



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](#)

국문초록

약물수송체(Drug transporter)는 여러 장기에 분포되어 있으며, 약물의 흡수, 분포와 배설에 크게 기여한다. 또한 약물수송체를 유도하거나 저해하는 약물상호작용(Drug-drug interaction)은 약물 대사의 변화에 중요한 역할을 한다. 이 때문에 미국 FDA는 약물상호작용에 많은 영향을 미치는 약물수송체 7가지를 선정하여, 신약개발 과정에서 후보물질이 이들 수송체의 기질 혹은 저해제로 작용하는지 조사단계가 필요하다고 명시하고 있다. 약물상호작용은 in vivo 상으로 관찰하는 것이 가장 정확하나, 비용도 많이 들뿐더러 위험하므로 그에 앞선 in vitro 실험으로 불필요한 in vivo 실험을 방지할 필요가 있다. 따라서 rat의 in vitro 약물 상호작용 평가 체계가 구축되어 있다면 rat과 human의 in vitro 자료의 상관성을 이용하여, 직접적으로 구하기 힘든 human에서의 in vivo 상호작용 결과를 예측하는데 큰 도움이 될 것으로 기대된다. 본 실험에서는 그러므로 FDA 선정 7가지 수송체 중 하나인 MDR1 (P-glycoprotein)에 해당하는 rat에서의 *mdr1a*를 cloning 하기로 하였다. Rat *mdr1a*가 많이 발현된 liver RNA로부터 Reverse transcription과 PCR(Polymerase Chain Reaction)을 통해 *mdr1a*를 coding하는 부분을 증폭시켰다. 그리고 PCR을 통해 얻은 *mdr1a* DNA를 pcDNA5/FRT vector 내로 cloning 하였다. 완성된 rat *mdr1a* clone을 MDCK II/FRT cell에 transient하게 transfection하였고, RT-PCR을 통하여 mRNA

발현을 확인하였다. 이어서 function study를 하였는데, mock cell과 mdr1a transfected MDCK II/FRT cell 간에 유의적인 function의 차이를 관찰하지 못하였다. 여러 원인이 존재할 수 있는데, 이를 보완하면 stable한 rat mdr1a-MDCK II/FRT cell line을 확보할 수 있을 것이라 생각된다. 확보한 rat mdr1a cell line은 후에 신약개발단계에서 약물상호작용 평가에 쓰일 수 있을 것으로 기대된다.

주요어 : mdr1a, cloning, 약물상호작용

학 번 : 2012-21610

목차

국문초록.....	1
1. Introduction.....	5
1.1. 약물수송체 (Drug transporter)	5
1.2. MDR1 (P-glycoprotein; ABCB1)	5
1.3. Rat mdrla.....	6
1.4. 약물상호작용 (DDI)	7
1.5. In-vitro studies.....	9
2. Materials.....	12
3. Methods.....	14
3.1. Reverse transcription (RT)	14
3.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)	15
3.3. PCR purification.....	17
3.4. Enzyme digestion and Ligation	17
3.5. Transformation.....	19
3.6. Liquid culture.....	19
3.7. Miniprep	20
3.8. Sequencing.....	20
3.9. Transient Transfection	21
3.10. RT-PCR.....	22
3.11. Function test.....	23

4. Results.....	26
5. Discussion	30
6. Reference	33
Abstract.....	35

1. Introduction

1.1. 약물수송체 (Drug transporter)

약물수송체는 체내의 여러 조직에 다양한 정도로 분포되어 있고, 약물과 같은 외인성 및 내인성 물질의 흡수(Absorption), 분포(Distribution), 배설(Excretion)에 중요한 역할을 하는 막단백질이다. 수많은 연구들에 의해서, 약물수송체는 약물의 안정성(safety)과 유효성(efficacy)에 있어서 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 따라서, 약물 개발 단계에서는 [그림1]에서 표시된 것처럼 장(intestine), 간(liver), 신장(kidney)의 상피세포, 그리고 혈액뇌장벽(blood-brain barrier)의 내피세포에 발현된 약물수송체들에 대한 자세한 관찰이 필요하다.(Giacomini, Huang et al. 2010) 총 400 개 이상의 막수송체들이 존재하는데, 이를 특성에 따라서 두 개의 superfamily로 나눌 수 있다; ATP-binding cassette(ABC), SLC(solute carrier). 약물수송체는 약물대사효소(drug metabolizing enzyme)와 더불어 약물상호작용(drug-drug interaction; DDI)의 관점에서도 중요성이 부각되고 있다.

1.2. MDR1 (P-glycoprotein; ABCB1)

P-glycoprotein (P-gp)는 ATP-binding cassette family에 속하는 transporter로서, 인간에서는 ABCB1 gene으로부터 발현된다. P-gp는

MDR1 (multidrug resistance 1)이라고도 불린다. MDR1은 efflux pump로 작용하는데(그림 2), ATP를 가수분해하여 얻어지는 에너지로 약물을 능동수송한다. 이름에서도 알 수 있듯이, MDR1은 다중약물에 내성을 나타내는 암세포에 발현되어 있고, 이 외에도 간, 신장, 소장, 뇌 등의 정상조직세포에도 발현되어 있다. MDR1은 약물의 생체내이용률(oral bioavailability), 분포(distribution), 배설(excretion)에 중요한 역할을 한다는 사실이 동물실험을 통해서 입증되었다. 수많은 약물들이 MDR1의 기질로써 수송되는데, 이들 중 다수는 또한 Cytochrome P450(CYP) 3A4의 기질이기도 하다. MDR1 기질로는 docetaxel, paclitaxel 등의 항암제와, diltiazem 등의 고혈압약, digoxin과 같은 항부정맥제 등이 있다. (Marzolini, Paus et al. 2004) 이처럼 많은 약물들을 기질로 가지고 있는 MDR1은 양친매성(amphiphilic) 물질들을 방출(efflux)시킴으로써 다수 약물의 약물동태(pharmacokinetics)와 조직 분포(tissue distribution)에 영향을 미칠 수 있다. 그러므로 예기치 않은 약물동태의 변화와, 원치 않는 임상적 결과를 확인하기 위해서 약물개발의 초기단계에서 MDR1과 약물의 상호작용은 반드시 고려되어야 한다. (Ambudkar, Kim et al. 2008)

