

항생제 선별 없이 alpha 1,3-Galactosyltransferase 유전자 nock아웃 기반 Membrane Cofactor Protein과 Thrombomodulin 유전자를 동시에 발현하는 세포라인 확립

이해선, 박미령, 오건봉*
농촌진흥청 국립축산과학원 동물바이오통과

Generation of alpha 1,3-Galactosyltransferase Knockout Pig Cell Expressing Membrane Cofactor Protein and Thrombomodulin without Application of Antibiotics for Selection

Haesun Lee, Mi-Ryung Park, Keon Bong Oh*
Division of Animal Biotechnology, National Institute of Animal Science, RDA

요약 돼지와 영장류의 면역 차이로 이종이식 돼지 장기에서 보체 활성화, 염증반응 그리고 혈액 응고 등의 거부반응이 발생하며 수여 영장류를 사망에 이르게 한다. 인위적으로 Membrane cofactor protein(MCP) 및 Thrombomodulin(TBM)을 발현시키는 것은 이러한 거부반응으로부터 세포를 보호하고 영장류 생존기간을 연장한다고 보고되었으며 이전 연구에서 코돈 최적화 MCP(*mMCP*)와 TBM *cDNA*를 활용한 발현 벡터를 구축한 바 있다. 본 연구의 목적은 항생제 저항성 유전자를 이용하지 않고 형질전환 세포 선별 시스템을 확립하며 alpha-1,3-Galactosyltransferase knock-out(GTKO)/mMCP/TBM 세포 라인을 개발하는 것이다. Nucleofection을 통해 mMCP/TBM 동시 발현 벡터를 도입한 GTKO 세포를 MCP에 대한 항체를 이용하여 MCP를 발현하는 세포만을 두 차례 분리하였다. 이를 통해 분리한 세포는 단일세포가 되도록 배양하였으며 유세포분석을 통한 MCP 발현 수준에 따라 단일 클론의 세포라인을 분류하여 선별하였다. 최종적으로 MCP 단백질 발현이 90% 이상인 GTKO/mMCP/TBM 유전자형 세포 라인 4종을 개발하였다. 선별된 클론들은 GTKO/mMCP/TBM 돼지 생산을 위한 핵이식 공여세포로 활용할 예정이다. 항생제 저항성 유전자를 사용하지 않는 선별 기술은 향후 의료용 원료 동물 생산에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract The immunological barriers between pigs and primates result in complement activation, inflammation, and coagulation in xenografts, consequently leading to the recipient's death. The intentional co-expression of membrane cofactor protein (MCP) and thrombomodulin (TBM) in pigs is known to contribute to the prolonged survival of xenografted recipient primates. In a previous study, we had constructed MCP/TBM co-expression vectors using codon-optimized MCP (mMCP) and TBM cDNA. The objectives of this study were to establish an antibiotic-free selection system and generate a pig cell line carrying mMCP and TBM expression vectors based on the alpha-1,3-galactosyltransferase knock-out (GTKO) genetic background. The mMCP/TBM co-expression vectors were introduced into GTKO pig fibroblasts. We isolated and selected only MCP-expressing cells using anti-MCP antibodies and cell separators twice. Additionally, we performed single-cell separation and clonal culture depending on the MCP expression level. Finally, we were able to obtain four GTKO/mMCP/TBM clones expressing MCP at levels of 90% and over. The selected clones will be used as donor cells for nuclear somatic cell transfer to produce GTKO/mMCP/TBM pigs for xenotransplantation. We believe that the antibiotic-free selection system established in this study could be useful to produce biomedical source animals without the antibiotic resistance gene.

Keywords : Pig Cells, Transfection, Antibiotic-Free Selection, Membrane Cofactor Protein, Thrombomodulin

본 논문은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01422802)의 지원에 의해 이루어진 것임.

*Corresponding Author : Keon Bong Oh(National Institute of Animal Science)

email: keonoh@korea.kr

Received October 12, 2021

Accepted December 6, 2021

Revised November 10, 2021

Published December 31, 2021

1. 서론

돼지와 영장류는 면역 시스템이 다르며, 이로 인해 돼지 장기를 영장류에 이식하면 초급성 거부반응을 비롯하여 보체 활성화, 혈액 응고, 염증반응, 조직의 괴사 등 복합적인 거부반응이 발생한다[1]. 이러한 반응을 억제하기 위해 거부반응의 원인이 되는 유전자를 제거하거나, 사람의 면역반응 조절 유전자를 도입한 형질전환 돼지 개발 연구가 이루어지고 있다[2, 3]. 돼지의 모든 세포에 존재하는 Galactose- α 1,3-galactose(Gal) 항원은 영장류에는 없는 대신 혈액에 Gal 항원에 대한 자연 항체가 존재한다. 이 Gal 항원이 가장 심각한 거부반응인 초급성 거부반응을 유발하는 원인이며[4], Gal 항원 합성 *alpha-1,3-galactosyltransferase* 유전자가 제거된 돼지(GTKO)의 심장을 이식받은 원숭이는 최대 179일 생존한 것으로 보고되었다[5].

