creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사학위논문

인간 OCT2를 발현시킨 Mice를 생성하는데 필요한 Knock-in 벡터 디자인에 관한 연구

Knock-in Vector Design
for the Humanization of OCT2 in mice

2014년 2월

서울대학교 대학원
약학과 약제과학 전공
형 성 우

국문초록

미국 FDA는 여러 약물 수송체 중 주요 7가지 수송체를 선정하고 신약 개발에서 후보물질의 수송체 수준의 약물상호작용 발생 가능성을 검토하도록 권장하였다. 그러나 인간의 수송체는 기질 특이성, affinity등의 면에서 실험동물의 수송체와 다르기 때문에 in vivo 약물상호작용을 실험동물 수준에서 연구하기는 한계가 있으며 사람에서 약물상호작용가능성을 검토할 경우 엄청난 비용과 시간이 소요된다는 어려움이 있다. 따라서 실험동물의 약물 수송체를 Knock-out한 다음 그 위치에 인간의 약물 수송체를 치환하여 'humanize'한 실험동물 모델은 실용적 의의가 크다 할 것이다. 따라서 본 연구에서는 mouse를 수송체 humanization의 대상으로 상정하고 중요 약물 수송체 중 하나인 oct2를 humanization하기 위한 Knock-in 하는 vector를 설계하고 그 효용성을 평가하고자 하였다. 우선 human kidney total RNA로부터 hOCT2를 cloning하였으며 이를 MDCK cell에 발현시켰다. 여기서 만들어진 세포에서의 수송연구 결과 인간의 OCT2 수송체가 잘 기능함을 알았다. 이와는 별도로 mouse Oct2 exon1 중 일부분을 cloning하여 homology arm을 제작하였으며, positive 및 negative selection marker를 cloning하여 Knock-in vector를 필요로 하는 모든 구성요소를 가지는 vector를 제작하였다. 최종적으로 sequencing을 통해서 vector가 온전히 만들어졌음을 확인하였다. Mouse 유래의 CMT-93 cell genome 중 해당위치에 double strand break를 유발한 다음, 제작한 vector를 transfection 시켰다. RT-PCR을 통해 vector가 설계한 대로 homologous recombination에 의해 hOCT2가 발현됨을 확인하였다. 본 연구를 통해 cell이 기원하는 종이 자체적으로 가지고 있는 약물 수송체를 Knock-out시키고 인간의 약물 수송체를 발현시킬 수 있는 vector를 만들 수 있었다. 이를 통해 궁극적으로 약물 수송체가 인간의 것으로 치환된 In vivo model을 만들어 약물동력학 연

구에 기여할 수 있을 것이다.

주요어 : OCT2, Transgenic model, CMT-93, Homologous recombination

학번 : 2012-21633

목차

국문초록.....i
목 차.....iii
표 목차.....iv
그림 목차.....v
1. Introduction.....1
1.1. Drug Transporter.....1
1.1.1. OCT2 (SLC22A2).....1
1.2. Transgenic model.....1
2. Materials.....3
3. Methods.....4
3.1. Establishment of stable hOCT2 cell line.....4
3.1.1. Cloning.....4
3.1.2. Ligation & Transformation.....5
3.1.3. Mutagenesis.....6
3.1.4. Subcloning.....6
3.1.5. Transfection & Selection.....7
3.1.6. RT-PCR.....8
3.1.7. Function study.....8
3.2. Establishment of Knock-in vector.....9
3.2.1. Knock-in vector 디자인.....9
3.2.2. Knock-in vector 제작.....10
3.2.3. Knock-in 확인.....11
4. Results.....13
5. Discussion & Conclusion.....20
6. Reference.....24
Abstract

표 목차

표 1 RT-PCR 조건.....4
표 2 PCR 조건.....5
표 3 Ligation 조건.....5
표 4 Enzyme digestion 조건.....7
표 5 Transfection 조건.....7
표 6 DMEM 배지 조성.....8
표 7 Knock-in vector 제한효소 배열순서.....10
표 8 Knock-in vector 제작용 primer.....11
표 9 Knock-in vector ligation 순서도.....11
표 10 mOct2 TALEN DNA 인식 부분.....12
표 11 Knock-in vector transfection.....12
표 12 MDCK-OCT2 의 function study 결과.....14

그림 목차

그림 1 Drug transporter에 의한 약물 상호작용의 예.....2
그림 2 hOCT2 PCR 결과.....13
그림 3 OCT2 mutation sequencing 결과.....13
그림 4 OCT2 stable cell line RT-PCR 결과.....13
그림 5 MDCK-OCT2 function study 결과.....14
그림 6 pCR2.1 vector MCS 부분.....15
그림 7 T-MCS vector MCS 부분.....15
그림 8 Knock-in vector gel 결과 & Map.....16
그림 9,10 Wild type/Transfected cDNA hOCT2, mOct2 PCR 결과.....17
그림 11 Transfected cell cDNA의 LA~hOCT2, TK~RA PCR 결과..18
그림 12 Transfected/WT cell cDNA에서 LA(-44)~hOCT2 PCR.....19
그림 13 Transfected cell cDNA에서 LA(-44)~hOCT2 PCR (64℃).....19

1. Introduction

1.1 Drug Transporter

Drug Transporter는 약물이 세포막 반대편으로 이동하는 것을 도와주는 막 단백질의 일종이다. 다양한 종류가 존재하며 각 transporter마다 특정한 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설에 깊이 관여한다. 작동원리에 따라서 influx transporter로 알려진 SLC transporter, efflux transporter로 알려진 ABC transporter로 나눌 수 있다. 어떤 약물이 특정 transporter의 기질, 억제제, 유도제로 작용하여 다양한 약물 상호작용을 일으킨다고 알려져 있다(그림 1)(Zhang, Huang et al. 2011). FDA는 약물 상호작용에 중요한 역할을 한다고 생각되는 transporter 7가지를 선정한 적이 있다(Huang, Temple et al. 2007).

1.1.1 OCT2 (SLC22A2)

OCT2는 SLC22 family에 속하는 transporter이다. 신장, 소장 벽에 주로 분포하며 Basolateral membrane에서 약물이 세포내로 유입되는 과정에 관여한다(Pietig, Mehrens et al. 2001). 따라서 약물이 신장에서 배설되는데 중요한 역할을 한다. OCT2는 Metformin, 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP+) 등 다양한 유기 양이온성 물질을 기질로 갖는다. 앞서 언급한 FDA 선정 7가지 transporter 중 하나이다.

1.2 Transgenic Model

In vivo model의 하나로 실험동물의 유전자를 조작하여 형질발현을

조절하는 model을 말한다. 크게 특정 유전자 발현을 억제하는 Knock-out model과 wild type이 갖지 않는 새로운 유전형질을 발현시키는 Knock-in model로 나눌 수 있다. Drug transporter 분야에서 다양한 transgenic model이 만들어져서 In vivo 실험에 사용되고 있다. 예를 들어 transporter knockout model를 이용해 특정 transporter가 약물 동태에 미치는 영향을 연구하거나(Vlaming, Lagas et al. 2009),(Higgins, Bao et al. 2014),(Jonker, Wagenaar et al. 2003),(Jonker, Wagenaar et al. 2001), 인간의 transporter를 mice에 발현시켜 그 기능을 in vivo에서 보는 등의 연구가 알려져 있다(van de Steeg, van der Kruijssen et al. 2009),(van de Steeg, van Esch et al. 2013),(Higgins, Bao et al. 2014).

그림 1 Drug transporter에 의한 약물 상호작용의 예

Gene	Aliases	Tissue	Function	Interacting drug	Substrate (affected drug)	Changes in substrate plasma AUC (AUC ratios)
ABC transporters of clinical importance in the absorption, disposition, and excretion of drugs						
ABCB1	P-gp, MDR1	Intestinal enterocyte, kidney proximal tubule, hepatocyte (canalicular), brain endothelia	Efflux	Dronedarone	Digoxin	2.6-fold
				Quinidine	Digoxin	1.7-fold
				Ranolazine	Digoxin	1.6-fold
				Tipranavir/ritonavir	Loperamide	0.5-fold
				Tipranavir/Ritonavir	Saquinavir/ ritonavir	0.2-fold
ABCG2	BCRP	Intestinal enterocyte, hepatocyte (canalicular), kidney proximal tubule, brain endothelia, placenta, stem cells, mammary gland (lactating)	Efflux	GF120918	Topotecan	2.4-fold
SLC transporters of clinical importance in the disposition and excretion of drugs						
SLCO1B1	OATP1B1, OATP-C, OATP2, LST-1	Hepatocyte (sinusoidal)	Uptake	Lopinavir/ritonavir	Bosentan	5-48 fold[a]
				Cyclosporine	Pravastatin	9.9-fold
				Rifampin (single dose)	Glyburide	2.3-fold
				Cyclosporine	Rosuvastatin	7.1-fold[b]
				Cyclosporine	Pitavastatin	4.6-fold
SLCO1B3	OATP1B3, OATP-8			Lopinavir/ritonavir	Rosuvastatin	2.1-fold
SLC22A2	OCT2	Kidney proximal tubule	Uptake	Cimetidine	Dofetilide	1.5-fold
				Cimetidine	Pindolol	1.5-fold
				Cimetidine	Metformin	1.4-fold
SLC22A6	OAT1	Kidney proximal tubule, placenta	Uptake	Probenecid	Cephradine	3.6-fold
				Probenecid	Cidofovir	1.5-fold
				Probenecid	Acyclovir	1.4-fold
SLC22A8	OAT3	Kidney proximal tubule, choroid plexus, brain endothelia	Uptake	Probenecid	Furosemide	2.9-fold