1.3. Rat mdr1a

사람의 MDR1은 1280개의 아미노산으로 이루어져 있고, 간세포의 모세담관(liver bile canaliculi), 신장의 근위세뇨관(kidney proximal tubules)의 apical side, 대장과 소장(large and small intestine), 혈액뇌장벽(blood-brain barrier; BBB), 대뇌피질(cortex), 해마(hippocampus), 소뇌(cerebellum), 척수(spinal cord), 고환(testes), 자궁내막(endometrium)과 태반(placenta) 등에 발현이 되어 있다. (Marzolini, Paus et al. 2004) 그 반면에 rat에서는 MDR1이 mdr1a(abcb1a)와 mdr1b(abcb1b) 두 가지의 형태로 존재하며, 분포양상도 다르다. Rat에서는 심장(heart), 폐(lung), 흉선(thymus)과 비장(spleen)에는 비슷한 정도의 mdr1a와 mdr1b가 둘 다 발현되어 있다. 그러나, 장, 혈액뇌장벽(BBB)과 혈액고환장벽(blood-testes barrier; BTB)에는 mdr1a만 발현되어 있고, 부신(adrenal gland), 임신한 자궁(uterus), 난소(ovaries)에는 mdr1b만 발현되어 있다. Rat의 mdr1a gene sequence는 인간의 MDR1과 86.6%의 높은 일치율을 보이고, rat mdr1b는 인간의 MDR1과 80.4%의 일치율을 보인다. (Ambudkar, Kim et al. 2008)

1.4. 약물상호작용 (DDI)

최근 들어 약물수송체로 인한 상호작용 사례들이 보고 되면서, 특히 신약개발 단계에서 각종 약물수송체와의 약물상호작용 연구의 중요성이 커

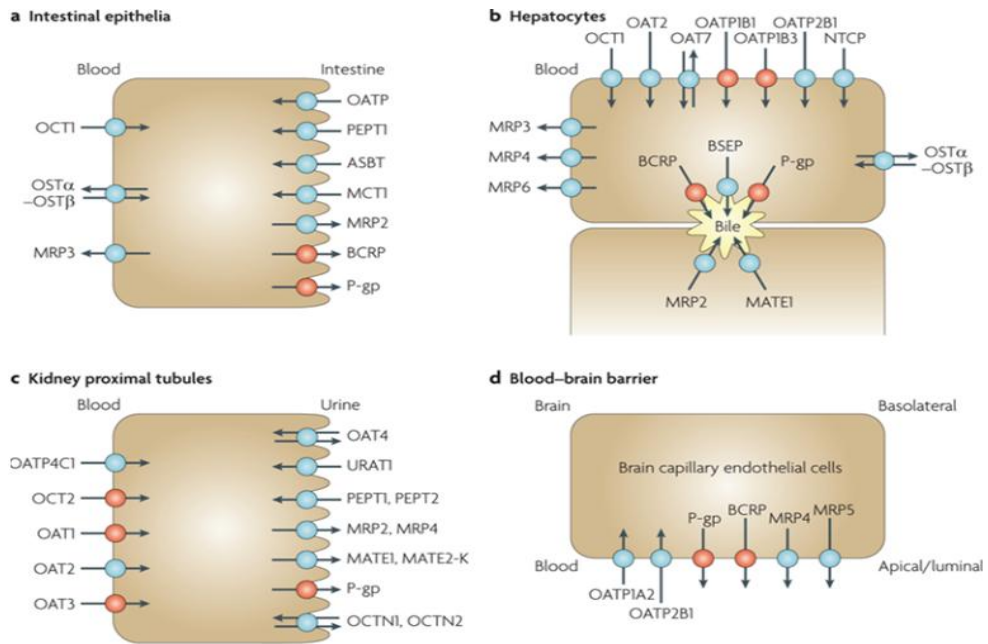
지고 있는 추세이다. 어떤 약물수송체의 저해제나 유도체로 작용하는 약물을 동일한 약물수송체의 기질로 작용하는 약물과 동시 투여 시, 기질 약물의 체내동태양상이 크게 변할 수 있다. (U.S department of Health and Human Services 2012) 예를 들어서, efflux 약물수송체인 MDR1(P-gp)는 많은 약물상호작용(DDI)에 관여한다. 강심배당체인 digoxin은 신장(kidney)에서 사구체 여과(glomerular filtration)과 능동 분비(active secretion)로 배설된다. MDR1은 Digoxin의 체내 약물 동태에 중요한 역할을 한다는 여러 연구가 보고되었다. (Kawahara, Sakata et al. 1999) 좁은 치료지수(therapeutic index)를 가지고 있는 digoxin은 심각한 부작용을 초래 할 수 있다. 그렇기 때문에 MDR1에 의한 digoxin과 다른 약물과의 상호작용은 주의 깊게 관찰되었다.(Li, Anderson et al. 2006) 항부정맥제인 quinidine은 MDR1의 저해제로 작용하여, 기질인 digoxin과 동시투여 시 [그림 3]에서 보듯이 혈중 digoxin의 농도를 2-3배 높이게 된다. 이런 경우, digoxin 중독 증상이 나타나므로 투여 시 주의를 기울여야 한다.

