

## GPCR 냉동보관 세포의 활용을 위한 냉동조건의 최적화 연구

노효진<sup>1</sup>, 이승호<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>상명대학교 의생명공학과

### Optimization of the cryopreserved condition for utilization of GPCR frozen cells

Hyojin Noh<sup>1</sup>, Sunghou Lee<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biomedical Technology, Sangmyung University

**요약** 신약 개발의 주요 표적이 되는 G-protein coupled receptor (GPCR)은 대부분의 생리적 활동에 관여하며 다양한 질병과 질환들에 관련되어 있다. GPCR을 타겟으로 하는 의약개발 연구에서 필수적인 실험방법으로 많이 활용되고 있는 세포기반 스크리닝 기술들은 사용되는 세포의 상태에 따라 데이터의 질이 좌우되는데 최근, 실험에 사용할 세포를 매번 배양하면서 소모되는 비용과 데이터의 변동성을 줄이기 위해 냉동보관 세포를 적용하는 추세이다. 이에 본 연구에서는 단일 세포를 많은 양으로 배양하고 냉동 보관한 다음 사용되는 세포의 반응을 최적화하기 위하여 칼슘 검출을 위한 광 단백질이 포함된 세포주에 calcium sensing receptor와 urotensin II receptor가 안정적으로 발현되는 안정화 세포를 제작하고 -80°C에서 보관한 다음 7 일 간격으로 실험했을 때 효능제와 길항제 반응을 비교하였다. 실험결과 보관기간이 증가함에 따라 세포 신호 값이 감소하였지만 EC<sub>50</sub>와 IC<sub>50</sub> 값의 변화는 나타나지 않았다(EC<sub>50</sub>:3.46±1.36 mM, IC<sub>50</sub>:0.49±0.15 μM). 그러나 액체질소에서 보관한 세포의 경우에는 비냉동 세포와 비교하여 세포 신호 값이 감소했지만 보존기간에 따른 변화가 나타나지 않았으며 기간에 따른 EC<sub>50</sub>와 IC<sub>50</sub>의 변화도 없었다. 보관기간이 경과 될수록 세포의 신호 값이 감소하는 것은 세포 손상도 증가가 원인인 것으로 판단되며, 이러한 결과들로부터 장기간 냉동 보관을 위해서는 액체질소를 이용하는 것이 가장 효과적이고 한 달 이내 단기간 사용의 목적으로는 -80°C 보관조건도 가능할 것으로 판단된다. 이와 같이 냉동세포의 적극적인 활용을 통하여 초기 스크리닝 과정에서 나타나는 실험 변동성을 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다.

**Abstract** The major target for drug discovery, G-protein coupled receptor (GPCR) is involved in many physiological activities and related to various diseases and disorders. Among experimental techniques relating to the GPCR drug discovery process, various cell-based screening methods are influenced by cell conditions used in the overall process. Recently, the utilization of frozen cells is suggested in terms of reducing data variation and cost-effectiveness. The aim of this study is to evaluate various conditions in cell freezing such as temperature conditions and storage terms. The stable cell lines for calcium sensing receptor and urotensin receptor were established followed by storing cultured cells at -80°C up to 4 weeks. To compare with cell stored at liquid nitrogen, agonist and antagonist responses were recorded based on the luminescence detection by the calcium induced photoprotein activation. Cell signals were reduced as the storage period was increased without the changes in EC<sub>50</sub> and IC<sub>50</sub> values (EC<sub>50</sub>:3.46±1.36 mM, IC<sub>50</sub>:0.49±0.15 μM). In case of cells stored in liquid nitrogen, cell responses were decreased comparing to those in live cells, however changes by storage periods and significant variations of EC<sub>50</sub>/IC<sub>50</sub> values were not detected. The decrease of cell signals in various frozen cells may be due to the increase of cell damages. From these results, the best way for a long-term cryopreservation is the use of liquid nitrogen condition, and for the purpose of short-term storage within a month, -80°C storage condition can be possible to adopt. As a conclusion, the active implementation of frozen cells may contribute to decrease variations of experimental data during the initial cell-based screening process.

**Key Words** : Drug screening, Frozen cells, G-protein coupled receptor, High-throughput screening

본 논문은 2013년도 상명대학교 교내 학술연구비 지원에 의해 작성되었음.

