



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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](#)

약학석사 학위논문

Cryptic promoter 위치의
c.307A>C 변이를 도입한
rat Abcb1a (p-glycoprotein)를
기능적으로 발현하는 MDCKII
세포주의 구축

Establishment of MDCKII cells with
functional expression of rat Abcb1a
(p-glycoprotein) via introduction of
c.307A>C mutation in the putative cryptic
promoter region

2022 년 2 월

서울대학교 대학원
약학대학 약제과학 전공
이 승 홍

Cryptic promoter 위치의
c.307A>C 변이를 도입한
rat Abcb1a (p-glycoprotein)를
기능적으로 발현하는 MDCKII
세포주의 구축

지도교수 정 석 재

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함
2021 년 11 월

서울대학교 대학원
약학대학 약제과학 전공
이 승 홍

이승홍의 약학석사 학위논문을 인준함
2022 년 1 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문 초록

신약후보물질에 대하여 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설에 관한 연구를 수행하고자 할 때, human *in vivo* pharmacokinetic (PK) data를 직접적으로 구하는 데는 연구 수행의 한계가 있으며 연구에 참여할 환자의 모집도 어렵다는 문제가 있다. 그러나 특정 약물의 ADME에 대한 약물동태모델 (PK model)을 구축하면 직접 *in vivo* 실험을 하지 않고도 *in vitro* PK data로부터 *in vivo* PK data를 예측할 수 있다는 장점이 있다. 이러한 이유로 PK연구에서는 Caco-2나 MDCKII cell을 이용한 *in vitro* 연구가 많이 이루어지고 있다. 또한, 미국 FDA에서는 신약후보물질의 약물상호작용에 주요한 영향을 미치는 약물 수송체 9가지를 선정하여, 신약개발과정에서 이들이 약물 수송체의 기질 또는 저해제로 작용하는지 조사가 필요하다고 규정하고 있다. 본 연구에서는 이들 약물 수송체 중 하나인 Abcb1a를 발현하는 MDCKII 세포 실험계를 구축하는 것을 목표로 하였다. Cloning 과정에서 rat *Abcb1a* 서열 내의 cryptic promoter가 원인으로 추정되는 competent cell의 사멸이 발생했다. 그래서 cryptic promoter를 억제할 필요가 있었고, 이를 위해서 site-directed mutagenesis를 통하여 rat *Abcb1a*의 coding sequence 내에 c.307A>C mutation을 도입했다. 이 방법으로 rat *Abcb1a* 서열이 포함된 타겟 플라스미드를 충분한 양으로 증폭시킬 수 있었다. 다음으로 이것을 MDCKII cell에 발현시켜서 그 기능을 확인하기 위해 차례로 RT-PCR, western blot analysis, bi-directional transport assay를 수행하였다. RT-PCR 결과 mRNA 수준에서 rat *Abcb1a*가 잘 발현됨을 확인하였다. 다음으로 western blot analysis에서 rat Abcb1a에 해당하는 크기에서 단백질 밴

드가 관찰되었고, 이를 통해 단백질 수준에서 rat Abcb1a가 잘 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 마지막으로 실험계의 efflux function을 확인하고자 시행한 bi-directional transport assay에서는 mock cell에 비해 우월한 efflux ratio를 보였기 때문에 이를 rat Abcb1a expressing MDCKII 세포 실험계로 활용할 가치가 있다고 생각되었다. 본 연구에서 구축한 rat Abcb1a expressing MDCKII cell을 PK연구에 이용하면, 특정 신약후보물질의 p-gp에 대한 기질성 및 걸보기 투과성 (Papp)을 구할 수 있는데 사용할 수 있을 것이라고 생각된다. 또한 Km, Vmax와 같은 *in vitro* PK parameter를 도출하여 *in vivo* 생리학적 체내동태모델링에도 유용하게 적용할 수 있을 것이라고 생각된다.

주요어 : Abcb1a, Mdr1a, p-gp, cryptic promoter, cloning, *in vivo*
in vitro extrapolation

학 번 : 2020-25811

목 차

1. Introduction	1
1.1. 약물수송체 (Drug transporter)	1
1.2. Rat Abcb1a (P-glycoprotein; Mdr1a)	2
1.3. In vivo - in vitro extrapolation (IVIVE)	3
1.4. Cryptic promoter	4
1.5. Down-regulation of endogenous canine Abcb1a ... transporter	5
2. Materials & Methods	7
2.1. Chemicals and reagents	7
2.2. Cell lines and cultures	7
2.3. Site-directed mutagenesis (SDM)	8
2.4. DNA purification (miniprep, midiprep) & sequencing	9
2.5. Transfection	10
2.6. Reverse transcription (RT-PCR)	11
2.7. Single cell selection	12
2.8. Rho 123 exclusion assay	12
2.9. Western blot analysis	13
2.10. LC-MS/MS validation of quinidine	15
2.11. Bi-directional transport assay	15
2.12. Quantitative real-time PCR (qPCR)	17
3. Results	18
4. Discussion	20
5. Conclusion	22
참고문헌	43

표 목 차

[표 1]	23
[표 2]	24
[표 3]	25
[표 4]	26
[표 5]	27
[표 6]	28

그림 목 차

[그림 1]	29
[그림 2]	30
[그림 3]	31
[그림 4]	32
[그림 5]	33
[그림 6]	34
[그림 7]	35
[그림 8]	36
[그림 9]	37
[그림 10]	38
[그림 11]	39
[그림 12]	40
[그림 13]	41
[그림 14]	42

1. Introduction

1-1. 약물 수송체 (Drug transporter)

약물 수송체란 세포막에 존재하여 drugs나 xenobiotics의 수송을 담당하는 단백질이다. 약물 수송체에는 다양한 종류가 있으나, 크게 SLC (solute carrier) transporter와 ABC (ATP-binding cassette) superfamily로 분류한다. 약물 수송체는 특히 다양한 약물의 흡수 (absorption), 분포 (distribution), 배설(excretion) 등에 아주 중요한 역할을 하고, 특히 약물의 약리작용이나 부작용에 중요한 요소로써 작용한다 (KM Giacomini et al, 2012). [그림 1]은 약물의 ADME에 영향을 미치는 주요 장기에 존재하는 여러 transporter의 종류를 나타낸 것이다.

약물 수송체는 약물에 의한 체내 동태를 변화시키는 요인이 될 수 있다고 알려져 있다. 예를 들어, HMG-CoA reductase inhibitor인 rosuvastatin은 hepatic uptake transporter인 OATP1B1 (organic anion transporting polypeptide, *SLCO1B1*)과 OATP1B3 (*SLCO1B3*)의 기질로 알려져 있는데 (M F Fromm, 2012), OATP1B1의 coding sequence 중 c.521TC genotype과 c.521CC genotype은, wild type인 c.521TT genotype에 비하여 rosuvastatin의 $AUC_{0-\infty}$ (area under the plasma concentration-time curve)가 각각 63%, 111% 증가 되었다는 PK/PD model simulation 결과가 있다 (RH Rose et al, 2014).

또한, 다양한 약물이 각종 transporter의 inhibitor로써 작용하는 경우가 많다. 인구의 고령화, 식단의 서구화로 현대인들은 혈압약, 고지혈증약, 당뇨약 등 다양한 약물을 동시에 먹는 경우가 매우 많은데, 복용하는

약물이 특정 transporter에 대한 저해제로써 작용한다면 환자가 약물의 부작용을 겪게 될 수도 있다. 이러한 이유로 약물-약물 상호작용 (drug-drug interaction, DDI) 연구의 중요성이 점점 커지고 있다.

[그림 2]는 미국 식품의약국(FDA)에서 나온 2020년 DDI guideline에 있는 자료이다. FDA에서는 신약후보물질이 다른 약물과 DDI를 나타내는지 연구하기 위해서 확인해야 하는 주요한 9가지의 약물 수송체를 소개하고 있다. 이들 9가지 약물 수송체에는 7개의 SLC transporter (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, MATE1, MATE2-K, OCT2)와 2개의 ABC transporter (MDR1, BCRP)가 있다.

1-2. Rat Abcb1a (P-glycoprotein; Mdr1a)

Rat Abcb1a는 ABC superfamily에 속하는 약물 수송체로써, Mdr1a나 p-glycoprotein이라고도 불린다. 주요 기질로는 paclitaxel, irinotecan, topotecan 등의 항암제와, diltiazem과 같은 고혈압약, quinidine, digoxin 과 같은 항부정맥약, ritonavir와 같은 항바이러스제, fexofenadine과 같은 항히스타민제 등이 있다. 그리고 대표적인 저해제로는 verapamil, cyclosporin A, elacridar 등이 있다. (UCSF-FDA TransPortal)

Rat Abcb1a는 1272-1277개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 그 크기는 170 kDa정도이다. ATP를 사용하여 cell 내부에서 외부로 물질을 펴내는 역할을 하는 efflux transporter이다. Human에는 ABCB1이라는 한 종류의 subtype으로 존재하지만, rat와 mouse와 같은 rodent는 Abcb1a, Abcb1b의 두 가지 subtype으로 존재한다. Abcb1a와 Abcb1b는 각각 human ABCB1과 87%, 80%의 amino acid homology를 공유한다. 또한

이들은 주로 분포하는 장기에 있어서 차이가 있는데, 이것을 [표 1]과 같이 요약하였다. [표 1]에서와 같이, Abcb1a는 Abcb1b와 달리 소장, 간, 신장, BBB와 같이 약물-약물 상호작용(DDI)에 더 크게 기여하는 장기에 분포하고 있다. 그러므로 본 연구는 rat Abcb1a를 발현 시키는데 목적을 두었다.

1-3. In vivo-in vitro extrapolation (IVIVE)

신약후보물질에 대하여 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설에 관한 연구를 하고자 할 때, human *in vivo* PK data를 직접적으로 구하는 데는 실험의 시간이 오래 걸리며 연구에 참여할 환자의 모집도 어렵다는 한계가 있다. 그러나 특정 약물의 ADME에 대한 약물동태모델 (PK model)을 구축하면 직접 *in vivo* 실험을 하지 않고도 *in vitro* PK data로부터 *in vivo* PK data를 예측할 수 있다. 약물동태학에서 이러한 접근 방법을 *in vivo-in vitro* extrapolation (IVIVE)이라고 한다.