돼지의 장기에서 사람 보체조절단백질 Membrane cofactor protein(MCP, CD46), Decay-accelerating factor(DAF, CD55), MAC-inhibitory protein(CD59) 등을 발현하면 이종이식 거부반응을 억제하여 영장류의 생존기간을 연장한다고 보고되었다[6]. 보체 활성화 과정에서 생성되는 C3b 및 C4b는 외부에서 유입된 항원을 둘러싸는 옵소닌작용(Opsonization)을 일으켜 면역세포의 식세포 작용을 촉진하고 염증반응을 유발한다[7, 8]. MCP는 C3b 및 C4b의 활성을 차단하여 세포를 보호하는 기능을 수행한다[9]. Mohiuddin 등의 연구에서 GTKO/MCP 돼지의 심장을 이식받은 원숭이의 생존기간이 최대 236일로서 사람 보체조절단백질의 중요성을 제안하였다[10].

초급성 거부반응과 보체 활성을 억제하였음에도 불구하고 이종이식 돼지의 장기에서 혈전성 미세혈관병증(Thrombotic microangiopathy)이나 허혈 손상(Ischemic injury) 등 혈액응고 현상이 발생한다[11]. 돼지의 혈관은 이종이식 시 영장류의 혈액과 가장 직접적인 접촉이 이루어지는 기관으로, 영장류의 혈액 속에 존재하는 각종 항체나 면역세포의 작용은 혈관내피세포의 손상을 유발하고 혈액응고를 촉진한다[12]. Mohiuddin 등은 혈관에서 특이적으로 Thrombomodulin(TBM)이 추가로 발현하는 GTKO/MCP/TBM 돼지의 심장을 이식받은 원숭이가 최대 945일 생존한 결과를 보고하였다[13]. TBM은 혈액 내 Thrombin과 결합하여 복합체를 형성하는데, 이를 통해 Thrombin이 혈액응고인자로서 작용하는 것을 억제할 뿐만 아니라 TBM-Thrombin 복합체

는 Protein C를 활성화시켜 혈액응고인자의 활성을 억제한다[14].

국내에서는 2012년도에 GTKO 돼지를 개발한 바 있다[15]. 본 연구는 이종이식 거부반응 억제를 강화하기 위하여 국내에서 개발한 GTKO 돼지의 세포를 기반으로 MCP 및 TBM 유전자가 도입된 세포주를 개발하는 것을 목표로 한다. 체세포 핵 이식(Somatic cell nuclear transfer, SCNT)을 위한 공여 세포 개발 시 유전자가 도입된 세포를 선별하는 방법으로 항생제를 활용하는 것이 일반적이나, 결과적으로 항생제 저항성을 가지게 되므로 이종이식용 돼지 개발에 적절하지 않은 방법이라고 제시되고 있다[16]. 본 연구는 항생제 선별 방법이 아닌 도입한 유전자를 발현하는 세포만을 선별하였고, 발현 수준에 따라 분리하여 배양함으로써 배양 수준을 예측할 수 있는 돼지 개발에 활용하고자 실시하였다.

2. 연구방법

2.1 세포 분리 및 배양

돼지 귀 섬유아세포(porcine ear fibroblasts, pEF) 분리 및 배양은 이전 연구를 참고하였다[17]. 1개월령 GTKO 형질전환 돼지에서 분리한 귀 조직에서 외피와 연골을 제거하고 작은 조각으로 잘라 세포 배양접시에 부착한 후 배양액과 함께 37°C 인큐베이터에서 배양하였다. 배양액은 15% Fetal bovine serum (Invitrogen, CA, USA), 1% Non-essential amino acid solution(Invitrogen), 1% Antibiotic/Antimycotic(Invitrogen), 0.1% Low serum growth supplement(LSGS; Invitrogen), 0.1mM β -Merchптоethanol(Sigma Aldrich, USA)이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM, Invitrogen)을 사용하였다.

2.2 유전자 도입 및 세포 분리

형질전환 세포주 구축을 위해 이전 연구에서 구축한 MCP/TBM 동시 발현 벡터를 활용하였다[18]. Nucleofector(Lonza, Koln, Germany)의 U-023 프로그램을 이용하여 섬유아세포에 도입한 후 약 10일 동안 증식시켰다. 이후 FITC-conjugated anti-human MCP antibody(BioLegend, CA, USA) 및 anti-FITC microbeads(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 사용하여 MCP를 발현하는 세포를 염색하

였으며 auto MACS Pro separator(Miltenyi Biotec)를 사용하여 제조사에서 제공한 방법에 따라 세포 선별을 수행하였다. 1차 선별 과정을 통해 분리한 MCP-positive 세포는 추가로 배양한 후 2차 선별을 진행하였다. 2차 선별된 MCP-positive 세포를 96-well plate(Thermo Fisher Scientific, MA, USA)에 단일 세포가 되도록 배양하였다(Fig. 1).