2. Materials

Human Kidney total RNA, PrimeScript RT-PCR Kit (Takara)
Ex Taq polymerase, Restriction enzymes (Takara, New England Biolabs)
QuikChange Ⅱ XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)
E.coli HST08 Premium Competent Cells (Takara)
WelPrep Gel Extraction Kit, WelPrep Plasmid Miniprep Kit (Welgene)
pCR®2.1 Vector, pcDNA™3.1 Vector (Invitrogen)
Sterile Tip, EP tube, 25/75T flask (BD)
MDCK
Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% Fetal Bovine Serum, penicillin/streptomycin, HEPES (Hyclone, Thermo scientific), non-essential amino acid (Sigma), gentamycin (Welgene, Korea), hygromycin (Invitrogen)
FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega)
RNeasy Mini Kit (Qiagen)
1-methyl-4-phenylpyridinium (Sigma)
[^{3}H] 1-methyl-4-phenylpyridinium (Perkin Elmer)
poly-l-ornithine (Sigma)
Ultima Gold LSC-cocktail (Packard bioscience)
bMQ417-m15 plasmid (Source BioScience)
GLS-1 PuroTK Donor Plasmid, TALEN Left, Right (Toolgen)
CMT-93 cell (한국세포주은행)

3. Methods

3.1 Establishment of stable hOCT2 cell line

3.1.1 Cloning

Human Kidney total RNA를 template로 사용, PrimeScript RT-PCR Kit (Takara)를 이용하여 역전사 반응(RT)을 수행하였다. 반응 조건은 다음과 같다.

표 1 RT-PCR 조건

Materials	Volume(㎕)
RNase Free water	6
dT Primer	1
dNTP	1
Human Kidney total RNA	2
65℃ 5 min / ice incubation 1 min	
5× buffer	4
Inhibitor	0.5
RTase	1
FDDW	4.5
42℃ 60 min / 95℃ 5 min / 4℃ incubation	

RT로 얻은 Human Kidney cDNA를 template로 PCR을 수행하였다. Ex Taq polymerase를 사용하였고 반응 조건과 primer 서열은 다음과 같다.

hOCT2 Forward Primer

5′-TCA GCT GGA CCA AGG AAA GGC CC-3′

hOCT2 Reverse Primer

5′-TTG CCT AGC CCA CAG TTC CCC-3′

표 2 PCR 조건

Materials	Volume(㎕)	
10× buffer	2	
dNTP	1.6	
Human Kidney cDNA	1	
Primer(F/R)	0.5/0.5	
Taq Polymerase	0.25	
FDDW	14.15	
총합 20㎕		
Temperature(℃)	Time	Cycles
94	5 min	
94	30 sec	30회
50~65	30 sec	
72	2 min	
72	10 min	
4	∞	

3.1.2 Ligation & Transformation

OCT2 gene (2176bp)을 agarose 젤에 전기영동하여 밴드를 확인하였다. 밴드 부분을 절단하여 WelPrep Gel Extraction Kit (Welgene)을 이용하여 hOCT2 gene에 해당하는 DNA를 추출하였다. pCR®2.1 Vector (Invitrogen) 에 hOCT2 DNA를 ligation 시켰다. 반응 조건은 다음과 같다.

표 3 Ligation 조건

Materials	Amount
DNA ligation mix	5 ㎕
DNA	250 fmol 당량
Vector	25 fmol 당량
16℃ 1hr	

Ligation mixture 10 ㎕를 E.coli HST08 Premium Competent Cells

(Takara) 30 ㎕와 섞은 후 10 min간 ice incubation했다. 42℃로 미리 데워둔 incubator에서 45초 간 heat shock을 가한 후 2분 간 ice incubation했다. 항생제가 없는 LB 배지 400 ㎕를 가하고 shaking incubator에서 1시간 동안 키웠다. Ampicillin 100 ㎍/mL로 만들어진 고체 LB배지를 미리 37℃로 데워놓았다. incubation한 mixture를 12000rpm, 5분간 centrifuge 시키고 상층액을 100 ㎕ 이하로 남기고 버렸다. Vortexing 한 후 고체 배지에 spreading 했다. 37℃ CO2 incubator에서 overnight 배양했다. 다음날 액체 LB배지 5 ㎖를 ampicillin 50 ㎍/mL로 만들고 여기에 불로 소독한 white tip으로 colony를 따서 넣었다. 이 culture를 overnight으로 키운다. 다음 날 WelPrep Plamsid Miniprep Kit (Welgene) 로 hOCT2 gene이 삽입된 Vector를 얻었다. 바이오닉스사에 Sequencing을 의뢰하여 hOCT2 gene의 존재 유무를 확인하였다.

3.1.3 Mutagenesis

Sequencing을 통해서 mutation이 발생한 것을 알 수 있었다. 분석 결과 아미노산에 영향을 주는 mutation가 3개(G823C, T982G, A1243G), 영향을 주지 않는 mutation이 2개(G1680A, T1872C) 존재하였다. 이 중 전자를 우선적으로 고치기 위해 primer를 주문했고 QuikChange Ⅱ XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)을 이용하였다. Sequencing을 통해 mutation이 고쳐졌음을 확인하였다. 아미노산 서열에 영향을 주지 않는 mutation 2개는 그대로 두고 Knock-in vector 제작할 시에 고쳤다.

3.1.4 Subcloning

Vector안에 든 hOCT2 DNA를 pcDNA™3.1 Vector (Invitrogen) 로

옮기기 위하여 subcloning을 진행하였다. KpnI과 XhoI을 이용하여 hOCT2 DNA와 pcDNA™3.1 Vector를 각각 절단한 다음 Gel 전기영동을 시켜 band를 분리하였다. Gel extraction으로 각 밴드에 해당하는 DNA를 얻은 후 ligation을 통해 새로운 vector를 얻었다. 반응 조건은 다음과 같다.

표 4 Enzyme digestion 조건

Materials	Amount
DNA	1 ㎍
KpnI	1 ㎕
XhoI	1 ㎕
10 × M buffer	2 ㎕
FDDW	20 ㎕ - 나머지의 합
37℃ 1hr	

3.1.5 Transfection & selection

실험에 사용할 MDCK cell을 다음과 같은 조성의 배지로 키웠다. 24 well plate에 MDCK cell을 seeding한 후 70~90%가 되도록 키웠다. 그 후 FuGENE® HD Transfection Reagent (Promega)를 사용하여 hOCT2가 든 vector를 transfection 시켰다. 반응 조건은 다음과 같다.

표 5 Transfection 조건

Materials	Amount
DMEM	총합이 50 ㎕가 되도록 맞춘다
hOCT2 vector	1 ㎍
FuGENE reagent	3 ㎕
15min incubation	

각 well에 Transfection mixture를 50 ㎕씩 넣고 살며시 흔들어줬다. 24~48 시간 배양한 다음 TE 처리하여 25T flask로 옮겼다. 24시간

후 hygromycin을 10 ㎍/mL가 되도록 배지에 넣어 selection해 주었다. 약 2주 후에 stable cell line을 얻을 수 있었다.

표 6 DMEM 배지 조성

Materials	Volume(㎖)
Dulbecco's Modified Eagle Medium	500
10% Fetal Bovine Serum,	50
penicillin/streptomycin	5
HEPES	5
non-essential amino acid	5
gentamycin	2

3.1.6 RT-PCR

완성된 Cell line에 hOCT2가 안정적으로 발현되었는지를 mRNA 수준에서 확인해보았다. 1×10^6 cells를 얻어서 RNeasy Mini Kit로 RNA를 추출하였다. 이 RNA를 template로 3.1.1에 언급한 것과 같은 방법으로 RT-PCR을 수행하였다. Positive control로 canine GAPDH를 함께 RT-PCR 하였다.