\*Corresponding Author : Sunghou Lee (Sangmyung Univ.)

Tel: +82-41-550-5388 email: lees@smu.ac.kr

Received October 2, 2014

Revised (1st November 14, 2014, 2nd November 24, 2014)

Accepted February 12, 2015

## 1. 서론

신약개발은 일반적으로 10년 이상의 기간과 많은 자본이 필요한 선진국형의 전략적 개발 과정이다. 또한 이를 수행하기 위해서는 많은 사회적 인프라가 요구된다. 신약개발 과정은 크게 기초연구에 의한 작용점 도출 및 선정으로 화합물 스크리닝에 의한 유효물질 및 선도물질 선정, 후보물질의 확정, 전임상/임상1상의 임상화 연구과정, 임상2, 3상의 상품화 과정이 있다. 신약개발의 초기과정으로 스크리닝 방법은 일반적으로 시험관에서 수행하는 다양한 생화학적인 방법들과 실제 세포를 이용하는 cell-based assay 방법으로 구분될 수 있다[1-3].

Cell-based assay 방법은 유효물질 및 선도물질의 도출을 위한 고효율 약효 검색 스크리닝(High Throughput Screening, HTS)시스템에 많이 사용되고 있다[4-5]. 신약 선도물질 발굴을 위한 스크리닝의 일반적인 작업과정은 화합물의 분주, 희석, 스크리닝 성분 혼합, 배양 및 검출, 스크리닝 데이터의 분석 및 결과 보고로 구성되며 이러한 과정을 신속하고 효율적으로 처리하기 위해 소형화 및 자동화된 HTS 시스템을 활용하고 있다[6-9]. 이와 같은 스크리닝 실험과정은 보통 몇 개월에서 수년의 장기간에 걸쳐서 연구가 수행되므로 기술적으로 용이하고 재현성이 높아야한다. 그러므로 스크리닝의 전체 과정 기간 동안에 세포 반응의 일관성은 cell-based assay 방법에서 필수적인 요소라고 할 수 있다.

그러나 일반적으로 일주일에 1-2 회 계대 배양하고 실험에 필요한 만큼 용량을 늘리는 형식으로 진행되는 cell-based assay의 경우 매번 실험에 사용하는 세포의 상태가 다르므로 세포반응 수준에 차이가 있고 이로 인해 실험결과의 변동성이 증가되는 단점이 있다. 또한 형질전환 과정을 거치면서 세포가 오염될 확률이 높아지고 세포배양 및 실험준비에 소비되는 자본과 연구자의 노동력이 증가되는 추가적인 문제점들을 가진다. 최근 이를 개선하기 위하여 많은 양의 세포를 냉동 보관하였다가 실험에 사용함으로써 보다 효율적으로 스크리닝을 진행할 수 있다는 가능성이 개진되었다. 이러한 냉동보관 세포의 사용은 세 가지 이점을 가지는데 첫째, 언제 어느 때라도 새로운 실험을 시작할 수 있기 때문에 실험의 유연성이 증가한다. 둘째, 같은 무리의 세포로 준비되었기 때문에 데이터의 질이 향상된다. 셋째, 냉동보관 세포를 가지고 작업을 하면 특히 세포 주를 유지하는 부분에서

세포 배양을 위해 소요되는 시간과 세포 배양을 위한 장비 및 시약, 일회용품들이 상당히 감소된다[10-12].

최근 세포전문 기업들에서 냉동보관 세포를 제품화하여 스크리닝 과정에 적용할 수 있도록 상업적으로 판매하고 있으나 개발된 냉동세포의 종류가 다양하지 않고 가격도 비싸서 도입하는데 어려움이 있다[13]. 따라서 스크리닝에 필요한 냉동보관 세포를 직접 제작하여 사용하는 것이 대안으로 제시되고 있으며 냉동 및 해동 속도, 냉동 보관제의 선택, 냉동보관 온도 등의 일반적인 조건들이 실험실의 고유 환경에 따라 적절히 고려되어야 한다[14]. 본 논문에서는 냉동 세포주의 안정성에 대한 연구를 위하여 칼슘 감지 수용체(calcium-sensing receptor, CaS)와 유로텐신 II 수용체(urotensin II receptor, UT)가 발현된 세포주를 구현하고 냉동보관을 위해 고려되는 여러 변수들을 비교분석해 보고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료 및 기기