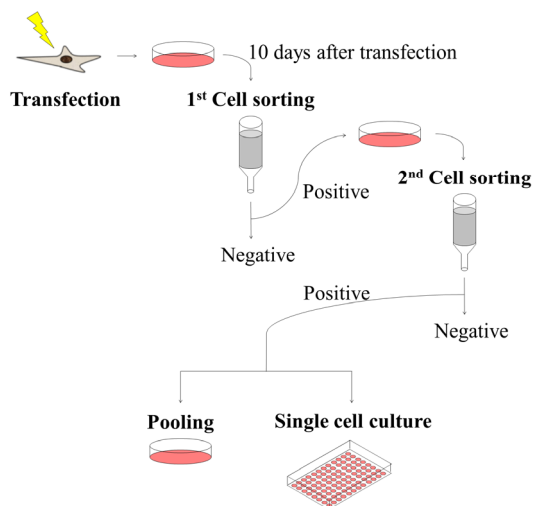


Fig. 1. Schematic diagram of selection methods for specific isolation of MCP-positive cells.

2.3 면역형광염색

돼지 귀 섬유아세포는 24시간 배양한 후 4% paraformaldehyde(Sigma Aldrich) 용액으로 고정하였다. FITC-conjugated Isolectin B4(Sigma Aldrich)는 1% Bovine serum albumin(BSA; Invitrogen)이 포함된 Phosphate-buffered saline(PBS; Invitrogen) 용액으로 각각 희석한 후 고정한 세포에 상온에서 1시간 처리하였다. 대조 염색을 위해 Hoechst(Sigma Aldrich)를 사용하였으며 형광 현미경(Leica, Germany)으로 염색한 세포를 관찰하였다.

2.4 유세포 분석

돼지 귀 섬유아세포에 Trypsin(Invitrogen)을 처리하여 단일 세포가 되도록 부유 시키고 FITC-conjugated anti-human MCP antibody(BioLegend)와 PE-conjugated anti-human TBM antibody(BD, Germany)를 사용하여 상온에서 1시간 염색하였다. 이를 위해 항체는 0.5% BSA가 포함된 PBS 용액에 각각 희

석하였으며 염색한 세포는 Attune NxT(Thermo Fisher Scientific)로 분석하였다.

2.5 Polymerase Chain Reaction(PCR)

섬유아세포에서 DNeasy Blood & Tissue kit(Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 genomic DNA(gDNA)를 추출하였다. 섬유아세포 도입한 유전자를 확인하기 위하여 Prime Taq Premix(Genet Bio, Korea)와 Table 1의 프라이머를 사용하였다.

Table 1. Primers used for PCR analysis

Vector	Sequences
m2A	F: CCGCAAGAAGTTCTACTACAAGGC
	R: CAGGGCCAAGATGGAGTACAAGTG
mpl2	F: CCGCAAGAAGTTCTACTACAAGGC
	R: TGCAGGACCACCTCTTTGCTAG

2.6 Western blot

단백질은 Radioimmunoprecipitation assay buffer(RIPA; Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 추출하고 Bradford assay(Bio-Rad, USA) 방법으로 정량하였다. 10 μ g의 단백질을 4-12% SDS-PAGE(Invitrogen)에서 전기영동 후 PVDF membrane(Invitrogen)으로 옮겼다. 1차 항체로는 Mouse monoclonal anti-MCP antibody(BioLegend)와 Mouse monoclonal anti-TBM antibody(Abcam, Cambridge, UK), Goat polyclonal anti-Actin antibody(Santa Cruz, CA, USA), 2차 항체로는 Goat anti-mouse IgG-HRP(Santa Cruz)와 Donkey anti-goat IgG-HRP(Santa Cruz)를 사용하였으며, 이를 희석하기 위한 차단 완충용액으로 0.1% Tween 20(Sigma Aldrich), 5% Skim milk(BD)가 첨가된 PBS를 사용하였다. 단백질은 Amersham ECL Prime Western Blot Detection Reagent(GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 확인하였다.

2.7 핵형 분석

구축한 세포주는 복제 난자 생산에 이용하기 전 염색체 이상 유무를 판별하기 위해 핵형 분석을 실시하였다. 이를 위해 T25 flask(Thermo Fisher Scientific)에 세포가 약 90%가 되도록 증식한 후 GTG-Banding 방법을 통해 분석하였다(동물염색체연구소, 서울, 대한민국).

3. 연구결과 및 고찰

3.1 GTKO/mMCP/TBM 돼지 세포 라인 개발

본 연구에서 GTKO 계통 돼지의 1개월령 수컷 #242 개체의 귀 조직으로부터 섬유아세포를 분리하여 배양하였다. 본 연구팀은 국내에서 개발한 GTKO가 안정적으로 증식되며 계통을 조성하였다고 보고한 바 있으며[15], 이들 후대에서도 *GGTA* 유전자가 제거되어 그 유전자로부터 합성되는 Gal epitope 발현이 지속적으로 이루어지지 않는 지 확인하기 위해 면역형광염색(Fig. 2a)과 유세포분석(Fig. 2b)을 실시하였다. Fig. 2a의 GTKO 돼지 세포에서 Wild type과 확연한 차이를 보이며 Gal epitope 발현이 발견되지 않았다. 유세포분석 역시 Wild type 세포는 Gal epitope을 발현하는 반면 GTKO 돼지 세포에서는 Gal epitope 발현이 없는 것을 확인하였다(Fig. 2b).

