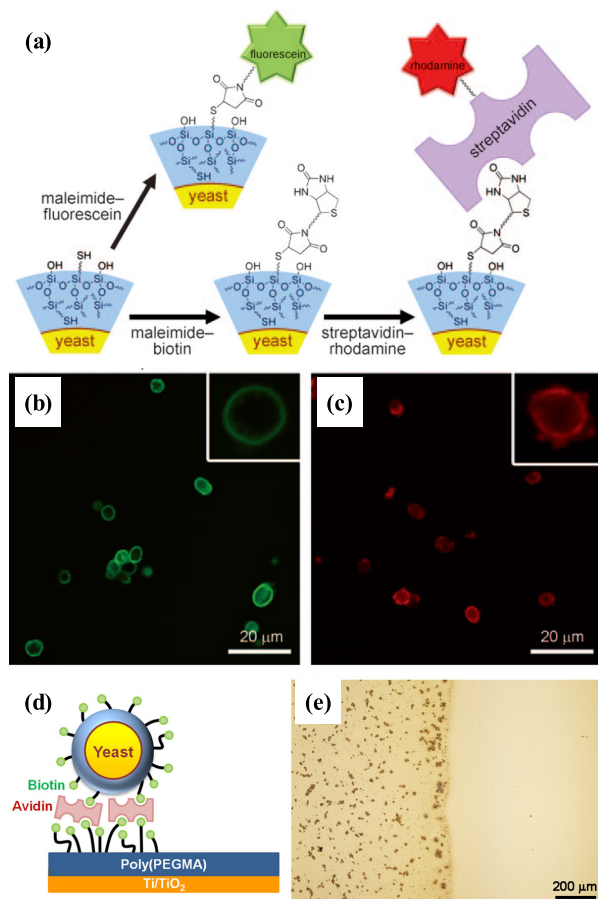


그림 7. (a) 황화수소 작용기를 가진 실리카로 캡슐화된 세포를 후 처리 과정으로 기능화하는 방법을 보여주는 모식도, (b) Fluorescein으로 기능화된 효모@실리카와 (c) 로다민-스트렙타비딘이 도입된 효모@실리카의 공초점 현미경 사진, (d) 바이오틴으로 기능화된 효모@실리카를 아비딘 패턴 표면에 위치선택적으로 부착하는 방법을 보여준 모식도와 (e) 그 광학현미경 사진 (왼쪽은 아비딘이 존재하는 표면, 오른쪽은 존재하지 않는 표면)(Wiley의 허가를 받아 게재함).¹¹⁵

로 예상되는 생광물에 비하면, 생체 내에 존재하지 않는 무기물은 세포에 독성을 나타낼 가능성이 훨씬 높다. 대부분의 무기물 합성이 높은 온도와 압력, 극한의 pH, 부식성의 시약 등을 필요로 한다는 사실에 비추어보면, 생체 내에 존재하지 않는 무기물로 세포를 캡슐화하는 것은 어려운 과제이다.¹¹⁶ 그럼에도 불구하고, 무기물이 가지는 다양한 기능적 특성을 세포에 적용하기 위해서는 생광물 이외의 무기물 역시 세포 피포화의 재료로 사용할 필요가 있다. 최인성 교수와 공동연구자들은 생물체에서 영감을 받아 클로렐라 세포(*Chlorella sp.*)를 산화티타늄(TiO_2)으로 캡슐화하는데 성공하였다.¹¹⁷ 온화한 조건에서 세포를 캡슐화하기 위해서, 박테리오파지 스크리닝을 통하여 산화티타늄에 대한 강한 친화성이 확인된 펩타이드인 RKKRKKRKKRKK((RKK)₄)를 산화티타늄 합성의 주형으로 선택하였다.¹¹⁸ 하지만 (RKK)₄ 펩타이드는 클로렐라 세포에 대해 강한 독성을 나타내었다. 양이온성 고분자가 세포에 독성을 나타낸다는 사실은 이미 잘 알려져 있기

