

CRF1 길항제 스크리닝을 위한 에퀴린 기반 세포실험 개발연구

노효진¹, 이승호^{1*}
¹상명대학교 의생명공학과

Development of an aequorin-based assay for the screening of corticotropin-releasing factor receptor antagonists

Hyojin Noh¹, Sunghou Lee^{1*}

¹Department of Biomedical Technology, Sangmyung University

요 약 corticotropin releasing factor(CRF)는 스트레스에 의해 유도되는 신경펩타이드 물질들 중 하나로서 모발의 손실 및 재성장 에 영향을 미친다고 광범위하게 제기되어 왔다. 이에 CRF1 수용체 길항제 개발을 위하여 세포 내 칼슘 신호전달 기전을 이용한 스크리닝 시스템을 개발하고 최적화 연구를 수행하고자 하였다. 이를 위하여 에퀴린 모체세포에 CRF1 수용체와 만능 G 단백질인 Ga16 유전자를 동시에 발현시켜 안정화 세포주를 구축하였다(HEK293a16/hCRF1). 표준 효현제인 sauvagine의 반응이 임시 발현세포와 비교하여 안정화 세포주에서 농도 의존적 반응 범위가 12배 이상 증가하였으며(EC_{50} :15.21±1.83 nM), 이에 따라 길항제 스크리닝에 필수적인 안정적인 신호와 높은 용매 허용도를 확보할 수 있었다. CRF1 수용체에 대한 표준 길항제인 antalarmin과 CP154526에 대한 IC_{50} 수치는 각각 414.1±5.5와 290.7±1.9 nM로 확인되었는데 냉동보관세포의 경우에도 유사한 결과를 얻었다. 에퀴린 기반 세포 기능실험의 최적화 연구를 통해 구축된 CRF 수용체 안정화 세포주는 모발의 재형성과 관련된 신구의 기능성 화장품 및 조절물질 개발 연구에 적극적으로 활용 가능 할 것으로 판단된다.

Abstract Corticotropin-releasing factor(CRF), one of the stress driven neuropeptides, was widely proposed to influence hair loss and re-growth. For the development of receptor antagonists, the screening system based on intracellular calcium signal process was developed and optimized. The aequorin parental cells were transfected with CRF1 receptor and alpha 16 promiscuous G protein cDNA to establish HEK293a16/hCRF1, a stable cell line for the human CRF1 receptor. In HEK293a16/hCRF1 cells, the range of sauvagine dose response was 12-fold higher(EC_{50} :15.21±1.83 nM) than in the transiently expressed cells, hence essential conditions for the antagonist screening experiments such as the robust signals and high solvent tolerance were secured. The standard antagonists for the CRF1 receptor, antalarmin and CP154526, resulted IC_{50} values of 414.1±5.5 and 290.7±1.9 nM, respectively. Similar results were presented with frozen HEK293a16/hCRF1 cells. Finally, our HEK293a16/hCRF1 cells with the aequorin based cellular functional assay can be a model system for the development of functional cosmetics and modulators that can have a clinical efficacy on hair re-growth.

Keywords : Drug screening, Corticotropin releasing factor receptor, G-protein coupled receptor, High throughput screening

1. 서론

스트레스로 인한 생리적인 변화에 대응하여 신속히

반응하는 것으로 알려진[1] corticotropin releasing factor(CRF)는 우울증, 정신분열증 및 알츠하이머병의 발생과도 관련성이 있다고 보고되었다[2-3]. CRF는 41

본 논문은 2014년도 상명대학교 교내 학술연구비 지원에 의해 작성되었음.

*Corresponding Author : Sunghou Lee (Sangmyung Univ.)

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

Received September 25, 2015

Revised (1st October 12, 2015, 2nd October 20, 2015)

Accepted November 6, 2015

Published November 30, 2015

개의 펩타이드로 구성되며, 수용체로는 1형(CRF1) 및 2형(CRF2)과 CRF 결합 단백질 (CRF-BP)이 알려져 있다[4-5]. 생리학적으로 중요한 조절자로서의 역할을 수행하는 CRF 수용체[6]는 활성화되면 cAMP의 조절과 phospholipase C, MAPK cascades 등 다양한 신호전달 기전과 관련된 것으로 알려져 있다[7-9]. 이러한 신경 펩타이드 신호전달 시스템을 통하여 CRF는 교감신경을 자극하거나 또는 부교감신경계를 억제하여 심혈관계 시스템[10]과 신경 내분비 시스템[11]을 조절하는데, CRF 수용체 길항제가 이러한 작용들을 억제할 수 있는 것으로 나타났다.