3.1.7 Function study

클린벤치에 24-well plate를 준비한 다음, 각 well 당 20 ㎕의 poly-l-ornithine (Sigma)을 넣고 멸균된 yellow tip으로 각 well의 바닥에 골고루 분포시켰다. 그 다음 well plate의 뚜껑을 열고 flow와 UV를 켠 채 약 1 시간 이상 건조시켰다. 그리고 대조군 cell(wild type MDCK)와 실험군 cell(MDCK-OCT2 stable cell line)을 각각 seeding하고 약 48시간 배양하였다. 이후 well 에 담겨있는 배지를 제거하고, 37℃로 데워둔 PBS를 500 ㎕씩 넣은 다음 제거하기를 2번 반복하였다. 37℃로 데워둔 transport media(TM)을 well당 500 ㎕씩

넣은 후 37℃에서 약 30 분간 incubation하였다. 그 후 TM을 제거하고 37℃로 데워둔 약물 용액을 well 당 200 ㎕씩 넣고 37℃에서 10분 incubation하였다.

OCT2의 대표적인 기질인 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP+)는 Km value를 고려하여 최종 농도가 1 μM이 되도록 정하였다.

10분 후 약물 용액을 완전히 제거하고, 4℃ 정도의 차가운 PBS를 500 ㎕씩 사용하여 3 회 세척하였다. PBS를 완전히 제거한 후 0.2 N NaOH를 well 당 500 ㎕씩 넣고 overnight 동안 상온에 방치하여 cell lysis를 유도하였다. 얻은 lysate와 liquid scintillation fluid를 vial에 각각 가하여 섞은 후 LSC (Liquid Scintillation Counter, Perkinelmer)를 이용하여 시료의 DPM 값을 측정하였다. Well 당 존재하는 cell 수의 차이를 Bradford assay에서 구한 단백질 양을 근거로 보정해주었다. 위 과정은 동 실험실 정소정, 노치경씨의 도움을 받아 진행하였다.

3.2 Establishment of Knock-in vector

3.2.1 Knock-in vector 디자인

Function study를 통해 활성을 갖는 것이 알려진 hOCT2 gene을 가지고 Knock-in vector를 디자인했다. Homolgous recombination에 필요한 Left arm(LA), Right arm(RA)을 양 끝에 놓고 hOCT2와 유전자 발현을 억제해줄 BGH(Bovine Growth Hormone)_polyA, positive selection marker인 Puromycin 내성 유전자, negative selection marker인 TK(Thymidine kinase) 유전자순으로 설계하였다. 각 gene 자체에 들어있는 제한효소 site를 피해서, gene들을 연결시켜줄 제한효소 순서를 정하였다. 벡터의 기본 골격을 만들기 위해 pCR®2.1 Vector의 MCS(Multiple Cloning Site) 부분을 새로 합성하여 3.1.4에

언급한 방법으로 T-MCS vector를 만들었다. 디자인한 Knock-in vector의 구성순서는 다음과 같다.

표 7 Knock-in vector 제한효소 배열 순서

효소		효소		효소		효소		효소		효소
Not I	LA	Kpn I	hOCT2	Xba I	BGH -pA	Xho I	Puro/ TK	BamH I	RA	Nsi I

3.2.2 Knock-in vector 제작

mOct2 exon1의 -908 ~ +91를 LA, +104 ~ +1103을 RA으로 두고 bMQ417-m15 plasmid를 template로 PCR을 통해 각각의 gene을 얻었다. LA의 Primer에는 순서대로 Not I , Kpn I 절단 서열을, RA의 Primer에는 순서대로 BamH I , Nsi I 절단 서열을 넣었다. 기존에 cloning해놓은 hOCT2는 상용 vector의 MCS부분과 5′UTR을 제거하도록 다시 PCR하였다. 이 때 3.1.3에서 고치지 않은 mutation 2개를 함께 고쳤다. Primer에 순서대로 Kpn I , Xba I 절단 서열을 넣었다. pcDNA™3.1 Vector를 template로 하여 BGH_pA를 PCR로 얻었다. Primer에 순서대로 Xba I , Xho I 절단 서열을 넣었다. GLS-1 PuroTK Donor Plasmid를 Xho I , BamH I 으로 절단하여 Selection marker인 Puro/Tk gene을 얻었다. PCR 과정은 3.1.1에 언급한 방법을 사용하였으며 Primer 구성은 표8 와 같다.

각 gene을 차례대로 T-MCS vector에 3.1.4에 언급한 방법으로 subcloning 시켰다. 이 때 각 gene에 절단할 수 있는 제한효소를 일부 사용하였기에 subcloning할 때 일정한 순서를 정하여 원치 않는 절단을 방지했다. LA, hOCT2, BGH_pA를 한 세트로, RA, Puro/TK를 한 세트로 먼저 ligation 시킨 후 마지막에 최종 vector를 만들었다. Sequencing을 외뢰하여 mutation 여부를 확인하였다. 3.1.3에 언

급한 방법으로 mutation을 제거한 후 Knock-in vector가 완성되었음을 확인하였다.

표 8 Knock-in vector 제작용 primer

Gene	효소	Primer(5′->3′)
LA	Not I	GCGGCCGCAGAGGAAGAGAGGGGGAGCACACAGA
	Kpn I	GGTACCGGTTCCTGGAGGCAGCTGAT
hOCT2	Kpn I	GGTACCATGCCCACCACCGTGGACGA
	Xba I	TCTAGATTTGCCTAGCCCACAGTTCC
BGH_pA	Xba I	TCTAGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG
	Xho I	CTCGAGCCATAGAGCCCACCGCATCC
RA	BamH I	GGATCCGATGATATTCTAGAACATAT
	Nsi I	ATGCATTGGGGGCTCTTGAGGTCCGT

표 9 Knock-in vector ligation 순서도

T-MCS	LA	hOCT2	BGH_pA	최종
	RA	Puro/TK		

3.2.3 Knock-in 확인

Mouse에서 유래한 세포인 CMT-93을 분양받아 표 6와 같은 배지조성하에서 키우기 시작했다. 안정적으로 자란 세포를 3.1.5에 언급한 방법대로 Knock-in vector를 transfection 시켰다. 이 때 미리 제작한 mOct2 TALEN을 Left, Right 각각 2 ㎍씩 가하고 Knock-in vector를 2, 5, 10, 20㎍이 되도록 gradient를 걸어줬다.

표 10 mOct2 TALEN DNA 인식 부분

mOct2 TALEN L1	TCAGGATCAGCTGCCTCCAG
mOct2 TALEN R1	CCGTGGATGATATTCTAGAA

표 11 Knock-in vector transfection

시료	양(Amount)			
DMEM	총합이 100 ㎕가 되도록 맞춘다			
Knock-in vector	2 ㎍	5 ㎍	10 ㎍	20 ㎍
TALEN Left	2 ㎍	2 ㎍	2 ㎍	2 ㎍
TALEN Right	2 ㎍	2 ㎍	2 ㎍	2 ㎍
FuGENE Reagent	18 ㎕	27 ㎕	42 ㎕	72 ㎕
15min incubation				

3.1.5에 언급한 대로 25T flask로 cell을 옮긴 후 24~48 시간 후에 Puromycin을 4 ㎍/mL 가 되도록 넣고 약 2주간 selection 하였다. 그 후 cell을 TE처리하여 떼어낸 후 transfected CMT-93과 wild type CMT-93의 RNA를 각각 추출하고 RT-PCR을 하였다. 얻은 cDNA를 template로 PCR하여 Knock-in vector에서 유래한 부분이 있는지 관찰하였다. LA의 중간지점부터 hOCT2 gene까지, selection marker의 후반부부터 RA의 중간지점까지를 각각 primer로 잡아서 진행하였다. Gel 전기영동을 통해 결과를 확인하였다.

Transfected CMT-93과 wild type CMT-93에서 genomic DNA를 각각 추출하였다. 이를 template로 PCR하여 Knock-in이 원하는 위치에서 일어났는지 관찰하였다. 이 때 LA의 -44 지점부터 hOCT2 gene까지 PCR이 일어나도록 primer를 설정하였다. Gel 전기영동을 통해 결과를 확인하였다.

4. Results

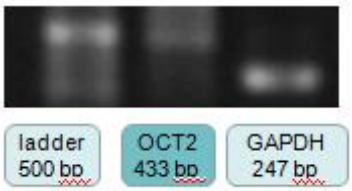
PCR 결과 annealing 온도 64℃에서 ladder의 2000bp보다 약간 더 위에 밴드가 나왔다(그림 2 세 번째 lane). 그리고 house keeping gene인 GADPH도 진하게 나왔다(그림 2 두 번째 lane). 원하는 사이즈가 약 2100bp이므로 PCR이 제대로 되었다고 판단하였다. 따라서 이 DNA로 실험을 진행하였고 pcDNA™3.1 Vector에 넣은 후 Sequencing한 결과 알아낸 5개 mutation(G823C, T982G, A1243G G1680A, T1872C)가 발견되었다. 그 중 아미노산 서열을 바꾸는 3개(G823C, T982G, A1243G)를 고쳤다. hOCT2를 transfection 시켜서 selection한 후 RT-PCR을 한 결과 hOCT2의 mRNA가 발현되었음을 확인하였다.