[그림 3]은 rat *in vitro* cell 실험계 구축에 대한 필요성에 대한 그림이다. 약물동태학 연구에서 궁극적인 목적은 human *in vivo* data를 예측하는 데 있다. 그러나 그 이전에 약물의 ADME에 대한 PBPK model을 구축하여 validation 하는 것이 필요하고, 그래서 rat와 같은 동물을 사용한다. 만약 rat *in vitro* 실험계를 구축한다면 rat *in vivo* PK data와 조합해서 PBPK model을 구축할 수 있다.

본 연구는 rat Abcb1a transporter를 발현하는 MDCKII cell system을 구축하는 것을 목표로 하였다. 이러한 cell system이 성공적으로 구축된다면, 이를 바탕으로 rat Abcb1a가 관여하는 여러 약물에 대하여 PBPK

model을 구축할 수 있을 것이며, 여기에 rat 대신 human의 생리학적 파라미터(blood flow rate, unbound protein fraction 등)들을 도입해서 궁극적으로 human *in vivo* data를 예측하는 데 사용될 수 있을 것으로 생각하였다.

1-4. Cryptic promoter

본 연구에 앞선 선행 연구에서, rat *Abcb1a* DNA sequence를 증폭하기 위해 competent cell인 *Escherichia coli*에 내로 transformation하였다. 성공적으로 transformation 된 균주만 선별하기 위해서 plasmid에 포함된 항생제저항성마커인 ampicillin (100 µg/mL)이 도말된 LB Agar media에서 colony를 거의 형성하지 않았으며, 일부 colony가 발견되더라도 많은 부분에서 sequencing 결과 major mutation이 발견되었다.

한편, mouse *Abcb1a* cDNA 서열은 박테리아 내로 cloning하는 과정에서 심한 유전적 불안정성 (genetic instability)을 보이며, 이것은 박테리아의 생존을 억제하는 독성을 나타낸다고 알려져 있다. DNA cloning 과정 중 유전적 돌연변이가 생긴 균주 중에서 이러한 독성을 약화시킬 수 있는 일부 균주만 생존한다. 클로닝 과정에서 독성 물질이 생성되는 이유는 mouse *Abcb1a* sequence 내의 cryptic promoter라고 불리는 특정 서열 때문이다. Cryptic promoter는, 진핵생물의 genome sequence이지만 박테리아 내에서 전사 (transcription) 될 수 있는 부분을 의미한다 (KM Pluchino et al., 2015). Cryptic promoter가 발현되면 competent cell인 박테리아와 관계없는 단백질이 생성되는데, 이와 같이 mammalian cell과 viral cDNA 내의 cryptic promoter로 인한 독성 효과에 대해서는 기존

에 연구된 자료가 있다 (Gregory RJ et al., 1990). 그리고 박테리아 내에서 p-gp와 같은 진핵생물의 막 단백질이 발현되면, 이렇게 발현된 p-gp의 membrane-spanning domain이 박테리아 세포막의 안정성을 떨어뜨려서 독성을 나타낸다고 알려져 있다 (Schlegel S et al., 2010). [그림 4]는 mouse와 rat에서 예상되는 cryptic promoter의 위치를 나타낸 것이다. [그림 4A]는 Pluchino et al. (2015)에서 sigma 70 binding site analysis로 추정된 mouse Abcb1a 서열상에서 예측되는 cryptic promoter를 나타낸 것이다. coding sequence (CDS)의 309번-314번 위치에서 shine-dalgarno서열, 319번-321번 위치에 5'-ATG-3'서열이 존재한다.

본 연구에서는 이전 Pluchino et al. (2015)을 참고하여, rat Abcb1a 서열상에서 예상되어지는 cryptic promoter의 위치를 추정하고, 그 발현의 억제를 시도하였다. [그림 4B]는 본 연구에서 예측한 rat Abcb1a CDS 상에서 예측되어지는 cryptic promoter의 위치를 나타낸다. rat Abcb1a CDS의 297번-302번 위치에 shine-dalgarno서열, 307번-309번 위치에 5'-ATG-3'서열이 존재한다. 이렇게 예측된 cryptic promoter의 발현을 억제시키기 위하여 site-directed mutagenesis (SDM)를 통하여 c.307A>C 단일염기변이 (single-point mutation)을 도입하였다.

1-5. Down-regulation of endogenous canine Abcb1a transporter

MDCKII (Mardin-Darby canine kidney II) cell은 내인성 수용체의 발

현이 적은 편에 속하는 세포주이다. Confluency가 낮을 때는 증식률 (proliferation rate)이 높아 다루기 쉬워서 (Stefan Nehls et al., 2019) p-gp를 발현시키는데 자주 사용된다. 그러나 최근 연구에 의하면 MDCKII cell에 존재하는 기존의 내인성 수송체 (endogenous transporter)는 외부에서 p-gp를 발현시켰을 때 그 발현량이 조정된다고 알려져 있다 (Konstantin Kuteykin-Teplyakov et al., 2010). [그림 5]는 본 연구에 참고한 논문에서의 endogenous p-gp의 down-regulation에 대한 qPCR (quantitative PCR) 결과를 나타내었다. [그림 5A]는 wildtype (WT)에서와 human ABCB1-transfected MDCKII cell에서의 endogenous (canine) *ABCB1* mRNA 발현량을 나타낸 결과이다. WT에 비해서 ABCB1-transfected cell에서 그 발현량이 7배 감소하였다. [그림 5B]는 WT과 ABCB1-transfected cell에서 human *ABCB1* mRNA 발현량을 나타낸 결과이다. transfection 시키지 않은 WT에서는 관찰되지 않았다. [그림 5C]는 WT과 ABCB1-transfected cell에서 p-gp 단백질 발현량을 나타낸 것이다. C219 항체를 1차 항체로 사용한 western blot에서 canine ABCB1과 human ABCB1을 구분할 수 없으므로 전체 ABCB1 발현량을 표시하였다.

위에서 인용한 KK-Teplyakov et al. 논문에서는 human ABCB1을 transfection했을 때의 canine ABCB1의 down-regulation에 대해 설명하고 있다. 따라서 본 연구에서는 rat *Abcb1a*를 transfection시키는 경우에서, canine ABCB1의 발현량이 변화하는지를 확인해보고자 qPCR을 통해 wild type과 rat *Abcb1a*-transfected MDCKII cell 각각에서 canine *ABCB1* mRNA 양을 측정하였다.

2. Materials & Methods

2-1. Chemicals and reagents

[³H]-Digoxin (specific activity 39.8 Ci/mmol)은 Perkin Elmer (Waltham, MA, USA)사에서 구입하였다. 방사능표지가 되지 않은 digoxin, quinidine, verapamil, Rhodamine 123는 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. DNA cloning 과정에서 competent *E.coli*를 배양하고 selection하기 위한 액체 배지와 고체 배지는 각각 BD (Franklin Lakes, NJ, USA)사에서 구입한 DifcoTM LB broth, DifcoTM LB agar를 사용하였다. LC-MS/MS로 정량적 분석에 사용하기 위하여 high-performance liquid chromatography-grade methanol과 formic acid는 각각 Fisher Scientific (Pittsburgh, PA, USA)사와 Fluka (Cambridge, MA, USA)사에서 구입하였다.

2-2. Cell lines and cultures

실험에 사용한 cell은 wild type MDCKII (MDCKII/WT) cell line이다. (passage number 62 to 77) (European Collection of Authenticated Cell Culture, Salisbury, UK). 음성 대조군 (negative control)으로 사용한 cell line인 mock cell (MDCKII/pCMV6-AC)은 MDCKII/WT cell에 공백터인 pCMV6-AC plasmid를 직접 transfection하여 사용하였다. 양성 대조군 (positive control)으로 사용한 cell line은 human ABCB1 cell은

Netherlands cancer institute (Amsterdam, Netherlands)로부터 공여 받은 것을 사용하였고, 본 연구의 실험에 사용하기 전에 예비실험에서 efflux function을 잘 나타내는 것을 확인하였다. 위의 모든 cell line들은 10% fetal bovine serum (Welgene Inc., Daegu, Korea), 1% nonessential amino acid용액, 100 units/mL penicillin, 그리고 0.1mg/mL streptomycin가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (low glucose) (Welgene Inc., Daegu, Korea)에서 culture하였고, 위의 조성으로 만든 배지 하에서 37°C의 온도와 5% CO₂ 기체조성이 유지되는 cell incubator에서 배양하였다. 모든 cell culture 조건은 이전에 출간된 논문 내용을 참고하였다. (Lee et al., 2015; Hyung et al., 2017; Yim et al., 2017; Song et al., 2018)

2-3. Site-directed mutagenesis (SDM)

Rat Abcb1a CDS의 cryptic promoter의 발현을 억제하기 위해서 site-directed mutagenesis로 c.307A>C mutation을 도입하였다. Template plasmid는 Origene (Rockville, MD, USA)사에서 구입한 Abcb1a Rat Tagged ORF Clone이다. 그리고 SDM을 위한 Quikchange XL Site-Directed Mutagenesis Kit는 Agilent (Santa Clara, CA, USA)사에서 구입하였다. mutagenesis를 위한 forward primer와 reverse primer는 각각 [표 2]와 같이 사용하였다.

SDM은 50 µL의 반응 혼합물 (10x reaction buffer 5 µL, 20ng template plasmid DNA, 125ng forward primer, 125ng reverse primer, 1 µL dNTP mix, 1 µL QuikSolution reagent를 넣고 나머지를 PCR water

로 채워서 전체 부피가 50 μ L가 되게 함)을 넣고, 마지막으로 Quik Lightning Enzyme 1 μ L를 섞어준 뒤 PCR을 진행했다. PCR조건은 denaturation (95°C, 2min) - PCR cycle (18cycle; 95°C 20s, 60°C 10s, 68°C 5min) - termination (68°C, 5min)으로 설정하였다. PCR이 끝나면 Dpn I enzyme 2 μ L를 넣어주고 37°C에서 5min간 기존 template DNA를 분해시켰다.

위의 과정을 거쳐서 cloning한 plasmid DNA (c.307A>C)의 competent cell 내로의 transformation을 시도하였다. Competent cell은 kit에 포함된 XL10-Gold ultracompetent cell을 사용하였다. Transformation 효율을 높이기 위해서 45 μ L의 competent cell에 2 μ L의 beta-mercaptoethanol을 섞어주고, 여기에 2 μ L의 Dpn I - treated DNA (c.307A>C)를 넣어주고 30분간 ice incubation 했다. 그 다음으로 42°C water에서 30초 동안 heat shock으로 transformation을 하였다.