때문에, 펩타이드의 독성을 줄이기 위해서 음전하를 띠는 아스파르산을 추가적으로 (RKK)₄에 붙여서 (RKK)₄D₈을 합성하였다. 음전하의 도입으로 양이온성이 줄어든 고분자는 클로렐라 세포에 대해서 훨씬 적은 독성을 나타내었다. 그들은 다층박막으로 세포를 피포화함에 있어 가장 큰 방해 요인 중 하나인, 양이온성 고분자의 독성을 줄이는 방법을 제시했다는 점에서 큰 의미를 가진다. 클로렐라 세포를 (RKK)₄D₈ 수용액과 산화티타늄의 전구물질인 titanium bis(ammoniumlactato)dihydroxide (TiBALDH)가 포함된 수용액에 번갈아 3 번씩 담가 줌으로써, 클로렐라@산화티타늄을 만들 수 있었다. 이전까지는 양이온성 고분자와 음이온성 고분자로 먼저 다층박막 주형을 만든 후에, 전구물질에 촉매 박막을 노출시켜 원하는 무기물로 합성하는 방식으로 세포를 캡슐화하였지만, 그들은 촉매 주형이 되는 고분자와 전구물질을 적층하여 한 층씩 무기물 박막을 만들었다는 점에서 다른 방법론을 제시하고 있다. 즉, 촉매 주형 고분자가 양전하를 띠고, 전구물질이 음전하를 띠는 사실을 이용하여, 다층박막적층법으로 무기물을 합성한 것이다. 그들은 다층박막적층법의 장점을 반영하여, 촉매 주형과 전구물질을 적층하는 횟수에 따라 무기물 박막의 두께를 제어할 수 있다는 사실을 보여주었다. 만들어진 클로렐라@산화티타늄의 생존력은 플루오세인 디아세테이트(fluorescein diacetate, FDA) 형광 시약과 엽록소의 자체형광발광으로 확인하였으며, 생존률은 69%로 확인되었다.¹¹⁹ 다른 한편으로, 산화티타늄 겹질에 pyrocatechol violet을 도입함으로써, 산화티타늄 겹질의 기능화가 가능함을 보여주었다.

그들은 후속 연구에서 생광물과 비생광물의 혼성 물질 역시 세포 피포화에 사용될 수 있음을 보여주었다.¹²⁰ 산화티타늄 겹질을 만드는 방법과 거의 유사한 방법으로, (RKK)₄D₈ 주형이 도입된 세포의 표면에서 전구물질인 규산과 TiBALDH를 동시에 반응시킴으로써, 클로렐라@ $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ 를 만들 수 있었다. 혼성 물질로 캡슐화한 후에도 약 87%의 세포가 살아 있으며, 세포 배양 실험으로 인공 겹질이 세포의 대사작용에 영향을 주지 않았음을 확인하였다. 또한, 인공겹질이 두꺼워짐에 따라, 세포 분열이 지연된다는 사실을 확인하였다. $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ 혼성물질이 실리카나 산화티타늄에 비하여 높은 열적 안정성을 가지고 있다는 사실을 이용하여,¹²¹ 열적 스트레스에 대한 클로렐라@ $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ 의 저항성을 시험하였다. 클로렐라가 생존하기에는 높은 온도인 45 °C에 클로렐라@ $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ 을 노출시킨 결과, 대조군 세포에 비해 생존률이 증가함을 확인하였다. 이는 아마도 $\text{SiO}_2/\text{TiO}_2$ 인공겹질이 외부에서 전달된 열을 잘 분산시켜 주었기 때문으로 추측할 수 있다.

