

칼슘 신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$
exchanger의 활성 조절

연세대학교 대학원
의과학과
조민재

칼슘 신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$
exchanger의 활성 조절

지도교수 이 민 구

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2005년 12월 일

연세대학교 대학원
의과학과
조 민 재

조민재의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

생명에 대한 관심으로 첫 발을 내디딘 연구자로서의 길, 2년이라는 짧지 않은 짧은 시간동안 많은 것을 배우고 느낄 수 있었습니다. 생명체가 얼마나 복잡한 시스템으로 되어있는지 그리고 생물학 교과서 그림 하나하나를 만들기 위해 많은 사람들의 피땀 어린 노력이 들어가 있다는 것을 직접 느낄 수 있었습니다. 많이 부족한 저에게 오늘이 있도록 도와주시고 힘이 되어주신 많은 분들께 깊이 감사드립니다.

먼저 연구자로서의 첫 길을 열어주시고 지도해주신 이민구 교수님께 감사드립니다. 교수님의 연구에 대한 열정과 실험결과에 대한 통찰력은 마음에 새겨 본받도록 하겠습니다. 학장 업무로 바쁘실 텐데도 저희를 격려해주시고 이끌어주셨던 김경환 교수님, 항상 따뜻하게 말을 건네시고 다독여주신 김혜영 교수님, 항상 열심히 일하시는 박경수 교수님 감사드립니다. 마라톤을 좋아하시는 멋진 안영수 교수님, 약리학교실을 위해 여러 가지로 신경써주시는 김동구 교수님, 연구에 대한 열정으로 가득 차신 장정원 교수님께도 감사드립니다. 그리고 심사위원으로 제 연구에 관심을 가지고 여러 가지 조언을 해주신 서정택, 허만욱 교수님 감사합니다.

실험에 대해서 여러 가지로 조언을 해주었던 완이 형과 나에게 실험실을 소개시켜주고 어려울 때 힘이 되어주었던 지현이에게 감사드립니다. 처음 실험을 가르쳐준 주영누나, 입담이 좋아 웃음을 선사해주었던 원선누나, 항상 반겨주는 지하누나, 서로에게 힘이 될 수 있었던 영웅이, 항상 열심히 하는 지현이, 항상 밝은 웃음으로 대해주는 친누나 같은 정남누나, 그리고 이성희 선생님, 정수, 준오, 재석이 모두에게 감사드리고 랩식구들이 있었기에 지금의 내가 있을 수 있다고 생각합니다. 그리고 항상 교실의 굿은 일을 맡아해 오신 임종수, 김건태, 민선해 선생님 감사합니다.

이름을 다 나열하지는 못하지만 힘들 때 힘을 북돋워주고 고민이 있을 때 자기 일처럼 생각해주신 약리학 교실원 모두에게 진심으로 감사드립니다.

다.

마지막으로 자식들 공부시키느라 힘든 농사일도 마다않으시고 항상 뒤에서 믿고 지켜봐 주시던 어머니와 아버지께 진심으로 감사드립니다. 부모님이 계시기에 지금의 제가 있을 수 있습니다. 그리고 동생들 민기, 형주에게도 감사하는 마음을 전하고 싶습니다.

이제 막 첫 발을 내디뎠을 뿐입니다. 앞으로 더 열심히 살아가는 모습 보여드리려고 노력하겠습니다.