이후에 충분한 양의 plasmid를 얻기 위하여 liquid culture를 하였다. Heat shock이 끝난 *E.coli*에 LB broth media 0.5 mL를 가하여 shaking incubator 200rpm, 37°C에서 1시간동안 liquid culture하였다. 끝으로, 배양된 *E.coli*를 100 μ g/mL ampicillin이 포함된 LB agar plate에 spreading하였다. 이를 overnight배양 하고나서 다음 날 colony가 생기는지를 관찰하였다.

2-4. DNA purification (miniprep, midiprep), sequencing

Miniprep은 Cosmogenetech (Seoul, Korea)사에서 구입한 LaboPassTM Plasmid Mini를 사용하였고, midiprep은 Bioneer (Daejeon,

Korea)사에서 구입한 Accuprep[®] Nano-Plus Plasmid Midi Extraction Kit를 사용하였다. 먼저 sequencing을 위한 DNA를 추출하기 위해 miniprep을 하였다. 실험과정은 제조사의 프로토콜에 따랐다. [그림 6]에서는 본 연구에 사용한 rat Abcb1a에 대한 plasmid map을 나타낸 것이다. Sequencing은 Cosmogenetech (Seoul, Korea)사에 의뢰하였고, 분석된 염기서열을 NIH (National Institutes of Health)의 NCBI의 *rattus norvegicus* Abcb1a reference 서열과 비교하였다. Miniprep 이후 sequencing은 T7 promoter에서 700-1000bp를 읽어서 reference 서열과 비교하였다. Midiprep 이후에는 ORF full sequencing을 통해 mutation 발생 유무를 판단하였다.

2-5. Transfection

Cloning한 plasmid DNA를 MDCKII cell에 발현시키기 위해 transfection을 했다. 사용한 시약은 FuGENE[®] HD Transfection Reagent (Promega, Madison, WI)으로, 제조사의 프로토콜에 따랐다. 간단하게 정리하면, 실험 하루 전날 100mm cell culture dish에 seeding해주었다. 다음날 confluency가 70%에서 80%가 되었을 때 DPBS로 한번 washing해주고, 새로운 DMEM media 10mL를 가해주었다. Fugene HD 60 μ L와 Opti-MEM (Rockville, Maryland, USA) 600 μ L를 mix해주고, 이것을 600 μ L 혼합액 (24 μ g에 해당하는 DNA를 넣고 나머지를 Opti-MEM으로 채워서 총 부피가 600 μ L가 되게 함)과 섞어주고, 이것을 cell culture media에 골고루 섞어주었다. 48시간 이후부터는 성공적으로 transfection 된 세포들만 골라내기 위해서 500 μ g/mL의 geneticin

이 포함된 DMEM media로 subculture 해주었다. 그 다음 실험에서도 계속 geneticin이 포함된 media를 사용하였다.

2-6. Reverse transcription (RT-PCR)

Transfection 48시간 후에, pooled population 단계에서 rat *Abcb1a* mRNA가 잘 발현되는지 확인하기 위해서 RT-PCR을 진행하였다. 먼저 PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용해서 total RNA를 뽑아내었다. 그 다음으로, PrimeScript RT-PCR kit (Takara, Japan)를 사용해서 역전사를 진행하였다. 역전사는 제조사의 프로토콜에 따랐다. 10 µL의 반응 혼합물 (i.e., 5 µg에 해당하는 total RNA, 2 µL of 5X PrimeScript Buffer, 0.5 µL of PrimeScript RT Enzyme Mix I, 0.5 µL of Random hexamers, 나머지를 PCR water로 채워서 전체 부피가 10 µL가 되게 함)을 37°C로 15 min - 85°C로 5 s - 4°C로 infinite terminate 시켰다.

DNA polymerase가 포함된 시약은 2X TOPsimple DyeMIX-nTaq (Enzynomics, Daejeon, Korea)을 사용하였다. PCR을 위한 forward와 reverse primer는 amplicon의 길이가 315bp, 1350bp, 2108bp, 3256bp가 되도록 네 가지 세트로 만들었다. 각각에 사용한 primer를 정리하면 [표 3]과 같다. 총 20 µL의 혼합 용액에 대하여 (i.e., 10 µL of 2X TOPsimple DyeMIX-nTaq, 1 µL of 5 pmole/µL forward primer, 1 µL of 5 pmole/µL reverse primer, 500 ng of template DNA, 나머지를 PCR water로 채워서 총 부피가 20 µL가 되게 함) 95°C, 2min - 30 cycle (95°C, 30 s - 52°C, 30 s - 72°C, 30 s) - 72°C, 5min - 4°C

infinite로 PCR을 실시하였다.

2-7. single cell selection

동일한 과정으로 transfection을 하더라도 각 single cell들마다 transfection의 효율이 다를 수 있다 (Homann S et al., 2017). 그렇기 때문에 efflux function study에 앞서서 가장 transfection이 효율적으로 된 단일 cell을 골라내는 것이 필요하다. 이를 위하여 96well plate에 각 well당 1개의 cell을 seeding하였다. Cell culture media는 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ geneticin이 포함된 DMEM low glucose media를 사용하였고, 매일 광학 현미경으로 관찰하여 하나의 cell에서 유래한 cell이 seeding된 well만 2 주 동안 subculture해주었다.

2-8. Rho123 exclusion assay

Single cell을 96well plate에서 2주간 배양한 후, 24well plate에 transfer한 후에 confluency가 70% 이상이 될 때까지 배양하였다. 24well plate에는 서로 다른 cell에 대하여 n=1로 seeding하였다. Exclusion assay의 기질로는 형광물질이자 Abcb1a의 기질인 Rhodamine 123을 6 μM 의 농도로 사용하였고, Abcb1a의 저해제로는 verapamil을 200 μM 의 농도로 사용하였다. Verapamil의 IC_{50} 은 17.3 μM 인데, 200 μM 의 농도에서는 모든 Abcb1a transporter가 inhibition될 것이라고 생각하였다. 실험에 앞서 transport media (i.e. TM, 1L ddH₂O + HBSS 9.8g + HEPES

2.3844g + sodium bicarbonate 0.3474g + glucose 1.9508g)로 2번 washing 해주었다. 다음으로 30분간 약물과 저해제를 co-incubation 했다. 30분이 지나면 차가운 DPBS로 2번 washing 해준 뒤에 각 well에 200 μ L씩 0.2N 농도의 NaOH를 넣어주고, plate를 알루미늄 호일로 감싸준 뒤에 shaker에서 4시간동안 lysis를 시켜주었다. 그 후에, 세포 수의 보정을 위하여 25 μ L씩 96well plate에 옮겨서 BCA assay를 진행하였고, 따로 100 μ L씩 96well black plate (SPL, Pocheon, Korea)에 옮겨서 plate reader로 excitation 파장 497nm, emission 파장 526nm에서 형광의 양을 측정하였다. 각 well당 측정된 형광의 양을 BCA assay 결과로 보정해주었고, 다음과 같은 식을 통해서 relative inhibition ratio (RIR)를 계산하였다.

$$RIR = \frac{\text{fluorescence}(S+I)}{\text{fluorescence}(S)}$$

위 식의 분자는 기질인 Rho 123와 저해제인 verapamil을 함께 가해주었을 때의 형광세기, 분모는 Rho 123만 가해주었을 때의 형광세기이다. RIR값이 큰 세포주는 rat Abcb1a의 발현량이 높을 것으로 추정하였다.

2-9. Western blot analysis

Rat Abcb1a가 MDCKII cell에서 단백질 수준에서 잘 발현되는지 확인하고자 western blot 실험을 진행하였다. 먼저 6 well plate의 confluency가 70%정도가 될 때까지 500 μ g/mL geneticin이 포함된 cell culture

media에서 cell을 culture해주었다. 이후에 모든 cell을 trypsinization하고 1000 rpm에서 3분간 cell pellet을 얻어내었다. 이것을 1 mL의 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) (Gyungsan, Korea)으로 resuspend시켜서 microcentrifuge tube로 transfer하였다. 이것을 다시 1000 rpm으로 3분간 centrifuge한 뒤, 상층액을 suction하고 하층의 pellet을 -80°C deep freezer에 보관하였다.

다음 날, deep freezer에서 cell pellet을 꺼내어 protease inhibitor (Complete[®]; Roche, IN, USA)가 포함된 lysis buffer를 처리하였다. 이것을 4°C, 10000g로 10분간 centrifuge한 이후에 상층액을 분리해서 BCA assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA)로 단백질 양을 정량하였다. 이는 실험에 앞서서 house-keeping gene의 양을 일정하게 정량하기 위함이다. House-keeping gene으로는 β -actin을 정량하였다.

위의 BCA assay 결과를 참고해서 동일한 양의 단백질 (25 μ g)에 해당하는 부피(μ L)를 정량한 뒤에 10%(v/v) beta-mercaptoethanol (Bio-Rad, Hercules, CA)가 포함된 Laemmli buffer (Laemmli, 1970)와 섞어주고 상온에서 1시간동안 incubation하여 단백질을 denaturation 시켰다.

샘플을 검출하기 위한 1차 항체로, anti-Myc antibody (Cell signaling, USA; dilution 1:1000, 5% skim milk in TPBS)를 사용하였고 house-keeping gene을 검출하기 위한 1차 항체로 anti- β -actin antibody (Cell signaling, USA; dilution 1:1000, 5% skim milk in TPBS)를 사용하였다. 1차 항체를 overnight 반응 처리해준 후에 HRP가 conjugate된 2차 항체 (anti-mouse or anti-rabbit Ig-G-HRP, Thermo Fisher Scientific, USA)를 처리해주었다. 항체가 부착된 단백질 밴드를 시각화하기 위해서 광화학물질 (Supersignal Femto, Pico reagents for the

detection of Myc tag and β -actin)을 처리해준 뒤, ImageQuantTM LAS4000 기기 (GE healthcare, NJ, USA)로 밴드를 분석하였다.

2-10. LC-MS/MS validation of quinidine

구축한 Abcb1a cell 실험계가 efflux function을 잘 나타내는지 확인하고자 Abcb1a의 기질을 이용한 efflux function test를 할 필요가 있다. 본 연구에서는 Abcb1a의 기질인 quinidine과 digoxin을 이용해서 function study를 진행했다. 그러나 digoxin의 경우, Abcb1a의 잘 알려진 기질이지만 LC-MS/MS로 분석이 가능한 peak가 검출되지 않았다. 그래서 digoxin을 수송하는 function은 [³H]-digoxin을 이용한 LSC (Liquid scintillation counting)을 통해서 분석하였다. 반면에 quinidine의 경우 LC-MS/MS를 통해서 분석할 수 있었으므로 function test에 앞서서 LC-MS/MS validation을 진행하였다. Validation guideline은 미국 FDA의 Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry (2018)를 참고했으며, linearity, specificity, lower limit of quantification (LLOQ), precision, accuracy에 대한 validation을 실시했다.