그림 2 hOCT2 PCR 결과

그림 3 OCT2 mutation sequencing 결과

```
TGGTTCACGAGCT   AAAGCAGGCTGGT   ACAGTTTCTCTGC
|||||| ||||||   |||||| ||||||   |||||| ||||||
TGGTTCGCGAGCT   AAAGCACGCTGGT   ACAGTTGCTCTGC
```

그림 4 OCT2 stable cell line RT-PCR 결과



MDCK-OCT2 cell의 function study 결과 OCT2에서는 wild type MDCK에 비해 MPP+ uptake가 1.43배 증가하는 것을 확인하였다. n=2, t-test 결과 wild type과 OCT2 군에서 p=0.04가 나왔다. 동 실험실에서 같은 cell을 가지고 추가로 대표적 Inhibitor인 Cimetidine을 0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μM 로 가했을 때 순차적으로 uptake가 감소하는 것을 확인하였다(데이터 미첨부).

그림 5 MDCK-OCT2 function study 결과

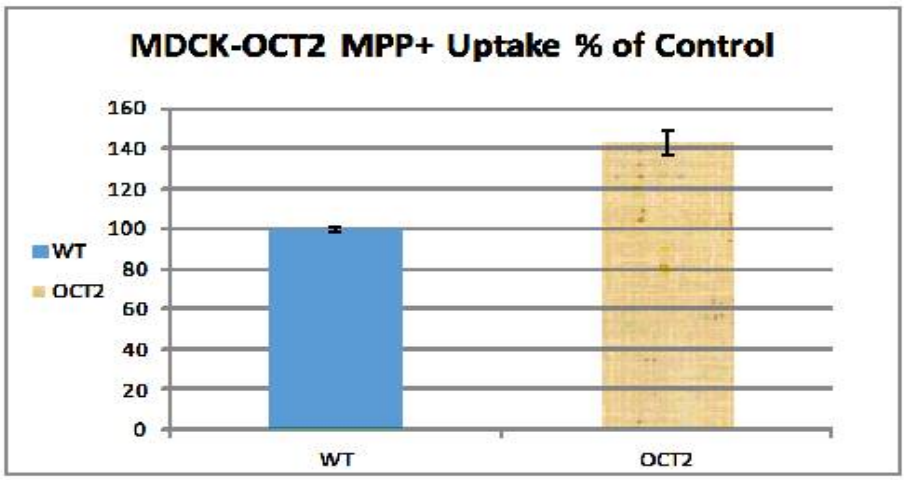


표 12 MDCK-OCT2 의 function study 결과

	wild type MDCK	MDCK-OCT2
Uptake % of Control	100±1.40	143±6.10

Knock-in vector의 구성요소들을 순서대로 배치하기 위해서 pCR®2.1 Vector의 제한효소 부분을 바이오닉스에 의뢰하여 그림 7과 같이 새롭게 합성하였다. HindⅢ, Apa I 으로 각 vector를 잘라서 MCS를 subcloning하였다. LA, hOCT2, BGH-pA, Puro/TK, RA를 각각 PCR 또는 subcloning을 통해 얻은 후 3.2.2에 언급한 순서대로

T-MCS vector에 삽입하였다. Gel을 내린 결과 10kb ladder보다 밴드가 위에 나온 것에서 vector가 성공적으로 제작되었다고 판단하였다. Sequencing 결과 디자인한 vector와 같은 서열을 갖는다는 것을 확인할 수 있었다.

그림 6 pCR2.1 vector MCS 부분

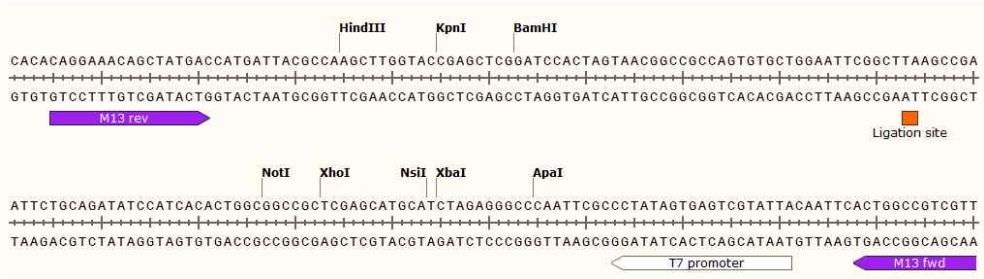


그림 7 T-MCS vector MCS 부분

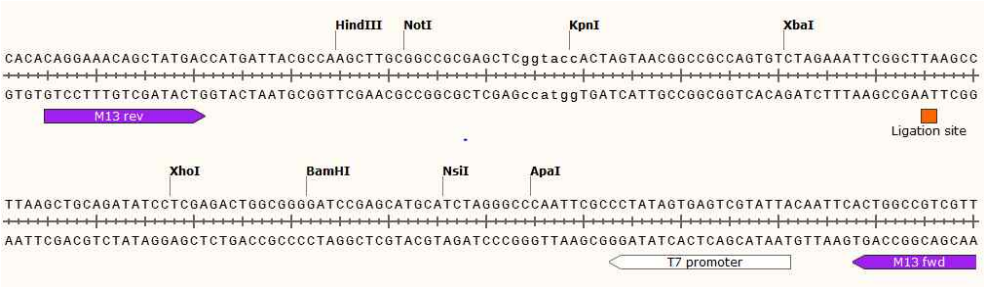
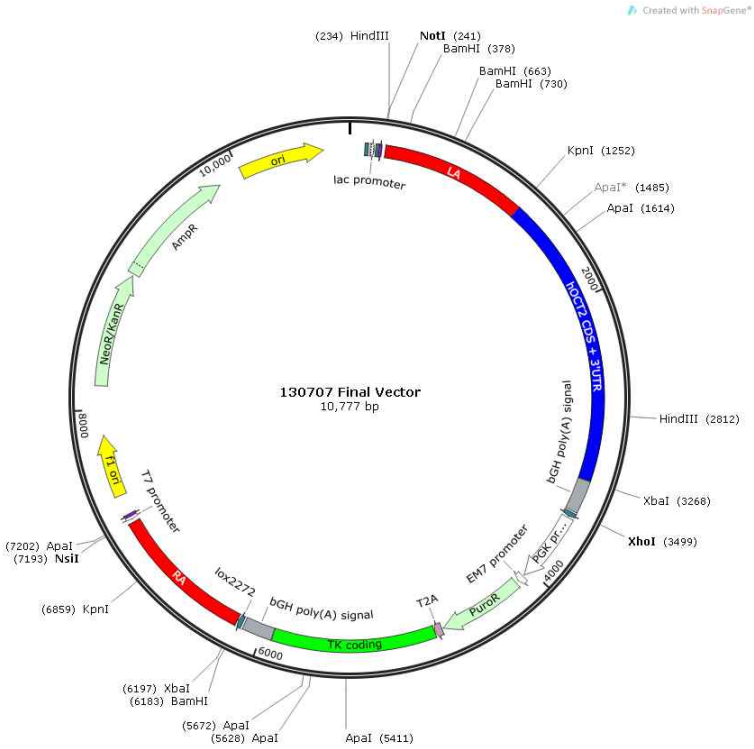


그림 8 Knock-in vector gel 결과 & Map



CMT-93에 3.2.3처럼 transfection을 한 결과 강한 독성을 보인 20 ㎍군을 제외한 나머지 군에서 transfected cell을 selection할 수 있었다. 그 중 5 ㎍ 군에서 cell 상태가 가장 양호하다고 판단하여 wild type 군과 함께 RNA를 추출, RT-PCR로 cDNA를 얻은 후 PCR 결과물을 확인하였다. 먼저 wild type을 PCR한 결과 그림 9에서 3 Rane의 mOct2 band만 나오고 2 Rane의 hOCT2 band는 나오지 않았다. 같은 조건에서 transfected cell 군에서 PCR을 한 결과, 그림 10에서 hOCT2 band인 1Rane과 mOct2 band인 2 Rane 모두 나왔다. 하지만 mOct2에 비해 hOCT2 band가 강하게 나타났다. 이로부터 Knock-in vector의 hOCT2 gene이 CMT-93 cell에 transfection 되었음을 알 수 있었다.