최근, transporter로 인한 약물상호작용(DDI)들이 관찰되면서, FDA에서는 주요하게 작용하는 transporter 7가지를 선정하여, 약물 개발 시 이들 transporter와의 작용을 자세히 관찰하도록 권고하였다. 선정된 7가지 transporter에는 SLC transporter 5가지(OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2)와 ABC transporter 2가지(p-gp, BCRP)가 있

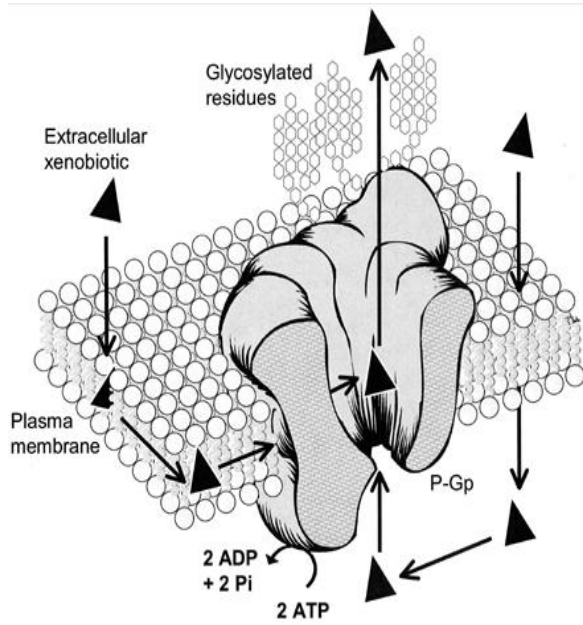
다. FDA에서는 약물 개발 시, 약물이 transporter의 기질이나 저해제로 작용하는지 조사가 필요하다고 명시했다. (U.S department of Health and Human Services 2012)

1.5. In-vitro studies

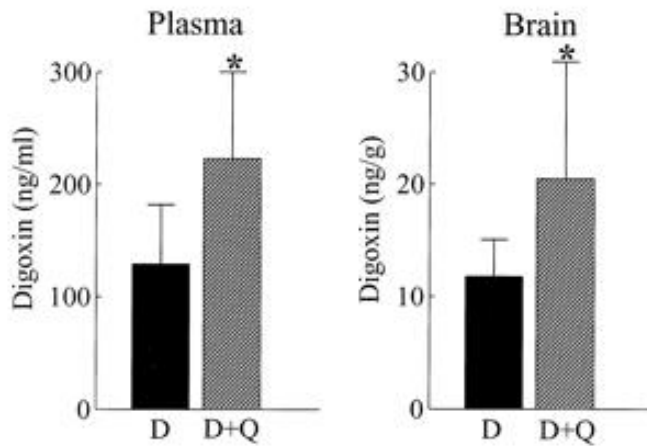
약물상호작용을 평가할 때에는 임상적인 약물동태학적 data와 함께, in vitro study 결과가 유용하게 쓰일 수 있다. In vitro study 결과는 추가적인 in vivo study를 사전에 차단하는 screening system으로 작용할 수 있고, 임상적인 실험 design의 기본을 제공하는 역할도 한다. (U.S department of Health and Human Services 2012) 그러므로, in vivo 실험에 앞선 in vitro 실험에 쓰일 transporter system의 필요성이 있다. 또한, rat의 in vitro 약물상호작용 평가 체계가 구축되어 있다면 rat과 human의 in vitro 자료의 상관성을 이용하여, 직접적으로 구하기 힘든 human에서의 in vivo 상호작용 결과를 예측하는데 큰 도움이 될 것으로 기대된다. 따라서, 본 실험에서는 FDA 선정 7가지 수송체 중 하나인 MDR1 (P-glycoprotein)에 해당하는 rat에서의 *mdr1a*를 cloning 하기로 하였다.



[그림1] 주요 장기에 분포하는 약물수용체 (Giacomini, Huang et al. 2010)



[그림2] P-gp(MDR1)의 구조와 기능 (Marzolini, Paus et al. 2004)



[그림3] Plasma와 brain에서 digoxin을 단독투여 하였을 때와 digoxin 과 quinidine 동시투여 하였을 때 농도 그래프(Fromm, Kim et al. 1999)

2. Materials

Rat liver total RNA (Takara)

Primescript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)

Ex taq polymerase (Takara)

Phusion High-Fidelity PCR Kit (Thermo Scientific)

WelPrep Gel Extraction Kit (Welgene)

WelPrep Plasmid Miniprep Kit (Welgene)

CoreOne PCR Purification Kit (Corebio)

The Original TA Cloning Kit pCR 2.1 vector (invitrogen)

pcDNA5/FRT vector (invitrogen)

10xM buffer, KpnI, XhoI (Takara)

DNA ligation mix <Mighty mix> (Takara)

E.coli HST08 Premium Competent Cells (Takara)

AbleK Competent Cells (Agilent Technologies)

SURE2 Competent Cells (Agilent Technologies)

MAX Efficiency Stbl2 Chemically Competent Cells (invitrogen)

S.O.C. media (Takara)

LB media <Tryptone 5g, NaCl 5g, Yeast extract 2.5g in 500ml, 고체

배지인 경우 agarose 첨가> (Beckton-Dickinson)

MDCK II/FRT cell

FuGENE HD DNA transfection reagent (Promega)

RNeasy Mini Kit (Quiagen)

[³H]digoxin (Perkin elmer)

Digoxin (Sigma)

Bradford reagent (Biobasic)

Transport media <Hank's Balanced Salts 9.7g, HEPES 2.38g,

Glucose 1.95g, NaHCO₃ 0.35g in 1L TM> (Sigma)

3. Methods

3.1. Reverse transcription (RT)

Rat의 *mdr1a*가 존재하는 rat liver total RNA(Takara)를 source로 하여 cDNA를 얻을 수 있는 reverse transcription 반응을 진행하였다. Primescript 1st strand cDNA Synthesis Kit(Takara)를 사용하였고, 반응에 필요한 material과 조건은 각각 아래 [표 1], [표 2]와 같다.