2-11. Bi-directional transport assay

Western blot analysis에서 Abcb1a 단백질 밴드가 관찰된 실험계에 대해서 efflux function을 잘 나타내는지 확인하기 위해서 bi-directional transport assay를 하였다. 본 실험에 앞서 exclusion

assay를 통해 그 기능을 평가해 보았으나, efflux transporter에 대하여 efflux ratio (ER)를 정확히 계산하는 데는 한계가 있다고 생각되었다. 그러므로 basolateral side → apical side (B to A)와 apical → basolateral (A to B)을 모두 구할 수 있는 bi-directional transport study를 통해 그 기능을 확인하였다.

MDCKII cell을 Transwell[®] filters (12mm diameter, 0.4 μm pore size; Corning, USA)에 0.5×10^6 cells/mL의 개수로 seeding했다. 그 뒤 7일-10일 정도 배양해주었다. Transport는 [³H]-digoxin이나 quinidine이 포함된 transport media (TM)를 donor compartment에 가해주는 방식으로 시작했다 (apical chamber : 500 μL, basolateral chamber : 1500 μL). 그 후 30분, 60분, 90분 후에 receiver compartment에서 샘플링을 하였다 (apical chamber : 300 μL 샘플링 후 blank TM을 동량 넣어 주었음, basolateral chamber : 500 μL 샘플링 후 blank TM을 동량 넣어 주었음). 마지막 time point인 90분에는 본 실험에 대한 recovery(%)를 계산하기 위하여 donor side의 약물도 샘플링했다. Quinidine (m/z=324.7)의 경우 acetonitrile (ACN)으로 전처리하여 분석하였다. Internal standard로는 propranolol (m/z=260.3)을 사용하였으며, 용매A : 0.1% folic acid in ACN, 용매B : 5 mM ammonium acetate in FDDW를 0.2 mL/min의 유속으로 gradient 조건 (5분 method; 0초-30초는 30%의 A, 70%의 B조건, 30초-1분30초는 70%의 A, 30%의 B조건, 1분5초-5분은 30%의 A, 70%의 B조건)으로 quinidine의 양을 정량하였다. [³H]-digoxin의 경우 그 양은 각 샘플에 scintillation fluid (Ultima Gold, Perkin Elmer, USA)를 1mL씩 가해서 liquid scintillation counting (Tri-Carb 3110 TR, Perkin Elmer, USA)로 정량하였다.

2-12. Quantitative real-time PCR (qPCR)

Rat *Abcb1a* plasmid DNA를 transfection 해주었을 때 endogenous canine *ABCB1* mRNA의 발현이 down-regulation되는지를 확인해보기 위해 qPCR 실험을 진행하였다. MDCKII/WT과 rat *Abcb1a*가 transfect된 MDCKII cell 각각에 대하여 PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용해서 total RNA를 뽑아내었다. 그 다음으로, PrimeScript RT-PCR kit (Takara, Japan)를 사용해서 역전사를 진행하였다. 마지막으로 StepOnePlus™ Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 사용해서 TOPreal™ qPCR 2xPreMIX with SYBR Green (Enzynomics, Korea)과의 반응을 통한 정량을 했다. Target mRNA의 표준화를 위해서 canine *GAPDH*의 발현량을 동시에 분석하였다.

Thermocycling은 15 μ L의 반응 혼합물 (i.e., 7.5 μ L SYBR Green premix, 0.1 μ L of forward and reverse primers (최종 농도 0.1 μ M), 6.3 μ L of PCR grade water, and 1 μ L target cDNA)에 대하여 진행하였다. Canine *ABCB1*에 대한 forward와 reverse primer는 각각 5'-GCA CAG TTG TTC AGC TCC TAG-3', 5'-TAG GCA ATG TTC TCG GCA ATG-3'으로 design하였고, rat *Abcb1a*에 대한 forward와 reverse primer는 각각 5'-CGT TGC CTA CAT CCA GGT TT-3', 5'-TAG GCT GGT TTG ACG TGC AT-3'으로 design하였다. 그리고 canine *GAPDH*에 대한 forward와 reverse primer는 각각 5'-ATT CCA CGG CAC AGT CAA G-3', 5'-TAC TCA GCA CCA GCA TCA CC-3'로 design하였다. (Kuteykin-Teplyakov et al., 2010)

반응 조건은 initiation (10min at 95°C), amplification (50cycle; 95°C

for 10 s, 60°C for 15 s, 그리고 72°C for 30 s), final melting step (95°C for 15 s로 진행하였다.

3. Results

Site-directed mutagenesis로 c.307A>C mutation을 도입한 rat *Abcb1a* plasmid DNA를 competent cell인 XL10-Gold *E.coli*에 성공적으로 도입하였다. 관찰된 *E.coli*의 colony를 얻어내서 T7 promoter부터 sequencing한 일부 서열이 rat *Abcb1a* 서열로 판명되어 plasmid의 ORF 부분에 대하여 full sequencing을 진행한 결과 [그림 7]과 같이 reference 서열과 99.97% 일치하는 서열이 나왔다.

다음으로는 전체 서열 중에서 mutation이 있는지 확인하기 위해서 NIH의 NCBI가 제공하는 rat *Abcb1a* reference 서열과 align하였다. 그 결과, 인위적으로 도입한 mutation인 [그림 8]의 c.307A>C mutation을 제외한 다른 mutation은 발견되지 않았다.

Transfection 48시간 후의 pooled population에 대한 RT-PCR 밴드는 [그림 9]과 같이 가장 짧은 350bp부터 가장 긴 3256bp까지 모든 크기에서 관찰되었다.

96well plate에 단일세포를 seeding하고난 후, transfection의 효율이 가장 높은 단일세포주를 스크리닝하기 위해서 형광물질이자 *Abcb1a*의 기질인 Rho 123을 이용한 exclusion assay를 시행한 결과는 [그림 10]과 같다. 1번부터 32번의 서로 다른 단일세포주 중에서 1, 4, 10, 14, 20, 23, 25, 27번 세포가 높은 RIR값을 보여서 이들 8개의 서로 다른 단일세포주

만 골라내서 6well plate에 옮겨서 배양하였고, 이것을 harvest하여 western blot analysis를 하였다. 그 결과는 [그림 11]과 같다. House-keeping gene으로 사용한 β -actin 밴드는 모든 세포주에서 잘 관찰되었으며, anti-Myc 밴드는 실험군 중에서 23번 단일세포주에서만 관찰되었다.

LC-MS/MS를 이용해서 TM 내에서 quinidine 양의 정량에 대한 validation을 했다. [표 4]와 같이 linearity에 대한 validation을 하였으며, [표 5]와 같이 specificity와 LLOQ에 대한 validation을 하였고, [표 6]와 같이 precision과 accuracy에 대한 validation을 하였다.

Western blot analysis에서 rat Abcb1a의 밴드가 관찰된 23번 단일세포주에 대해서 bi-directional transport assay를 했다. 그 결과는 [그림 12]와 [그림 13]과 같다. 먼저 [그림 12]는 quinidine을 기질로 했을 때의 결과이다. B to A transport와 A to B transport 된 약물의 양을 정량해서, 이를 바탕으로 efflux ratio (ER) 값을 계산하였다. 그 값은 [그림 12]의 왼쪽부터 차례대로 7.154 / 1.114 / 8.121 / 0.953 / 1.044 / 1.137로 계산되었다. [그림 13]은 [^3H]-Digoxin을 기질로 했을 때의 결과이다. ER 값은 [그림 13]의 왼쪽부터 차례대로 37.269 / 3.756 / 59.079 / 3.689 / 20.153 / 3.819로 계산되었다.

Rat Abcb1a를 MDCKII 세포에 발현 시켰을 때 endogenous canine ABCB1이 down-regulation 되는지 확인하기 위해서 qPCR로 canine *ABCB1* mRNA의 양을 측정하였다. 그 결과는 [그림 14]와 같다. Rat Abcb1a를 발현시킨 세포주에서 어느 정도 canine ABCB1의 발현량이 감소했지만, 그 정도가 오차범위 이내였다.

4. Discussion

본 연구는 rat *Abcb1a*를 발현시키는 MDCKII cell line을 구축하는 것을 목표로 하였다. Cloning 과정에서 rat *Abcb1a*의 cryptic promoter가 원인으로 추정되는 competent cell의 사멸이 발생했고, cryptic promoter의 발현을 억제하기 위해서 c.307A>C mutation을 도입했다. 이 방법으로 rat *Abcb1a* 서열이 포함된 타겟 플라스미드를 충분한 양으로 증폭시킬 수 있었다. 이것을 MDCKII cell에 발현시켜서 차례로 RT-PCR, western blot analysis, bi-directional transport assay를 하였다. RT-PCR 결과 mRNA level에서 rat *Abcb1a*가 잘 발현됨을 확인하였다. 다음으로 western blot analysis에서 rat *Abcb1a*에 해당하는 크기에서 단백질 밴드가 관찰되었고, 이를 통해 protein level에서 rat *Abcb1a*가 잘 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 마지막으로 실험계의 efflux function을 확인하고자 bi-directional transport assay를 하였다. 이 결과 mock에 비해 우월한 efflux ratio를 보였기 때문에 이를 rat *Abcb1a* - overexpressing MDCKII 세포 실험계로 활용할 수 있다고 생각되었다.