에퀴린 모체 세포주 (HEK293-aeq)[15]는 Perkinelmer life and analytical science (미국)사에 허가를 받아 사용하였다. CaS (GenBank Acc#, NM\_000388.2)의 cDNA는 ORIGENE (미국)으로부터 받았으며, CaS의 효능제인 calcium chloride는 바이오세상(한국)사의 제품을 사용하였다. 유로텐신 수용체 (UT : GenBank Acc#, NM\_018949)의 cDNA는 Missouri S&T cDNA resource center (미국)사의 제품이며, UT의 효능제인 urotensin II는 SIGMA (미국)사의 제품을 사용하였다. 96-well white Optiplate는 Perkinelmer life and analytical science사의 제품이며, chromophore 보조인자로 세포 내 칼슘 변동 측정에 사용되는 coelenterazine h는 Promega Corporation (미국)사의 제품을 사용하였다. 세포로부터의 반응은 Perkinelmer life and analytical science (미국)사의 EnVision Xcite MultiLabel Reader를 사용하여 측정하였다.

### 2.2 세포배양

HEK293-aeq는 EMEM과 10% fetal bovine serum (GIBCO, 미국) 100 IU/ml penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (HyClone, 미국), 10 µg/ml zeocin

(Invitrogen, 미국)의 조성을 가지는 배양액을 사용하였다. 세포는 지름 100 mm dish에서 5% CO<sub>2</sub>가 포함된 humidified atmosphere에서 37°C 조건으로 배양하였다. 세포의 포화도가 80% 일 때, 1X Phosphate buffered saline (PBS : BIOSESANG, 한국) 5 ml로 세척하고 Trypsin-EDTA 5 ml을 첨가하여 세포를 분리한 후 배양액 5 ml을 넣어 1,000 xg에서 5 분간 원심분리 하였다. 다시 배양액 10 ml과 혼합하여 4×10<sup>5</sup> 개의 세포를 지름 100 mm dish에 옮겨 5 일 간격으로 계대 배양하였다.

### 2.3 안정화 세포주의 구축

실험할 때마다 유전자 삽입 과정을 거치지 않기 위한 목적으로 세포 내 CaS 유전자가 안정적으로 발현되는 안정화 세포주를 제작하였다. 에퀴린 모체 세포주에 CaS 유전자를 삽입하고 그 유전자를 가지는 벡터에 대한 selection antibiotics을 포함한 배양액으로 갈아주며 세포를 배양하였다. 만들어진 여러 개의 colony를 분리하여 따로 배양한 다음 칼슘에 대한 반응을 실험하여 최대 반응을 보이는 colony를 선별하였다. UT의 경우도 동일하게 안정화 세포주 구축과정을 수행하였다. 실험에 사용된 안정화 세포주는 CaS (HEK293-aeq/ hCaS), UT (HEK293-aeq/hUT)로 표시하였다. 형질전환의 구체적인 실험 조건은 Invitrogen 사의 Lipofectamine 2000 reagent을 사용하여 제조회사의 protocol대로 HEK293-aeq 세포에서 수행하였다.

### 2.4 에퀴린기반 세포 내 칼슘 변동의 측정

세포 내에서 방출되는 칼슘과 미토콘드리아 에퀴린을 통한 발광현상을 기초로 하는 functional assay를 활용하였다. 간단히 설명하면 형질전환을 통해 CaS 유전자가 삽입된 세포는 48 시간 배양이 끝난 후 PBS 10 ml로 세척하고 세포를 분리한 다음 1,000 xg에서 5 분간 원심분리 하였다. 침전된 세포는 기본 완충액 (DMEM/HAM's F12 without phenol red, with L-Glutamate, 15 mM HEPES, pH 7.0, 0.1% BSA)으로 2X10<sup>6</sup> cells/ml의 농도가 되도록 coelenterazine h를 첨가한 다음 빛을 차단하고 상온에서 rotator를 사용하여 세포와 coelenterazine h를 반응시켰다. 4 시간 동안 반응시킨 후에 기본 완충액으로 10 배 희석하여 2×10<sup>5</sup> cells/ml농도로 맞춘 후 앞에 서와 같은 조건으로 60 분간 방치하였다.