CRF 수용체 시스템과 관련된 최근 연구에 따르면, CRF 수용체가 과발현된 탈모증 마우스모델에서 *astressin-B*를 피하주사 하여 CRF1과 CRF2 수용체를 차단시켰을 때 모발 재형성과 함께 활발한 피부 색소침착이 나타났다[12]. 이러한 결과는 CRF 수용체 길항제가 만성적인 스트레스로 인한 모발의 손실 및 재형성과 관련이 있다는 것으로 CRF 및 관련된 여러 신경펩타이드 수용체 조절물질들에 대한 개발연구와 활용 가능성이 제기되었다.

지금까지의 수용체 조절물질들에 대한 1단계 스크리닝 연구는 주로 리간드와 수용체간의 상호작용을 수용체 절편을 이용하여 검색하는 방법으로 수행되어 왔다[13]. 그러나 다양한 수용체 조절물질들에 대한 활성을 효현제와 길항제 차원에서 검증하고자 점차로 세포 내 수용체 단백질의 발현을 활용하게 되고 따라서 형광신호를 이용한 이미징 등 여러 플랫폼 기술들이 이용되어 왔다[14]. 특히 광범위하게 활용되고 있는 형광신호의 경우 스크리닝하는 물질들이 자체 형광을 가지고 있거나 검출되는 형광을 간섭하는 경우 실험결과에 매우 부정적인 효과를 나타내어 이러한 현상을 극복하고자 전 세계적으로 라벨 프리 기술[15] 등 다양한 기술들이 검토되어 왔다. 그들 중 광단백질인 에쿼린을 활용한 세포 내 칼슘신호전달 감지기술[16-7]은 시료들에 의한 간섭현상을 최소화 할 수 있다는 측면에서 천연물 시료들을 포함하는 CRF1 수용체에 대한 스크리닝 기술로서 적합하다고 판단되었다.

이에 본 논문에서는 모발의 재형성에 관여하는 CRF 길항제 스크리닝 연구를 위하여 CRF1 수용체와 함께 만능 G 단백질을 동시발현 시킨 안정화 세포주를 개발하고, 이를 활용한 에쿼린 기반 세포 기능실험의 최적화 연구 결과를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료 및 기기

에쿼린[18-9] 모체 세포주 (ES-000-A30)는 Perkin-Elmer life and analytical science (미국)사에 허가를 받아 사용하였다. CRF1 (GenBank Acc#, AY457172)과 *Gα16*(GenBank Acc#, M63904)의 cDNA는 Missouri S&T cDNA Resource center (미국)로부터 분양받았으며, CRF1의 효능제인 *sauvagine*은 American peptide company (미국)사의 제품을 사용하였다. CRF1의 표준 길항제인 *antalarmin*과 CP154526은 TOCRIS (영국)사의 제품을 사용하였다. 96-well white Optiplate는 PerkinElmer life and analytical science사의 제품을 사용하였으며, 세포 내 칼슘 변동 측정에 사용되는 *coelenterazine h*는 chromophore 보조인자로서 Promega Corporation (미국)사의 제품을 사용하였다. 세포로부터의 반응은 Berthold (독일)사의 Mithras LB 940 장비를 사용하여 측정하였다.

2.2 세포배양

에쿼린 모체 세포주는 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[20]. 세포는 100 mm 디쉬를 사용하여 5% CO₂가 포함된 가습조건에서 37°C로 배양하였다. 세포의 포화도가 80% 정도에 도달했을 때, 1X Phosphate buffered saline (PBS : BIOSESANG, 한국) 5 ml로 세척하고 Trypsin-EDTA 5 ml를 첨가하여 세포를 분리한 후 배양액 5 ml를 추가하여 1,000 Xg에서 5 분간 원심분리 하였다. 다시 배양액 10 ml과 혼합하여 4×10⁵개의 세포를 100 mm 디쉬에 옮겨 5 일 간격으로 계대 배양하였다.