한편, 본 연구에서 구축한 세포 실험계와 관련해서 몇 가지 고려할 점이 있다. 첫 번째로, rat *Abcb1a*의 아미노산 하나가 바뀐다는 점이다. 본 연구에서는 *Abcb1a*의 cryptic promoter를 억제하고자 c.307A>C mutation을 도입하였다. 그러나 이 경우 CDS의 103번 아미노산이 Met에서 Leu으로 변화한다는 문제가 발생한다. 하나의 아미노산이라도 transporter의 기능에 영향을 미칠 수 있기에, 이 문제를 보완하기 위해서 transporter의 3D 단백질 구조에서 mutation이 일어난 아미노산의 위치가 drug binding pocket 부근인지 확인하거나, CRISPR/Cas9 실험으로 cell 수준에서 다시 307번 염기서열을 cytosine에서 adenine으로 되돌릴

수 있을지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이라고 생각된다. 두 번째로, Myc과 ddk tag의 efflux function에 대한 영향이다. Ranjodh Sandhu et al. (2019)에 따르면 단백질에 부착된 tag는 단백질의 기능에 영향을 줄 가능성이 있다고 알려져 있다. 본 연구의 rat Abcb1a의 크기는 170kDa로 비교적 큰 편인 데 비하여, Myc tag는 아미노산 10개, ddk tag는 아미노산 8개의 작은 편이라 transporter의 기능에 영향을 미치지 않을 것으로 생각되나, 이와 관련해서도 추가 연구가 보완되면 좋을 것 같다.

5. Conclusion

본 연구에서는 rat *Abcb1a*를 발현시키는 MDCK II *in vitro* 실험계를 구축하였다. c.307A>C mutation 도입을 통해 rat *Abcb1a* cloning의 주요 난관으로 작용했던 cryptic promoter를 억제하여 성공적으로 rat *Abcb1a*를 증폭할 수 있었다. 완성한 세포 실험계는 mRNA와 단백질 단계에서 rat *Abcb1a*를 잘 발현하고 있다는 것을 확인하였고, function study에서는 mock cell에 비하여 기능적으로 우월한 efflux function을 나타내는 것을 확인하였다. 본 연구에서 구축한 rat *Abcb1a* expressing MDCKII cell을 PK연구에 이용하면, 특정 신약후보물질의 p-gp에 대한 기질성 및 걸보기 투과성 (P_{app})을 구할 수 있는데 사용할 수 있을 것이라고 생각된다. 그리고 K_m , V_{max} 와 같은 *in vitro* PK parameter를 도출하여 *in vivo* 생리학적 체내동태모델링에 유용하게 사용할 수 있을 것이라고 생각된다.

Type of Abcb1	Major organ of expression
Abcb1a	Intestine, lung, liver, kidney, blood-brain barrier
Abcb1b	Adrenal, placenta, ovary, pregnant uterus

[표 1] Abcb1a와 Abcb1b가 주로 분포하는 장기

Forward primer	5'-GCTGGAGGACGAACTGACCACGTACGCC-3'
Reverse primer	5-GGCGTACGTGGTCAGTTCGTCCTCCAGC-3'

[표 2] Site-directed mutagenesis에 사용한 forward, reverse primer

분류	길이	프라이머	서열 (5'-3')
set 1	315bp	Forward	ACA AAG GGA CTC AGC TGT CG
		Reverse	CAG CGT GCA CAC TGA CCA TG
set 2	1350bp	Forward	AAG GGG CTA CAG GGT CTA GG
		Reverse	CAG CCT GCA CAC TGA CCA TG
set 3	2108bp	Forward	GTT TCG CTA TGC AGG TTG GC
		Reverse	GCT GGA TTT CAG GGG TGT CA
set 4	3256bp	Forward	TAG GCT GGT TTG ACG TGC AT
		Reverse	ACC ACG ATC AAG TCT GCG TT

[표 3] RT-PCR에 사용한 primer set

Run	in transport media (TM)		
	Slope	Intercept	R
1	0.998	2.1107	0.9997
2	0.999	-0.0148	0.9998
3	0.989	5.4099	0.9997
Mean	0.995	2.5019	0.9997
CV (%)	0.55		

[表 4] Calibration curves for quinidine in transport media (TM)

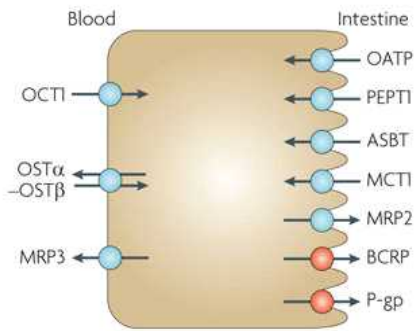
MATRIX LOT	DB	ZB	Response (Peak Area)		
			LLOQ (20 nM)	MQC (500 nM)	HQC (1500 nM)
1	0	0	19.7	401	1480
2	0	0	17.9	489	1460
3	0	0	20.5	482	1480
4	0	0	18.2	512	1480
5	0	0	20.6	486	1520
6	0	0	20.8	507	1530
Mean	0	0	19.6	480	1492
CV (%)	0	0	6.49	8.40	1.82

[표 5] The specificity of quinidine in transport media (TM)

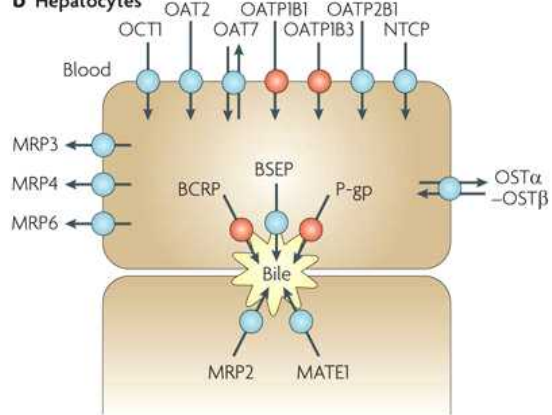
	Theoretical concentration (nM)						
	20	50	100	200	500	1000	2000
Mean estimated concentration	19	52	96	208	494	1006	1990
Precision (CV,%)	1.1	6.4	1.9	6.1	0.5	2.4	1.0
Accuracy (%)	2.8	3.4	3.7	3.8	1.2	0.6	0.6

[表 6] Precision and accuracy for quinidine in transport media (TM)

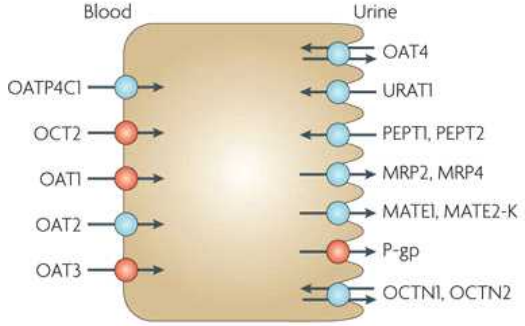
a Intestinal epithelia



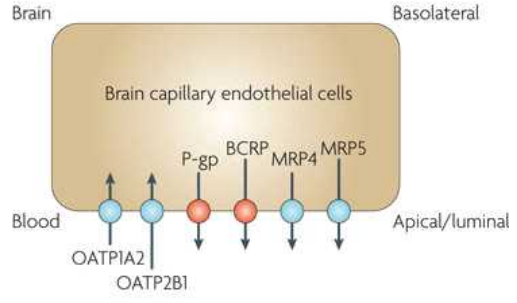
b Hepatocytes



c Kidney proximal tubules



d Blood-brain barrier

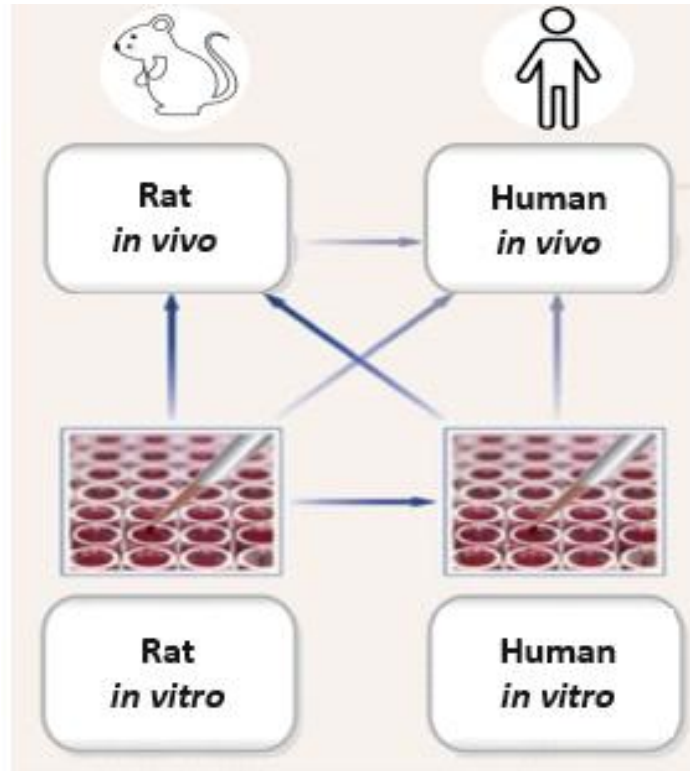


[그림 1] 주요 장기에 존재하는 여러 약물 수송체들. (Giacomini et al. 2010)

Several transporters interact with drugs in clinical use (Giacomini, Huang, et al. 2010; Giacomini and Huang 2013), for example:

- P-glycoprotein (P-gp or Multi-drug Resistance 1 (MDR1) protein)
- Breast cancer resistance protein (BCRP)
- Organic anion transporting polypeptide 1B1/1B3 (OATP1B1/OATP1B3)
- Organic anion transporter 1/3 (OAT1/OAT3)
- Multidrug and toxin extrusion (MATE) proteins (MATE1/MATE2-K)
- Organic cation transporter 2 (OCT2)

[그림 2] 신약후보물질의 DDI를 연구할 때 중요한 영향을 끼치는 transporter들



[그림 3] rat에서의 model을 구축하면 human in vivo PK data를 예측하는데 활용할 수 있다.