GTKO 세포에서 사람의 MCP와 TBM 발현을 향상시키기 위해 코돈 최적화 *MCP cDNA(mMCP)*를 *Cytomegalovirus enhancer/chicken β -actin(CAG)* 프로모터에 연결한 전 조직 발현 벡터에 혈관 특이 유전자로 알려진 돼지 *Intercellular adhesion molecule 2(plcam2)* 프로모터에 연결한 *TBM cDNA* 이중 벡터 *CAG-mMCP-plcam2-TBM-R(mpl2)*와 mMCP와 TBM cDNA를 *P2A signal sequence(2A)*로 연결한 Dicistron 발현 벡터 *CAG-mMCP-2A-TBM(m2A)*를 선택(Fig. 3)하여 GTKO pEF에 도입하였다. 본 연구팀은 이전 연구를 통해 MCP 유전자는 cDNA 형태로 세포에 도입하는 경우 전사체 수준에 비해 단백질로 발현되는 수준이 매우 낮았으나 코돈의 염기서열 최적화(*mMCP*)를 통해 단백질 발현을 증가시킬 수 있었다[18]. 본 연구에서는 목적유전자의 도입 여부만을 확인하는 것이 아니라, MCP 항체를 활용해 도입한 발현 벡터로부터 단백질이 높은 수준으로 발현하는 세포만을 분리하기 위한 선별 과정을 진행하였다.

첫 번째 cell separator로 MCP를 발현하는 세포를 선별했을 때 *m2A*와 *mpl2* 벡터 모두 1% 이내(0.27%와 0.6%)로 일부분의 세포만이 MCP를 발현하는 것으로 판단되었다. 선별한 세포를 증식한 후 두 번째 선별을 진행하였고, 이를 통해 20% 정도(19.79% 및 21.57%)의 MCP를 발현하는 세포를 확보할 수 있었다(Table 2). Fig 4a에서 보이는 바와 같이, 유전자 분석 결과 첫 번째 선별을 통해 유전자가 도입된 세포와 도입되지 않은 세포의 분리가 가능하고 두 번째 선별을 통해 유전자가 도입된 세포 중에서 MCP를 발현하는 세포의 선별이 가능한 것을 알 수 있었다. Western blot 분석은 2회의 선별을 통해 1회보다 MCP 발현 수준이 높은 세포를 선별할 수 있음을 보여준다(Fig. 4b).

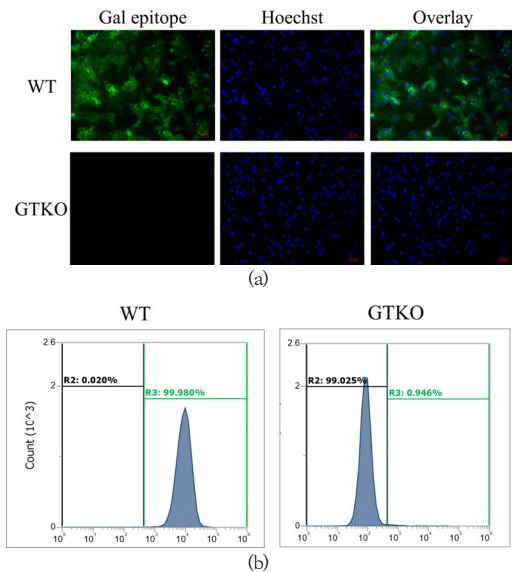


Fig. 2. Validation of *GGTA* ablation in pEF cells isolated and incubated from GTKO pig to detect absence of Gal epitope using (a) Immunocytochemistry (b) Flow cytometry analyses.

Table 2. Summary of selection for the MCP expressing cells by cell separator

Vector	Sorted		Cell number(cells/ml)			Viability	% of total cells
			Total	Live	Dead		
m2A	1st	Negative	3.6×107	3.1×107	5.7×106	84.25	99.73
		Positive	9.7×104	5.1×104	4.7×104	52.8	0.27
	2nd	Negative	7.7×106	6.3×106	1.4×106	82.35	80.21
		Positive	1.9×106	1.3×106	6.0×105	68.25	19.79
mp12	1st	Negative	3.8×107	3.6×107	2.6×106	93.15	99.40
		Positive	2.3×105	1.5×105	7.4×104	66.70	0.60
	2nd	Negative	8.0×106	7.2×106	8.3×105	89.25	78.43
		Positive	2.2×106	1.7×106	4.1×105	80.95	21.57

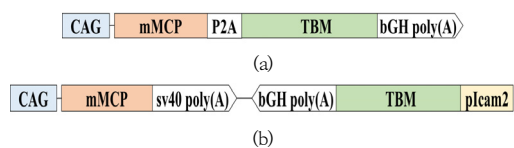


Fig. 3. Constructs of MCP and TBM dual-expression vectors

(a) *CAG-mMCP-2A-TBM(m2A)*

(b) *CAG-mMCP-plcam2-TBM-R(mpl2)*

유세포분석도 Western blot 분석과 동일한 결과를 얻을 수 있었는데, 선별된 세포의 집단에서 MCP 발현 수준이 세포별로 다른 것으로 판단되었다(Fig. 4c). TBM의 발현 수준은 MCP의 발현 수준 양상과 동일하였고, *CAG* 프로모터에 발현이 조절되도록 설계된 dicistronic *m2A* 벡터의 TBM 발현 수준이 혈관특이 프로모터 *plcam2* 조절에 의한 수준보다 높았다(Fig. 4b와 c). *plcam2* 프로모터가 혈관내피세포 특이적인 발현을 유도한다는 연구 결과와 일치하며[19], 이를 통해 TBM이 작용하는 혈관내피에서의 선택적인 발현을 유도할 수 있을 것으로 기대된다.