5. 결론 및 제언

세포 피포화 연구의 경향을 보면, 유기 다층박막에서 생체

모방 무기물로 그 흐름이 넘어온 것처럼 보인다. 무기물이 유기물에 비해서 물리적 강도가 더 높기 때문에, 무기물을 이용한 인공캡슐이 개발되어 세포를 보호하고 세포의 행동을 제어하는데 사용되었던 것이 사실이다. 하지만 최근 2 년간의 연구를 살펴보면, 유기 박막을 이용해서도 세포 보호 및 세포 분열 제어 가능하다는 결과를 찾아볼 수 있다. 최인성 교수와 공동연구자들은 홍합의 접착 단백질로부터 영감을 받아서, 폴리도파민(polydopamine)으로 세포를 피포화하는데 성공하였다.¹²² 폴리도파민으로 거둬하여 피포화함으로써, 인공겔질의 두께를 증가시킬 수 있었고, 겔질의 증가는 세포의 분열이나 외부 공격으로부터 세포를 보호하는 효과를 증가시킴을 확인하였다. 다층박막적층법에 벗어나서 직접적인 화학반응을 세포 표면에서 일으킴으로써 세포를 단단한 무기물로 캡슐화했다는 점에서 중요한 방법론을 제시했다고 볼 수 있다. 그들은 후속 연구에서 홍합의 접착 단백질을 응용하여, 다층박막 간의 가교결합을 형성할 수 있는 방법 개발하였다. 먼저 PEI와 hyaluronic acid(HA)에 카테콜 작용기를 화학적으로 붙인 다음, 다층박막적층법을 통해서 세포 표면을 피포화하였다. pH 8.5에서 카테콜 작용기가 아민 작용기와 가교결합을 형성할 수 있다는 사실을 이용하여, 다층박막의 층 사이를 화학 결합으로 연결하였다. 가교 결합을 형성하지 않은 경우보다 가교결합을 형성한 후에 세포의 분열이 더 지연된다는 사실을 보여줌으로써, 다층박막 내의 가교결합이 세포의 생물학적 행동 제어에 도움을 준다는 사실을 확인하였다.¹²³ Tsukruk와 공동연구자는 타닌 산과 poly(*N*-vinylpyrrolidone)(PVP)을 이온성이 아닌 수소결합을 통하여 세포 표면에 다층박막을 형성함으로써, 세포의 분열이 제어됨을 보여주었다.¹²⁴ 또한, 아민을 포함하도록 변형한 poly(methacrylic acid)과 PVP를 효모 세포 표면에 적층한 후에 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide(EDC)로 카르복시 산과 아민 작용기를 화학 결합으로 연결 시킴으로써, 다층박막을 더 단단하게 할 수 있었다.¹²⁵ 가교결합을 형성한 후에도 피포화된 효모 세포는 생존력을 유지했으며, pH에 따라서 다층박막의 투과성이 달라지는 사실을 이용하여 세포 분열을 제어할 수 있었다. 무기물에 비해서 고분자 다층박막의 강도가 약한 것은 사실이지만, 고분자 다층박막을 가교결합이나 수소결합으로 강하게 함으로써, 무기물 겔질이 보여주었던 세포의 생물학적 행동 제어가 가능하다는 사실을 최근의 연구들이 뒷받침하고 있다. 비록 최근에 무기물 겔질을 이용한 연구가 활발히 진행되어서 고분자 다층박막에 대한 중요성이 떨어진 듯 보이지만, 무기물의 겔질 형성 역시 고분자 다층박막을 그 주형으로 하고 있다는 사실을 감안하면, 다층박막적층법은 세포 피포화 연구에 있어서 가장 중요하고 핵심적인 방법이라고 볼 수 있다. 가장 최근의 몇몇 연구 사례들이 보여주듯, 다층박막적층법이 가지는 높

은 생체친화성, 정교한 두께 제어성, 손쉬운 표면 기능화 등의 장점은 세포 피포화 연구에 있어서 결코 포기할 수 없는 특성이다. 고분자 다층박막의 강도를 증가시킴으로써, 고분자 박막만으로도 세포의 행동을 제어하고 세포를 보호하려는 시도는 추후에도 계속될 것이다.

현재 그리고 미래의 단일세포 피포화 연구에 있어 구현되어야 할 기능은 크게 세 가지로 나누어 볼 수 있다. (1) 세포의 보호; 세포가 가지는 원래 세포벽이나 세포막 이외에 단단한 인공겔질을 도입함으로써, 외부의 독성물질이나 생물학적 공격으로부터 세포를 보호할 수 있다. 이는 세포를 장기간 보관하는데 인공겔질이 효과적임을 의미한다. 세포 기반 바이오센서의 경우, 세포의 생존력이 곧 센서의 안정성 및 내구성과 연결되기 때문에, 캡슐화된 세포는 세포 기반 센서의 상용화를 앞당기는데 도움이 된다. 또한, 세포 치료와 같은 분야에 있어서도, 체내에 전달 혹은 이식된 세포가 생존하기에 적합하지 않는 환경에서도 장시간 생존하면서 모체와 이식 세포의 결합을 도울 수 있기 때문에 중요하다. (2) 세포의 대사 및 분열 제어; 단단한 인공겔질의 도입으로 세포의 분열이 제어될 수 있다. 단단한 인공겔질은 그 자체가 물리적인 장벽으로 작용하여, 세포의 분열을 제어할 수 있는 좋은 방법이 될 수 있다. 다른 한편으로, 인공겔질이 외부의 물과 영양분의 공급을 차단하거나 방해함으로써, 세포의 분열이 제어될 수 있다. 물리적으로 단단한 캡슐에 의해 고립된 단일 세포는 외부의 물질 및 다른 세포와 활발히 상호작용할 수 없기 때문에, 보통의 세포와는 전혀 다른 생물학적 양상을 보일 수 있다. 이러한 이유로 단일세포 수준에서 세포의 분열을 제어하고 세포를 보호하는 기술은 기초생물학적 지식의 확장에 큰 도움을 줄 것이다. 더 나아가, 인공겔질의 물질 투과도를 의도적으로 조절함으로써, 세포와 외부 환경의 상호작용을 선택적으로 조절하여 세포의 대사 및 행동을 제어할 수 있을 것이다. (3) 세포의 표면 기능화; 세포를 감싸고 있는 인공겔질을 화학적으로 처리함으로써 세포를 선택적으로 원하는 표면에 부착하여 정렬시킬 수 있을 뿐 아니라, 새로운 생물학적 혹은 화학적 기능을 세포 표면에 도입할 수 있다. 살아있는 세포벽이나 세포막에 직접적으로 화학 작용기를 도입하게 되면, 세포의 생존력에 좋지 않은 영향을 줄 가능성이 높다. 하지만 이미 도입된 인공겔질을 화학적으로 처리하거나 기능화하는 방식은 세포에게 덜 해로운 뿐만 아니라, 인공겔질의 보호 효과까지 더해져서 그 응용성을 더 넓게 한다. 표면 기능화된 세포는 세포 치료 및 세포 기반 센서 등에 폭넓게 이용될 수 있다.