(A)

Mouse *Abcb1a* sequence

5' – AAACTGGAGGAAAGAATGACCACGTAC – 3'

Shine-Dalgarno
(309-314)

Start Codon
(319-321)

(B)

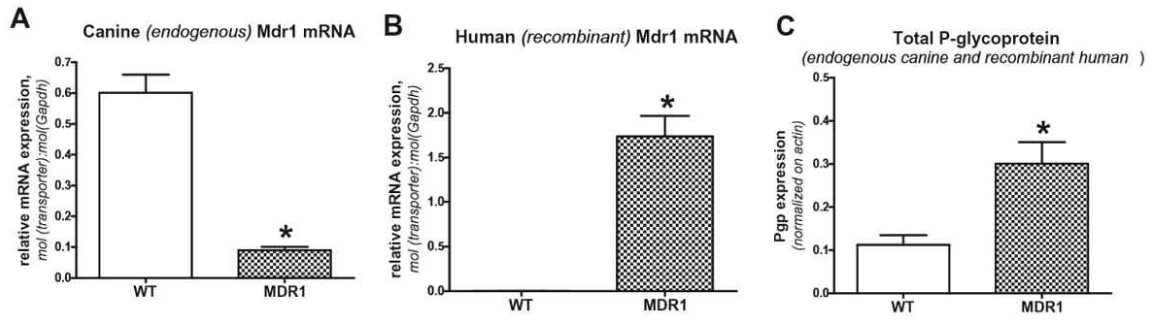
Rat *Abcb1a* sequence

5' – AAGCTGGAGGACGAAATGACCACGTA – 3'

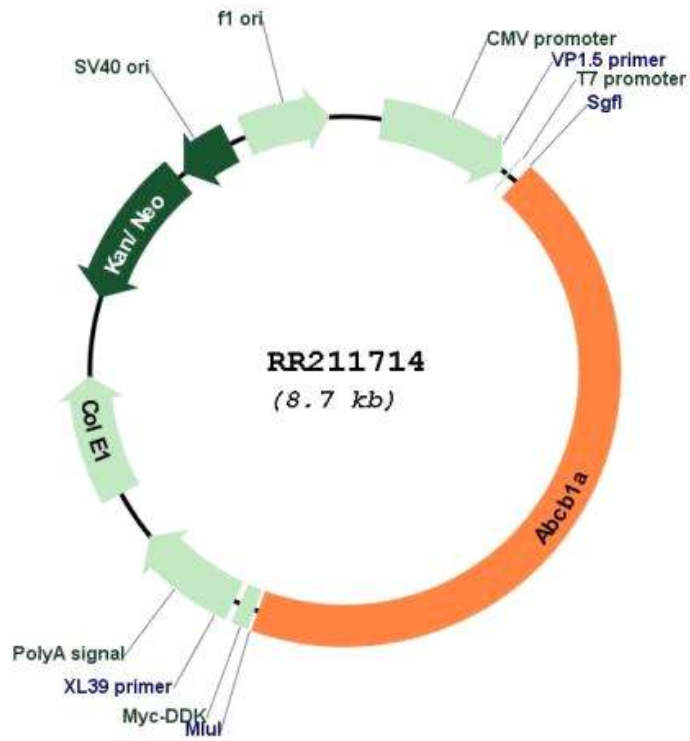
Shine-Dalgarno
(297-302)

Start Codon
(307-309)

[그림 4] (A) Mouse *Abcb1a* 서열상의 cryptic promoter의 위치 (Pluchino et al., 2015), (B) Rat *Abcb1a* 서열에서 예측되어지는 cryptic promoter의 위치.



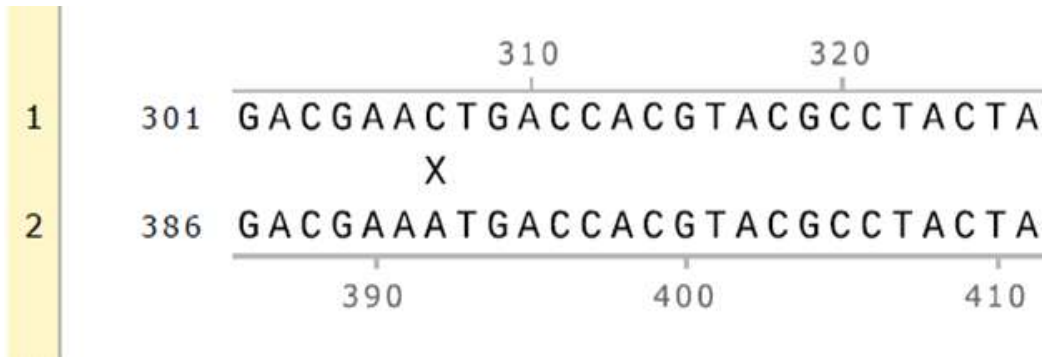
[그림 5] endogenous p-gp의 down-regulation (KK-TePLYakov et al., 2010)



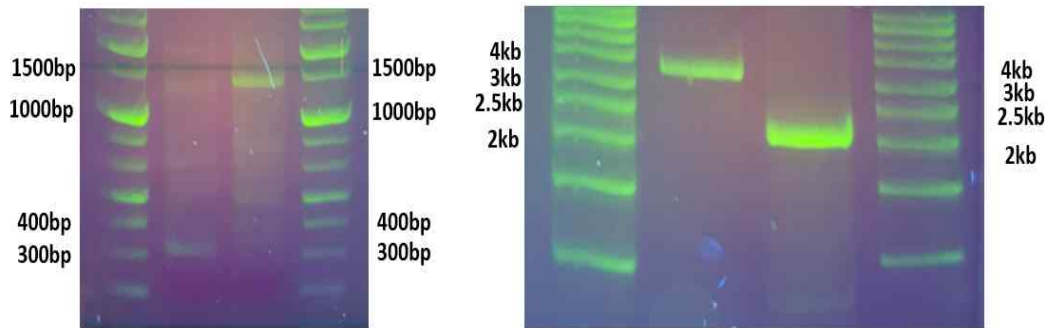
[그림 6] 실험에 사용한 plasmid map (Origene®)

Description	Query Cover	E value	Per. Ident
Rattus norvegicus ATP binding cassette subfamily B member 1A (Abcb1a), mRNA	99%	0.0	<u>99.97%</u>

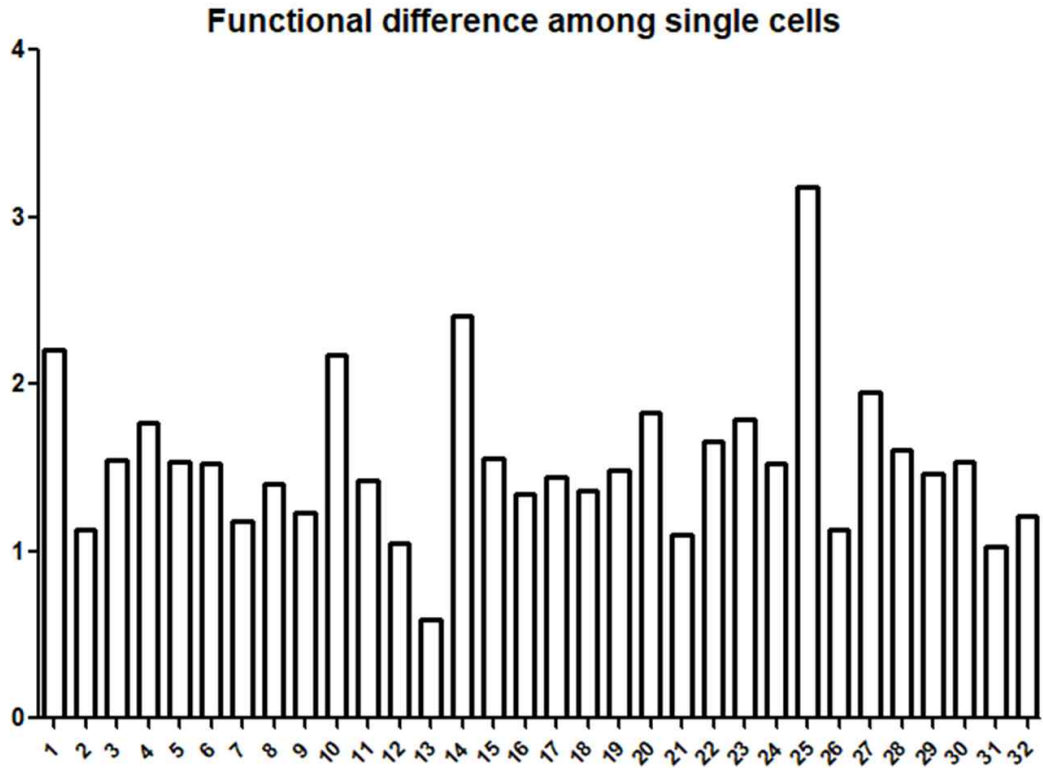
[그림 7] SDM 후 full sequencing 결과



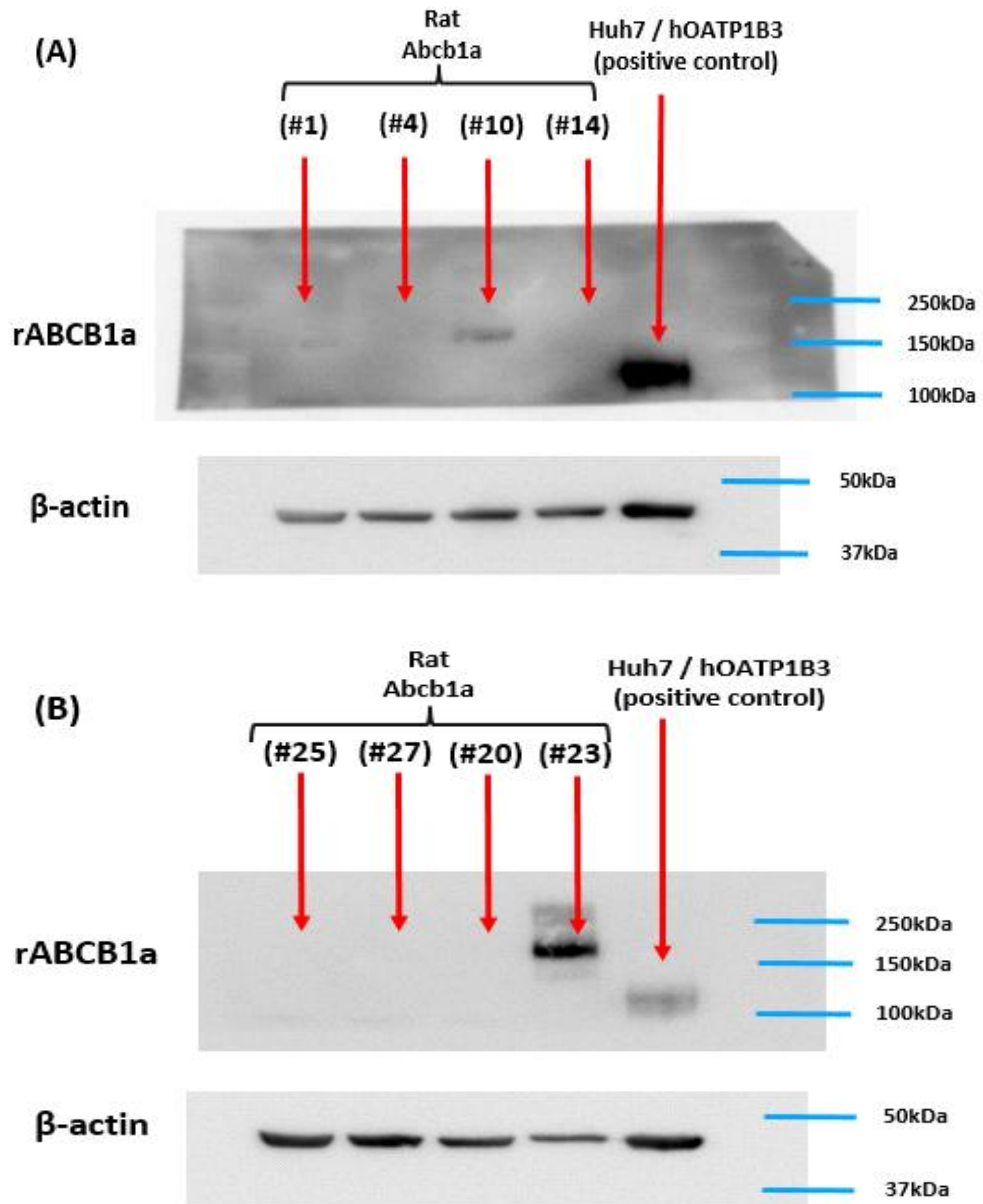
[그림 8] Full sequencing에서 확인 된 c.307A>C mutation