2.3 안정화 세포주의 구축

CRF1 수용체 유전자가 안정적으로 발현되는 세포주를 확립하기 위하여 에쿼린 모체 세포주에 CRF1과 *Gα16*[21] 유전자를 삽입하고 그 유전자들을 가지는 벡터에 대한 selection antibiotics을 포함한 배양액으로 같이주며 세포를 배양하였다. 만들어진 여러 개의 colony를 분리하여 배양한 다음 칼슘에 대한 반응을 실험하여 최대 반응을 보이는 colony를 선별하였다. 실험에 사용된 안

정화 세포주는 CRF1 (HEK293aeq16/hCRF1)로 표시하였다. 형질전환의 구체적인 실험 조건은 LONZA사의 4D-Nucleofector system을 사용하여 제조회사의 프로토콜을 따라 에퀴린 모체 세포주에서 수행하였다.

2.4 에퀴린 기반 세포기능실험

세포 내에서 방출되는 칼슘과 미토콘드리아 에퀴린을 통한 발광현상을 기초로 하는 세포기능실험 방법을 활용하였다[20]. 간단히 설명하면 형질전환을 통해 CRF1 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 2×10^6 cells/ml의 농도가 되도록 coelenterazine h를 첨가한 다음 빛을 차단하고 상온에서 rotator를 사용하여 세포와 coelenterazine h를 반응시켰다. 4 시간 동안 반응시킨 후에 기본 완충액으로 10배 희석하여 2×10^5 cells/ml 농도로 맞추는 후 앞에서와 같은 조건으로 60 분간 방치하였다.

효능제 활성을 확인하기 위해서 50 μ l/well의 효능제가 담긴 96-well Optiplate에 미리 준비한 세포를 50 μ l/well (10,000 cells/well)로 가한 후 결과 신호 값을 측정하였다. 길항제 활성을 확인하기 위하여 준비된 세포를 50 μ l/well의 길항제가 담긴 96-well Optiplate에 Multipipette Plus (Eppendorf, 독일)를 사용해 50 μ l/well로 첨가한 후 15 분간 길항제와 반응시키고 50 μ l/well의 효능제를 주입하여 반응을 확인하였다. 세포의 활성으로 인해 방출되는 빛은 Mithras LB 940를 사용하여 측정되는 수치로 기록되었다. 실시간으로(20초/well) 측정된 relative light units(RLU) 수치들을 AUC(area under the curve)값으로 변환하여 RLU(AUC)로 나타내었다.

2.5 냉동보관 세포 실험

세포주의 냉동보관을 위해서 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 7.0,

10% DMSO, 20% FBS)으로 2×10^6 cells/ml의 농도가 되도록 혼합하여 Cryotube (Nunc, 덴마크)에서 -80°C 까지 서서히 냉동시킨 뒤 -80°C 또는 액체질소에 보관하였다. 냉동 보관한 세포를 실험에 사용할 때는 Cryotube를 꺼낸 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[22].

2.6 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 EC₅₀, IC₅₀, R², HillSlope 변수 값을 얻어 그래프를 평가하였다. 유의 수준을 평가하기 위해 Student t test를 사용하여 그룹 내 데이터를 콘트롤 데이터와 상호 비교하고, 그 외의 통계적 데이터는 Microsoft Excel (Microsoft Corporation, Redmond, 미국)을 사용하여 분석하고 mean \pm SD로 나타내었다.