최근 5년만에 단일세포 캡슐화 연구는 비약적으로 발전하였다. 10년 전만 하여도, 여러 개의 세포를 겔 매트릭스에 고정하는 방식이 주를 이루었던 것에 비해, 현재는 다양한 무기물질과 신소재들로 세포를 캡슐화하는 방법이 개발되었다.

최근의 연구들을 살펴보면, 주로 인공껍질에 사용될 새로운 물질/소재와 그로 인해서 파생된 세포의 변화 및 그 응용성에 초점이 맞추어져 있었다. 이제는 단순히 인공적인 물질로 세포를 캡슐화 한다는 기술적인 접근에서 벗어나야 할 시점이다. 재료과학적인 측면에서 바라보면, 인공물질과 살아있는 생물체의 복합 구조는 그 자체로서 매우 흥미 있는 것이 사실이다. 하지만, 좀 더 생물학적인 측면에서 바라보면, 인공 껍질이 세포를 보호하고 세포의 분열을 제어하는데 도움을 준다는 점에서, 캡슐화된 세포는 자연 상에 존재하는 “포자”를 모방한 시스템이라고 볼 수 있다. 포자는 미생물 및 일부 식물들이 생존하기에 부적절한 환경에서 유전적 정보를 오랫동안 안정적으로 보존하기 위해서 단단한 껍질을 만들어 스스로를 보호하는 생물학적 메커니즘이다. 세포 피포화 연구의 다음 목표들은 인공포자의 형성에 있다고 볼 수 있다. 원하는 때에 세포의 껍질을 도입하여 세포를 보호하고 세포 분열을 억제한다. 다시 원하는 시점에 외부에서 자극을 주어 껍질을 분해함으로써 세포를 원래의 상태로 되돌리고 세포 분열을 시작하게 하는 것이다. 아울러, 이미 개발된 세포 피포화 방법을 의학학, 전기공학, 생물학 분야 등에 응용하는 연구가 계속될 것이다.

Acknowledgment

이 논문은 2013년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(2013R1A1A1008102).