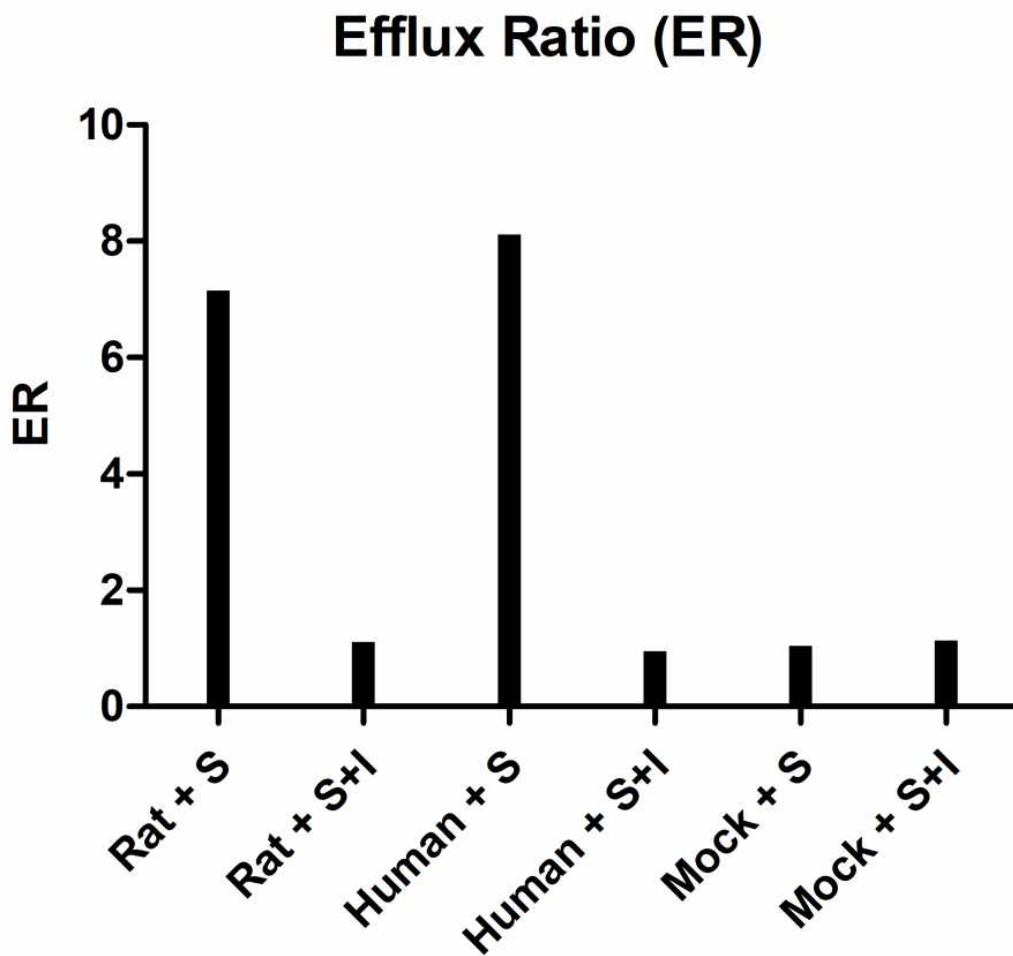
[그림 9] Transfection 후 pooled population에서 RT-PCR 밴드 (왼쪽 밴드부터 차례로 350bp, 1350bp, 3256bp, 2108bp)



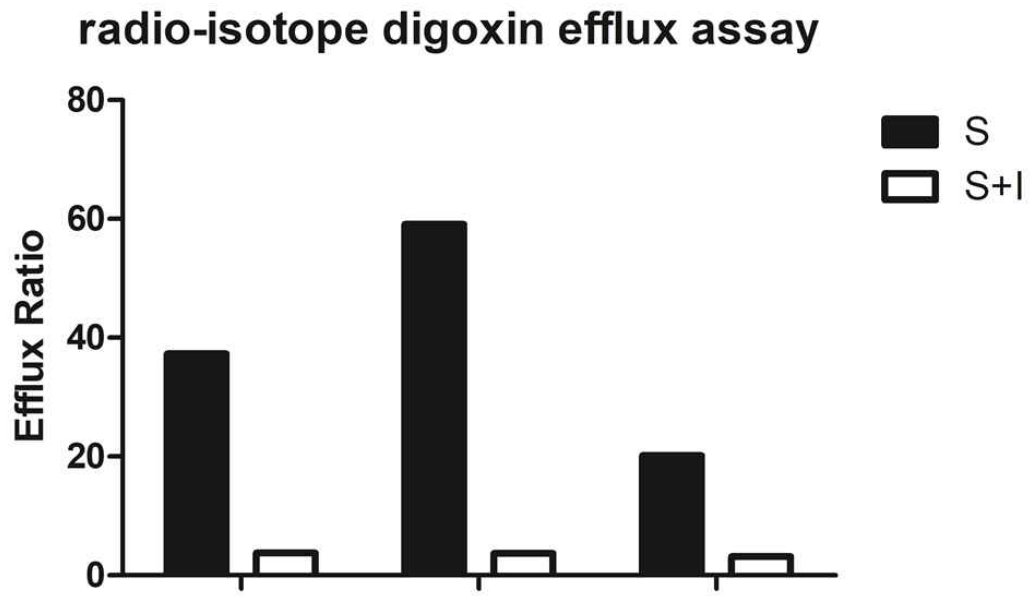
[그림 10] Rho 123을 이용한 exclusion assay로 측정된 RIR (Relative inhibition ratio) 값



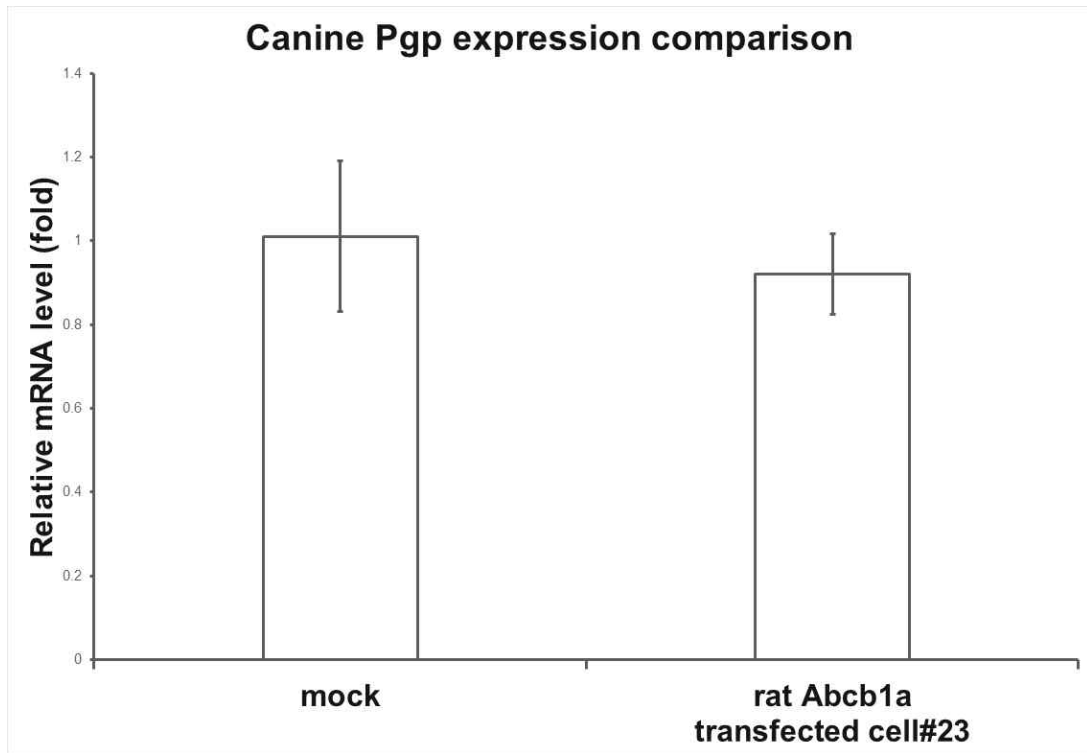
[그림 11] (A) 왼쪽부터 각각 anti-Myc과 anti- β -actin으로 분석한 1, 4, 10, 14번 단일세포주, Huh7/hOATP1B3 세포주 (양성대조군). (B) 왼쪽부터 각각 anti-Myc과 anti- β -actin으로 분석한 25, 27, 20, 23번 단일세포주, Huh7/hOATP1B3 세포주.