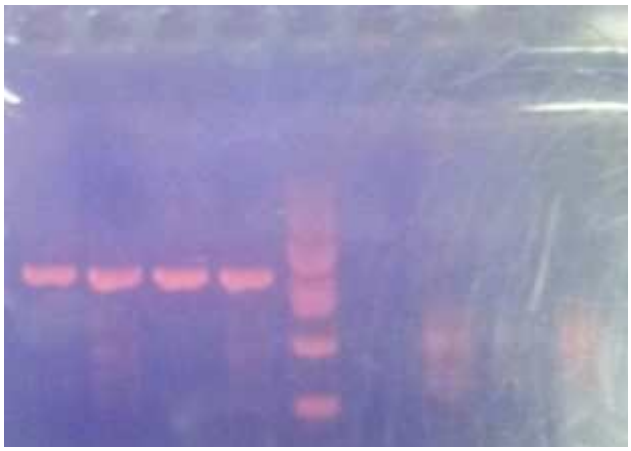
그림 9,10 wild type/Transfected cDNA hOCT2, mOct2 PCR 결과

Knock-in vector가 전체적으로 잘 들어갔는지 확인하기 위해 다음과 같이 진행하였다. 그림 11에서 1~4 Rane은 LA의 중간지점(500)을 Forward primer, hOCT2의 중간지점(1800)을 Reverse primer 구간으로 설정하고 PCR한 결과물이다. 밴드가 2000bp보다 조금 더 크게 나왔는데 PCR 결과물의 크기가 약 2200bp이므로 PCR이 제대로 되었다고 판단하였다. 7,9 Rane은 Selection marker의 뒷 부분(2400)부터 RA까지를 PCR한 결과물이다. 밴드가 1000bp보다 조금 더 크게 나왔는데 예상한 밴드 크기가 1200bp이므로 PCR이 제대로 되었다고 판단

하였다.

두 PCR결과를 토대로 Knock-in vector가 transfection 되었음을 알 수 있었다.

그림 11 Transfected cell cDNA의 LA~hOCT2, TK~RA PCR 결과



Mouse cell의 gene 중 어느 위치에 Knock-in이 되었는지 확인하기 위해 Transfected cell과 wild type CMT-93 cell에서 각각 genomic DNA를 추출하였다. 이를 template로 mOct2의 intron 부분인 LA의 -44부터 hOCT2 gene의 1680번 염기까지 PCR을 진행한 결과, 64℃ 조건에서 wild type CMT-93은 밴드가 나오지 않았지만 Transfected cell에선 2900bp보다 조금 작게 밴드가 나왔다. 예상한 PCR 결과물이 2700bp 정도이므로 원하는 결과가 나왔다고 판단하였다. 따라서 nonspecific insertion에 의해 Knock-in 된 것이 아니라 LA, RA에 대한 homologous recombination에 의해 mOct2 exon 부분에 Knock-in 되었음을 확인할 수 있었다. 64℃ 이하의 온도에서 공통적으로 나온 다수의 밴드들은 nonspecific band로 판단된다.

그림 12 Transfected/WT cell cDNA에서 LA(-44)~hOCT2 PCR

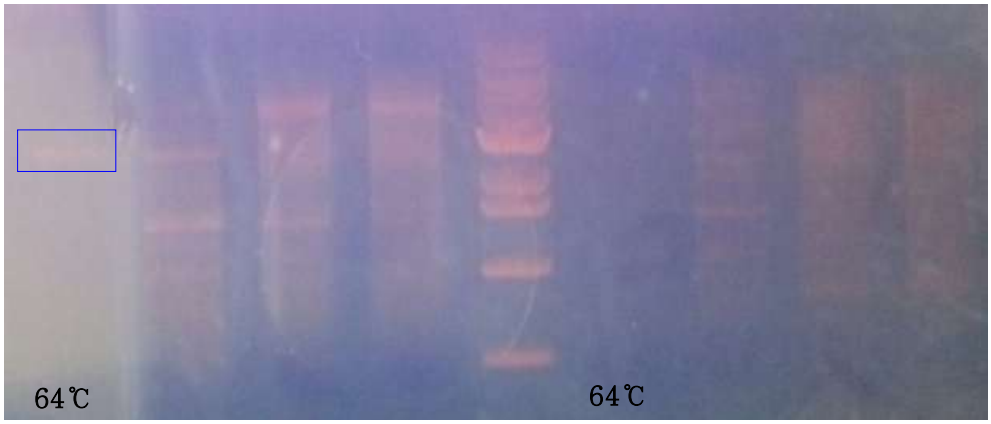


그림 13 Transfected cell cDNA에서 LA(-44)~hOCT2 PCR (64℃)

5. Discussion & Conclusion

본 연구에서는 약물상호작용에 중요한 역할을 한다고 알려진 7가지 transporter 중 OCT2를 human kidney RNA로부터 cloning하여 MDCK cell line을 완성하였다. OCT2가 안정적으로 발현되었는지 확인하기 위해 mRNA, protein function을 각각 확인하였다. RT-PCR 결과 디자인한 primer에 맞는 밴드가 나왔고, function study 결과 기질 농도가 wild type MDCK에 비해 잘 나왔다.

이 hOCT2 gene을 바탕으로 Knock-in vector를 디자인하였다. 이 때 homologous recombination 원리를 기반으로 하였다. 이 것은 두 쌍의 DNA에 서로 염기서열이 일치하는 부분이 있을 때 양쪽의 DNA 가닥 일부가 교환되는 현상을 말한다. 이 현상을 이용하여 실험자가 원하는 부분에 유전자를 쉽게 Knock-in할 수가 있다. 본 논문에선 이 원리를 이용하여 human OCT2를 mouse Oct2 gene 사이에 Knock-in 시키는 것을 연구하였다. 그 결과 mouse Oct2는 Knock-out 시키면서 동시에 human OCT2를 발현시킬 수 있는 Knock-in vector를 디자인하였다. 이를 위해 Vector의 양 쪽에 mouse Oct2 gene과 동일한 서열을 갖는 LA, RA를 1000bp씩 cloning 하였다. 이 때 mouse RNA로부터 RT-PCR을 하는 방법으론 splicing 한 mRNA에는 존재하지 않는 Intron 부분을 얻을 수 없다. 그래서 mouse genomic DNA library의 일부인 BMQ417-m15 plasmid를 template로 PCR을 하여 LA, RA을 얻었다.

MDCK cell line에 사용한 human OCT2 gene은 CDS뿐 아니라 5′ UTR의 일부가 포함된 형태이다. UTR이 아미노산 서열에는 관여하지 않지만 transporter 발현에 영향을 줄 수 있다는 연구 결과가 존재하기 때문이다(Wei, Yang et al. 2012). 그러나 human OCT2 5‘ UTR 부분이 mouse genome에 Knock-in될 경우 기존 mouse Oct2 5′

UTR의 작용에 방해가 될 수 있단 가정에 5' UTR과 MCS 부분을 제거하여 다시 cloning 하였다.

Selection marker인 Puromycin resistance gene과 TK gene은 Knock-in이 일어난 cell을 골라내는데 사용된다. puromycin은 항생물질로 mouse cell과 같은 진핵세포에도 유효하므로 transfection이 일어나지 않은 cell을 골라내는데 사용된다. TK gene은 구아노신 유사물질인 Ganciclovir를 활성화시켜서 cell에 피해를 주게 하므로 negative selection marker로 사용된다. 이 때 Puro/TK gene의 양 가장자리에 loxP sequence가 위치하는데, Cre-recombinase라는 효소와 반응하여 각 서열 사이에 있는 gene을 제거해주는 역할을 한다. 따라서 puromycin으로 찾아낸 Knock-in 된 cell에서 불필요한 selection marker를 Knock-out 해주는 역할을 한다. 그 후 ganciclovir로 negative selection하면 Knock-out이 되지 않은 cell을 제거할 수 있다.

Knock-in vector가 만들어졌단 것을 확인한 후 실제로 vector가 작동하는지를 확인해보았다. CMT-93은 male mouse rectum에서 유래한 carcinoma cell로 type은 epithelial cell이며 유래한 strain은 C57BL/icrf이다. 일반적으로 Transgenic model을 만드는 mouse strain는 C57BL/6이므로, Knock-in vector가 기능을 보일 수 있으려면 Homology arm을 C57BL/6의 genomic DNA에 맞춰야 한다고 판단하였다. 따라서 vector의 기능을 테스트하는 cell도 최대한 비슷한 strain에서 유래한 cell을 사용하기로 하였다. C57BL/icrf는 그 자체로 transgenic model이긴 하나 mOct2 부분에는 변화가 없다고 판단하였다.

Transfection 과정에서 Vector와 Reagent를 많이 가할수록 cell들이 많이 죽는 것을 관찰하였다. 하지만 20 μg 군을 제외한 다른 군에선 25T-flask로 옮겼을 때 살아남은 cell들이 있어서 실험을 진행하였다. 먼저 wild type CMT-93에 Puromycin를 농도별로 순차적으로 가하

였을 때 최저 농도인 2.6 μg/mL에서 cell들이 죽는 것을 확인하였다. 따라서 이보다 조금 높은 4 μg/mL를 실험농도로 정하고 selection을 진행하였다.