3. 결과

3.1 Ga 16에 대한 CRF1 효능제 활성비교

에퀴린 모체세포에서 CRF1 유전자와 함께 만능 G 단백질인 $\alpha 16$ cDNA를 도입한 경우와 그렇지 않은 세포에서 칼슘 신호전달에 의한 반응 정도를 효능제를 통해 비교하였다[Fig 1]. HEK293 세포주에 내재되어 있는 수용체인 아세틸콜린 수용체에 대한 신호 값은 두 세포에서 유사한 반응이 관찰되었다. Ga16 cDNA가 삽입되지 않은 세포에서 실험한 결과(a), 효능제인 sauvagine의 최저 농도 신호 값은 4339, 최대 농도 신호 값은 7790으로 Signal to Noise ratio(S/N ratio)가 1.8 정도로 CRF1 수용체에 대한 활성이 거의 확인되지 않았다. 반면에 Ga 16 cDNA를 함께 삽입한 세포의 경우(b), 효능제인 sauvagine에 대한 최저 농도 신호 값은 8593, 최대 농도 신호 값은 41350(S/N ratio 4.8, EC₅₀ = 419 \pm 15 nM)으로 나타났다. 이와 같은 결과는 효능제로 활성화된 CRF1 수용체가 Ga16 단백질과 결합하여 칼슘을 유리시키는 Gq 유형의 신호전달을 일으킨 것을 의미한다. 따

라서 에퀴린 모체 세포주에 Ga16 cDNA와 함께 CRF1 유전자를 삽입하면, Gs 유형의 신호전달을 이용하는 CRF1 수용체의 경우에도 세포 기능의 변화에 따른 칼슘 이온의 변화도를 측정할 수 있게 되어 핵심 최적화 연구를 통하여 CRF1 길항제 스크리닝에 응용하고자 한다.

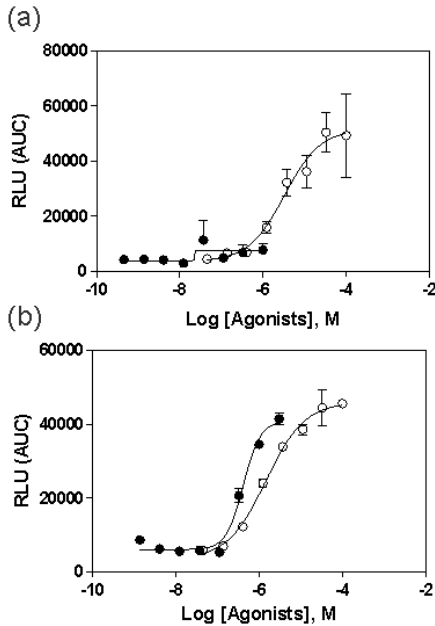


Fig. 1. Stimulation of internal calcium release by CRF1 receptor agonist in HEK293aeq/hCRF1 live cells. Various concentrations of sauvagine(●) and acetylcholine(○) were prepared in assay buffer, and applied to coelenterazine-loaded HEK293aeq/hCRF1 cells without(a), and with(b) Ga16 cDNA expression. Presented data were representative data set from at least two separate experiments performed in triplicate, and each data points were expressed as mean ± SD.

3.2 안정화 세포주에서의 CRF1 활성 확인

스크리닝 실험에 필수적인 안정화 세포주의 구축을 위하여 에퀴린 모체 세포주에 Ga16 cDNA와 CRF1 유전자를 삽입하여 배양된 다수의 클론들에 대한 효능제 반응을 실험하여 최적의 반응을 보이는 클론을 선별하였다.

선별된 HEK293aeq16/hCRF1의 효능제와 길항제에 대한 활성을 확인하기 위해 농도별 신호를 그래프로 나타내었다[Fig 2]. sauvagine의 최저 농도와 최고 농도의 신호 값(a)은 각각 5701, 335051로 나타났다 (S/N ratio 58.8, EC₅₀ = 15.21±1.83 nM).

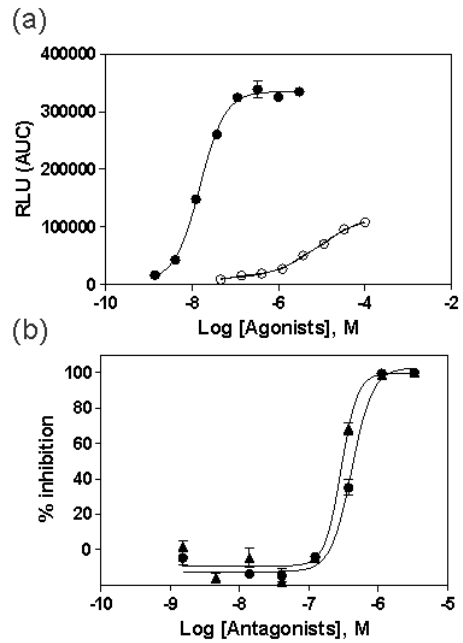


Fig. 2. Dose-response curves of CRF1 receptor agonist and antagonists in HEK293aeq16/hCRF1 live cells. (a) Dose-response curves of sauvagine(●) and acetylcholine(○). (b) Inhibitory-response curves of antalarmin(●) and CP154526(▲) as standard antagonists. Presented data were representative data set from at least two separate experiments performed in triplicate, and each data points were expressed as mean ± SD.