유전자가 도입된 세포를 선별하기 위한 방법으로는 발현 벡터에 선별 마커(Selection marker)로서 Neomycin, Hygromycin 등 항생제에 대한 저항성 유전자를 포함시켜 항생제 처리에도 생존한 세포만을 선별하는 방법이 주로 활용된다[20]. 본 연구의 세포가 이종이식에 활용하기 위한 돼지 개발을 위한 공여세포로 사용될 것을 고려하였을 때 항생제 저항성 유전자는 향후 항생제 처방 다양성을 감소시킬 수 있기에 불필요한 선택 사항이라고 판단된다. 일부의 연구에 의하면 유전자를 도입하고 항생제로 선별한 이후에 염색체 상에 남아있는 항생제 저항성 유전자만을 제거하기 위해 Cre/loxP recombination 시스템을 적용하였다고 보고하였다[21]. 본 연구에서는 도입 유전자에 대한 항체를 이용하여 세포를 분리하는 방법을 확립하였으며, 항생제 저항성 유전자가 없는 것을 권고하고 있는 이종장기용 원로동물로 개발하는 돼지 등 인체에 활용할 목적으로 개발하는 동물에 유용하게 활용될 것으로 생각된다.

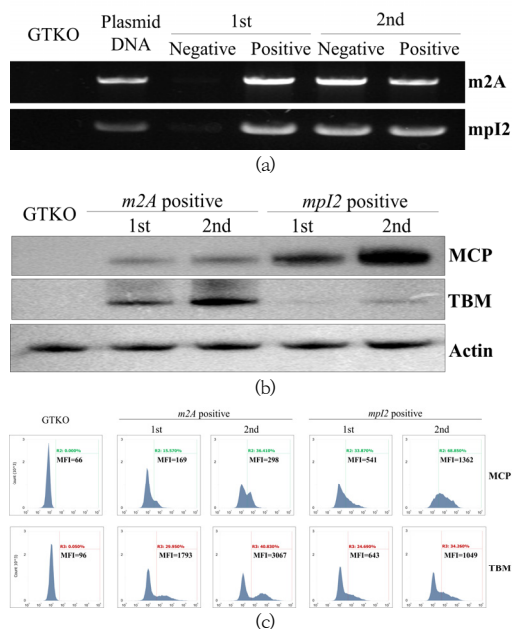


Fig. 4. Efficient selection of MCP and TBM expressing cells using MACS separation system.

(a) Genotype analysis to identify the integration of mMCP and TBM expression vector among selected cells. Western blot (b) and flow cytometry (c) analyses for MCP and TBM expressions

3.2 GTKO/mMCP/TBM 단일클론 선별 및 분리

본 연구에서는 2회의 선별과정을 거쳐 MCP를 발현하는 세포를 96-well plate의 1개 well에 단일 세포가 되도록 배양하였으며 세포를 증식한 후 유세포분석을 통해 MCP 단백질 발현 수준에 따라 분리하는 세 번째 선별을 실시하였다. 33개의 *mpl2* 단일 클론 세포와 42개의 *m2A* 단일 클론 세포를 선별 후 분리한 결과, 그 중에서 각각 14개와 13개의 단일 클론세포가 90% 이상 수준에서 MCP 발현을 확인하였다(Table 3). MCP를 발현하는 세포를 선별하였음에도

그 세포 집단 내에서 모든 세포가 동일한 수준으로 발현하지 않는다는 것을 보여준다. 이는 세포에 도입된 유전자는 무작위로 염색체에 삽입(Random integration)

Table 3. Summary of selection for clones depending on MCP expression level

Vector	No. of isolated clones	No. of analyzed clones	No. of MCP-positive <50% clones	No. of MCP-positive ≥50% and <90% clones	No. of MCP-positive ≥90% clones
m2A	113	42	10	19	13
mpl2	114	33	10	9	14

되므로 삽입된 위치에 따라 다양한 전사 관련 인자의 조절이 달라지는 position effect에 의해 것으로 생각된다[22]. 하지만 도입한 유전자 구조에 따른 선별 효율과 발현 수준에 차이가 없음을 알 수 있었다.