TALEN(Transcription Activator-like Effector Nucleases)은 *Xanthomonas* 속에 속하는 식물 병원성 세균에서 유래한 효소이다 (Cermak, Doyle et al. 2011). 두 쌍으로 이루어져있으며 각각에 특정 유전자의 염기서열과 일치하는 부분이 있어 그 곳에 선택적으로 결합, 두 쌍의 효소가 중합체를 이루어 제한효소로서 작동한다. 정해진 서열만을 자르는 일반적 제한효소와 달리 어떻게 제작하느냐에 따라 실험자가 원하는 유전자 위치를 절단할 수 있다. 이 실험에선 mOct2을 목표로 TALEN을 제작, mOct2 exon 부근에 Double strand break를 일으켜서 homologous recombination을 촉진하였다.

Knock-in이 되었는지를 확인하기 위해 wild type CMT-93과 transfected cell에서 얻은 cDNA를 hOCT2, mOct2 PCR을 하였을 때 wild type에선 mOct2 band만이 나왔다. 따라서 hOCT2 Primer의 nonspecific binding에 의한 band는 일단 배제할 수 있었다. 같은 조건에서 transfected cell에선 mOct2 band도 일부 나타났으나 hOCT2 band가 강하게 나타났다. 이로부터 hOCT2 gene이 Transfected cell에 있다는 것을 확인할 수 있었다.

Knock-in이 어느 위치에 되었는지 확인하기 위해 Left arm의 5‘ 방향으로 44bp 올라간 지점에서 primer를 짜고 PCR을 하였다. 이 부분은 mRNA splicing이 일어나면서 제거되는 intron이기 때문에 추출한 RNA에서 만든 cDNA에는 존재하지 않을 가능성이 높다. 따라서 genomic DNA를 추출하였고 전기영동 결과 band가 존재한다는 점에서 homologous recombination에 의해 Knock-in이 되었단 것을 확인할 수 있었다.

Transfected cell에서도 mOct2 gene이 존재하였는데, 이것은 Puromycin 내성이 생긴 wild type CMT-93이 혼재하거나 Knock-in

vector가 원하는 위치가 아닌 다른 곳에 random insertion 된 것으로 보인다. 추후 transfected CMT-93 cell로 in vitro 실험을 하고자 할 경우 monoclonal cell을 골라내는 작업을 수행해야할 것이다.

Mouse cell에 존재하는 mOct2 gene 위치에 선택적으로 hOCT2 gene을 Knock-in하는 vector는 추후 다른 transporter로 그 개념을 확장할 수 있을 것이다. 또한 vector를 이용하여 새로운 In-vitro screening system을 만들 수 있을뿐 아니라, mouse의 transporter를 Knock-out 시키면서 human transporter를 발현시키는 새로운 transgenic model 생성에도 이용할 수 있을 것이다. 결과적으로 transporter의 종차 연구에 기여하여 신약개발 단계에서 약물상호작용을 예측하는데 큰 역할을 할 수 있다고 사료된다.

6. Reference

Higgins, J. W., J. Q. Bao, A. B. Ke, J. R. Manro, J. K. Fallon, P. C. Smith and M. J. Zamek-Gliszczynski (2014). "Utility of Oatp1a/1b-Knockout and OATP1B1/3-Humanized Mice in the Study of OATP-Mediated Pharmacokinetics and Tissue Distribution: Case Studies with Pravastatin, Atorvastatin, Simvastatin, and Carboxydichlorofluorescein." Drug Metab Dispos 42(1): 182-192.

Huang, S. M., R. Temple, D. C. Throckmorton and L. J. Lesko (2007). "Drug interaction studies: study design, data analysis, and implications for dosing and labeling." Clin Pharmacol Ther 81(2): 298-304.

Jonker, J. W., E. Wagenaar, C. A. Mol, M. Buitelaar, H. Koepsell, J. W. Smit and A. H. Schinkel (2001). "Reduced hepatic uptake and intestinal excretion of organic cations in mice with a targeted disruption of the organic cation transporter 1 (Oct1 [Slc22a1]) gene." Mol Cell Biol 21(16): 5471-5477.

Jonker, J. W., E. Wagenaar, S. Van Eijl and A. H. Schinkel (2003). "Deficiency in the organic cation transporters 1 and 2 (Oct1/Oct2 [Slc22a1/Slc22a2]) in mice abolishes renal secretion of organic cations." Mol Cell Biol 23(21): 7902-7908.

Pietig, G., T. Mehrens, J. R. Hirsch, I. Cetinkaya, H. Piechota and E. Schlatter (2001). "Properties and regulation of organic cation transport in freshly isolated human proximal tubules." J Biol Chem 276(36):

33741-33746.

van de Steeg, E., C. M. van der Kruijssen, E. Wagenaar, J. E. Burggraaff, E. Mesman, K. E. Kenworthy and A. H. Schinkel (2009). "Methotrexate pharmacokinetics in transgenic mice with liver-specific expression of human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (SLCO1B1)." Drug Metab Dispos 37(2): 277-281.

van de Steeg, E., A. van Esch, E. Wagenaar, K. E. Kenworthy and A. H. Schinkel (2013). "Influence of human OATP1B1, OATP1B3, and OATP1A2 on the pharmacokinetics of methotrexate and paclitaxel in humanized transgenic mice." Clin Cancer Res 19(4): 821-832.

Vlaming, M. L., J. S. Lagas and A. H. Schinkel (2009). "Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice." Adv Drug Deliv Rev 61(1): 14-25.

Wei, R., F. Yang, T. J. Urban, L. Li, N. Chalasani, D. A. Flockhart and W. Liu (2012). "Impact of the Interaction between 3′-UTR SNPs and microRNA on the Expression of Human Xenobiotic Metabolism Enzyme and Transporter Genes." Front Genet 3: 248.

Zhang, L., S. M. Huang and L. J. Lesko (2011). "Transporter-mediated drug-drug interactions." Clin Pharmacol Ther 89(4): 481-484.

Cermak, T., E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somia, A. J. Bogdanove and D. F.

Voytas (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." Nucleic Acids Res 39(12): e82.

Abstract

FDA in USA selected seven kinds of main drug transporter. FDA encouraged scientists to research about the possibility of drug-drug interaction(DDI) in the level of drug transporter during new drug development. But human transporters are different from animal transporters in terms of substrate specificity, affinity. So It is hard to predict in vivo DDI using animal model because it has limitation, and to research DDI with human volunteers because of great cost and time. So The Humanized animal model that knock the animal transporter out and knock the human transporter in the same point of animal gene will be meaningful. Therefore, We decided to humanize mouse Oct2 transporters and design Knock-in vector for mOct2 gene and evaluate the function. First, hOCT2 gene was cloned from human kidney total RNA and expressed in MDCKⅡ cell. It is confirmed that hOCT2 transporter worked normally, by using uptake study. Separately, We made homology arm by cloning some parts of mOct2 exon1 site and cloned positive, negative selection markers. Finally the Knock-in vector including all factors to knock-in function was made. It wass confirmed that vector was made as its design by using sequencing. Double strand break occurred in the genome of CMT-93 cells derived from mouse strain, and Knock-in vector was transfected in that cells. Using RT-PCR, It was defined that hOCT2 gene was expressed by homologous recombination. In this study, It was confirmed that the vector that delete original drug transporter gene and express human transporter gene can be made. As the result, In vivo model replaced its

transporters to human transporters can be used in Pharmacokinetic study.

Key words : OCT2, Transgenic model, CMT-93, Homologous recombination

Knock-in Vector Design for the Humanization of OCT2 in mice

2013. 11. 8
석사과정 4학기
형 성 우

Introduction

- Drug transporter는 약물 PK에 중요

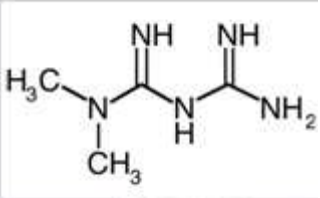
Interacting Drug	Affected Drug	Consequence	Fold Changes in Substrate Plasma AUC
Quinidine	Digoxin	Digoxin Exposure 1.7-fold ↑	P-glycoprotein (P-gp, MDR1) Inhibition
Rifampin	Digoxin	Digoxin Exposure 30% ↓	P-gp Induction
Dronedarone	Digoxin	Digoxin Exposure 2.6-fold ↑	P-gp Inhibition
Probenecid	Cephradine	Cephradine Exposure 3.6-fold ↑	Organic Anion Transporter (OAT) Inhibition
Cimetidine	Metformin	Metformin Exposure 1.4-fold ↑	Organic Cation Transporter (OCT) Inhibition
Cyclosporine	Rosuvastatin	Rosuvastatin Exposure 7-fold ↑	Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) Inhibition & Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) Inhibition
Lopinavir/ Ritonavir	Rosuvastatin	Rosuvastatin Exposure	OATP Inhibition

http://www.fda.gov/drugs/developmentapprovalprocess/developmentresources/druginteractionslabeling/ucm093664.htm

Introduction

- FDA 선정 7가지 약물 상호작용에 중요 transporter

- I) Five SLC transporters
  - OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1, OAT3
- II) Two ABC transporters
  - P-gp, BCRP



- OCT2는 다양한 amine류의 약물들(ex : Metformin)을 기질로 삼고, 이러한 약물들은 실제 체내에서 Cation 형태로 존재하기 때문에 임상적으로도 유효한 가치가 있다!

the draft FDA guidance for industry on drug interaction studies (Feb 2012)

Introduction

- Animal은 자체 transporter를 가짐
  - Knockout model은 human transporter의 기능을 specific하게 볼 수 없음

- Transporter 종간 차이 존재
  - Rat은 kidney에도 OCT1 발현
  - mouse의 MRP2 efficiency가 human과 유의한 차이 존재

mouse Mrp2 activity. In conclusion, although human and mouse MRP2/Mrp2 have largely overlapping substrate specificities, there are important species differences in the transport efficiency of MRP2 substrates and in the modulation of transport by other compounds. These differences should be taken into account when results obtained in mice are extrapolated to humans.

