

최적의 luminescence 신호 분석을 위한 유전자 전달 방법의 비교연구

박서현, 이승호*
상명대학교 의생명공학과

Comparative studies of various transfection processes for the optimal luminescence signal analysis

Seohyun Park, Sunghou Lee*

Department of Biomedical Technology, Sangmyung University

요약 형광 간섭 현상을 최소화시켜 상대적으로 민감한 측정이 가능한 aequorin 기반 luminescence 기술은 $G_{\alpha 16}$ 단백질 도입을 통해 세포 내부의 칼슘 이동 신호를 감지하여 G 단백질 결합 수용체(G protein-coupled receptor, GPCR)의 기능 분석을 가능하게 하는 세포 기반 분석 기술로 수용체 및 G 단백질 유전자 전달의 최적화 과정이 필수적이다. 본 연구를 위해 corticotropin releasing factor receptor subtype 2(CRF2) 수용체를 모델 시스템으로 CRF2와 $G_{\alpha 16}$ 단백질이 구축된 세 가지 안정화 세포주를 제작하였고, 이들을 이용한 서로 다른 세 가지 조건의 임시 발현 세포주에서 작용제(sauvagine)와 길항제(K41498)의 반응성을 분석하여 최적의 유전자 전달 방법을 도출하고자 하였다. 그 결과 sauvagine 및 K41498의 농도에 따른 반응에서 CRF2- $G_{\alpha 16}$ 안정화 세포주가 임시 발현 세포주보다 10배 이상의 유효신호 비율을 나타내었고($z'=0.77$) 임시 발현 세포주의 경우 $G_{\alpha 16}$ 의 안정화 발현 이후에 CRF2를 전달하는 경우가 다른 임시 발현 조건보다 2배 이상 높은 효율을 보였다($z'=0.84$). 따라서 임시 유전자 전달 기술을 GPCR 세포 기능 분석 시스템에 활용할 경우 $G_{\alpha 16}$ 단백질에 대한 안정화 세포주를 우선적으로 구축하고, 목표하는 다양한 수용체들을 단계적으로 발현시키는 것이 최선의 방법이라 판단된다.

Abstract By minimizing fluorescence interference phenomena, aequorin-based luminescence technology can provide a relatively sensitive detection platform with integration of $G_{\alpha 16}$ protein in order to track internal calcium mobilization by G protein-coupled receptors (GPCR). In this type of cell-based functional assay format, it is essential to optimize the transfection process of a receptor and $G_{\alpha 16}$ protein. For this study, corticotropin releasing factor receptor subtype 2(CRF2) was set as a model system to generate three stable cells with CRF2 and $G_{\alpha 16}$ in addition to transiently transfected cells under three different conditions. Agonist (sauvagine) and antagonist (K41498) responses in those cells were analyzed to develop the optimum transfection process. As a result, the effective signal ratio in the dose response experiments of sauvagine and K41498 were at least 10-fold higher ($z'=0.77$) in CRF2- $G_{\alpha 16}$ stable cells. For the transient transfection cells, stable expression of $G_{\alpha 16}$ prior to the CRF2 represented a two-fold higher signal ($z'=0.84$) than the other cases of transient transfection. In conclusion, for the utilization of transient transfection processes to develop a cell-based GPCR functional assay system, it is suggested to introduce various target receptors after stable expression of $G_{\alpha 16}$ protein.

Keywords : Aequorin, Cell based assay, Corticotropin releasing factor receptor, G protein coupled receptor, Transient transfection efficiency

본 논문은 2015년도 상명대학교 교내 학술연구비 지원에 의해 작성되었음.

*Corresponding Author : Sunghou Lee (Sangmyung Univ.)

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

Received September 26, 2016

Accepted November 10, 2016

Revised (1st October 26, 2016, 2nd November 9, 2016)

Published November 30, 2016

1. 서론

G 단백질 결합 수용체(G protein coupled receptor, GPCR)의 구조와 신호 전달 기전이 밝혀진 후로 생체 내 다양한 생리학적인 반응을 유발시키는 원인을 알게 되면서 현재 개발 중인 신약의 40% 이상이 GPCR에 초점을 맞춰 개발되고 있다[1]. 국외 연구 선두 그룹에 의해 다수의 GPCR 구조를 밝히는 등[2] 연구가 활발히 진행되고 있는 반면 국내에서 구조 연구는 투자 및 연구 진행 방향과 기술력이 부족하여 성장이 더디고 있다. 향후 GPCR을 타겟으로 하는 생리활성물질의 개발[3-5] 및 신약 개발 연구를 위하여 구조 및 기능에 관한 활발한 연구가 필요하다고 판단된다.