[표 1] Reaction mixture required for Reverse transcription(RT)

Materials		Volume ($\mu\ell$)
First step	RNase free water	6
	dT primer	1
	dNTP	1
	Rat liver total RNA	2
Second step	5X buffer	4
	inhibitor	0.5
	RTase	1
	FDDW	4.5
Total		20

[표 2] Condition of Reverse transcription (RT)

Temperature (°C)		Time(min)
First step	65	5
Ice incubation		1
Second step	42	60
	95	5

3.2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

Reverse transcription 반응으로부터 얻은 cDNA를 template로 하여 얻고자 하는 부분의 DNA만 증폭시키기 위하여 PCR반응을 진행하였다. Rat *mdr1a*의 CDS는 86번부터 3904번까지였는데, 이를 포함하도록 primer를 제작하였다. 제작 시, forward primer의 5' end에는 KpnI site를 붙였고, reverse primer의 5' end에는 XhoI site를 붙였다. PCR 반응에 사용된 primer, 반응에 필요한 materials 그리고 반응조건은 각각 아래 [표 3], [표 4], [표 5]와 같다.

PCR은 Takara의 Ex Taq를 사용하여 진행하였다.

[표 3]PCR에 사용된 primer

Primer	Sequence
Forward primer	5'-CGA <u>GGT ACC</u> GTA GAG ACA CGT GAG GTC GTG-3'
Reverse primer	5'-GTT <u>CTC GAG</u> TAA CAT CTC GCA TGG TCA CAG-3'

[표 4] PCR Reaction mixture

Materials	Volume (μ l)
RNase free water	14.15
10x buffer	2
dNTP	1.6
cDNA	1
Primer (forward/reverse)	0.5/0.5
Ex Taq polymerase	0.25
Total	20

[표 5] Condition of PCR reaction

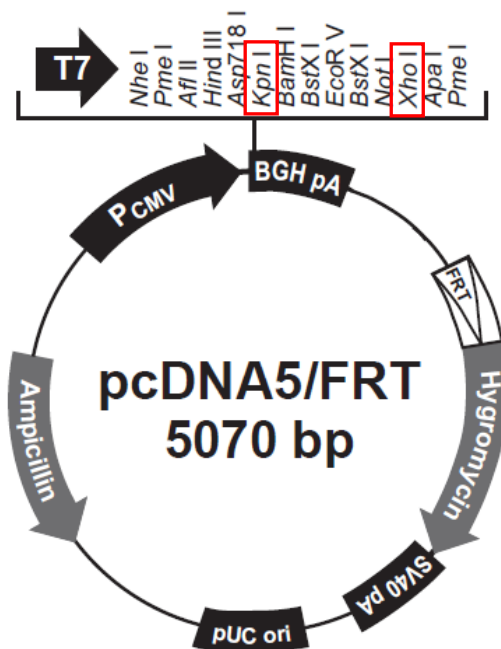
Temperature ($^{\circ}$ C)	Time	Cycles
94	5 min	1
94	30 sec	30
62	30 sec	
72	5 min	
72	10 min	1

3.3. PCR purification

PCR 반응 후 젤 전기영동을 통해서 DNA 크기를 확인하였다. 약 4000bp 정도의 band로 크기가 맞는 것을 확인하였고, PCR purification kit(Corebio)을 사용하여 불순물을 제거하고 PCR product을 높은 순도로 얻었다.

3.4. Enzyme digestion and Ligation

Purification을 거친 PCR product을 KpnI과 XhoI으로 double digestion을 하였고, pcDNA5/FRT vector(그림 4)도 마찬가지로 KpnI과 XhoI으로 double digestion을 하였다.



[그림 4] pcDNA5/FRT vector map marked with digestion sites

Double digestion 반응은 아래 [표 6]과 같은 조성으로 mixture를 만들어 37°C에서 1시간 동안 incubation을 진행하였다.

[표 6] Double digestion mixture

Materials	Volume
KpnI	1 μ l
XhoI	1 μ l
10x M buffer	2 μ l
DNA	1 μ g
FDDW	up to 20 μ l
Total	20 μ l

Double digestion을 통해 얻은 linear 한 형태의 DNA insert와 pcDNA5/FRT vector를 ligation하여 circular하게 만들었다. Ligation mixture는 아래 [표 7]과 같은 조성으로 만들어 16°C에서 2시간 동안 ligation 반응을 진행하였다.

[표 7] Ligation mixture

Materials	Amount
pcDNA5/FRT vector	25fmol = x μ l
DNA	250fmol = y μ l

Ligation mix(Takara)	(x+y) μ l
Total	Between 10 and 20 μ l

3.5. Transformation

Ligation 반응을 통하여 얻은 circular한 형태의 vector를 competent e.coli cell안으로 Transformation을 하였다. 실험에 사용한 competent cell은 invitrogen의 MAX efficiency Stbl2 chemically competent cell이었다. Transformation은 다음과 같은 순서로 진행되었다. 가장 먼저, prechilled EP tube에 Stbl2 competent cell 30 μ l와 ligation mix 10 μ l을 넣고 얼음상에서 30분간 incubation을 하였다. 이 후, 42 $^{\circ}$ C 수욕상에서 25초 동안 heat shock을 진행하였고, 바로 얼음상에서 2분 동안 incubation을 하였다. S.O.C medium을 400 μ l를 첨가한 후에 실온에서 2시간 동안 shaking을 하였다. 이 때, 실온은 20~25 $^{\circ}$ C 사이로 유지하였다. 끝으로 배양된 e.coli cell을 100 μ g/ml ampicillin이 첨가된 LB 고체 배지에 spreading 하였고, 이를 실온에서 이틀 이상 배양하면서 colony가 생기는지 관찰하였다.