2006년 12월 조민재

차례

그림 및 표 차례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	6
1. 실험 재료 및 관류액	6
2. 세포 배양 및 transfection	6
3. 역전사 증합효소 연쇄반응	7
4. 세포내 pH 측정	8
5. 세포내 칼슘신호 측정	9
III. 결과	10
1. CAPAN-1 세포에서 칼슘신호에 의한 Cl^-/HCO_3^- 교환 활성화	10
2. CAPAN-1 세포에서 발현하는 AE 아형 검색	11
3. HEK293 세포에서 칼슘신호 측정	12
4. 칼슘신호에 의한 SLC4 family Anion Exchanger의 기능 변동	13
5. 칼슘신호에 의한 SLC26 family Anion Exchanger의 기능 변동	17
IV. 고찰	19
V. 결론	22
참고문헌	23
영문요약	27

그림 차례

그림 1. CAPAN-1 세포에서 ATP와 ionomycin에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환변화	10
그림 2. CAPAN-1 세포에서 발현하는 AE 아형	12
그림 3. HEK293 세포에서 ATP와 ionomycin에 의한 칼슘신호 측정	13
그림 4. SLC4 family AE 아형의 칼슘신호에 의한 기능 변동	15
그림 5. CFTR 발현시 SLC4 family AE 아형의 칼슘신호에 의한 기능 변동	16
그림 6. DRA의 칼슘신호에 의한 기능 변동	17

국문요약

Ca^{2+} 신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger의 활성 조절

췌관세포는 140 mM의 중탄산염(HCO_3^-)을 포함하는 체액을 분비한다. 고농도의 중탄산염은 강산에 의해 십이지장이 손상되는 것을 방지하며 체액 분비의 원동력이 되어 mucin plugging에 의하여 췌관이 막히는 것을 방지하는 등 소화에 중요한 역할을 한다.

췌관세포 내강막에 존재하는 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR)와 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger(AE)는 중탄산염 분비 기전에 중요한 역할을 한다. cAMP 신호는 CFTR 의존적인 AE의 활성을 크게 증가시켜 중탄산염의 분비를 증가시키며 CFTR 유전자에 돌연변이가 생긴 경우 중탄산염 분비가 감소하게 된다. cAMP 신호뿐만 아니라 칼슘 신호도 중탄산염의 분비를 증가시킬 수 있다. 하지만 그 분자기전에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.

본 실험에서는 칼슘 신호에 의한 중탄산염 분비에 관여하는 분자기전을 탐색하고자 하였으며 특히 칼슘신호에 의해 활성화되는 AE들을 검색하고자 하였다. 췌관세포인 CAPAN-1 세포에서 칼슘 신호에 의해 AE의 교환활성이 증가한다는 것을 확인하였다. AE1, AE2, AE3 그리고 DRA를 각각 HEK293 세포에 발현시킨 경우 ATP에 의해 유발된 세포내 칼슘 신호에 의해서 AE의 교환 활성 변화는 나타나지 않았다. 또한, AE1, AE2, AE3, DRA를 CFTR과 동시 발현시킨 경우에도 칼슘신호에 의한 AE의 교환 활성 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 췌관세포에서 칼슘신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환활성의 증가는 cAMP 신호와는 다른 분자기전에 의해 일어날 수 있으며, 이 과정에 본 실험에서 사용한 AE 이외의 SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11 등 다른 종류의 AE들이

관여하고 있다고 생각된다.

핵심되는 말: 중탄산염, CFTR, anion exchanger, 칼슘

Ca²⁺ 신호에 의한 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger의 활성 조절

<지도교수 이민구>

연세대학교 대학원 의과학과

조민재

I. 서론

췌관세포는 140 mM의 중탄산염(HCO₃⁻)을 췌관으로 분비한다. 이러한 고농도의 중탄산염 분비는 소화에 중요한 역할을 한다. 중탄산염은 십이지장으로 들어오는 강산의 위액을 중화시켜 십이지장을 보호하는 역할을 하며, 췌장에서 분비되는 여러 소화효소가 췌액에 잘 녹을 수 있는 환경을 제공하여 부적절한 소화효소 활성화에 의해 췌장관이 손상되는 것을 방지한다.¹ 또한 췌관세포를 통한 중탄산염의 분비는 췌액이 분비되는 원동력이 되어 적절한 췌액의 부피와 mucin 농도를 유지하여 mucin plugging에 의하여 췌장관이 막히는 것을 방지한다.^{2,3}