분자 유전학의 발전에 따라 약물로 개발될 수 있는 가능성을 지닌 타겟의 수가 매우 증가하였고 타겟에 대한 새로운 후보물질을 탐색하기 위해 많은 물질들을 효율적으로 빠른 시간 내에 검색이 가능한 고효율 약효 검색 스크리닝(High-throughput screening, HTS) 기법이 적용된 다양한 분석 실험들이 개발되어 활용되고 있다[6]. 이러한 실험들 중 다양한 GPCR를 타겟으로 하여 개발되는 기능 분석 시스템은 주로 세포를 기반으로 분석되기 때문에 유전자 전달 과정이 필수적이다.

유전자 전달 방법은 원형 형태의 벡터를 이용하여 임시로 유전자가 발현되도록 하는 임시 유전자 전달 방법과 선형화 시킨 벡터를 세포로 전달하여 발현된 유전자가 환경적인 요인에 의해서 사라지지 않고 안정적으로 발현이 되게 하는 안정적 유전자 전달 방법으로 나뉜다[7]. 안정적 유전자 전달 방법은 제작기간이 길지만 양질의 실험 결과를 얻을 수 있는 가능성이 높은 반면 임시 유전자 전달 방법은 안정화 단계를 거치지 않기 때문에 바로 이용할 수 있지만 실험결과와 변동성이 크게 나타나는 단점이 있다. 300여종 이상의 서로 다른 GPCR 수용체들에 대한 기능 분석 시스템이 요구되는 현재의 연구 환경을 고려한다면 빠른 시간 내에 최적의 실험 조건을 검색 가능한 임시 유전자 전달 방법의 체계적인 활용이 필수적이다.

이에 본 연구에서는 GPCR 타겟들에 대한 세포 기능 분석을 위해 필요한 G 단백질과 수용체 유전자들의 전달 방법에 따른 실험결과를 모델 시스템을 통하여 상호 비교하였다. 이를 위하여 중추 신경계부터 피부 질환까지 다양한 영향[8-10]에 관계한다고 알려져 있는 부신피

질자극호르몬 수용체(Corticotropin-releasing factor receptor subtype 2, CRF2)를 모델시스템으로 G 단백질($G_{\alpha 16}$)과 수용체(CRF2) 유전자들의 전달 방법에 따른 실험결과를 비교를 통하여 다양한 GPCR 기능 분석 시스템에 효율적으로 활용 가능한 기초 자료를 제시하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료 및 기기

수용체 활성화에 따른 세포 내 칼슘 이동 신호를 luminescence 신호로 감지하기 위하여 개발된 세포주인 A30(ES-000-A30)은 HEK293 세포에 칼슘과 반응하는 광 단백질인 aequorin[11, 12] 유전자가 안정적으로 구축된 세포주[13, 14]로서 PerkinElmer사(미국)로부터 라이센스를 구입하여 사용하였다. CRF2(GenBank Acc#, AY449734)[15]와 칼슘 신호 전달에 필요한 G 단백질인 $G_{\alpha 16}$ (GenBank Acc#, M63904) cDNA는 Missouri S&T cDNA Resource center(미국)로부터 구입하였으며 CRF2 수용체에 대한 작용제인 Sauvagine은 American peptide company(cat# 34-7-11, 미국)사의 제품을 사용하였다. CRF2에 대한 길항제인 K41498은 TOCRIS(cat# 2070, 영국)사의 제품을 사용하였다. 세포 내부의 칼슘 이동의 변화를 측정하기 위하여 proaequorin의 cofactor로 이용되는 Coelenterazine h는 Discoverx(cat# 90-0084, 미국)사의 제품을 사용하였다. 아울러 측정에 이용되는 96-well black polystyrene plate는 Costar(cat# 3915, 미국)사의 제품을 사용하였으며 수용체 활성화에 따른 luminescence 측정은 Mithras LB 940(Berthold, 독일)을 사용하였다.

2.2 세포 배양

A30 세포는 MEM 배지(cat# LM007-08, WELGENE, 한국)에 10% fetal bovine serum(GIBCO, 미국), 100IU/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin(HyClone, 미국)과 10 μ g/ml zeocin(Invitrogen, 미국)이 첨가된 배양액을 사용하였으며 세포는 100mm tissue culture dish(cat# 430167, Corning, 미국)에서 5% CO₂가 공급되는 37°C의 온도 조건에서 배양하였다. 세포 밀집도가 80%에 도달했을 때 Phosphate buffered saline(HyClone, 미국) 5ml로 세척하고 0.05% Trypsin-EDTA(GIBCO, 미국)

5ml을 첨가하여 세포를 떼어낸 뒤 항생제가 없는 배양액 5ml을 첨가하여 1,000xg에서 5분 동안 원심 분리를 진행하였다. 침전된 세포에 항생제가 없는 배양액을 10ml 첨가하여 혼합 후 4×10^5 개의 세포를 100mm tissue culture dish로 옮긴 뒤 10 μ g/ml zeocin(Invitrogen, 미국)을 주입하여 5일 간격으로 계대 배양하였다.