참고문헌

1. G. Carturan, R. Camprostrini, S. Dirè, and E. de Alteris, *J. Mol. Cat.*, **57**, L13 (1989).
2. K. S. Finnie, J. R. Bartlett, and J. L. Woolfrey, *J. Mater. Chem.*, **10**, 1099 (2000).
3. J. R. Premkumar, O. Lev, R. Rosen, and S. Belkin, *Adv. Mater.*, **13**, 1773 (2001).
4. M. L. Ferrer, L. Yuste, F. Rojo, and F. del Monte, *Chem. Mater.*, **15**, 3614 (2003).
5. G. Carturan, R. Dal Toso, S. Boninsegnab, and R. Dal Monte, *J. Mater. Chem.*, **14**, 2087 (2004).
6. N. Nassif, O. M. M. Bouvet, M. N. Rager, C. Roux, T. Coradin, and J. Livage, *Nat. Mater.*, **1**, 42 (2002).
7. H. K. Baca, C. Ashley, E. Carnes, D. Lopez, J. Flemming, D. Dunphy, S. Singh, Z. Chen, N. Liu, H. Fan, G. P. López, S. M. Brozik, M. Werner-Washburne, and C. J. Brinker, *Science*, **313**, 337 (2006).
8. R. F. Fakhrullin, A. I. Zamaleeva, R. T. Minullina, S. A. Konnova, and V. N. Paunov, *Chem. Soc. Rev.*, **1**, 4189 (2012).
9. R. F. Fakhrullin and Y. M. Lvov, *ACS Nano*, **6**, 4557, (2012).
10. S. H. Yang, D. Hong, J. Lee, E. H. Ko, and I. S. Choi, *Small*, **9**, 178 (2013).
11. D. Hong, M. Park, S. H. Yang, J. Lee, Y.-G. Kim, and I. S. Choi, *Trends Biotechnol.*, **31**, 442 (2013).
12. S. Leporatti, A. Voigt, R. Mitlöhner, G. Sukhorukov, E. Donath, and H. Möhwald, *Langmuir*, **16**, 4059 (2000).
13. H. Möhwald, *Colloids Surf. A*, **171**, 25 (2000).
14. S. Moya, L. Dähne, A. Voigt, S. Leporatti, E. Donath, and H. Möhwald, *Colloids Surf. A*, **183-185**, 27 (2001).
15. S. Leporatti, C. Gao, A. Voigt, E. Donath, and H. Möhwald, *Eur. Phys. J. E.*, **5**, 13 (2001).
16. E. Donath, S. Moya, B. Neu, G. Sukhorukov, R. Georgieva, A. Voigt, H. Bäuml, H. Kieseewetter, and H. Möhwald, *Chem. Eur. J.*, **8**, 5481 (2002).
17. R. Georgieva, S. Moya, M. Hin, R. Mitlöhner, E. Donath, H. Kieseewetter, H. Möhwald, and H. Bäuml, *Biomacromolecules*, **3**, 517 (2002).
18. S. Moya, R. Georgieva, H. Bäuml, W. Richter, and E. Donath, *Med. Biol. Eng. Comput.*, **41**, 504 (2003).
19. R. Georgieva, S. Moya, E. Donath, and H. Bäuml, *Langmuir*, **20**, 1895 (2004).
20. Kreft, R. Georgieva, H. Bäuml, M. Steup, B. Müller-Röber, G. Sukhorukov, and H. Möhwald, *Macromol. Rapid Commun.*, **27**, 435 (2006).
21. B. Neu, A. Voigt, R. Mitlöhner, S. Leporatti, C. Y. Gao, E. Donath, H. Kieseewetter, H. Möhwald, H. J. Meiselman, and H. Bäuml, *J. Microencapsulation*, **18**, 385 (2001).
22. H. Ai, M. Fang, S. A. Jones, and Y. M. Lvov, *Biomacromolecules*, **3**, 560 (2002).
23. M. Yu and A. Ivanisevic, *Biomaterials*, **25**, 3655 (2004).
24. A. Diaspro, D. Silvano, S. Krol, O. Cavalleri, and A. Gliozzi, *Langmuir*, **18**, 5047 (2002).
25. S. Krol, M. Nolte, A. Diaspro, D. Mazza, R. Magrassi, A. Gliozzi, and A. Fery, *Langmuir*, **21**, 705 (2005).
26. S. Krol, O. Cavalleri, P. Ramoino, A. Gliozzi, and A. Diaspro, *J. Microscopy*, **212**, 239 (2003).
27. S. Krol and A. Diaspro, *IEEE Trans. Nanobiosci.*, **3**, 32 (2004).
28. T. S. Lanero, O. Cavalleri, S. Krol, R. Rolandi, and A. Gliozzi, *J. Biotechnol.*, **124**, 723 (2006).
29. T. Svaldo-Lanero, S. Krol, R. Magrassi, A. Diaspro, R. Rolandi, A. Gliozzi, and O. Cavalleri, *Ultramicroscopy*, **107**, 913 (2007).
30. A. Hillberg and M. Tabrizian, *Biomacromolecules*, **7**, 2742 (2006).
31. S. Mansouri, Y. Merhi, F. M. Winnik, and M. Tabrizian, *Biomacromolecules*, **12**, 585 (2011).
32. S. S. Balkundi, N. G. Veerabadran, D. M. Eby, G. R. Johnson, and Y. M. Lvov, *Langmuir*, **25**, 14011 (2009).
33. B. Franz, S. S. Balkundi, C. Dahl, Y. M. Lvov, and A. Prange, *Macromol. Biosci.*, **10**, 164 (2010).
34. I. Drachuk, O. Shchepelina, S. Harbaugh, N. Kelley-Loughnane, M. Stone, and V. V. Tsukruk, *Small*, **9**, 3128 (2013).
35. M. Germain, P. Balaguer, J.-C. Nicolas, F. Lopez, J.-P. Esteve,