[그림 12] Bi-directional transport assay를 통해 계산한 ER값 : quinidine



[그림 13] Bi-directional transport assay를 통해 계산한 ER값 :
 $[^3\text{H}]$ -Digoxin



[그림 14] canine ABCB1 mRNA 발현량을 비교한 quantitative PCR 그래프

참고 문헌

1. K M Morrissey, C C Wen, S J Johns, L Zhang, S-M Huang, K M Giacomini. The UCSF-FDA TransPortal: A public Drug Transporter Database. (2012) *Clin Pharm & Ther.* 92 5, 545-546.
2. Kathleen M Giacomini, Shiew-Mei Huang, Donald J Tweedie, Leslie Z Benet, Kim L R Brouwer, Xiaoyan Chu, Amber Dahlin, Raymond Evers, Volker Fischer, Kathleen M Hillgren, Keith A Hoffmaster, Toshihisa Ishikawa, Dietrich Keppler, Richard B Kim, Caroline A Lee, Mikko Niemi, Joseph W Polli, Yuichi Sugiyama, Peter W Swaan, Joseph A Ware, Stephen H Wright, Sook Wah Yee, Maciej J Zamek-Gliszczynski, Lei Zhang. Membrane transporters in drug development. (2010) *Nat Rev Drug Discov.* 9(3):215-36
3. M F Fromm. Prediction of transporter-mediated drug-drug interactions using endogenous compounds. (2012) *Clin Pharmacol Ther.* 2012;92(5):546-8.
4. Masashi Uchida, Yoriko Tajima, Masakazu Kakuni, Yutaka Kageyama, Taro Okada, Eri Sakurada, Chise Tateno and Ryoji Hayashi. Organic Anion - Transporting Polypeptide (OATP) - Mediated Drug-Drug Interaction Study between Rosuvastatin and Cyclosporine A in Chimeric Mice with Humanized Liver. (2018). *Drug Metabolism and Disposition.* 46(1):11-19.
5. RH Rose, S Neuhoff, K Abduljalil, M Chetty, A Rostami-Hodjegan, M Jamei. Application of a Physiologically Based Pharmacokinetic

- Model to Predict OATP1B1-Related Variability in Pharmacodynamics of Rosuvastatin. (2014). *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 3, e124.
6. FDA (2020) In Vitro Metabolism and Transporter Mediated Drug-Drug Interaction Studies : Guidance for Industry. *US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research* (CDER)
 7. Solvo Biotechnology, Preclinical/Animal Transporters:Mdr1a-rat
 8. UCSF-FDA TransPortal:ABCB1
 9. Lee JH, Noh CK, Yim CS, Jeong YS, Ahn SH, Lee W, Kim DD and Chung SJ. Kinetics of the Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Lobeglitazone, a Novel Activator of Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma in Rats. (2015) *J Pharm Sci* 104:3049-3059.
 10. Yim CS, Jeong YS, Lee SY, Pyeon W, Ryu HM, Lee JH, Lee KR, Maeng HJ and Chung SJ. Specific Inhibition of the Distribution of Lobeglitazone to the Liver by Atorvastatin in Rats: Evidence for a Rat Organic Anion Transporting Polypeptide 1B2-Mediated Interaction in Hepatic Transport. (2017). *Drug Metab Dispos* 45:246-259.
 11. Hyung SW, Jeong YS, Yeo JM, Song YK, Kim MS, Im YJ, Maeng HJ, Chung SJ. Identification of the primary determining factor(s) governing the oral absorption of edaravone in rats. (2018). *Eur J Pharm Sci.* 15;123:312-320.
 12. Song YK, Park JE, Oh YS, Hyung SW, Jeong YS, Kim MS, Lee

- WI, Chung SJ. Suppression of Canine ATP Binding Cassette ABCB1 in Mardin-Darby Canine Kidney Type II Cells Unmasks Human ABCG2-Mediated Efflux of Olaparib. (2018). *J Pharmacol Exp Ther*;368(1):79-87.
13. Jeong YS, Yim CS, Ryu HM, Noh CK, Song YK, Chung SJ. Estimation of the minimum permeability coefficient in rats for perfusion-limited tissue distribution in whole-body physiologically-based pharmacokinetics. (2017). *Eur J Pharm Biopharm.* 115:1-17.
 14. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* 227:680-685
 15. Hyung S, Pyeon W, Park JE, Song YK and Chung SJ (2017). The conditional stimulation of rat organic cation transporter 2, but not its human ortholog, by mesoridazine: the possibility of the involvement of the high affinity binding site of the transporter in the stimulation. *J Pharm Pharmacol* 69:1513-1523.
 16. Agarwal S, Sane R, Gallardo JL, Ohlfest JR and Elmquist WF (2010). Distribution of gefitinib to the brain is limited by P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2)-mediated active efflux. *J Pharmacol Exp Ther* 334:147-155.
 17. EMA (2012) Guideline on the investigation of drug interactions. EMA.
 18. Ito S, Woodland C, Sarkarkadi B, Hockmann G, Walker SE and Koren G (1999). Modeling of P-glycoprotein-involved epithelial

- drug transport in MDCK cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 277:F84-F96.
19. Jeong Y-S, Yim C-S, Ryu H-M, Noh C-K, Song Y-K and Chung S-J (2017). estimation of the minimum permeability coefficient in rats for perfusion-limited tissue distribution in whole-body physiologically-based pharmacokinetics. *Eur J Pharm Biopharm* 115:1-17.
 20. Kodaira H, Kusuhara H, Ushiki J, Fuse E and Sugiyama Y (2010). Kinetic analysis of the cooperation of P-glycoprotein (P-gp/ABCB1) and breast cancer resistance protein (Bcrp/Abcg2) in limiting the brain and testis penetration of erlotinib, flavopiridol, and mitoxantrone. *J Pharmacol Exp Ther* 333:788-796.
 21. Kuteykin-Teplyakov K, Luna-Tortos C, Ambroziak K and Loscher W (2010). Differences in the expression of endogenous efflux transporters in MDR1-transfected versus wildtype cell lines affect P-glycoprotein mediated drug transport. *Br J Pharmacol* 160:143-1463.
 22. Simoff I, Karlgren M, Backlund M, Lindstrom AC, Gaugaz FZ, Matsson P and Artursson P (2016). Complete Knockout of Endogenous Mdr1 (Abcb1) in MDCK Cells by CRISPR-Cas9. *J Pharm Sci* 105:1017-1021.
 23. Catherine L Booth-Genthe, Steven W Louie, Edward J Carlini, Bing Li, Brenda F Leake, Roy Eisenhandler, Jerome H Hochman, Qin Mei, Richard B Kim, Thomas H Rushmore, Masayo Yamazaki (2006), Development and characterization of LLC-PK1 cells

- containing Sprague-Dawley rat Abcb1a (Mdr1a): comparison of rat P-glycoprotein transport to human and mouse. *J Pharmacol Toxicol Methods* 54(1):78-89.
24. Kristen M. Pluchino, Dominic Esposito, Janna K. Moen, Matthew D. Hall, James P. Madigan, Suneet Shukla, Lauren V. Procter, Vanessa E. Wall, Thomas D. Schneider, Ian Pringle, Suresh V. Ambudkar, Deborah R. Gill, Steven C. Hyde, Michael M. Gottesman (2015). Identification of a Cryptic Bacterial Promoter in Mouse (mdr1a) P-Glycoprotein cDNA. *PLoS ONE* 10(8): e0136396.
 25. Gregory RJ, Cheng SH, Rich DP, Marshall J, Paul S, Hehir K (1990). Expression and characterization of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 347: 382-386.
 26. Schlegel S, Klepsch M, Gialama D, Wickstrom D, Slotboom DJ, de Gier JW (2010). Revolutionizing membrane protein overexpression in bacteria. *Microb Biotechnol* 3:1 403-411.
 27. Stefan Nehls, Helen Nöding, Susanne Karsch, Franziska Ries, and Andreas Janshoff (2019). Stiffness of MDCK II Cells Depends on Confluency and Cell Size. *Biophysical Journals* 116, 2204-2211.
 28. Homann S, Hofmann C, Gorin AM, Nguyen HCX, Huynh D, Hamid P (2017). A novel rapid and reproducible flow cytometric method for optimization of transfection efficiency in cells. *PLoS ONE* 12(9): e0182941.
 29. FDA (2018) Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry. *US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and*

Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM).

30. Ranjodh Sandhu, Derek Wei, Madhav Sharma, Lifeng Xu (2019). An N-terminal Flag-tag impairs TPP1 regulation of telomerase function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 512: 230–235.

Abstract

Establishment of MDCKII cells with functional expression of rat Abcb1a (p-glycoprotein) via introduction of c.307A>C mutation in the putative cryptic promoter region

Seung-Hong Lee

Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

When conducting research on drug absorption, distribution, metabolism, and excretion for new drug candidates, there are limitations to directly obtaining human *in vivo* pharmacokinetic (PK)

data, and it is difficult to recruit patients to participate in the study. This is a problem to obtain human *in vivo* PK data. However, building a pharmacokinetic model for ADME of a specific drug has the advantage of predicting *in vivo* PK data from *in vitro* PK data without direct *in vivo* experiments. For this reason, many *in vitro* studies using Caco-2 or MDCKII cells have been conducted in PK research. In addition, the US FDA defines 9 drug transporters that have a major influence on drug interactions of new drug candidates and stipulates that it is necessary to investigate whether they act as substrates or inhibitors of drug transporters in the process of drug development. In this study, the purpose of this study is to establish an experimental system for MDCKII cells expressing Abcb1a, one of these drug transporters. During the cloning process, death of competent cells, presumed to be caused by the cryptic promoter in the rat *Abcb1a* sequence, has occurred. Therefore, it was necessary to suppress the cryptic promoter, and for this, by the site-directed mutagenesis process, the c.307A>C mutation was introduced in the coding sequence of rat *Abcb1a*. In this way, it was possible to amplify the target plasmid containing the rat *Abcb1a* sequence in a sufficient amount. Next, the plasmid containing rat *Abcb1a* sequence was transfected to MDCKII cells and RT-PCR, western blot analysis, and bi-directional transport assay were sequentially performed to confirm the function. As a result of RT-PCR, it was confirmed that rat *Abcb1a* was well expressed at the mRNA level. Next, in western blot analysis, a protein band was observed at a size corresponding to

rat Abcb1a, and it was confirmed that rat Abcb1a was well expressed at the protein level. Lastly, the bi-directional transport assay performed to confirm the efflux function of the experimental system showed a superior efflux ratio compared to the mock cell, so it was considered worth using it as an experimental system for MDCKII cells expressing rat Abcb1a. If the rat Abcb1a expressing MDCKII cell system that was constructed in this study is used for PK research, it is thought that it can be used to obtain data such as substratability and apparent permeability (Papp) to p-gp of a specific new drug candidate. In addition, it is thought that *in vitro* PK parameters such as Km and Vmax can be derived and can be usefully applied to *in vivo* physiological in vivo kinetic modeling.

keywords : Abcb1a, Mdr1a, p-gp, cryptic promoter, cloning, in vivo in vitro extrapolation

Student Number : 2020-25811