2.3 안정화 세포주 구축 및 luminescence 신호 분석을 위한 임시 유전자 전달

제조사의 프로토콜에 따라 4D-Nucleofector system (LONZA, 스위스)을 사용하여 A30 세포주에 각각 선형의 CRF2 수용체 유전자 3 μ g과 G_{at16} 유전자 3 μ g을 전달한 후 적정 항생제 농도와 세포 수로 96-well culture plate(BD Falcon, 미국)에 5% CO₂가 공급되는 37 $^{\circ}$ C의 온도 조건에서 배양하였다. 약 2-3개월에 걸쳐 만들어진 클론들을 칼슘과 cAMP에 대한 반응성 실험을 통하여 최대 반응성을 갖는 클론을 선택하였으며 각각 A30CRF2와 A30G16로 명명하였다. 실제 CRF2 수용체 연구를 위해 구축된 안정화 세포주인 A30G16CRF2는 luminescence 신호 분석을 위한 비교 세포주로 사용하였다. 임시 발현 세포는 A30CRF2 세포주에 G_{at16} 유전자를 전달한 A30CRF2/G16, A30G16 세포주에 CRF2 유전자를 전달한 A30G16/CRF2, A30 안정화 세포주에 G_{at16}과 CRF2 유전자를 동시에 전달한 A30/G16CRF2 세포들로 서로 상호 비교하여 최적의 luminescence 신호 분석을 위한 임시 발현 조건을 검색하고자 하였다.

2.4 세포 내 칼슘 측정을 위한 aequorin기반 luminescence 신호 분석

aequorin기반 수용체 기능 분석 시스템을 이용하여 수용체 활성화에 따른 세포 내부의 칼슘 이동을 luminescence 신호로 측정하였다[6, 16]. 임시 유전자 전달 세포는 48시간 동안 배양 후 Phosphate buffered saline(Hyclone, 미국) 10ml로 세척하고 Accutase(PAA, 영국) 1ml을 사용하여 세포를 떼어낸 뒤 Phosphate buffered saline(Hyclone, 미국) 9ml을 첨가하여 1,000xg에서 5분간 원심 분리하였다. 침전된 세포에 1×10^6 cells/ml이 되도록 DMEM/HAM's F12 배지(cat# LM002-05, WELGENE, 한국)와 0.1% Albumin bovine Fraction V(SERVA, 독일)의 조성을 갖는 완충액을 첨가한 뒤, 500 μ M의 Coelenterazine h를 첨가하였다.

Rotator(FINEPCR, 한국)를 사용하여 암실에서 22-23 $^{\circ}$ C의 온도 조건하에 약 18시간 동안 반응시킨 후 완충액으로 세포수를 1×10^5 cells/ml로 맞추고 22-23 $^{\circ}$ C 암실에 1시간 동안 방치하였다.

작용제 활성 신호를 측정하기 위해 96-well black plate(Costar, 미국)에 준비해 둔 세포 50 μ l/well(5,000cells/well)에 추가로 Sauvagine을 50 μ l/well(10 μ M - 4.57nM)로 분주 후 측정하였다. 길항제의 활성 신호는 K41498을 50 μ l/well(A30G16CRF2: 3 μ M - 1.37nM, A30CRF2/G16: 1 μ M - 457pM, A30G16/CRF2: 300nM - 137pM, A30/G16CRF2: 1 μ M - 457pM)로 준비해 둔 세포 50 μ l/well에 첨가한 뒤 15분 동안 빛을 차단시키고 측정기계와 동일한 온도 조건에서 반응시킨 후 50 μ l/well(500nM)의 작용제를 분주하여 측정하였다. Mithras LB 940(Berthold, 독일) 장비를 사용하여 반응을 통해 생성되는 luminescence 신호를 실시간으로 20초/well(작용제 활성) 또는 18초/well(길항제 활성)로 측정하였으며 측정된 Relative light units(RLU) 값을 시간에 대한 Area under the curve(AUC)로 변환시킨 수치인 RLU(AUC)로 사용하였다.

2.5 자료처리 및 통계분석

농도에 따라 얻어진 데이터 수치는 PRISM version 5.0(GraphPad Software Inc., 미국)의 Non-linear curve fitting 기능으로 분석하였으며 데이터의 유의관계를 비교하기 위해 One way ANOVA 및 Bonferroni's multiple comparison test로 분석하였다. 작용제와 길항제의 투여농도에 따른 반응성에서 최대와 최소 수치, EC₅₀, IC₅₀, Hillslope의 변수 값을 통하여 그래프를 나타내었다. 데이터의 평균, 표준편차, 변동계수는 Microsoft Excel(Microsoft Corporation, 미국)을 사용하여 분석하였다.