췌관세포를 통한 중탄산염의 분비에는 췌관세포 측저막의 Na⁺/H⁺ exchanger(NHE), Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter(NBC), Na⁺,K⁺-ATPase, 내강막의 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator(CFTR), Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger(AE)등 여러 가지 세포막 이온수송단백들이

관여하고 있다.⁴ 이 중 췌관세포 내강막의 CFTR과 AE가 중탄산염 분비에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.^{5,6} CFTR은 중탄산염을 직접 분비하기보다는 AE를 통해서 세포내에 축적된 Cl^- 를 다시 배출하여 AE가 계속해서 작동하기 위한 Cl^- 농도 차이를 유지하는 역할을 한다. 뿐만 아니라 췌장관 세포의 내강막에서 CFTR과 AE는 서로 상호작용하여 CFTR의 발현은 AE의 활성을 증가시킬 수 있으며, AE는 CFTR의 Cl^- 전도도를 증가시킬 수 있다.^{7,8,9,10}

중탄산염 분비조절에 핵심적인 역할을 수행하고 있는 CFTR에 발생하는 변이는 만성췌장염 및 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)과 같은 질환을 일으키며, 이러한 환자의 경우 중탄산염 분비 장애로 인한 소화 장애와 십이지장의 손상 그리고 췌관에서의 mucin plugging 발생과 부적절한 소화효소 활성이 일어나게 된다.¹¹

췌관에서 중탄산염의 분비를 촉진하는 대표적 신호는 secretin, vasoactive intestinal peptide(VIP) 등의 자극에 의한 세포내 cAMP 농도 증가이다. cAMP는 protein kinase A(PKA)를 통해 CFTR의 Cl^- 전도도를 활성화시키고 CFTR 의존적인 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger의 활성을 증가시켜 대량의 중탄산염 분비를 가능하게 한다.^{1,11} cAMP 신호 이외에도 콜린성 수용체, purinergic 수용체(P2R), protease-activated receptor(PAR) 등의 활성화에 의한 칼슘 신호도 췌관에서 중탄산염의 분비를 유도한다.^{12,13} 기니피그의 췌관에서 purinergic 수용체 효현제인 ATP에 의해 중탄산염의 분비가 증가하며,¹⁴ 사람 췌관 세포인 CAPAN-1 세포에서 측저막의 PAR2 수용체와 내강막의 purinergic 수용체의 활성이 중탄산염 분비를 증가시킬 수 있다.^{15,16} 또한 췌장 선세포의 zymogen granule이 췌관으로 분비되면서 ATP가 같이 분비되어 췌관 내강막의 P2R을 활성화시켜 세포내 칼슘신호를 일으켜 중탄산염 분비를 증가시킬 수 있다.^{17,18}

SLC4와 SLC26의 두개의 gene family가 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger 기능을 한다. SLC4 family는 11개의 유전자로 구성되어 있으며 그중 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$

exchanger 기능을 가지고 있는 것은 SLC4A1(AE1), SLC4A2(AE2), SLC4A3(AE3), SLC4A9(AE4)¹⁹이다.²⁰ 먼저 밝혀진 SLC4 family와 구조적으로는 다르지만 기능적으로 비슷한 SLC26 family는 10개의 유전자로 구성되어 있는데, 각각은 이온 특이성이나 발현 조직 분포에서 차이를 보이고 있다.²¹ 이중 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger 기능을 가지고 있는 것은 SLC26A3(DRA)²², SLC26A4(Pendrin), SLC26A6(Pat-1)^{23,24,25}, SLC26A7²⁶, SLC26A8²⁷, SLC26A9²⁸이다.