- G. B. Shkhorukov, M. Winterhalter, H. Richard-Foy, and D. Fournier, *Biosens. Bioelectron.*, **21**, 1566 (2006).
36. N. G. Veerabadran, P. L. Goli, S. S. Stewart-Clark, Y. M. Lvov, and D. K. Mills, *Macromol. Biosci.*, **7**, 877 (2007).
37. L. H. Granicka, M. Antosiak-Iwańska, E. Godlewska, M. Strawski, M. Szklarczyk, B. Maranowski, C. Kowalewski, and J. Wiśniewek, *Cell Blood Sub. Biotechnol.*, **37**, 274 (2011).
38. M. Borkowska, E. Godlewska, M. Antosiak-Iwańska, J. Kinasiewicz, M. Strawski, M. Szklarczyk, and L. H. Granicka, *J. Biomed. Nanotechnol.*, **8**, 912 (2012).
39. S. Krol, S. del Guerra, M. Grupillo, A. Diaspro, A. Gliozzi, and P. Marchetti, *Nano Lett.*, **6**, 1933 (2006).
40. A. Nishiguchi, H. Yoshida, M. Matsusaki, and M. Akashi, *Adv. Mater.*, **23**, 3506 (2011).
41. M. Matsusaki, K. Kadowaki, Y. Nakahara, and M. Akashi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **46**, 4689 (2007).
42. R. F. Fakhruddin, A. Zamaleeva, M. V. Morozov, D. I. Tazetdinova, F. K. Alimova, A. K. Hilmutdinov, R. I. Zhdanov, M. Kahraman, and M. Culha, *Langmuir*, **25**, 4628 (2009).
43. I. Safarik, K. Pospiskova, K. Horska, and M. Safarikova, *Soft Matter*, **8**, 5407 (2012).
44. G. Wang, L. Wang, P. Liu, Y. Yan, X. Xu, and R. Tang, *ChemBioChem*, **11**, 2368 (2010).
45. A. Zamaleeva, I. R. Sharipova, A. V. Porfireva, G. A. Evtugyn, and R. F. Fakhruddin, *Langmuir*, **26**, 2671 (2010).
46. S. A. Konnova, I. R. Sharipova, T. A. Demina, Y. N. Osin, D. R. Yarullina, O. N. Ilinskaya, Y. M. Lvov, and R. F. Fakhruddin, *Chem. Commun.*, **49**, 4208 (2013).
47. S. H. Yang, T. Lee, E. Seo, E. H. Ko, I. S. Choi, and B.-S. Choi, *Macromol. Biosci.*, **12**, 61 (2012).
48. R. F. Fakhruddin, J. García-Alonso, and V. N. Paunov, *Soft Matter*, **6**, 391 (2010).
49. J. García-Alonso, R. F. Fakhruddin, and V. N. Paunov, *Biosens. Bioelectron.*, **25**, 1816 (2010).
50. J. Garcia-Alonso, R. F. Fakhruddin, V. N. Paunov, Z. Shen, J. D. Hardege, N. Pamme, S. J. Haswell, and G. M. Greenway, *Anal. Bioanal. Chem.*, **400**, 1009 (2011).
51. M. D. Tarn, R. F. Fakhruddin, V. N. Paunov, and N. Pamme, *Mater. Lett.*, **95**, 182 (2013).
52. R. F. Fakhruddin, L. V. Shlykova, A. I. Zamaleeva, D. K. Nurgaliev, Y. N. Osin, J. García-Alonso, and V. N. Paunov, *Macromol. Biosci.*, **10**, 1257 (2010).
53. A. I. Zamaleeva, I. R. Sharipova, R. V. Shamagsumova, A. N. Ivanov, G. A. Evtugyn, D. G. Ishmuchametova, and R. F. Fakhruddin, *Anal. Methods*, **3**, 509 (2011).
54. D. Zhang, R. F. Fakhruddin, M. Özmen, H. Wang, J. Wang, V. N. Paunov, G. Li, and W. E. Huang, *Microb. Biotechnol.*, **4**, 89 (2011).
55. M. Szamukova, A. I. Zamaleeva, D. G. Ishmuchametova, Y. N. Osin, A. P. Kiyasov, D. K. Nurgaliev, O. N. Ilinskaya, and R. F. Fakhruddin, *Langmuir*, **27**, 14386 (2011).
56. M. R. Dзамukova, E. A. Naumenko, N. I. Lannik, and R. F. Fakhruddin, *Biomater. Sci.*, **1**, 810 (2013).