3. 실험결과

3.1 안정화 세포주에서 반응성 확인

G_{at16} 유전자와 CRF2 유전자를 안정적으로 발현시킨 안정화 세포주(A30G16CRF2)에서 투여 농도에 따른 작용제와 길항제의 반응성을 확인하였다[Fig 1]. A30 세포 내에 존재하는 아세틸콜린 수용체에 대한 아세틸콜린의

반응성은 최대 농도 신호 값 $188,850 \pm 4,233$ 과 최저 농도 신호 값 $30,920 \pm 15,906$ 으로 S/B 비율(Signal to Background ratio)이 7.10이었고 EC_{50} 는 $1.16\mu M$ 로 확인되었다. CRF2에 대한 작용제인 sauvagine의 반응성은 최대 농도 신호 값 $194,400 \pm 3,201$, 최저 농도 신호 값 $8,981 \pm 6,494$ 로 S/B 비율이 21.65이었으며 EC_{50} 는 $56.85nM$ 으로 확인되었다. CRF2에 대한 길항제인 K41498에 대한 반응 분석에서 negative control 수치가 $36,359 \pm 2,689$, positive control 수치가 $437,095 \pm 7,981$ 로 S/B 비율이 12.02이었으며 실험 데이터의 품질을 평가하는 통계 파라미터인 z' 수치[17]는 0.77로 나타났다. 아울러 투여농도에 따른 반응성 실험에서 최대 농도 신호 값 $426,739 \pm 16,044$, 최저 농도 신호 값 $16,252 \pm 12,658$ 로 S/B 비율이 26.26로 나타났으며 IC_{50} 는 $45.14nM$ 으로 확인되었다.

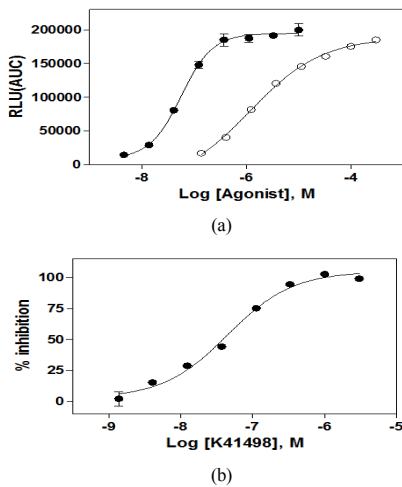


Fig. 1. Dose-response curves of (a) acetylcholine(○), sauvagine(●) and (b) K41498, a CRF2 antagonist, in the stable A30G16CRF2 live cells. Presented data were representative data set from at least three separate experiments performed in triplicate, and each data points were expressed as mean \pm SEM(Standard error of mean).

3.2 임시 유전자 전달에서 작용제 반응성 비교

임시로 $G_{\alpha 16}$ 과 CRF2 유전자를 발현시킨 세포에서 투여 농도에 따른 작용제 반응성을 비교 분석하였다[Fig. 2]. CRF2 수용체 세포주에 $G_{\alpha 16}$ 단백질을 발현시키거나 또는 $G_{\alpha 16}$ 단백질 세포주에 CRF2 수용체를 발현시킨

A30CRF2/G16과 A30G16/CRF2, 그리고 $G_{\alpha 16}$ 단백질 및 CRF2 수용체를 동시에 전달시킨 A30/G16CRF2, 세 가지 세포 조건에서 내재된 아세틸콜린 수용체에 대한 작용제의 최대 농도 신호 값은 각각 $86,901 \pm 4,395$, $141,130 \pm 5,746$, $333,637 \pm 6,959$ 로 A30/G16CRF2 세포가 가장 높게 나타났으며 최저 농도 신호 값은 $4,313 \pm 13,395$, $15,282 \pm 13,814$, $15,613 \pm 14,410$ 으로 A30CRF2/G16 세포가 가장 낮게 나타났다. S/B 비율은 A30/G16CRF2 세포가 21.37로 가장 높았고 S/B 비율이 9.24로 가장 낮은 수치 값을 갖는 A30G16/CRF2 세포에 비해 2.31배 높았다. 그리고 A30CRF2/G16과 A30/G16CRF2 세포는 유사한 S/B 비율을 보였다. CRF2에 대한 sauvagine의 최대 농도 신호 값은 각각 $49,301 \pm 1,898$, $105,826 \pm 2,846$, $27,262 \pm 2,858$ 이었으며 최저 농도 신호 값은 $4,211 \pm 1,154$, $12,778 \pm 3,075$, $12,022 \pm 1,681$ 로 A30G16/CRF2 세포에서 최대 농도 신호 값이 가장 높은 것으로 확인되었다. 이에 따라 S/B 비율은 A30CRF2/G16 세포에서 11.71로 가장 높았으며 A30/G16CRF2 세포에서 2.27로 가장 낮은 수치를 보였고 EC_{50} 는 각각 $491nM$, $175nM$, $945nM$ 로 확인되었다.