### 2.5 효능제와 길항제의 활성 확인

효능제 활성을 확인하기 위해서 50 µl/well의 효능제가 담긴 96-well Optiplate에 미리 준비한 세포를 50 µl/well (10,000 cells/well)로 가한 후 결과 신호 값을 측정하였다. 길항제 활성을 확인하기 위하여 준비된 세포를 50 µl/well의 길항제가 담긴 96-well Optiplate에 Multipipette Plus (Eppendorf, 독일)를 사용해 50 µl/well로 첨가한 후 15 분간 길항제와 반응시키고 50 µl/well의 효능제를 주입하여 반응을 확인하였다. 세포의 활성으로 인해 방출되는 빛은 EnVision Xcite MultiLabel Reader를 사용하여 측정되는 수치로 기록되었다. 측정된 값 (AUC integrated signal)은 relative light units (RLU)로 나타내었다.

### 2.6 냉동보관 세포 실험

세포주의 냉동보관을 위해서 배양 후 세포 포화도가 80%에 도달하면 배양액을 교체하고 항생제 없는 조건에서 18 시간 동안 배양하였다. PBS 10 ml로 세척하고 세포를 분리한 다음 1,000 xg에서 5 분간 원심분리 하였다. 침전된 세포는 냉동 보관액 (DMEM/HAM's F12 without phenol red, with L-Glutamine, 15 mM HEPES, pH 7.0와 10% DMSO, 20% FBS)으로 2×10<sup>6</sup> cells/ml의 농도가 되도록 혼합하여 Cryotube (Nunc, 덴마크)에서 -80°C 까지 서서히 냉동시킨 뒤 -80°C 또는 액체질소에 보관하였다. 냉동 보관한 세포를 실험에 사용하기 위해 Cryotube를 꺼내어 즉시 37°C 수욕조에서 1-2 분간 해동시킨 후 배양액 5 ml이 담긴 tube로 옮겨서 1,000 xg에서 5 분간 원심분리 하였다. 이후 세포와 coelenterazine h를 반응시키는 과정을 통하여 실험에 사용할 세포를 준비하였다.

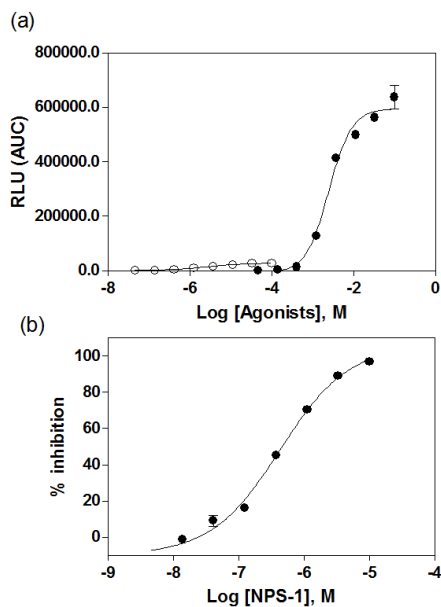
### 2.7 통계적 분석

농도 별 반응 실험으로부터 얻은 데이터는 PRISM version 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, 미국)의 non-linear curve fitting functions을 사용하여 EC<sub>50</sub>, IC<sub>50</sub>, R<sup>2</sup>, HillSlope 변수 값을 얻어 그래프를 평가하였다. 유의 수준을 평가하기 위해 Student t test와 One way ANOVA 방법을 사용하여 그룹 간 데이터를 기존 데이터와 상호 비교하였다. 다른 통계적 데이터는 Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, 미국)을 사용하여 분석하고 mean ± SD로 나타내었다.

### 3. 결론

#### 3.1 일반 세포주 (비냉동세포)에서의 활성 확인

냉동세포와 비냉동 세포의 비교를 위하여 선별된 HEK293-aeq/hCaS의 효능제와 길항제의 각 농도 별 신호를 그래프로 나타내었다[Fig 1]. HEK293-aeq/hCaS의 효능제인 칼슘에 대한 최저 농도 신호 값은 1359, 최대 농도 신호 값 637867으로 S/N이 469.4이었다. 칼슘의 EC<sub>50</sub> 값은 칼슘 2.484 mM으로 나타났다. 표준 길항제로서 NPS-1의[16] 활성 실험에서는 low control 값이 4981, high control 값은 423901로 S/N이 85.1로 매우 높게 나타났다으며 IC<sub>50</sub> 값은 0.426  $\mu$ M로 확인되었다.