3.6. Liquid culture

Transformation 결과 colony가 나타난 경우 liquid culture을 진행하였

다. Liquid culture는 ampicillin $2.5\mu\text{l}$ ($100\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한 LB media 5ml에 white tip으로 colony를 떠서 tip채로 media에 넣었다. 그리고 실온에서 하루 동안 shaking incubation을 하여 액체배지 상에서 다량의 E.coli를 확보하였다.

3.7. Miniprep

얻은 Liquid culture product에 Welgene의 miniprep kit을 사용하여 miniprep 과정을 진행하였다. Kit를 사용하여 cell을 lysis하고 이어서 neutralization 함으로써 plasmid DNA를 얻을 수 있었다. 결과물을 gel에 loading 하고 ladder와 함께 전기영동을 하여 대략의 크기를 파악하였다.

3.8. Sequencing

Miniprep 결과 목표로 하는 product와 비슷한 크기가 관찰되면, 이를 외부 업체를 통하여 전체 sequence 분석을 하였다. Rat mdr1a의 큰 크기 때문에 한 번에 sequence 분석이 되지 않아서 분석용 primer 5개를 추가적으로 제작하여 sequencing을 의뢰하였다. Sequencing을 통하여 전체적인 sequence와 mutation의 여부를 확인하였다.

3.9. Transient Transfection

본 실험에서는 Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell의 chromosome에 FRT site를 삽입하여 본 실험실에서 만든 MDCKII/FRT 세포를 사용하였다. MDCK cell line은 다 자란 후에 monolayer를 형성하고, 자체적으로 발현하고 있는 transporter가 적은 특성을 지니고 있다.(Cereijido, Ehrenfeld et al. 1980) Promega 사에서 공급하는 FuGENE HD DNA transfection reagent 를 사용하여 transfection을 진행하였다.

우선 24 well plate에 본 실험실에서 만든 MDCKII/FRT cell을 5×10^5 cell/well 의 농도로 seeding을 한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 배양하여 세포의 confluency가 70~90% 정도 되는 지를 현미경을 통해 확인하였다.

Transfection mixture를 만들기 위한 DNA : transfection reagent의 비율을 1 : 3으로 제조하였다. 먼저 DNA의 경우 rat의 mdr1a gene이 삽입된 pcDNA5/FRT vector 1 μ g과 pOG44 vector 1 μ g을 준비하였다. 여기에 transfection reagent를 6 μ l를 넣고 나머지를 serum-free media로 채워 총 100 μ l의 transfection mixture를 제조하였다. 대조군으로서 앞의 과정에서 rat의 mdr1a gene이 삽입된 pcDNA5/FRT vector 대신에 rat의 mdr1a gene이 삽입되지 않은 pcDNA5/FRT

vector를 넣어 같은 방법으로 transfection mixture를 제조한 후, 30분 간 상온에서 incubation하였다. 이후 각 실험군 마다 well에 각각 13 μ l씩의 transfection mixture를 넣었다. 7개의 well을 준비하여 6개의 well을 uptake 실험에 사용하고, 1개의 well을 RT-PCR실험에 사용하였다. 다음 실험을 위하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

3.10. RT-PCR

Transfection을 통해 MDCKII/FRT cell에 rat *mdr1a*가 발현되었는지 RT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 확인해보았다. mRNA 확인을 위해서 Quiagen의 RNeasy Mini Kit을 사용하여 세포 내 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 template로 하여 RT-PCR을 진행하였고, 이에 사용될 primer는 아래 [표 8]과 같이 제작하였다. Control로는 housekeeping gene인 canine GAPDH을 사용했고, 이의 primer는 아래 [표 8]과 같이 제작하였다.

[표 8] Primers for RT-PCR

Gene	Direction	Primer
Rat	Forward	5'- ACTGCCTGAGAAATACAACA-3'

mdr1a	Reverse	5'-GTTCTCGAGTAACATCTCGCATGG TCACAG-3'
GAPDH	Forward	5'-AACATCATCCCTGCTTCCAC-3'
	Reverse	5'-GACCACCTGCTCAGTGT-3'

3.11. Function test

Transfection을 통해 MDCKII/FRT 세포에 mdr1a가 발현이 되어 작용을 하는지를 살펴보았다. Mdr1a은 기질이 되는 물질을 세포 내부에서 외부로 수송하는 efflux 수송체이다. Mdr1a를 transfection 하지 않은 세포와, mdr1a을 transfection한 세포에서 기질물질이 수송되는 양을 측정하여 비교하였다. 또한 mdr1a의 작동에 영향을 미치는 inducer 물질을 기질물질과 동시에 각 세포에 처리하여 기질물질의 수송에 어떤 영향을 미치는 지를 알아보았다. 세포 내에 uptake되어 남아있는 기질물질의 양을 측정하여, 남아있는 기질물질의 양이 적을수록 mdr1a에 의해 더 많은 양의 기질물질이 수송되어 efflux된 것으로 가정하고, 각 세포의 수송 능력을 비교하였다. 기질물질로는 digoxin을 사용하였고, (Kim 2002) inducer로 rifampicin을 사용하여 digoxin과 동시에 처리하였을 경우 mdr1a의 활성이 증가하는지 실험하였다.