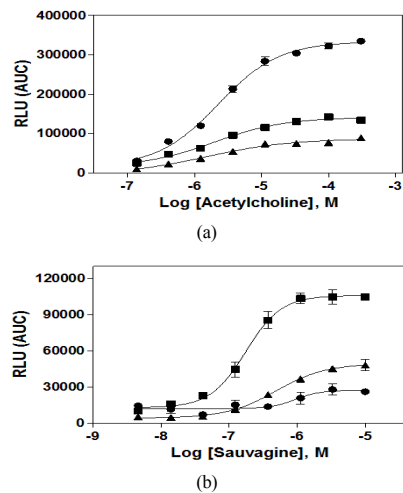


Fig. 2. Dose-response comparisons of acetylcholine (a) and sauvagine (b) in three different transfection conditions, A30CRF2/G16(▲), A30G16/CRF2 (■) and A30/G16CRF2(●). Presented data were representative data set from at least three separate experiments performed in triplicate, and each data points were expressed as mean \pm SEM(Standard error of mean).

3.3 임시 유전자 전달에서 길항제 반응성 비교

CRF2 길항제 K41498의 투여 농도에 따른 반응성을 비교하고 실험 데이터의 품질을 평가하는 통계 파라미터인 z' 수치를 비교분석하였다. A30CRF2/G16, A30G16/CRF2, A30/G16CRF2 세포 조건의 반응성 실험에서 negative control 값이 각각 $6,503 \pm 311$, $10,932 \pm 972$, $10,239 \pm 1,626$ 이었으며 positive control 값이 $64,366 \pm 2,253$, $256,307 \pm 3,663$, $21,253 \pm 1,757$ 로 S/B 비율은 9.90, 23.45, 2.08로 나타났다. z' 수치는 0.62, 0.84, -1.61로 확인되었다. 투여농도에 따른 반응성에서 최대 농도 신호 값은 각각 $61,275 \pm 2,140$, $260,277 \pm 9,318$, $34,195 \pm 8,626$ 이었으며 최저 농도 신호 값은 $7,891 \pm 950$, $14,959 \pm 14,540$, $13,425 \pm 1,540$ 으로 확인되었다. 이에 따라 S/B 비율이 7.77, 17.40, 2.55로 A30G16/CRF2 세포에서 가장 높은 수치를 보였으며 IC_{50} 는 3.65nM, 13.5nM, 1.75nM로 현저한 차이가 확인되지 않았다[Fig. 3].

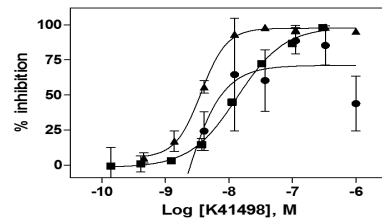


Fig. 3. Dose-response comparisons of K41498, a CRF2 specific antagonist, in three different transfection conditions, A30CRF2/G16(▲), A30G16/CRF2 (■) and A30/G16CRF2(●). Presented data were representative data set from at least three separate experiments performed in triplicate, and each data points were expressed as mean \pm SEM(Standard error of mean).

3.4 안정화 세포주와 임시 유전자 전달 세포의 반응성 비교

안정화 세포주인 A30G16CRF2와 임시로 유전자를 전달시킨 A30CRF2/G16, A30G16/CRF2, A30/G16CRF2 세포들의 실험결과를 일원분산분석과 함께 Bonferroni 사후검증을 실시하고 그 결과를 표에 나타내었다[Table 1].

Table 1. Comparison of functional responses in differential transfection conditions.^{1, 2}

| | | Stably transfected cells | Transiently transfected cells | | |
|-----------|------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| | | A30G16CRF2 | A30/G16CRF2 | A30CRF2/G16 | A30G16/CRF2 |
| Sauvagine | Bottom RLU(AUC) ³ | 10,669 \pm 7,763 | 30,490 \pm 15,639 | 5,448 \pm 638.4 | 15,519 \pm 5,489 |
| | Top RLU(AUC) ³ | 231,409 \pm 32,840 ^{a, b} | 54,014 \pm 15,111 ^a | 26,759 \pm 4,989 ^{b, c} | 152,774 \pm 18,924 ^c |
| | Hillslope | 1.48 \pm 0.14 | 1.45 \pm 0.27 | 1.73 \pm 0.20 | 1.63 \pm 0.23 |
| | EC ₅₀ (nM) | 40.51 \pm 3.08 ^a | 2,440 \pm 760 ^{a, d, e} | 800 \pm 97.96 ^e | 278 \pm 32.78 ^d |
| | Signal to Background(S/B) | 30.31 \pm 9.82 ^{a, b} | 2.49 \pm 0.35 ^a | 5.06 \pm 1.10 ^b | 14.94 \pm 2.46 |
| K41498 | Bottom RLU(AUC) ³ | 22,023 \pm 2,729 | 53,817 \pm 36,101 ^e | 5,650 \pm 665.1 ^e | 20,654 \pm 7,358 |
| | Top RLU(AUC) ³ | 264,746 \pm 41,393 ^{a, b} | 75,467 \pm 35,295 ^{a, d} | 34,924 \pm 6,195 ^{b, c} | 256,825 \pm 19,089 ^{c, d} |
| | Hillslope | -1.29 \pm 0.08 | -0.43 \pm 1.14 ^e | -2.22 \pm 0.29 ^e | -1.36 \pm 0.13 |
| | IC ₅₀ (nM) | 132 \pm 37.67 | 158 \pm 157 | 6.24 \pm 0.97 | 7.77 \pm 1.18 |
| | Signal to Background(S/B) | 14.37 \pm 2.96 | 1.94 \pm 0.41 | 6.04 \pm 0.74 ^c | 22.87 \pm 4.89 ^c |