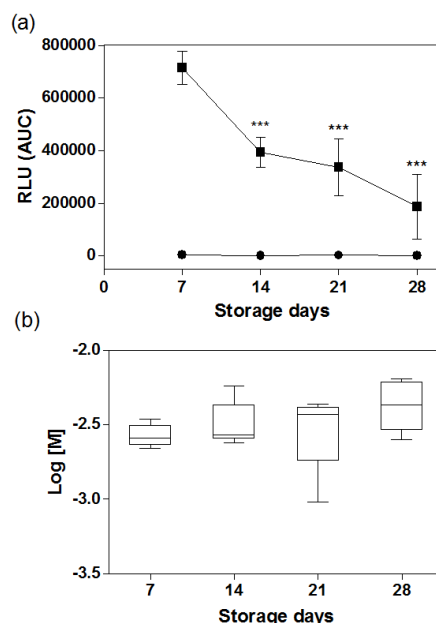


[Fig. 1] Dose-response curves of CaS receptor agonist and antagonist in HEK293-aeq/hCaS live cells. (a) Agonist dose-response curves of calcium(●) and acetylcholine(○). (b) Dose-response curve of NPS-1 as a standard antagonist.

#### 3.2 -80° C에서 냉동 보관한 세포주에서의 효능제 활성 확인

HEK293-aeq/hCaS 세포주를 냉동시켜 -80°C 에서 보관하였다가 실험하였을 때 냉동 보관기간에 따른 세포반응에 차이가 있는지 확인하였다. 보관기간은 7 일 간격으로 7, 14, 21, 28 일간 보관한 다음 세포를 꺼내어 실험에

사용하였을 때 효능제에 대한 반응 결과를 비교하였다 [Fig 2]. (a)는 칼슘에 대한 반응으로 칼슘의 최저 농도와 최고 농도의 신호 값 변화를 나타낸 것이다. 보관기간이 7, 14, 21, 28일로 증가함에 따라 최저 농도의 신호 값은 4069, 1052, 35792, 5683으로 큰 변동이 없었지만 최대 농도에서 신호 값은 433804, 273771, 219054, 91686으로 보관기간에 따라 신호 값이 감소되었다. (b)는 칼슘에 대한 농도 별 반응 실험에서 얻은 EC<sub>50</sub>를 기간에 따라 비교한 결과로 종합해보면 보관기간에 따른 현저한 차이가 없는 것으로 나타났다(EC<sub>50</sub> : 3.46 ± 0.75 mM).

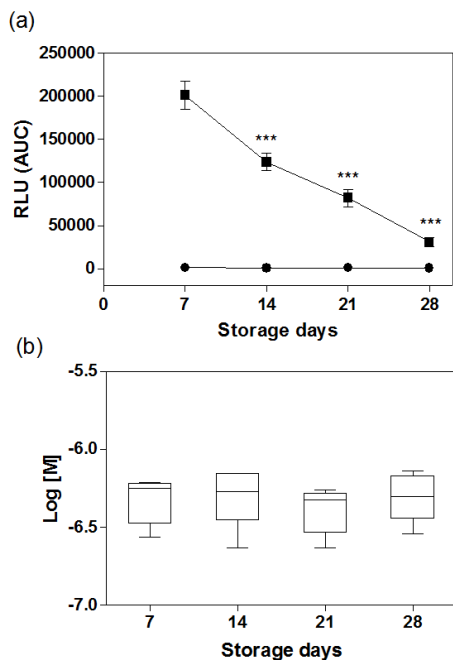


[Fig. 2] Agonist response of HEK293-aeq/hCaS. (a) Calcium responses minimum (30  $\mu$ M) and maximum (100 mM) concentrations in frozen cells stored at -80°C. (b) Comparison of EC<sub>50</sub> values of differential cell storage conditions. Data presented as the whisker plot with minimum, maximum and median values from live independent experiments. \*\*\* $P < 0.005$ , significantly different from seven storage day groups. (n=3-5)