세 번의 선별과정을 진행하는 동안 배양된 세포들은 형태적으로 wild type 세포와 차이가 없었다. MCP를 90% 이상 발현하는 *m2A* 단일 클론 #7, #23과 *mpl2* 단일 클론 #25, #47을 선택하였다(Fig. 5). 4종의 클론 모두 정상적인 핵형을 가지는 것을 확인하였다(Fig. 6). 유전자의 도입으로 생리적으로 활성이 높은 단백질이 과도하게 발현되면 개체의 생리적 손상을 초래할 우려가 있으므로 특정 위치와 시기에 유전자의 발현이 향상되도록 하는 조절 시스템 개발 연구가 진행되고 있다[23]. 다른 한편으로, 목적 유전자의 발현을 특정 조직이나 세포에서 제한적으로 발현되도록 조절할 수도 있다. 이전의 연구를 살펴보면 이종이식용으로 개발된 돼지에서 MCP는 전 조직에서 TBM은 혈관세포에서 특이적으로 발현하도록 설계된 것이 일반적이다[24, 25].

본 연구에서 *m2A* 벡터가 도입된 클론 #7과 23에서는 MCP와 TBM의 발현 모두 *CAG* 프로모터에 의해 조절되므로 돼지를 개발한다면 전 조직에서 발현될 것이다. 한편, *mpl2* 벡터는 MCP와 TBM의 발현을 위해 두 종류의 프로모터를 별도로 활용하였는데, 돼지에서 MCP는 전 조직에서 TBM은 혈관세포에서 발현될 것이다. 본 연구에서 90% 이상 수준으로 MCP를 발현하는 단일 클론을 3회의 선별과정을 통해 분리하였다. 이 클론들은 GTKO/mMCP/TBM 돼지를 생산을 위한 체세포 핵 이식 공여세포로 활용할 예정이다.

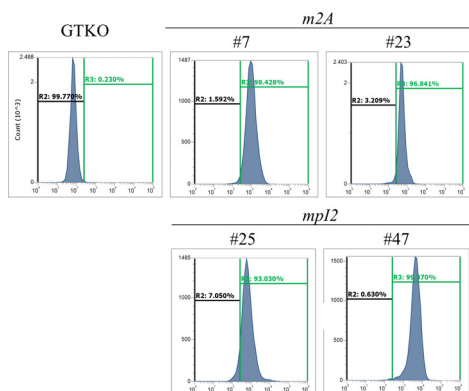


Fig. 5. Selection of clones expressing MCP over 90% level

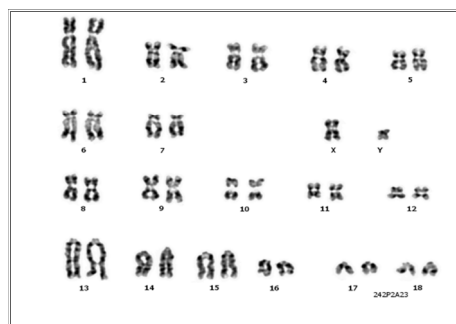


Fig. 6. Representative of karyotype analysis of single clones

4. 결론

돼지와 영장류 사이의 면역 시스템 차이는 이종이식 시 초급성 거부반응을 시작으로 복합적인 면역반응을 유발한다. 이를 극복하기 위해 본 연구에서는 *CAG* 프로모터에 의해 보체조절단백질 MCP와 혈액응고를 억제 단백질 TBM을 동시에 발현하는 벡터와 *CAG* 프로모터에 의해 MCP를 돼지 *Icam2* 프로모터에 의해 TBM을 동시에 발현하는 벡터를 활용하였다. GTKO 세포에 상기 발현 벡터가 도입된 세포 라인을 개발하였다. MCP를 발현하는 세포만을 2회 선별하였으며, TBM 발현도 확인하였다. 세 번째 선별을 통해 MCP 발현 수준에 따라 단일 클론 세포를 분리하였으며, 이를 통해 90% 이상 MCP를 발현하는 단일 클론 세포 라인을 확립하였다. 항생제 저항성 유전자의 도입 없이 세포에서 목표 유전자 발현 수준을 바탕으로 세포 라인을 구축할 수 있는 유용한 기술로 활용될 것이다. 선별한 단일클론 #7과 #23은 *CAG* 프로모터에 의해 MCP와 TBM이 동시에 발현하며 클론 #25와 #47은 MCP는 *CAG* 프로모터, TBM은 *plcam2* 프로모터에 의해 발현이 개별적으로 조절되는 세포 라인이다. 이 세포는 GTKO/mMCP/TBM 형질전환 돼지 생산에 활용할 예정이며, 이종이식 시 영장류 생존기간 연장에 기여할 것으로 기대된다.