¹ Presented data were mean \pm SEM(standard error of mean) of at least three independent experiments performed in triplicate.

² Statistical evaluations (one way ANOVA) followed by bonferroni's multiple comparison test were performed. Significant differences ($P < 0.05$) were found across the specific paired transfection conditions as follows.

^a A30G16CRF2 vs. A30/G16CRF2

^b A30G16CRF2 vs. A30CRF2/G16

^c A30G16/CRF2 vs. A30CRF2/G16

^d A30G16/CRF2 vs. A30/G16CRF2

^e A30/G16CRF2 vs. A30CRF2/G16

³ RLU(AUC): Relative light units-Area under the curve

투여 농도에 따른 작용제와 길항제의 반응성 결과는 최대 농도 신호 값과 S/B 비율에서 세포간의 유의성이 현저하게 나타났다. CRF2 작용제인 sauvagine의 농도에 따른 반응성 결과에 따라 A30G16CRF2 세포는 최대 농도 신호 값과 S/B 비율에서 A30/G16CRF2, A30CRF2/G16 세포와 유의성을 보였고 A30CRF2/G16 세포는 최대 농도 신호 값에서 A30G16/CRF2 세포와 유의성을 보였으며 A30/G16CRF2 세포는 EC₅₀수치를 기준으로 A30G16CRF2, A30CRF2/G16, A30G16/CRF2 세포와 유의성을 보였다. 길항제인 K41498의 농도에 따른 반응성 결과에 따라 A30/G16CRF2 세포는 최저 농도 신호 값에서 A30CRF2/G16 세포와 유의성을 보였고 최대 농도 신호 값에서 A30G16CRF2 세포는 A30/G16CRF2, A30CRF2/G16 세포와 유의성을 보였다. 또한 A30CRF2/G16 세포는 A30G16/CRF2 세포와 유의성을 보였으며 A30/G16CRF2 세포는 A30G16/CRF2 세포와 유의성을 보였다. 그리고 A30CRF2/G16 세포는 S/B 비율에서 A30G16/CRF2 세포와 유의성을 보였다.

4. 고찰 및 결론

세포를 기반으로 한 GPCR의 기능 분석은 주로 G단백질을 매개로 생성되는 이차 전달자인 cAMP 또는 IP₃의 변화를 측정 할 수 있도록 개발되었고[18] 특히, GPCR의 활성화를 통하여 변화되는 세포 내부의 칼슘을 형광(Fluorescence imaging plate reader, FLIPR) 또는 luminescence(aequorin)로 측정하는 기법이 광범위하게 활용되고 있다[19]. 이 경우 세포 내 칼슘 이동 신호를 전달하기 위하여 Gq 단백질의 연결이 필요하며 Gi/s 단백질이 연계된 GPCR들의 경우 칼슘 신호를 감지할 수 있게 하기 위하여 추가로 promiscuous G 단백질인 G_{α16}[20, 21]의 도입이 필요하여 다중 유전자 도입에 따른 칼슘 신호의 최적화 과정이 필수적이다. 이러한 과정을 통하여 형광 간섭이 최소화되어 상대적으로 민감하고 넓은 신호 영역이 제공되므로 광범위하게 이용되고 있는 luminescence 기술[11, 12, 22]을 사용한 CRF2 수용체 기능 분석 시스템을 개발하고자 하였다.

실험에 영향을 미치는 유전자 전달 방법의 최적화 과정을 확인하기 위하여 안정화 세포주(A30G16CRF2)와 임시 발현 세포들(A30CRF2/G16, A30G16/CRF2,