이러한 결과는 Fig 1에 나타난 임시발현 세포의 실험 결과와 비교하여 안정화 세포주에서 S/N ratio가 12 배 이상 높게 개선된 것을 의미한다. 또한 표준 길항제인 antalarmin과 CP154526에 대한 반응(b)을 실험한 결과 IC₅₀ 값이 각각 414.1±5.5과 290.7±1.9 nM로 확인되었다. 효능제 실험결과와 마찬가지로 안정화 세포주에서 임시발현 세포에서의 결과와 비교하여 positive control 값이 약 1.8 배 이상 높은 값으로 측정되어 안정화 세포주에서 길항제 스크리닝 실험을 위하여 최적화된 결과를 나타내었다.

유기 물질들의 용해에 광범위하게 사용되는 dimethyl sulfoxide(DMSO)의 허용 조건에 대한 실험을 진행한 결과[Fig 3], 5% DMSO 실험조건까지 DMSO를 추가하지 않은 대조 샘플과 비교하여 통계적으로 유의성이 없는 결과가 나타났다.

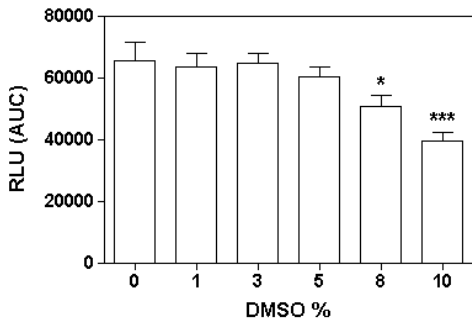


Fig. 3. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) % on the CRF1 inhibition assays. * $P < 0.05$ and *** $P < 0.005$, significantly different from positive control group without DMSO. (n=3-5)

하지만 10% DMSO 조건에서는 대조샘플 대비 40%의 신호감소 효과가 나타났고, 8% DMSO 조건에서도 22%의 신호저하 효과가 관찰되었다. 이러한 결과는 현재까지의 다양한 세포기반 실험들이 1% 미만의 DMSO를 허용하는 것과 비교하여 DMSO의 허용도가 매우 높게 나타난 것으로, 실험대상 시료의 최초 실험농도를 최대한으로 유지할 수 있다는 것을 의미한다. 즉 현재의 실험조건에서 100% DMSO를 함유하는 시료들을 최초 스크리닝 실험에서 1/200로 희석 실험 가능하여 스크리닝 실험의 신뢰도를 높일 수 있을 것이라고 판단된다.

3.4 냉동보관 안정화 세포주의 활성 확인

신물질발굴을 위한 스크리닝 시스템에 제작한 안정화 세포주의 효율적인 활용을 위해 HEK293acqa16/hCRF1 세포를 액체질소 또는 -80°C 에 냉동보관 후 세포를 사용하였을 때 효능제와 길항제의 신호 값을 비교하였다 [Fig 4]. 효능제인 sauvagine에 대한 반응(a)으로 EC_{50} 값은 23.80 ± 1.92 nM로 확인되었다. 또한 길항제인 antalarmin의 반응(b)에서는 IC_{50} 값이 118.2 ± 9.4 nM로 나타났다. 이러한 결과는 배양세포 상태에서 실험한 경우와 비교하여 세포 반응 값이 거의 동일한 수준으로 측정되었다는 것을 의미하며, 효능제와 길항제 실험에서 얻은 EC_{50} 값과 IC_{50} 값 또한 통계적으로 유의성이 있는 현저한 차이가 발견되지 않았다.