Species-Dependent Transport and Modulation Properties of Human and Mouse Multidrug Resistance Protein 2

Introduction

Wild-type mice

Humanized mice

- Transporter의 종 간 차이때문에 생기는 오차 제거
- Transporter외 다른 요소는 control 가능
- 두 model을 비교하면 transporter 기능의 종 차이도 알아낼 수 있음

Objectives

- To design Knock-in vector for the Humanized OCT2 in mice and reproduce it.

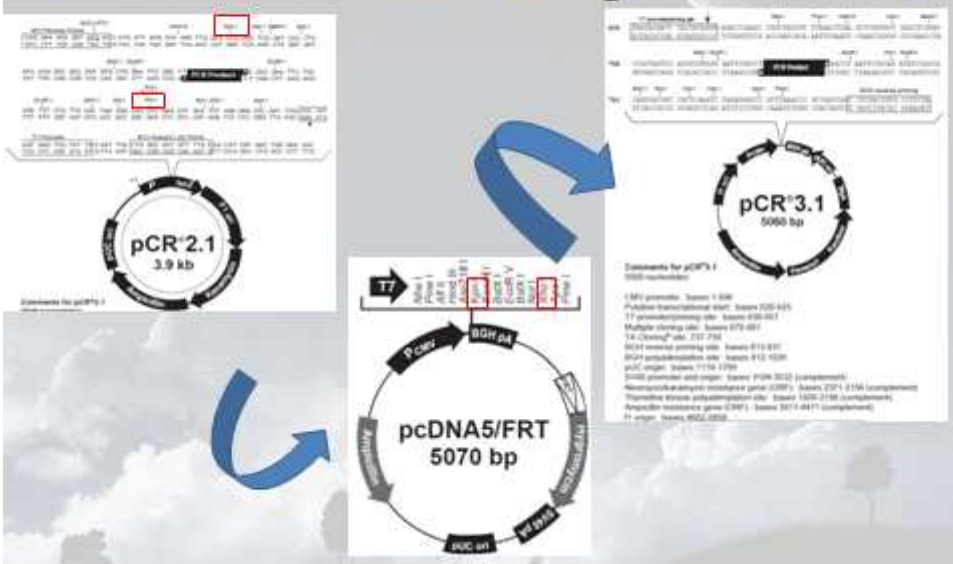
실험 순서

PCR	DNA 농도 확인	Enzyme Digestion	Sequencing
Gel Extraction	DNA Prep	Gel Extraction	DNA prep
DNA 농도 확인	Liquid culture	DNA 농도 확인	Liquid culture
Ligation	Transformation	Ligation	Transformation

Human OCT2 cDNA 확보

- RNA source
  - Human kidney total RNA
- OCT2 Primer
  - 5'-CA GCT GGA CCA AGG AAA GGC CC-3'
  - 5'-TTG CCT AGC CCA CAG TTC CCC-3'
  - Annealing temperature : 64℃
  - Elongation time : 2min

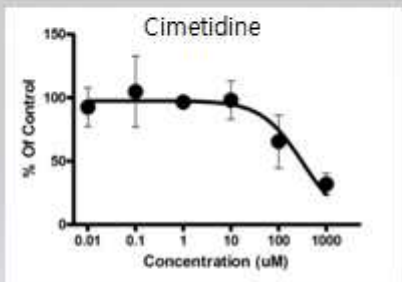
Subcloning

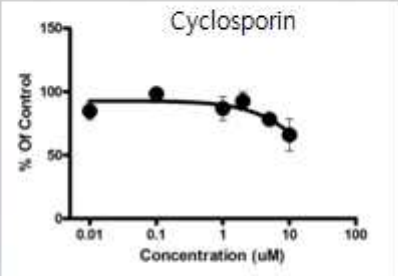


Sequencing/Mutagenesis

- CDS 175~1842bp,
- 염기서열 분석 결과
  - 823번 G➡C (Gly➡Arg)
  - 982번 T➡G (Ser➡Ala)
  - 1243번 A➡G (Thr➡Ala)
  - 1680번 G➡A (silent mutation)
  - 1872번 T➡C (nonsequcing region)
- Mutagenesis 수행

RT-PCR/Function test





•기질

-Estrone-3-sulfate (Sigma) 1μM

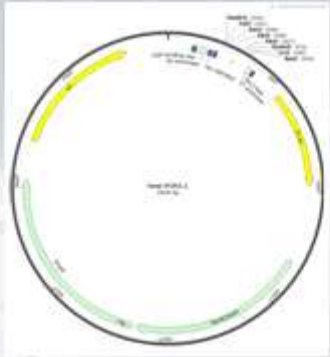
-[3H] Estrone-3-sulfate (Perkin Elmer) 1μM

Knock-in vector 필요 요소

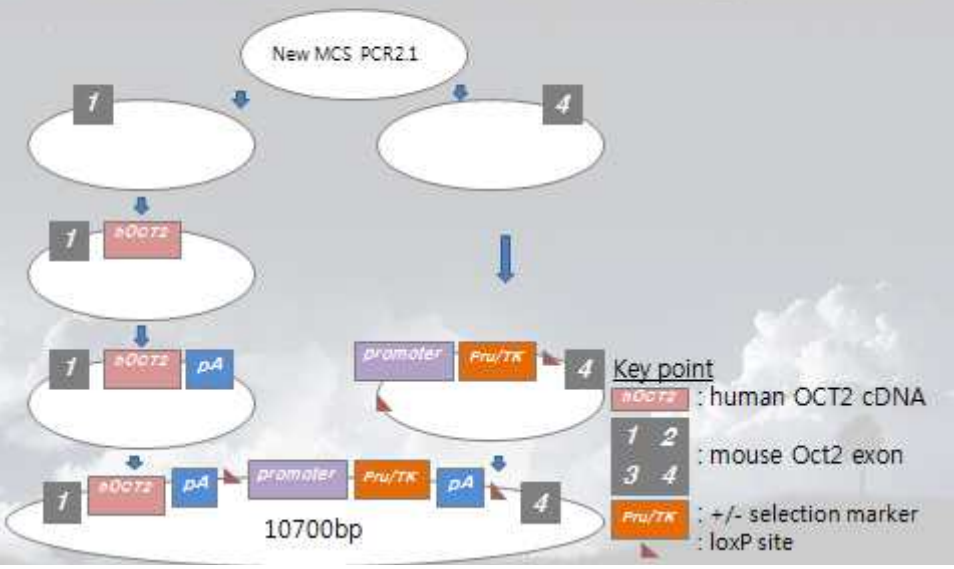
hOCT2 cDNA
loxP sequence (selection marker 제거용)
Left / Right arm (homologous recombination)
Puromycin 내성 유전자 (positive selection marker)
HSV-Thymidine kinase 유전자 (negative selection marker)

Knock-in vector 제작

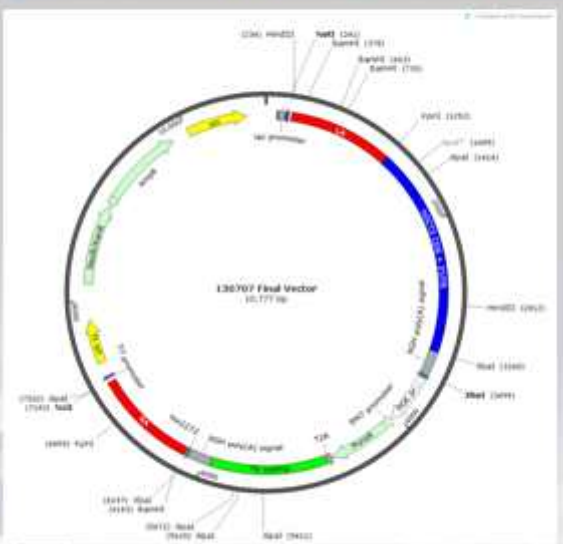
- PCR template
  - LA, RA : BMQ417m15 (c57bl/6j 유래 BAC clone)
  - BGH-Poly A : PCDNA3.1 vector
  - PgK promoter, Puro/TK selection marker, loxP : GLS1 PuroTK Donor Plasmid
- Backbone vector
  - PCR2.1 vector MCS site 수정
  - New MCS PCR2.1



Knock-in vector 제작/작용



Knock-in vector



Conclusion

- Knock-in vector for human OCT2 is completely made.
- If the vector can make knock hOCT2 gene into the position of mouse Oct2 in mouse-oriented cell, It can be used to generate hOCT2 transgenic model.