#### 3.3 -80° C에서 냉동 보관한 세포주에서의 길항제 활성 확인

HEK293-aeq/hCaS 세포주를 앞에서와 같이 7일 단위

로 -80°C에서 냉동 보관하여 실험한 결과로 길항제인 NPS-1에 대한 활성을 확인하였다[Fig 3]. 냉동보관 후에 7 일씩 경과함에 따라 low control에 대한 반응 값은 1948, 1756, 928, 586으로 차이가 크지 않았지만 high control에 대한 반응 값은 202564, 107766, 83776, 43004으로 점차 감소하였다. 효능제 실험에서 확인한 결과와 마찬가지로 보관기간이 증가함에 따라 세포 반응 값이 감소하는 양상은 동일하였다. 또한 NPS-1에 대한 IC<sub>50</sub>값은 0.49 ± 0.04 μM으로 현저한 차이가 없었다.



[Fig. 3] Antagonist response of HEK293-aeq/hCaS. (a)NPS-1 responses for low controls (●, 3 nM) and high controls (■, 10 μM) in frozen cells stored -80°C. (b)Comparison of IC<sub>50</sub> values of differential cell storage conditions. Data presented as the whisker plot with minimum, maximum, and median values from five independent experiments. \*\*\**P*<0.005, significantly different from seven storage day groups. (n=3-5)

### 3.4 액체질소에서 냉동 보관한 세포주에서의 활성 확인

Table 1은 HEK293-aeq/hCaS와 HEK293-aeq/hUT

세포주의 일반적인 비냉동 상태의 세포와 액체질소에 냉동보관 후 세포를 사용하였을 때 효능제와 길항제의 농도 별 신호 값을 비교하기 위하여 각 세포주에 따른 결과 값을 표로 요약하였다. 두 가지 세포주에서 모두 비냉동 상태에서 실험한 경우에 비해 냉동보관 후 사용한 세포주에서 반응 값이 감소하였다. 하지만 -80°C에서 보관한 세포와는 달리 보관 기간에 따른 세포 신호 값의 차이는 나타나지 않았다. 또한 효능제와 길항제 실험에서 얻은 EC<sub>50</sub> 값과 IC<sub>50</sub> 값은 각각 1.97 ± 0.41 mM, 0.34 ± 0.06 μM으로 현저한 차이가 발견되지 않았다.

[Table 1] Comparison of agonist and antagonist responses in live cells and those stored in liquid nitrogen for more than 30 days.<sup>1), 2)</sup>

Functional signals in HEK293-aeq/hCaS			
		Fresh cells (n=5)	Frozen cells (n=3)
Calcium chloride	Bottom	3018 ± 2237	649 ± 108
	Top	643775 ± 77550	284592 ± 97344 *
	S/N	213.3 ± 227.1	455.1 ± 212.4
	EC <sub>50</sub>	1.83 ± 0.7 (mM)	3.18 ± 0.67 (mM)
NPS-1	Bottom	5523 ± 914	509 ± 165 ***
	Top	450464 ± 27783	144867 ± 42387 **
	S/N	81.5 ± 11.4	315.8 ± 176.5
	IC <sub>50</sub>	1.24 ± 0.53 (μM)	0.33 ± 0.16 (μM)

Functional signals in HEK293-aeq/hUT			
		Fresh cells (n=5)	Frozen cells (n=3)
Urotensin II	Bottom	12904 ± 11766	1096 ± 574
	Top	540894 ± 164374	35970 ± 33105 **
	S/N	66.0 ± 39.1	33.3 ± 29.0
	EC <sub>50</sub>	137.3 ± 45.3 (nM)	164.7 ± 37.51(nM)
Palosuran	Bottom	1312 ± 576	290 ± 40 *
	Top	199808 ± 81246	9150 ± 10929 **
	S/N	156.0 ± 43.6	29.4 ± 34.0
	IC <sub>50</sub>	113.3 ± 55.31 (nM)	76.1 ± 55.1 (nM)

<sup>1)</sup> 데이터는 평균 ± 표준편차로 나타내었음.

<sup>2)</sup> 유의성 검정통계 Paired student t test 결과로

\**P*<0.05, \*\**P*<0.01, \*\*\**P*<0.005로 표시함.