A30/G16CRF2)을 비교 분석한 결과 안정화 세포주인 A30G16CRF2의 작용제 최대 농도 신호 값이 230,000 RLU(AUC)이상으로 다른 세 조건의 임시 발현 세포주들에 비해 최대 8.85배 이상의 높은 수치를 보였다. 또한 길항제 반응성에서 최대 농도 신호 값이 260,000 RLU(AUC)이상으로 다른 세 조건의 임시 발현 세포주에 비해 최대 7.65배 이상의 높은 수치를 보여 안정화 세포주에서 최상의 반응성을 보였다. 그리고 세 조건의 임시 발현 세포주에서는 A30G16/CRF2가 A30CRF2/G16, A30/G16CRF2에 비해 작용제와 길항제 반응성의 최대 농도 신호 값과 S/B 비율이 2배 이상의 높은 수치를 보였다. 이는 G_{α16}이 먼저 세포막에 구축되어 있을 때 외부로부터 전달되는 CRF2와 보다 더 효율적으로 결합하여 CRF2 자체의 신호를 Gq 신호 경로로 전달하게 되어 칼슘 측정에 높은 반응성을 나타낸 것으로 보인다. A30/G16CRF2 세포 조건에서는 측정 시 작용제 반응성에서 큰 효율을 보이지 않았으며 작용제로 인한 반응성이 낮아 역학반응 초기에 불안정한 신호 수치를 나타내어 실험이 불가능하다고 판단되었다. 이에 대한 원인은 보고된 바와 같이 외부로부터 인위적으로 여러 유전자들을 도입할 때 세포 내에서 발현 정도를 조절하는 것이 매우 어려우며[23]G_α subunit에서 C말단 끝의 5개 아미노산[24]과 4α/6β loop, N말단 α-helix 지역 등이 수용체 결합 특이성을 결정하여 상호작용을 한다고 알려진 내용[25]과 관계가 있다고 판단된다. 또한 비록 수용체와 G_α subunit이 융합된 단백질 유전자를 전달시킨 경우가 더 향상된 결과를 주지만 융합되지 않는 수용체와 G_α subunit의 유전자를 동시 전달시킬 경우 수용체가 세포막에 있는 내생의 G_α subunit에 우선적으로 선택성을 가지고 결합이 되기 때문에[26] 이러한 결과가 초래된다고 판단된다.

본 논문에서 CRF2 수용체를 모델로 이용하여 G 단백질과 수용체 유전자들의 전달 방법을 비교 분석한 결과 aequorin기반 luminescence 실험에서 안정화 세포주가 가장 반응성이 높지만 임시 발현 세포를 사용할 경우 우선적으로 G 단백질을 안정적으로 발현시킨 후 목표하는 수용체를 2차적으로 발현시키는 방법이 가장 성공 가능성이 크다고 판단된다.