References

- [1] T. Lu, B. Yang, R. Wang, and C. Qin, "Xenotransplantation: current status in preclinical research", *Frontiers in Immunology*, Vol.10, pp.3060, Jan. 2020.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.03060>

- [2] E. Wolf, E. Kemter, N. Klymiuk, B. Reichart, "Genetically modified pigs as donors of cells, tissues, and organs for xenotransplantation", *Animal Frontiers*, Vol. 9, No.3, pp.13-20, Jun. 2019.
<https://doi.org/10.1093/af/vfz014>
- [3] M. Hryhorowicz, J. Zeyland, R. Słomski, D. Lipiński, "Genetically modified pigs as organ donors for xenotransplantation", *Molecular Biotechnology*, Vol.59, No.9, pp.435-444, Jul. 2017.
<https://doi.org/10.1007/s12033-017-0024-9>
- [4] L. Lai, D. Kolber-Simonds, K. W. Park, H. T. Cheong, J. L. Greenstein, G. S. Im, M. Samuel, A. Bonk, A. Rieke, B. N. Day, "Production of α -1, 3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning", *Science*, Vol.295, No.5557, pp.1089-1092, Jan. 2002.
<https://doi.org/10.1126/science.1068228>
- [5] K. Kuwaki, Y. L. Tseng, F. J. Dor, A. Shimizu, S. L. Houser, T. M. Sanderson, C. J. Lancos, D. D. Prabharaasuth, J. Cheng, K. Moran, "Heart transplantation in baboons using α 1, 3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience", *Nature Medicine*, Vol.11, No.1, pp.29-31, Jan. 2005.
<https://doi.org/10.1038/nm1171>
- [6] D. H. Adams, A. Kadner, R. H. Chen, R. S. Farivar, J. S. Logan, L. E. Diamond, "Human membrane cofactor protein (MCP, CD 46) protects transgenic pig hearts from hyperacute rejection in primates", *Xenotransplantation*, Vol.8, No.1 pp.36-40, Feb. 2001.
<https://doi.org/10.1046/j.0908-665x.2000.00085.x>
- [7] H. Yamamoto, A. F. Fara, P. Dasgupta, C. Kemper, "CD46: the 'multitasker' of complement proteins", *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, Vol.45 No.12, pp.2808-2820, Dec. 2013.
<https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.09.016>
- [8] M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, "Complement regulator CD46: genetic variants and disease associations". *Human Genomics*, Vol.9 No.1, pp.1-13, Jun. 2015.
<https://doi.org/10.1186/s40246-015-0029-z>
- [9] M. K. Liszewski, C. Kemper, "Complement in motion: the evolution of CD46 from a complement regulator to an orchestrator of normal cell physiology", *The Journal of Immunology*, Vol.203, No.1, pp.3-5, Jul. 2019.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900527>
- [10] M. M. Mohiuddin, A. K. Singh, P. C. Corcoran, R. F. Hoyt, M. L. Thomas III, B. G. Lewis, M. Eckhaus, N. L. Dabkowski, A. J. Belli, K. A. Reimann, "Role of anti-CD40 antibody-mediated costimulation blockade on non-Gal antibody production and heterotopic cardiac xenograft survival in a GTKO. hCD46Tg pig-to-baboon model", *Xenotransplantation*, Vol.21, No.1, pp.35-45, Jan. 2014.
<https://doi.org/10.1111/xen.12066>
- [11] H. Iwase, B. Ekser, V. Satyananda, J. Bhama, H. Hara, M. Ezzelarab, E. Klein, R. Wagner, C. Long, J. Thacker, "Pig-to-baboon heterotopic heart transplantation-exploratory preliminary experience with pigs transgenic for human thrombomodulin and comparison of three costimulation blockade-based regimens", *Xenotransplantation*, Vol.22, No.3, pp. 211-220, May. 2015.
<https://doi.org/10.1111/xen.12167>
- [12] G. Puga Yung, M. K. Schneider, J. D. Seebach, "The role of NK cells in pig-to-human xenotransplantation", *Journal of Immunology Research*, Vol.2017, Dec. 2017.
<https://doi.org/10.1155/2017/4627384>
- [13] M. M. Mohiuddin, A. K. Singh, P. C. Corcoran, M. L. Thomas III, T. Clark, B. G. Lewis, R. F. Hoyt, M. Eckhaus, R. N. Pierson III, A. J. Belli, "Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO. hCD46. hTBM pig-to-primate cardiac xenograft", *Nature Communications*, Vol.7, No.1, pp.1-10, Apr. 2016.
<https://doi.org/10.1038/ncomms11138>
- [14] G. Anastasiou, A. Gialeraki, E. Merkouri, M. Politou, A. Travlou, "Thrombomodulin as a regulator of the anticoagulant pathway: implication in the development of thrombosis", *Blood Coagulation & Fibrinolysis*, Vol.23, No.1, pp.1-10, Jan. 2012.
<https://doi.org/10.1097/MBC.0b013e32834cb271>
- [15] S. S. Hwang, K. B. Oh, D. H. Kim, J. S. Woo, H. S. Shim, I. J. Yun, J. K. Park, G.-S. Im, "Production of α 1,3-Galactosyltransferase (GalT) Double Knock-out (-/-) Transgenic Pigs for Xenotransplantation", *Journal of Embryo Transfer*, Vol.27, No.1, pp.9-14, 2012.
- [16] D. N. Kwon, K. Lee, M. J. Kang, Y. J. Choi, C. Park, J. J. Whyte, A. N. Brown, J. H. Kim, M. Samuel, J. Mao, "Production of biallelic CMP-Neu5Ac hydroxylase knock-out pigs", *Scientific Reports*, Vol.3, No.1, pp.1-10, Jun. 2013
<https://doi.org/10.1038/srep01981>
- [17] N. Ko, J. W. Lee, S. S. Hwang, B. Kim, S. A. Ock, S. S. Lee, G. S. Im, M. J. Kang, J. K. Park, S. Jong Oh, "Nucleofection-mediated α 1, 3-galactosyltransferase gene inactivation and membrane cofactor protein expression for pig-to-primate xenotransplantation", *Animal Biotechnology*, Vol.24, No.4, pp.253-267, Aug. 2013.
<https://doi.org/10.1080/10495398.2012.752741>
- [18] H. Lee, I. s. Hwang, B. M. K. Vasamsetti, H. R. Rallabandi, M. R. Park, S. J. Byun, H. Yang, S. A. Ock, H. C. Lee, J. S. Woo, "Codon optimized membrane cofactor protein expression in α 1, 3 galactosyltransferase knockout pig cells improve protection against cytotoxicity of monkey serum", *3 Biotech*, Vol.10, No.3, pp.1-10, Mar. 2020.
<https://doi.org/10.1007/s13205-020-2091-z>
- [19] E. Barbon, C. Kaweck, S. Marmier, A. Sakal, F. Collaud, S. Charles, G. Ronzitti, C. Casari, O. D. Christophe, C. V. Denis, P. J. Lenting, F. Mingozzi, "Development of a dual hybrid AAV vector for endothelial-targeted expression of von Willebrand factor", *Gene Therapy*, Jan. 2021.