## 4. 고찰

신약 선도물질 발굴을 위한 스크리닝은 오랜 기간에 걸쳐 수행되는 과정으로 세포 반응의 일관성은 데이터의 질 향상에 큰 영향을 미친다[17]. 최근 human muscarinic M1 수용체 모델 시스템에서 일시적으로 유전자를 삽입한 후 냉동 보관하여 스크리닝 과정에 사용할 수 있도록 실험한 연구결과가 보고된 바 있다[18]. 안정화 세포를 제작하는데 보통 6 - 9 개월이 소요되는 것에 비해 일시적 유전자 삽입을 할 경우 요구되는 시간이

1 - 2 주 이내로 적다는 장점이 있지만 세포 배양 및 유전자 삽입과정에서 수반되는 변화 요인들이 이미 보고된 바와 같이[19] 데이터의 질에 영향을 주기 때문에 타겟 유전자가 안정적으로 발현되는 안정화 세포를 제작하여 실험에 사용하는 것이 일반적이다. 본 연구에서는 세포를 냉동 보관하기 위한 세포 보관액의 조성으로 DMEM/F12와 10% DMSO, 20% FBS를 사용하였으며 냉동보관 시 -80°C에서 최대 28일까지 보관기간에 따른 세포 반응의 결과를 액체질소 보관조건과 함께 비교하였다. HEK293-aeq/hCaS 세포에서 칼슘의 최저 농도에 대한 신호 값은 보관 기간에 따른 영향을 받지 않았지만 보관 기간이 7 일씩 증가할수록 칼슘의 최대 농도에 대한 신호 값은 37%, 50%, 79%의 감소로 나타났다. 반면 동일조건에서의 EC<sub>50</sub> 수치와 NPS-1의 IC<sub>50</sub> 값은 냉동 보관기간에 상관없이 동일한 수치를 얻었다.

한편 액체질소에 세포를 보관했을 때는 HEK 293-aeq/hCaS와 HEK293-aeq/hUT에서 모두 기간에 따른 신호 값의 차이가 없었는데 이것은 액체질소 보관조건에서 세포의 손상이 최소화된 것으로 판단된다. 따라서 6 개월 이상의 장기간 보관이 필요할 경우 액체질소에 보관하는 것이 바람직할 것으로 예상된다. 이와 같이 세포의 배양 조건과 여러 변동성을 최소화하기 위해서 단기간에 대용량의 세포를 배양한 다음 냉동 보관하여 사용하는 방법을 선택할 때 본 논문에서 실험한 냉동조건 및 기간에 대한 실험결과가 참고자료로 활용 가능할 것으로 판단된다.