앞선 transfection 과정에서 대조군(pcDNA5/FRT transfected

MDCKII/FRT cell)과 실험군(mdr1a-pcDNA5/FRT transfected MDCKII/FRT cell)을 준비하였다. Transfection 한 후 하루를 배양하여 70~90%의 confluency를 보이는 것을 확인하고 uptake실험을 진행하였다. 먼저 배지를 제거하고 두 차례에 걸쳐 PBS로 남아있는 배지를 세척하였다. 그리고 TM(Transport media)을 넣고 30분 동안 37℃에서 pre-incubation을 하였다.

약물은 아래 [표 9]와 같이 준비를 하였다. 기질로는 1 μ M digoxin을 사용하였고, 여기에 분석을 위한 방사성동위원소 물질로서 [³H]digoxin (Perkin elmer)을 준비한 기질물질 농도의 10%가 되도록 하여 첨가하였다. 사용한 [³H]digoxin의 농도는 1 Ci/L, specific activity는 29.8 Ci/mmol이었다. Inducer로는 rifampicin (Sigma)을 1 mM으로 준비하여 사용하였다.

[표9] rat mdr1a function test

Cell Type	약물	Volume
Mock cell (MDCKII/FRT)	Digoxin	250 μ l
MDCKII/FRT- rat mdr1a	Digoxin	
Mock cell (MDCKII/FRT)	Digoxin + Rifampicin	

MDCKII/FRT- rat mdr1a	Digoxin + Rifampicin	
--------------------------	----------------------	--

30분의 preincubation이 끝나면 실험장소를 방사성동위원소실로 옮기고, TM을 제거한 후, 위와 같이 준비한 약물을 각 well에 200 μ l씩 가하고 10분 동안 37°C에서 incubation을 하였다. 이 후 약물을 제거하고, 4°C 정도의 차가운 PBS로 washing을 세 번 하였다. 그리고 각 well당 0.2N NaOH를 500 μ l씩 가하여 세포를 lysis시켰다. Sample의 분석은 lysate 400 μ l씩 취하여 여기에 1 mL의 cocktail 액을 섞고, LSC로 분석하였다. 끝으로 BCA assay로 단백량을 측정하여 well 마다 발생할 수 있는 cell 수의 차이로 인한 오차를 보정하였다.

4. Results

Rat liver total RNA를 source로 하여 reverse transcription 반응을 진행하였고, 그 결과 cDNA를 얻었다. 이 cDNA를 template로 하여 PCR을 진행한 결과, 아래 [그림 5]에 표시한 것과 같이 약 4000bp 정도의 위치에서 band를 확인 할 수 있었다. 본 실험에서 제작한 primer로 PCR을 할 경우, 3861bp의 DNA를 얻게 되기 때문에 product 크기의 일치함을 확인 할 수 있었다.

[그림 5] Rat mdr1a PCR result

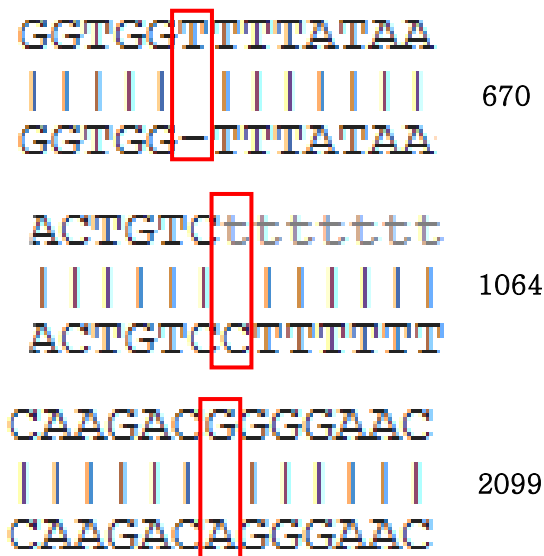


크기 확인을 한 후에 PCR purification 과정을 통하여 불순물을 제거하고 PCR product을 높은 농도로 얻을 수 있었다. Purification을 한 rat mdr1a와 pcDNA5/FRT vector를 각각 KpnI 과 XhoI을 사용하여

double digestion을 하였고, 둘을 ligation하였다. 이렇게 subcloning 한 product를 MAX Efficiency Stbl2 competent cell에 transformation하여 실온에서 이틀 동안 incubation을 한 결과 적은 수의 colony을 얻을 수 있었다. 생성된 colony들을 떼서 liquid culture를 하였고, miniprep을 진행한 후 gel을 내려 size확인을 하였다. 이 중 하나가 원하는 크기여서 정확한 sequence를 확인하기 위하여 sequencing을 의뢰하였다.

Sequence 분석 결과, 65번부터 3926번까지 전체가 성공적으로 pcDNA5/FRT vector내로 삽입된 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 CDS 상에서 아미노산을 변화시키는 mutation 네 개를 각각 670, 1064, 2099, 2850번의 위치에서 관찰하였다. (그림 6)