<https://doi.org/10.1038/s41434-020-00218-6>

- [20] A. M. Lanza, D. S. Kim, H. S. Alper, "Evaluating the influence of selection markers on obtaining selected pools and stable cell lines in human cells", *Biotechnology Journal*, Vol.8, No.7, pp.811-821, Mar. 2013.
<https://doi.org/10.1002/biot.201200364>
- [21] K. M. Whitworth, R. Cecil, J. A. Benne, B. K. Redel, L. D. Spate, M. S. Samuel, R. S. Prather, K. D. Wells, "Zygote injection of RNA encoding Cre recombinase results in efficient removal of LoxP flanked neomycin cassettes in pigs", *Transgenic Research*, Vol.27, pp.167-178, Mar. 2018.
<https://doi.org/10.1007/s11248-018-0064-3>
- [22] J. Kirchhoff, A. Schiermeyer, K. Schneider, R. Fischer, W. M. Ainley, S. R. Webb, H. Schinkel, S. Schillberg, "Gene expression variability between randomly and targeted transgene integration events in tobacco suspension cell lines", *Plant Biotechnology Reports*, Vol.14, No.4, pp.451-458, May. 2020.
<https://doi.org/10.1007/s11816-020-00624-7>
- [23] J. G. No, H. Lee, N. H. Lee, W. S. Sun, I. S. Hwang, M. Lee, K. B. Oh, "Porcine tissue factor promoter induces specific expression of target gene in response to human serum in porcine aortic endothelial cells", *Korean Journal of Agricultural Science*, Vol.48, No.2, pp.353-365, Jun. 2021.
<https://doi.org/10.7744/kjoas.20210027>
- [24] A. Wuensch, A. Baehr, A. K. Bongoni, E. Kemter, A. Blutke, W. Baars, S. Haertle, V. Zakhartchenko, M. Kurome, B. Kessler, "Regulatory sequences of the porcine THBD gene facilitate endothelial-specific expression of bioactive human thrombomodulin in single and multitransgenic pigs", *Transplantation*, Vol.97, No.2, pp.138-147, Jan. 2014.
<https://doi.org/10.1097/TP.0b013e3182a95cbc>
- [25] K. Fischer, S. Kraner-Scheiber, B. Petersen, B. Rieblinger, A. Buermann, T. Flisikowska, K. Flisikowski, S. Christan, M. Edlinger, W. Baars, "Efficient production of multi-modified pigs for xenotransplantation by 'combineering', gene stacking and gene editing", *Scientific Report*, Vol.6, No.1, pp.1-11, Jun. 2016.
<https://doi.org/10.1038/srep29081>

이 해 선(Haesun Lee)

[정회원]



- 2018년 2월 : 전남대학교 농업생명과학대학학연협동과정 (농학석사)
- 2018년 9월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

분자생물, 유전자 편집, 이종이식

박 미 령(Mi-Ryung Park)

[정회원]



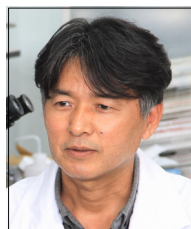
- 2000년 2월 : 경상대학교 낙농학과 (농학석사)
- 2005년 2월 : 경상대학교 응용생명과학부 (이학박사)
- 2010년 1월 ~ 2012년 12월 : 건국대 동물자원 전임연구원
- 2013년 1월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사

<관심분야>

동물발생, 생명공학

오 건 봉(Keon Bong Oh)

[정회원]



- 1995년 2월 : 충남대학교 축산학과 (농학석사)
- 2000년 2월 : 충남대학교 축산학과 (농학박사)
- 2008년 11월 ~ 현재 : 농촌진흥청 국립축산과학원 농업연구사교수

<관심분야>

발생공학, 유전자 변형 동물