여러가지 AE의 아형 중 cAMP 신호에 의해서 CFTR 의존적으로 활성화될 수 있는 것은 SLC26A3, SLC26A4, SLC26A6라고 알려져 있다.⁹ 췌관세포에서는 cAMP 신호뿐만 아니라 칼슘 신호도 중탄산염의 분비에 중요한 역할을 하고 있다. 하지만 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비의 분자 기전에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 본 실험에서는 세포내 칼슘 신호가 각 AE 아형의 기능에 미치는 영향을 살펴봄으로써 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비 증가의 분자적 기전을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 재료 및 관류액

Fura-2-AM과 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF-AM)은 Molecular Probes(Eugene, OR, U.S.A)로부터 구입하였고 ATP 외 다른 시약은 Sigma(St. Louis, Missouri, U.S.A)로부터 구입하였다. 기본 관류액은 140 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-Glucose 그리고 10 mM HEPES로 구성되어 있으며, NaOH를 사용하여 pH를 7.4로 맞추었다. 고농도 K⁺(100 mM K⁺), HCO₃⁻ 관류액은 25 NaCl, 100 KCl, 1 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 D-glucose, 5 HEPES 그리고 25 mM NaHCO₃로 구성되어 있으며, pH는 7.4로 맞추었다. 고농도 K⁺(100 mM K⁺), Cl⁻-free HCO₃⁻ 관류액은 25 Na⁺-gluconate, 100 K⁺-gluconate, 1 MgSO₄, 1 hemicalcium cyclamate, 10 D-glucose, 5 HEPES 그리고 25 mM NaHCO₃로 구성되어 있으며, pH는 7.4로 맞추었다. 모든 HCO₃⁻ 관류액은 95% O₂, 5% CO₂ 가스를 계속해서 주입하여 pH를 유지하였다. 모든 관류액의 삼투압은 310 mOsm로 맞추었다.

2. 세포 배양 및 transfection

HEK293, CAPAN-1 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A)에서 구입하였으며 각각 10% FBS, 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 DMEM과 RPMI1640 배양액을 넣고 각각 10%와 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. CAPAN-1 세포는 cover slip 위에서 10% FBS가 첨가된 RPMI1640 배양액으로 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 배양 후 실험하였다. HEK293 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배양액으로 10% CO₂ incubator에서 하루 동안 배양한 후 Lipofectamine Reagent(Life Technologies, Carlsbad, CA,

U.S.A)를 이용하여 각각의 Anion Exchanger 아형 clone을 transfection 하고, 그 후 48~72시간 배양 후 실험하였다. 실험에 사용한 AE1, AE2, AE4, DRA, CFTR 유전자 clone은 Dr. S. Muallem으로부터 받았다.⁹

3. 역전사 중합효소 연쇄반응.

CAPAN-1 세포에 Guanidinium thiocyanate phenolchloroform(Trizol, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A)을 처리해서 원심분리 후 상층액을 얻어 isopropanol로 침전시켜 total RNA를 추출하였다. total RNA에서 random hexamer와 oligo dT primer(Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A)를 이용하여 reverse transcriptase(Super script II, Invitrogen, Carlsbad, CA, U.S.A)로 역전사하여 cDNA를 합성하였다. cDNA와 각 AE 아형 특이적인 primer, Taq DNA polymerase(Promega, Madison, WI, U.S.A)를 사용하여 PCR을 수행하였고, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기 영동하여 확인하였다. 사용한 primer의 염기서열과 예상 PCR product의 크기는 다음과 같다.