References

- [1] J. Drews, "Drug discovery: a historical perspective", *Science*, 287(5460), pp. 1960-1964, 2000.
DOI: <https://doi.org/10.1126/science.287.5460.1960>
- [2] D. Zhang, Q. Zhao, B. Wu, "Structural studies of G protein-coupled receptors", *Mol Cells*, 38(10), pp. 836-842, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.14348/molcells.2015.0263>
- [3] Y. W. Kim, H. S. Kim, S. Y. Kim, Y. H. Choi, S. H. Moh, Y. W. Cheon, "Development of scar improving materials using enkephalin derivatives", *J Korea Acad Cooper Soc*, 16(8), pp. 5336-5342, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.5762/kais.2015.16.8.5336>
- [4] I. Y. Ku, S. J. Moon, K. H. Ka, M. K. Park, "Effects of carbenoxolone and P2X receptor antagonist combined therapy on oral neuropathic pain in rat", *J Korea Acad Cooper Soc*, 17(2), pp. 123-128, 2016.
- [5] B. U. Ki, S. Y. Lee, "Role of Rab11 on membrane trafficking of rat vanilloid receptor, TRPV1", *J Korea Acad Cooper Soc*, 12(7), pp. 3096-3102, 2011.
- [6] X. Wu, J. F. Glickman, B. R. Bowen, M. A. Sills, "Comparison of assay technologies for a nuclear receptor assay screen reveals differences in the sets of identified functional antagonists", *J Biomol Screen*, 8(4), pp. 391-392, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1177/1087057103256466>
- [7] T. K. Kim, J. H. Eberwine, "Mammalian cell transfection: the present and the future", *Anal Bioanal Chem*, 397(8), pp. 3173-3178, 2010.
DOI: <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
- [8] K. A. Paschos, E. Chouridou, M. Koureta, M. Lambropoulou, G. Kolios, E. Chatzaki, "The corticotropin releasing factor system in the liver: expression, actions and possible implications in hepatic physiology and pathology", *Hormones (Athens)*, 12(2), pp. 236-245, 2013.
DOI: <https://doi.org/10.14310/horm.2002.1407>
- [9] E. D. Reinbold, J. L. Scholl, K. M. Oliver, M. J. Watt, G. L. Forster, "Central CRF2 receptor antagonism reduces anxiety states during amphetamine withdrawal", *Neurosci Res*, 89, pp. 37-43, 2014.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neures.2014.08.010>
- [10] J. Sanders, C. Nemeroff, "The CRF system as a therapeutic target for neuropsychiatric disorders", *Trends Pharmacol Sci*, doi: 10.1016/j.tips.2016.09.004, 2016. (Epub ahead of print).
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2016.09.004>
- [11] H. Noh, and S. Lee, "Optimization of the cryopreserved condition for utilization of GPCR frozen cells", *J Korea Acad Cooper Soc*, 16(2), pp. 1200-1206, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.5762/kais.2015.16.2.1200>
- [12] H. Noh, S. Lee, "Development of an aequorin-based assay for the screening of corticotropin-releasing factor receptor antagonists", *J Korea Acad Cooper Soc*, 16(11), pp. 7575-7581, 2015.
DOI: <https://doi.org/10.5762/kais.2015.16.11.7575>
- [13] D. Prasher, R. O. McCann, M. J. Cormier, "Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein", *Biochem Biophys Res Commun*, 126(3), pp. 1259-1268, 1985.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90321-3](https://doi.org/10.1016/0006-291X(85)90321-3)
- [14] D. Button, M. Brownstein, "Aequorin-expressing mammalian cell lines used to report Ca²⁺ mobilization", *Cell Calcium*, 14(9), pp. 663-671, 1993.
DOI: [https://doi.org/10.1016/0143-4160\(93\)90091-J](https://doi.org/10.1016/0143-4160(93)90091-J)
- [15] C. W. Liaw, T. W. Lovenberg, G. Barry, T. Oltersdorf, D. E. Grigoriadis, E. B. de Souza, "Cloning and characterization of the human corticotropin-releasing factor-2 receptor complementary deoxyribonucleic acid", *Endocrinol*, 137(1), pp. 72-77, 1996.
DOI: <https://doi.org/10.1210/en.137.1.72>
- [16] T. Riss, R. Moravec, A. Niles, "Selecting cell-based assays for drug discovery screening", *Cell note*, 13, pp. 16-21, 2005.
- [17] J. H. Zhang, T. D. Chung, K. R. Oldenburg, "A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays", *J Biomol Screen*, 4(2), pp. 67-73, 1999.
DOI: <https://doi.org/10.1177/108705719900400206>
- [18] D. Y. Oh, J. Y. Seong, "Physiological function of G protein-coupled receptors(GPCRs) and research trends for orphan GPCRs", *J Korean Soc Endocrinol*, 20(3), pp. 185-199, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.3803/jkes.2005.20.3.185>
- [19] W. Thomsen, J. Frazer, D. Unett, "Functional assays for screening GPCR targets", *Curr Opin Biotechnol*, 16(6), pp. 655-665, 2005.
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.10.008>
- [20] P. J. Knight, T. A. Pfeifer, T. A. Grigliatti, "A functional assay for G-protein-coupled receptors using stably transformed insect tissue culture cell lines", *Anal Biochem*, 320(1), pp. 88-103, 2003.
DOI: [https://doi.org/10.1016/S0003-2697\(03\)00354-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00354-3)
- [21] T. Zhu, L. Y. Fang, X. Xie, "Development of a universal high-throughput calcium assay for G protein-coupled receptors with promiscuous G-protein G_{ai5/16}", *Acta Pharmacol Sin*, 29(4), pp. 507-516, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1745-7254.2008.00775.x>
- [22] V. Menon, A. Ranganath, V. H. Jorgensen, M. Sabio, C. T. Christoffersen, M. A. Uberti, K. A. Jones, P. S. Babu, "Development of an aequorin luminescence calcium assay for high-throughput screening using a plate reader, the lumilux", *Assay Drug Dev Technol*, 6(6), pp. 787-793, 2008.
DOI: <https://doi.org/10.1089/adt.2008.157>
- [23] D. Wu, A. Katz, C. H. Lee, M. I. Simon, "Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family", *J Biol Chem*, 267(36), pp. 25798-25802, 1992.
- [24] B. R. Conkin, Z. Farfel, K. D. Lustig, D. Julius, H. R. Bourne, "Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha", *Nature*, 363(6426), pp. 274-276, 1993.
DOI: <https://doi.org/10.1038/363274a0>
- [25] A. Heydom, R. J. Ward, R. Jorgensen, M. M. Rosenkilde, T. M. Frimurer, G. Milligan, E. Kostenis, "Identification of a novel site within G protein alpha subunits important for specificity of receptor-G protein

interaction”, *Mol Pharmacol*, 66(2), pp. 250-259, 2004.
DOI: <https://doi.org/10.1124/mol.66.2.250>

- [26] P. Molinari, C. Ambrosio, D. Riitano, M. Sbraccia, M. C. Gro, T. Costa, “Promiscuous coupling at receptor-G alpha fusion proteins”, *J Biol Chem*, 278(18), pp. 15778-15788, 2003.
DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M300731200>

박 서 현(Seohyun Park)

[정회원]



- 2015년 2월 : 상명대학교 의생명공학과 (공학사)
- 2015년 3월 ~ 현재 : 상명대학교 의생명공학과 (석사과정)

<관심분야>

GPCR, cell signaling, High throughput screening

이 승 호(Sunghou Lee)

[정회원]



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

<관심분야>

고효율 약효검색, 약물수용체 분자생리학