감사의 글

다채로운 면에서 부족한 제가 석사과정을 마칠 수 있도록 도와주신 많은 분들께 이 자리를 빌어 감사드립니다.

먼저 지도교수님이신 정석재 교수님께 감사드립니다. 학부 때부터 약제학에 관심을 가질 수 있게 가르쳐주시고, 대학원에 와서도 날카로운 지적과 따뜻한 말씀을 함께 주셔서 지난 2년을 즐겁게 보낼 수 있었습니다. 그리고 부족한 제 의견을 경청해주시고 제 생각대로 실천해볼 수 있게 운신의 폭을 주셔서 제가 과학에 보다 많은 흥미를 갖게 되었습니다. 또 고기는 언제 뒤집어야하는지 알려주셔서 제 인생에 크나큰 사회적응력을 얻을 수 있었습니다. 퇴임하셔서 삶의 새로운 장을 열게 되신 심창구 교수님께 감사드립니다. 약학연습에서 뵈면서 과학자로서 염두에 두어야할 것이 많다는 것을 알게 해주셨습니다. 늘 웃으며 인사를 받아주시는 김대덕 교수님께도 감사드립니다. 존재만으로도 늘 든든한 지원군이 되어주셨습니다. 지금은 미국에 계신 정세호 교수님께도 감사드립니다. 대학 입학 이후 학교에만 있던 저에게 또 다른 세계가 있다는 걸 알려주셨습니다. 그리고 학부 시절 여러번 절 지도해주시고 이번 논문심사도 맡아주신 오유경 교수님께도 감사드립니다.

2년간 제 집처럼 드나들며 노래와 실험을 병행했던 317호, 그 곳을 함께 누볐던 많은 분들이 있었기에 제가 이 자리까지 올 수 있었습니다. 2년간 좋고 나쁜 많은 기억들이 있었지만 모든 분들에게 감사드릴 것이 있습니다. 2011년 여름 처음 특연온 저에게 실험실을 떠난다며 작별을 고하시고 예쁜 아이의 아버지가 되어 돌아오신 경륜이형, 3달 정도 짧은 기간 같이 지냈지만 늘 다정하게 대해주시고 미국에서 귀환하셔서 진로를 고민하는 저에게 아낌없이 조언을 주신 미모와 실력을 겸비한 윤지누나, 멋진 부부이신 두 분께 감사드립니다. 애플과 카메라, 그리고 술&고기의 마스터이시며 자차소유자인 준형이형, 많이 혼나기도 했지만 가끔

제가 지나친 언행을 해도 참아주시고 자주 퇴근길에 33두에 불러주셔서 감사합니다. 창가 너머로 비치는 태양을 피하고 싶어하시고 요플레를 쌓아두신 메이저리그 애청자 치경이형, 실험의 기초를 짧고 굵게 가르쳐주셔서 감사합니다. 함께 E-sports의 흥망성쇠를 논하며 감탄과 탄식을 나눴던 걸어다니는 여유의 화신 창순이형, 여유 있는 남자가 얼마나 멋진지 알려주셔서 감사합니다. 소리 없는 부수입의 소유자인 인체환원주의자 헌민이형, 주식시장에 발을 들여놓으면 안된단 걸 알려주셔서 감사합니다. 지난 늦봄 걱정이 태산 같을 때 많은 조언해주신 멋진 사회인 명재형, 앞으로 어떤 방향으로 공부해나가야할지 늘 길을 일러주셔서 감사합니다. 자주 뵙진 못했지만 정감있게 대해주신 멋진 종화형, 대전이 좋은 도시라는걸 알려주셔서 감사합니다. 학회에서 가끔 뵈지만 볼 때마다 반갑고 더 친해지고 싶은 채림이형과 승엽이형, 잠깐 봤지만 반갑게 맞아주셔서 감사합니다. 가을에 실험실로 오신 직장생활에 대한 애증의 소유자 보란누나, 제 언행과 성격을 돌아볼 수 있게 조언해주셔서 감사합니다. 학부 조교때부터 잘생김으로 각인된 재일이형, 마음씨 넓게 제 허울을 덮어주고 진지한 조언들을 해주셔서 감사합니다. 향기가 나는 여성스런 기타리스트 소정누나, 막내누나처럼 늘 다정하게 실험과 학교생활에 대해 알려주셔서 감사합니다. 철두철미한 건강지킴이 정현이, 절 재테크 전문가로 과분하게 인정해줘서 감사합니다. 타고난 게이머지만 정체를 숨기고 싶어하는 나긋나긋한 목소리의 은둔자 유경이, 실험이 막힐 때마다 많이 들어주고 해결책을 주어 감사합니다. 약대 탁구장 지하도의 추억을 공유할 수 있는 동기이자 임재범의 열렬한 지지자 유성이, 대학원 생활이 답답하게 느껴질 때 그는 나에게로 날아와 웃음이 되어주어 감사합니다. 늘 해맑은 자체 볼터치 피부의 소유자 은정이, 그리고 과묵한 라이더이자 황금발의 소유자 병진이, 1년이 지나도록 이것저것 시켜서 귀찮을텐데 웃으면서 해줘서 미안하고 감사합니다. 그리고 올 여름 실험실에 들어오게 될 귀엽고 현명한 베이시스트 경민이와 내년 여름 실험실에서 보게 될 활기찬 목소리로 주변을 기분 좋게하는 교생선생님 송

이, 모두 고맙고 고마울 예정입니다. 마지막으로 이대생에 대한 편견을 깨주고 여성 문화에 대한 많은 상식을 안겨준 신나는 웃음소리의 소유자 인영이, 입학 후 힘든 시절을 함께하며 위안이 되준 진짜 동기, 2년이 지난 지금은 서로 많이 성장한 것 같아 기분좋고 감사합니다.

문을 열면 바로 보이는 318호 식구들에게도 감사의 말씀을 드립니다. 늘 친근하게 말씀해주신 충길이형, 검도의 달인이자 닭볶음탕을 잘하시는 상범이형, 약연때 많은 조언해주시는 지언쌤, 늘 인사받아주시는 미정쌤, 약제학실의 에어조던 은재형, 함께 와룡전설을 누볐던 동환이형, 바다 건너 야외놀이 문화를 알려준 Alex, 외국여성과 소개팅할 기회를 주지 않았던 Ubonvan Termsarasab보다도 한국이름이 잘 어울리는 연화누나, 선배쇼의 새 장을 여신 주환이형, 과자를 마음껏 절도당해주신 재영이형, 술자리에서 장난쳐도 잘 받아주시는 기택이형까지 모두 감사합니다.

지금은 인적 없는 316호, 20동 317분들에게도 감사드립니다. 미모와 카리스마를 갖춘 문무겸장 지은누나, 90년대 초 게임에 대한 향수를 가지신 규상이형, 드라이빙 플랜B를 지니신 우영이형, 같은 동네 주민이 된 수원이형, 즐거운 삶을 영유하고 계신 한국 직장인의 모범 태광이형, 청순가련한 은서누나, 수많은 명영상을 남기고 언젠가 무중력 사랑을 제작하실 알렉산더 준영이형 모두 감사합니다.

시몬스처럼 흔들리지 않고 편안한 침착함의 소유자 지현누나, 외국으로 나아가게 될 멋진 MVP 성준이형, 회사에서 잘 작동하게 될 건이, 눈웃음이 매력적인 민주, 수없이 많은 과자의 구매자 낑 미연이, 신환회부터 2년간 3층을 같이 누빈 동기들 덕분에 즐거웠습니다.

학부 시절부터 지금까지 같이 해준 동기들 덕분에 힘든 일은 잘 넘기고 즐거운 일은 추억이 되었습니다. 2년간 모임하면서 즐거웠던 은수, 세형이, 준영이, 승범이, 은아, 현은이, 채린이, 세희, 가현이, 나연이, 예슬이, 유진누나, 현주누나, 현무형 등등 08동기들에게 감사합니다.

예전 고등학교 때부터 지금까지 인연 이어오며 벌써 추억거리가 많이

쌓인 지윤이, 다영이 등등 능파친구들에게도 고맙습니다.
마지막으로 늘 따뜻하게 조언해주시고 제가 스스로 한 결정은 언제나 전폭적으로 지지해주시는 사랑하는 부모님, 그리고 늘 든든한 형에게 고마움과 사랑을 담아 이 논문을 드립니다.