57. R. T. Minullina, Y. N. Osin, D. G. Ishmuchametova, and R. F. Fakhruddin, *Langmuir*, **27**, 7708 (2011).
58. M. Cusack and A. Freer, *Chem. Rev.*, **108**, 4433 (2008).
59. S. Weiner, W. Traub, and H. D. Wagner, *J. Struct. Biol.*, **126**, 241 (1999).
60. L. Addadi, S. Raz, and S. Weiner, *Adv. Mater.*, **15**, 959 (2003).
61. S. Mann, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **39**, 3392 (2000).
62. F. C. Meldrum, *Int. Mater. Rev.*, **48**, 187 (2003).
63. S. Weiner and L. Addadi, *J. Mater. Chem.*, **7**, 689 (1997).
64. L. C. Palmer, C. J. Newcomb, S. R. Kaltz, E. D. Spoerke, and S. I. Stupp, *Chem. Rev.*, **108**, 4754 (2008).
65. B. Wang, P. Liu, W. Jiang, H. Pan, X. Xu, and R. Tang, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **47**, 3560 (2008).
66. B. Wang, P. Liu, Z. Liu, H. Pan, X. Xu, and R. Tang, *Biotechnol. Bioeng.*, DOI: 10.1002/bit.25016 (2013).
67. M. Huang and Y. Wang, *J. Mater. Chem.*, **22**, 626 (2012).
68. B. Wang, P. Liu, Y. Y. Tang, H. H. Pan, X. R. Xu, and R. Tang, *PLoS ONE*, **5**, e9963 (2010).
69. K. Hickmann, V. John, A. Oertel, K. Koempe, and M. Haase, *J. Phys. Chem. C*, **113**, 4763 (2009).
70. K. Henderiks, *J. Mar. Micropaleontol.*, **67**, 143 (2008).
71. M. R. Langer, M. T. Silk, and J. H. Lipps, *J. Foraminiferal Res.*, **27**, 271 (1997).
72. R. F. Fakhruddin and R. T. Minullina, *Langmuir*, **25**, 6617 (2009).
73. S. C. Huang, K. Naka, and Y. Chujo, *Langmuir*, **23**, 12086 (2007).
74. E. Chibowski, L. Hotysz, and A. Szczes, *Colloids Surf. A*, **222**, 41 (2003).
75. A. Jada and A. Verraes, *Colloids Surf. A*, **219**, 7 (2003).
76. J. Flemke, M. Maywald, and V. Sieber, *Biomacromolecules*, **14**, 207 (2013).
77. C. J. Weaver, J. Aizenberg, E. G. Fantner, D. Kisailus, A. Woesz, P. Allen, K. Fields, J. M. Porter, W. F. Zok, K. P. Hansma, P. Fratzl, and D. E. Morse, *J. Struct. Biol.*, **158**, 93 (2007).
78. M. Sumper and E. Brunner, *Adv. Funct. Mater.*, **16**, 17 (2006).
79. V. C. Sundar, A. D. Yablon, J. L. Grazul, M. Ilan, and J. Aizenberg, *Nature*, **424**, 899 (2003).
80. N. Kröger, S. Lorenz, E. Brunner, and M. Sumper, *Science*, **298**, 584 (2002).
81. M. Sumper, *Science*, **295**, 2430 (2002).
82. M. Sumper, S. Lorenz, and E. Brunner, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 5192 (2003).
83. M. Sumper and N. Kröger, *J. Mater. Chem.*, **14**, 2059 (2004).
84. M. B. Dickerson, K. H. Sandhage, and R. R. Naik, *Chem. Rev.*, **108**, 4935 (2008).
85. S. V. Patwardhan, N. Mukherjee, and S. J. Clarson, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, **11**, 19 (2001).
86. S. V. Patwardhan and S. J. Clarson, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, **13**, 49 (2003).
87. S. V. Patwardhan and S. J. Clarson, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, **13**, 193 (2003).
88. F. Noll, M. Sumper, and N. Hampp, *Nano Lett.*, **2**, 91 (2002).