[그림 6] Sequence내에 발생한 mutation



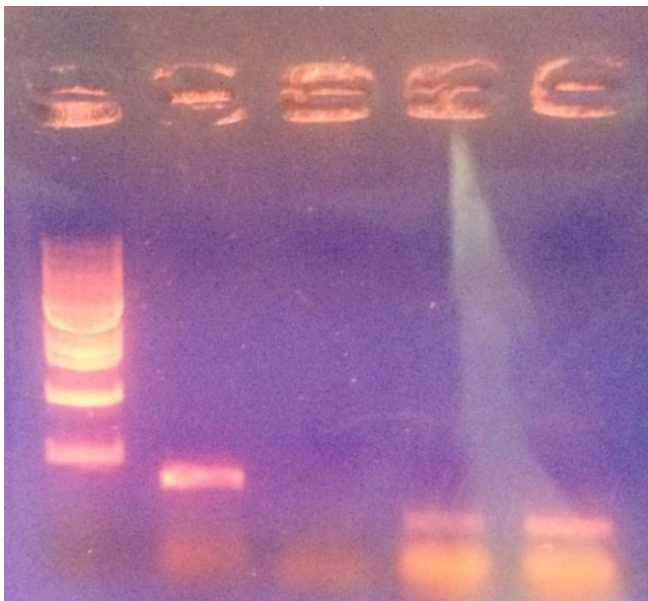
```

CAGAAATGCTTTG
||||| ||||| 2850
CAGAAATGCTTTG

```

이렇게 완성된 rat mdr1a를 MDCKII/FRT cell에 transient 하게 transfection을 하고 monolayer하게 배양하였다. Transfection한 cell의 추출한 RNA로부터 RT-PCR을 진행한 결과는 아래 [그림 7]과 같다.

[그림 7] Rat mdr1a cell line RT-PCR result

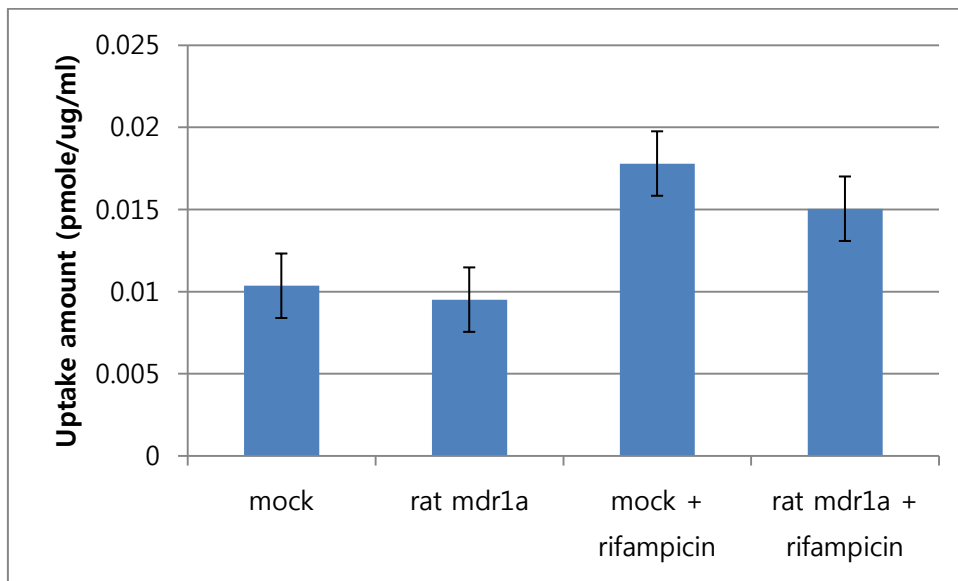


위의 그림에서 왼쪽 열부터 차례대로 ladder, mdr1a, 공 vector를 나타내고, 오른쪽 두 열은 GAPDH를 나타낸다. GAPDH band의 확인을 통하여 RT-PCR 반응이 성공적으로 진행됐음을 확인하였다. 크기 363bp

의 rat mdrla 확인용 RT-PCR의 결과로부터 rat mdrla의 mRNA가 발현했다는 것을 알 수 있었다.

Function study 결과는 아래 [그림 8]과 같았다. rat mdrla와 mock cell(wild type MDCKII/FRT cell)간 digoxin uptake는 거의 차이를 보이지 않았다. Inducer인 rifampicin을 함께 처리했을 때는 digoxin의 uptake가 조금 증가하였으나, t-test 결과, rat mdrla에 기질만 처리한 경우와 rat mdrla에 inducer 인 rifampicin을 동시에 처리한 경우, 둘 간의 p-value는 0.122로 유의적인 차이가 없었다.

[그림 8] MDCKII/FRT-rat mdrla function study 결과



5. Discussion

약물상호작용 연구에서 약물수송체의 중요성이 부각됨에 따라 미국 FDA에서는 주의 깊은 관찰이 필요한 주요 약물수송체 7가지를 선정하였다. 본 연구에서는, 이 7가지 약물수송체 중의 하나인 p-glycoprotein에 중점을 두어 p-glycoprotein의 rat에서 존재하는 형태인 *mdr1a*의 *in vitro* system을 구축하였다. 이는 신약개발 초기단계에서 p-glycoprotein의 영향을 예측하는 데에 도움을 줄 것으로 사료된다. 본 실험에서는, rat liver total RNA 단계로부터 cloning을 진행하였다. Rat *mdr1a* cloning은 성공적으로 진행되어 pcDNA5/FRT vector내로 삽입되었고, MDCK II/FRT cell에 transient하게 transfection하였다. Rat *mdr1a*의 발현을 확인하기 위하여 mRNA 측면에서와 function 측면에서 평가를 하였다. mRNA 측면에서의 확인을 위해 transfected cell에서 추출한 RNA로부터 RT-PCR을 진행하였고, 실험 결과 mRNA의 발현을 확인하였다. 그러나 function study에서는 mock cell과 rat *mdr1a* transfected cell 간에 기질인 digoxin uptake amount 차이가 거의 나지 않았다. 이 뿐 아니라 *mdr1a* transfected cell에 기질만 처리한 경우와 *mdr1a* transfected cell에 기질과 inducer인 rifampicin을 동시에 처리한 경우를 t-test한 결과, p-value가 0.122로 유의적인 차이가 없다는 결과가 나왔다.