## References

- [1] Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L. "How many drug targets are there?", *Drug Discov. Today* 5, 993-996, 2006.
- [2] Bhaumik, S., Gambhir, S. S. "Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice.", *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 377-382, 2002.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.012611099>
- [3] Lorenz, W. W., McCann, R. O., Longiaru, M., Cormier, M. J. "Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase.", *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 4438-4442, 1991.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.88.10.4438>
- [4] Fox, S., Farr-Jones, S., Sopchak, L., Boggs, A., Comley, J. "High-throughput screening: Searching for higher productivity.", *J Biomol Screen*, 9(4):354-8, 2004.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1087057104265290>
- [5] Beske, O. E., Goldbard, S. "High-throughput cell analysis using multiplexed array technologies.", *Drug Discov Today* 7, S131-S135, 2002.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446\(02\)02388-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1359-6446(02)02388-7)
- [6] Zhu, Z., Puglisi, J., Connors, D., Stewart, J., Herbst, J., Marino, A., Sinz, M., O'Connell, J., Banks, M., Dickinson, K., Cacace, A. B. "Use of cryopreserved transiently transfected cells in high-throughput pregnane X receptor transactivation assay.", *J. Biomol. Screen*, 11, 644-651, 2007.
- [7] Lerner, M.R. "Tools for investigating functional interactions between ligands and G-protein-coupled receptors.", *Trends Neurosci*, 17:142-146, 1994.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236\(94\)90087-6](http://dx.doi.org/10.1016/0166-2236(94)90087-6)
- [8] Stadel, J.M., Wilson, S., Bergsma, D.J. "Orphan G protein-coupled receptors: a neglected opportunity for pioneer drug discovery.", *Trends Pharmacol Sci* 18:430-437, 1997.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(97\)01117-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(97)01117-6)
- [9] Milligan, G. "Strategies to identify ligands for orphan G-protein-coupled receptors.", *Biochem Soc Trans* 30:789-793, 2002.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/BST0300789>
- [10] Zaman, G.J., de Roos, J.A., Biemenrohr, M., van Koppen, C.J., Oosterom, J. "Cryopreserved cells facilitate cell-based drug discovery.", *Drug Discov Today*, 12:521-6, 2007.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2007.05.008>
- [11] Dong, J.F., Detta, A., Hitchcock, E.R., "Susceptibility of human foetal brain tissue to cool-and freeze-storage.", *Brain Res*, 621:242-248, 1993.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90112-Z](http://dx.doi.org/10.1016/0006-8993(93)90112-Z)
- [12] Hall, C. V., Jacob, P. E., Ringold, G. M., Lee, F. "Expression and regulation of Escherichia coli lacZ gene fusions in mammalian cells.", *J Mol Appl Genet*. 2, 101-109, 1983.
- [13] Kunapuli, P., Zheng, W., Weber, M., Solly, K., Mull, R., Platchek, M., Cong, M., Zhong, Z., Strulovici, B. "Application of division arrest technology to cell-based HTS: Comparison with frozen cells and fresh cells.", *Assay Drug Dev. Technol*, 3, 17-26, 2005.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/adt.2005.3.17>
- [14] Marinissen, M.L., and Gutkind, J.S. "G-protein-coupled receptors and signaling networks: emerging paradigms.", *Trends Pharmacol Sci*, 22:368-376, 2001.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147\(00\)01678-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0165-6147(00)01678-3)

- [15] Button, D., Brownstein, M. "Aequorin-expressing mammalian cell line used to report  $Ca^{2+}$  mobilization.", *Cell Calcium*, 14(9):663-71, 1993.  
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160\(93\)90091-J](http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160(93)90091-J)
- [16] Kifor, O., MacLeod, R.J., Diaz, R., Bai, M., Yamaguchi, T., Yao, T., Kifor, I., Brown, E.M. "Regulation of MAP kinase by calcium-sensing receptor in bovine parathyroid and CaR-transfected HEK293 cells.", *Am J Physiol Renal Physiol*, 280(2):F291-302, 2001.
- [17] Zhiyun, Z., Ni, G., Ting, L., Dale E. M., Mingwei, W. "Quality control of cell-based high-throughput drug screening.", *Acta Pharmaceutical Sinica B*, 2(5):429-438, 2012.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2012.03.006>
- [18] Jones, B., Holskin, B., Meyer, S., Ung, T., Dupriez, V., Flores, SY., Burgeon, E., Ator, M., Duzic, E. "Aequorin functional assay for characterization of G-protein-coupled receptor: implementation cryopreserved transiently transfected cell.", *Anal Biochem*, 400(2):184-9, 2010.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.01.028>
- [19] Liu, J., Chen, T., Norris, T., Knappenberger, K., Huston, J., Wood, M., Bostwick, R. "A high-throughput functional assay for characterization of gamma-aminobutyric acid(A) channels modulators using cryopreserved transiently transfected cells. *Assay Drug Dev Technol*, 6(6):781-6, 2008.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/adt.2008.161>

**노 효 진(Hyojin Noh)**

**[정회원]**



- 2009년 2월 : 상명대학교 의생명공학과 (공학사)
- 2011년 2월 : 상명대학교 의생명공학과 분자생리학전공 (공학석사)
- 2011년 3월 ~ 현재 : 상명대학교 바이오환경기반공학과 (박사과정)

<관심분야>

GPCR, Cell biology

**이 승 호(Sunghou Lee)**

**[정회원]**



- 1990년 2월 : 미국 Fairleigh Dickinson Univ., Dept. of Biochem. (이학석사)
- 2001년 5월 : 미국 Georgetown Univ., Dept. of Physiology (이학박사)
- 1990년 7월 ~ 2004년 8월 : 한국 화학연구원 선임연구원
- 2004년 9월 ~ 현재 : 상명대학교 천안캠퍼스 의생명공학과 교수

<관심분야>

고효율 약효검색, 약물수용체 분자생리학