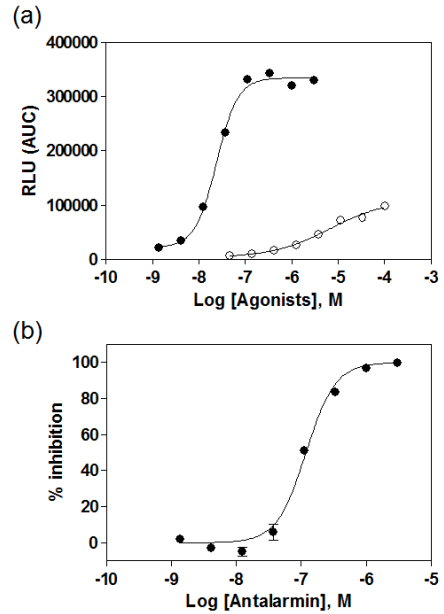


Fig. 4. Dose-response curves of CRF1 receptor agonist and antagonist of CRF1-transfected in frozen cells stored at -80°C . (a) Agonist dose-response curves of sauvagine (●) and acetylcholine (○). (b) Dose-response curve of antalarmin as a standard antagonist. Presented data were representative data set from at least two separate experiments performed in triplicate, and each data points were expressed as mean \pm SD.

4. 고찰

스트레스에 의해 다양한 생리조절 물질들의 발현 패턴이 변화되고 이에 따라 생리 활성의 변화가 나타난다 [1]. 본 연구에서는 스트레스에 의해 유도되는 신경 펩타이드 물질들 중 하나인 corticotropin releasing factor (CRF)에 대한 수용체 길항제 개발과 이의 산업적인 활용을 위하여 세포 내 칼슘 신호전달 과정을 통한 스크리닝 시스템을 개발하고 이를 최적화 하여 CRF1 수용체 조절물질의 개발에 활용하고자 하였다.

이러한 스크리닝 과정은 세포 반응의 일관성이 데이터의 질 향상에 큰 영향을 미치기 때문에 안정적인 데이터를 얻기 위해 안정화 세포주를 구축하여 최적화 단계를 거치는 것이 필수적이다. 임시 발현세포를 사용한 사전 실험에서 CRF1 수용체만 도입한 경우 S/N ratio가 1.8 정도로 신호수준이 안정적이지 못하여 스크리닝 실

험에 적용하기가 어렵다고 판단되었다. 이를 극복하기 위하여 에퀴린 모체 세포주에 CRF1과 Ga16[21] 유전자를 함께 전달하고 생성된 클론들로부터 S/N ratio가 58 이상인 안정화 세포주(HEK293aeqa16/hCRF1)를 확보하게 되었다.

이와 같은 결과는 CRF1 수용체가 효능제에 의하여 만능 G 단백질인 Ga16과 결합하여 칼슘신호전달 기전을 활성화시킨 것으로, Gs[7] 유형의 신호전달이 주류인 CRF1 수용체의 경우에도 Ga16을 도입하여 스크리닝에 응용할 수 있다는 것을 보여주는 것이다. 특히 Ga16을 도입하지 않은 형광실험[23]의 경우 안정적인 신호의 확보를 위하여 100,000 cells/well 조건으로 실험을 했지만 본 연구에서 확보한 안정화 세포주의 경우 5,000 cells/well 최소 조건으로도 충분한 신호 수준을 확보할 수 있었다. 또한 에퀴린 기반 세포실험은 발광신호가 형광과 달리 시료물질들의 자체 형광 또는 간섭현상을 최소화할 수 있는 장점이 있어 최근에 논의되고 있는 천연물 유래 CRF1 길항제의 개발[24]에 적극적으로 활용될 수 있을 것이라고 판단된다.

안정화 세포주를 이용하여 길항제 스크리닝 실험의 안정성을 확인한 결과 임시 발현세포의 초기 실험결과와 비교하여 실험간 변동성도 최소화된 것으로 나타났다. 이에 대한 정량적인 근거로 13개 미소관으로 진행한 Z' 지수[25] 실험 결과 데이터 범위가 0.5062±0.0464로 공식적인 스크리닝 실험이 가능한 안정적인 수치를 나타내었다. 또한 범용 용매인 DMSO에 대한 실험 허용도가 최대 5%로 시료의 최초 스크리닝 농도를 희석율 0.005까지 높게 설정할 수 있었다. 일반적인 세포기능 실험들의 DMSO에 대한 실험 허용도가 0.1-0.5%인 것을 고려하면 확립된 에퀴린 기반 세포기능 연구 시스템은 냉동보관세포의 활용 가능성과 함께 다양한 물질을 기반으로 하는 스크리닝 연구분야에 적합도가 매우 높다고 판단된다.