89. S. V. Patwardhan, N. Mukherjee, and S. Clarson, *J. Silicon Chem.*, **1**, 47 (2002).
90. S. V. Patwardhan, N. Mukherjee, and S. J. Clarson, *J. Inorg. Organomet. Polym.*, **11**, 117 (2001).
91. E. Brunner, K. Lutz, and M. Sumper, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **6**, 854 (2004).
92. S. V. Patwardhan and S. Clarson, *J. Mater. Sci. Eng.*, **23**, 495 (2003).
93. S. H. Yang, *Solid State Sci.*, **23**, 1 (2013).
94. S. H. Yang and I. S. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **31**, 753 (2010).
95. S. H. Yang, J. H. Park, W. K. Cho, H.-S. Lee, and I. S. Choi, *Small*, **5**, 1947 (2009).
96. W. K. Cho, S. M. Kang, D. J. Kim, S. H. Yang, and I. S. Choi, *Langmuir*, **22**, 11208 (2006).
97. D. J. Kim, K.-B. Lee, T. G. Lee, H. K. Shon, W.-J. Kim, H.-j. Paik and I. S. Choi, *Small*, **1**, 992 (2005).
98. D. J. Kim, K.-B. Lee, Y. S. Chi, W. J. Kim, H.-j. Paik, and I. S. Choi, *Langmuir*, **20**, 79 (2004).
99. N. Laugel, J. Hemmerle, C. Porcel, J.-C Voegel, P. Schaaf, and V. Ball, *Langmuir*, **23**, 3706 (2007).
100. S. H. Yang and I. S. Choi, *Chem. Asian J.*, **4**, 382 (2009).
101. S. H. Yang, J. H. Park, and I. S. Choi, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **30**, 2165 (2009).
102. S. H. Yang, E. H. Ko, and I. S. Choi, *Macromol. Res.*, **19**, 511 (2011).
103. O. Helmecke, A. Hirsch, P. Behrens, and H. J. Menzel, *Coll. Interface Sci.*, **321**, 44 (2008).
104. E. A. Coffman, A. V. Melechko, D. P. Allison, M. L. Simpson, and M. J. Doktycz, *Langmuir*, **20**, 8431 (2004).
105. L. L. Brott, R. R. Naik, D. J. Pikas, S. M. Kirkpatrick, D. W. Tomlin, P. W. Whitlock, S. J. Clarson, and M. O. Stone, *Nature*, **413**, 291 (2001).
106. S. H. Yang, K.-B. Lee, B. Kong, J. H. Kim, H. S. Kim, and I. S. Choi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **48**, 9160 (2009).
107. S. T. Laughlin, J. M. Baskin, S. L. Amacher, and C. R. Bertozzi, *Science*, **320**, 664 (2008).
108. L. K. Mahal, K. J. Yarema, and C. R. Bertozzi, *Science*, **276**, 1125 (1997).
109. W. Liu, A. Brock, S. Chen, S. Chen, and P. G. Schultz, *Nat. Methods*, **4**, 239 (2007).
110. S. Boonyarattanakalin, S. E. Martin, Q. Sun, and B. R. Peterson, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 11463 (2006).
111. I. Chen, M. Howarth, W. Lin, and A. Y. Ting, *Nat. Methods*, **2**, 99 (2005).
112. B. Kellam, P. A. De Bank, and K. M. Shakesheff, *Chem. Soc. Rev.*, **32**, 327 (2003).
113. J. W. Morse, R. S. Arvidson, and A. Lüttge, *Chem. Rev.*, **107**, 342 (2007).
114. S. Onclin, B. Jan Ravoo, and D. N. Reinhoudt, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **44**, 6286 (2005).
115. S. H. Yang, E. H. Ko, and I. S. Choi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 6115 (2011).
116. X. Chen and S. S. Mao, *Chem. Rev.*, **107**, 2891 (2007).
117. S. H. Yang, E. H. Ko, and I. S. Choi, *Langmuir*, **28**, 2151 (2012).
118. M. B. Dickerson, S. E. Jones, Y. Cai, G. Ahmad, R. R. Naik, N. Kröger, and K. H. Sandhage, *Chem. Mater.*, **20**, 1578 (2008).
119. Y. V. Nanchaiah, M. Rajadurai, and V. P. Venugopalan, *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 2617 (2007).
120. E. H. Ko, Y. Yoon, J. H. Park, S. H. Yang, D. Hong, K.-B. Lee, H. K. Shon, T. G. Lee, and I. S. Choi, *Angew. Chem. Int. Ed.*, DOI: 10.1002/anie.201305081 (2013).
121. V. Zeleňák, V. Homebecq, S. Mornet, O. Schäf, and P. Llewellyn, *Chem. Mater.*, **18**, 3184 (2006).
122. S. H. Yang, S. M. Kang, K.-B. Lee, T. D. Chung, H. Lee, and I. S. Choi, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 2795 (2011).
123. J. Lee, S. H. Yang, S.-P. Hong, D. Hong, H. Lee, H.-Y. Lee, Y.-G. Kim, and I. S. Choi, *Macromol. Rapid Commun.* **34**, 1351 (2013).
124. V. Kozlovskaya, S. Harbaugh, I. Drachuk, O. Shchepelina, N. Kelley-Loughnane, M. Stone, and V. V. Tsukruk, *Soft Matter*, **7**, 2364 (2011).
125. I. Drachuk, O. Shchepelina, M. Lisunova, S. Harbaugh, N. Kelley-Loughnane, M. Stone, and V. V. Tsukruk, *ACS Nano*, **6**, 4266 (2012).