Function test에서 두드러진 차이가 나타나지 않은 결과는 여러 요인의

로 설명이 가능하다. 첫째, mRNA 발현은 되었지만, function이 나타나지 않는다는 점에 의하면 sequence내에 존재하는 4개의 mutation으로 인해 protein 발현에 영향을 미쳤을 가능성이 있다. Mutation을 모두 reference sequence대로 수정하고 그 이후의 단계를 진행하면 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것이다. 두 번째 가능한 원인으로 transient하게 transfection 하였기 때문에 한계가 있을 것이라 생각된다. Transfection을 하고 24시간 후에 function study을 진행하였기에 단백질을 발현하기에는 시간이 너무 짧았을 가능성도 있다. Stable한 cell line으로 다시 실험을 한다면 다른 결과를 기대해 볼 수 있을 것이라 생각된다. 마지막으로 inducer를 기질과 함께 처리한 경우와 기질만 단독으로 처리한 경우 uptake 실험간에 유의적인 차이가 없는 것은 incubation time을 원인으로 제시할 수 있다. 본 실험에서는 약물 처리 후 incubation을 10분 동안 진행하였는데, mdr1a가 efflux transporter인 점을 감안하면 incubation time을 다소 길게 설정하여야 더 정확한 실험결과를 얻을 것이라 생각된다. 이는 약물이 세포 내로 들어갔다 나오는 시간을 고려하여 도출해 낸 결론이다. 이 부분들을 보완하여 stable한 cell line을 구축한다면 실제 mdr1a의 function을 나타내는 in vitro system을 얻을 수 있을 것이라 생각한다.

MDCK II/FRT cell에 rat mdr1a를 발현시킨 in vitro system은 uptake study를 통한 약물상호작용 연구에 활용 가능할 것이다. 또한 rat

mdr1a의 in vitro와 in vivo data간의 상관성으로부터 human p-glycoprotein이 약물상호작용에 미치는 영향을 예측하는 데에 도움이 될 것이라 기대된다. 궁극적으로 rat mdr1a in vitro system은 신약개발 시 screening system으로 작용하여 적합한 약물 후보군을 결정하는 데에 적용이 가능하고, 효율적인 신약개발에 기여할 것으로 사료된다.

6. Reference

Ambudkar, S. V., et al. (2008). "Relationship between drugs and functional activity of various mammalian P-glycoproteins (ABCB1)." Mini reviews in medicinal chemistry **8**(3): 193–200.

Cereijido, M., et al. (1980). "Structural and functional membrane polarity in cultured monolayers of MDCK cells." The Journal of membrane biology **52**(2): 147–159.

Fromm, M. F., et al. (1999). "Inhibition of P-Glycoprotein-Mediated Drug Transport A Unifying Mechanism to Explain the Interaction Between Digoxin and Quinidine." Circulation **99**(4): 552–557.

Giacomini, K. M., et al. (2010). "Membrane transporters in drug development." Nature reviews Drug discovery **9**(3): 215–236.

Kawahara, M., et al. (1999). "Physiologically based pharmacokinetics of digoxin in mdr1a knockout mice." Journal of pharmaceutical sciences **88**(12): 1281–1287.

Kim, R. B. (2002). "Drugs as P-glycoprotein substrates, inhibitors, and inducers." Drug metabolism reviews **34**(1–2): 47–54.

Li, M., et al. (2006). "Drug–drug interactions involving membrane transporters in the human kidney."

Marzolini, C., et al. (2004). "Polymorphisms in Human MDR1 (P-glycoprotein): Recent Advances and Clinical Relevance&ast." Clinical Pharmacology & Therapeutics **75**(1): 13–33.

U.S department of Health and Human Services, F. a. D. A., Center for Drug Evaluation and Research(CDER) (2012). "Drug Interaction Studies– Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations." Guidance for Industry.

Abstract

Cloning and Expression of rat *mdr1a* (p-glycoprotein) in MDCK cells

Inyoung Lee

Department of Pharmaceutics

College of Pharmacy

Seoul National University

Drug transporters are distributed widely in various organs and contribute greatly in the absorption, distribution and elimination of drugs. On top of that, drug-drug interactions that induce or inhibit drug transporters play an important role in drug metabolism. Based on these reasons the US FDA selected seven drug transporters that affect drug-drug interaction most immensely and stated that thorough inspection studying whether the developing drug acts as a substrate or inhibitor of any of these drug transporters is required in the early drug development phase. Drug-drug interactions are the most accurate when observed in vivo. However, human in-vivo

studies are not only expensive but can also be hazardous and thus, in-vitro studies preceding in-vivo studies are necessary to prevent needless experiments in-vivo. If an in-vitro system of rat *mdr1a* is established to evaluate drug-drug interaction, in-vivo drug-drug interactions in human could be predicted using the correlation of rat in-vitro and rat in-vivo data. In this study, *mdr1a*, the corresponding part of human MDR1 (p-glycoprotein) in rat, was chosen to be cloned amongst the seven transporters selected by the FDA. Rat *mdr1a* was cloned and transiently transfected to MDCKII/FRT cells. Results from RT-PCR showed that mRNA was expressed. However, function study results showed no significant difference in the function between the mock cell and *mdr1a*-transfected cell. There are several possible reasons for this result and supplementation of these would lead to the establishment of the stable rat *mdr1a*-MDCKII/FRT cell line. The rat *mdr1a* cell line is expected to be practically useful in predicting drug-drug interaction in the early phase of drug development.

Key Words: *mdr1a*, cloning, drug-drug interaction

Student Number: 2012-21610