현재까지 도출된 실험조건과 그 결과들을 종합하면 에퀴린 기반 세포 기능실험의 최적화 연구를 통해 구축된 CRF 수용체 안정화 세포주는 모발의 재형성과 관련된 신규의 기능성 화장품 및 조절물질 개발 연구에 적극적으로 활용가능 할 것으로 판단된다.

References

- [1] Lucas, M., Chen, A., Richter-Levin, G. "Hypothalamic corticotropin-releasing factor is centrally involved in learning under moderate stress.", *Neuropsychopharmacology*, 38(9), 1825-1832, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/npp.2013.82>
- [2] Arborelius, L., Owens, M.J., Plotsky, P.M., Nemeroff, C. B. "The role of corticotropin-releasing factor in depression and anxiety disorders.", *J Endocrinol*, 160(1), 1-12, 1999.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1677/joe.0.1600001>
- [3] Dong, H., Murphy, K.M., Meng, L., Montalvo-Ortiz, J., Zeng, Z., Kolber, B.J., Zhang, S., Muglia, L.J., Csernansky, J.G. "Corticotrophin releasing factor accelerates neuropathology and cognitive decline in a mouse model of Alzheimer's disease.", *J Alzheimers Dis*, 28(3), 579-592, 2012.
- [4] Hillhouse, E.W., Randeve, H., Ladds, G., Grammatopoulos, D. "Corticotropin-releasing hormone receptors.", *Biochem Soc Trans*, 30(4), 428-432, 2002.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1042/bst0300428>
- [5] Muramatsu, Y., Suqino, N., Suzuki, T., Totsune, K., Takahashi, K., Tashiro, A., Hongo, M., Oki, Y., Sasano, H. "Urocortin and corticotropin-releasing factor receptor expression in normal cycling human ovaries.", *J Clin Endocrinol Metab*, 86(3), 1362-1369, 2001.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.86.3.7299>
- [6] Hemley, C.F., McCluskey, A., Keller, P.A. "Corticotropin releasing hormone-a GPCR drug target.", *Curr Drug Targets*, 8(1), 105-115, 2007.
DOI: <http://dx.doi.org/10.2174/138945007779315542>
- [7] Dautzenberg, F.M., Kilpatrick, G.J., Hauger, R. L., Moreau, J. "Molecular biology of the CRH receptors in the mood.", *Peptides*, 22(5), 753-760, 2001.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0196-9781\(01\)00388-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0196-9781(01)00388-6)
- [8] Karteris, E., Grammatopoulos, D., Randeve, H., Hillhouse, E.W. "Signal transduction characteristics of the corticotropin-releasing hormone receptors in the fetoplacental unit." *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 1989 - 1996, 2000.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/jcem.85.5.6590>
- [9] Grammatopoulos, D.K., Randeve, H.S., Levine, M. A., Katsanou, E.S., Hillhouse, E.W. "Urocortin, but not corticotropin-releasing hormone (CRH), activates the mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway in human pregnant myometrium: an effect mediated via R1a and R2b CRH receptor subtypes and stimulation of Gq-proteins.", *Mol Endocrinol*, 14, 2076 - 2091, 2000.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1210/mend.14.12.0574>
- [10] Kasahara, M., Groenink, L., Olivier, B., Samyay, Z. "Corticotropin-releasing factor (CRF) over-expression down-regulates hippocampal dopamine receptor protein expression and CREB activation in mice.", *Neuro Endocrinol Lett*, 32(2), 193-198, 2011.
- [11] Budziszewska, B., Zając, A., Basta-Kaim, A., Leśkiewicz, M., Steczkowska, M., Lason, W., Kaciński, M. "Effects of neurosteroids on the human corticotropin-releasing hormone gene.", *Pharmacol Rep*,

- 62(6), 1030-1040, 2010.
DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140\(10\)70365-0](http://dx.doi.org/10.1016/S1734-1140(10)70365-0)
- [12] Wang, L., Million, M., Rivier, J., Rivier, C., Craft, N., Stenzel-Poore, M.P., Taché, Y. "CRF receptor antagonist astressin-B reverses and prevents alopecia in CRF over-expressing mice.", *PLoS One*, 6(2), e16377, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016377>
- [13] Fang, Y. "Ligand-receptor interaction platforms and their applications for drug discovery", *Expert Opin Drug Discov*, 7, 969-988, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2012.715631>
- [14] Lee, S., "Platform technologies for research on the G protein coupled receptor: Applications to drug discovery research", *Biomol Therapeutics*, 19, 1-8, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2011.19.1.001>
- [15] Peters, M.F., Vaillancourt, F., Heroux, M., Valiquette, M. and Scott, C.W. "Comparing label-free biosensors for pharmacological screening with cell-based functional assays", *Assay & Drug Develop Tech*, 8, 219-227, 2010. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/adt.2009.0232>
- [16] Button, D., Brownstein, M. "Aequorin- expressing mammalian cell line used to report Ca²⁺ mobilization.", *Cell Calcium*, 14(9):663-671, 1993. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160\(93\)90091-J](http://dx.doi.org/10.1016/0143-4160(93)90091-J)
- [17] Eglén, R.M. and Reisine, T. "Photoproteins: Important new tools in drug discovery", *Assay & Drug Develop Tech*, 6, 659-671, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/adt.2008.160>
- [18] Inoué, S., Noguchi, M., Sakaki, Y., Takagi, Y., Miyata, T., Iwanaga, S. and Tsuji, F.I. "Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin", *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 3154-3158, 1985. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.82.10.3154>
- [19] Prasher, D., McCann, R.O. and Cormier, M.J. "Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein", *Biochem Biophys Res Commun*, 126, 1259-1268, 1985. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X\(85\)90321-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-291X(85)90321-3)
- [20] Dupriez, V.J., Maes, K., Le Poul, E., Burgeon, E. and Dethoux, M. "Aequorin-based functional assays for G-protein-coupled receptors, ion channels, and tyrosine kinase receptors", *Receptors Channels*, 8, 319-330, 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/10606820214646>
- [21] Ueda, T., Ugawa, S., Ishida, Y., Hondoh, A. and Shimada, S. "Development of generic calcium imaging assay for monitoring G-protein-coupled receptors and G-protein interaction", *J Biomol Screen*, 14, 781-788, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/1087057109335258>
- [22] Noh, H., Lee, S. "Optimization of the cryopreserved condition for utilization of GPCR frozen cells", *J Korea Acad Cooper Soc*, 16(2), 1200-1206, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5762/kais.2015.16.2.1200>
- [23] Dautzenberg, F.M., Gutknecht, E., Van der Linden, I., Olivares-Reyes, J.A., Durrenberger, F. and Hauger, R.L. "Cell-type specific calcium signaling by corticotropin-releasing factor type 1 (crf1) and 2a (crf2(a)) receptors: Phospholipase C-mediated responses in human embryonic kidney 293 but not sk-n-mc neuroblastoma cells", *Biochem Pharmacol*, 68, 1833-1844, 2004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2004.07.013>
- [24] Huang, H.J. and Chen, C.Y. "A possible solution for hair loss by inhibiting corticotropin-releasing factor (crf) receptor from traditional chinese medicine", *J Biomol Str & Dynamics*, 32, 1613-1623, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/07391102.2013.831377>
- [25] Zhang, J.H., Chung, T.D., Oldenburg, K.R. "A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays", *J Biomol Screen*, 4, 67-73, 1999. DOI: <http://dx.doi.org/10.1177/108705719900400206>

노 효 진(Hyojin Noh)

[준회원]



- 2009년 2월 : 상명대학교 의생명 공학과 (공학사)
- 2011년 2월 : 상명대학교 의생명 공학과 분자생리학전공 (공학석사)
- 2011년 3월 ~ 2015년 8월 : 상명대학교 바이오환경기반공학과 (박사)

<관심분야>

GPCR, Cell biology

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 : 한국화학연구원 선임연구원
- 2004년 9월 ~ 현재 : 상명대학교 천안캠퍼스 의생명공학과 교수

<관심분야>

고효율 약효검색, 약물수용체 분자생리학