AE1: sense (5'-CCC TAG ACC CTC CCC CAC CAT TCC AC-3')
antisense (5'-GCC TTT GCT TCT ACC CCT GCC TGT GC-3')
PCR product: 319 base pairs

AE2: sense (5'-ATG CCG CCC AAA CAC CAC CCA GAT G-3')
antisense(5'-CGG CTG TCC CTC GGT GGC GGC TAC A-3')
PCR product: 317 base pairs

AE3: sense (5'-GGA GTT GGG GGG CTC TGA GGC GAC-3')
antisense (5'-TCG GAC ACG CCC ATC AGC CCC TCG-3')
PCR product: 243 base pairs

AE4: sense (5'-AGC GCT TGG ACT GCC TTG GTA TGT-3')
antisense (5'-AGG GGG AAG ATG ATG GCT GCA GGG GTA GAC-3')
PCR product: 432 base pairs

DRA: sense (5'-TGC CAC AGC CAA CAG AAA AAT CAA A-3')

antisense (5'-GGG GGA ATG TCG ACC AGC AGA G-3')

PCR product: 330 base pairs

Pendrin: sense (5'-GTT TAC TAG CTG GCC TTA TAT TTG GAC TGT-3')

antisense (5'-AGG CTA TGG ATT GGC ACT TTG GGA ACG-3')

PCR product: 484 base pairs

SLC26A6: sense (5'-TAG GGG AGG TTG GGC CAG GGA TGC-3')

antisense (5'-TGC CGG GAA GTG CCA AAC AGG AAG TAG AT-3')

PCR product: 456 base pairs

SLC26A7: sense (5'-CACTGTGTCTGGGATAATGTTGG-3')

antisense (5'-CCA GTT GCA GCA CAA ACA TG-3')

PCR product: 353 base pairs

SLC26A8: sense (5'-CCA AGA CCC AGA CCG AGA TG-3')

antisense(5'-GAG TCT GAG ACT GGG TGG AAG C-3')

PCR product: 150 base pairs

SLC26A9: sense (5'-TCC AGG TCT TCA ACA ATG CCA C-3')

antisense (5'-CGA ATC TTG TGC ATG TAG CGA G-3')

PCR product: 400 base pairs

SLC26A11: sense (5'-ATC CCG CCC TTC TCA GTG AC-3')

antisense (5'-TAG TCC AGA GAC AGC AGC ACC AG-3')

PCR product: 329 base pairs

4. 세포내 pH 측정

Cover slip 위에서 배양한 세포를 pH 측정용 형광물질인 BCECF-AM이 4 μ M 함유된 기본 관류액에서 10분간 loading한 후 관류 chamber에 장착한 다음 excitation 487 nm 및 442 nm 와 emission 510 nm 에서의 형광을 Delta Ram System(PTI, NJ, U.S.A)을 이용하여 측정하였다. pH 6.2와 pH 7.2의 145 mM KCl, 10 mM HEPES 그리고 5 μ M nigericin 관류액을 이용하여 487/442 ratio를 pH_i로 보정하였다. 145

mM Cl^- 가 포함된 HCO_3^- 관류액을 흘려주다가 Cl^- -free HCO_3^- 관류액을 흘려주면 pH_i 가 상승하게 되는데, $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성은 단위시간에 증가하는 pH_i 를 통하여 측정하였다.

5. 세포내 칼슘신호 측정

Cover slip 위에서 배양한 HEK293 세포에 칼슘 형광물질인 Fura2-AM을 30분간 상온에서 loading하였다. Fura2가 loading된 세포를 관류 chamber에 장착 후 기본관류액을 흘리면서 excitation 355 nm 및 380 nm 와 emission 510 nm에서 Fura2의 형광을 Delta Ram system(PTI, NJ, U.S.A)을 이용해서 측정하였다.

III. 결과

1. CAPAN-1 세포에서 칼슘 신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성화

췌관세포는 다양한 종류의 P2R을 내강막과 측저막 모두에 가지고 있으며 ATP에 의해 세포내 칼슘 신호를 유발한다.^{12,17} 이러한 칼슘 신호는 기니피그의 췌관 또는 사람 췌관세포에서 CFTR-의존적인 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger(AE)를 활성화한다.^{14,15} 정상 CFTR을 발현하는 사람 췌관세포에서 ATP에 의한 칼슘 신호가 AE를 활성화하는 것을 확인하였다.

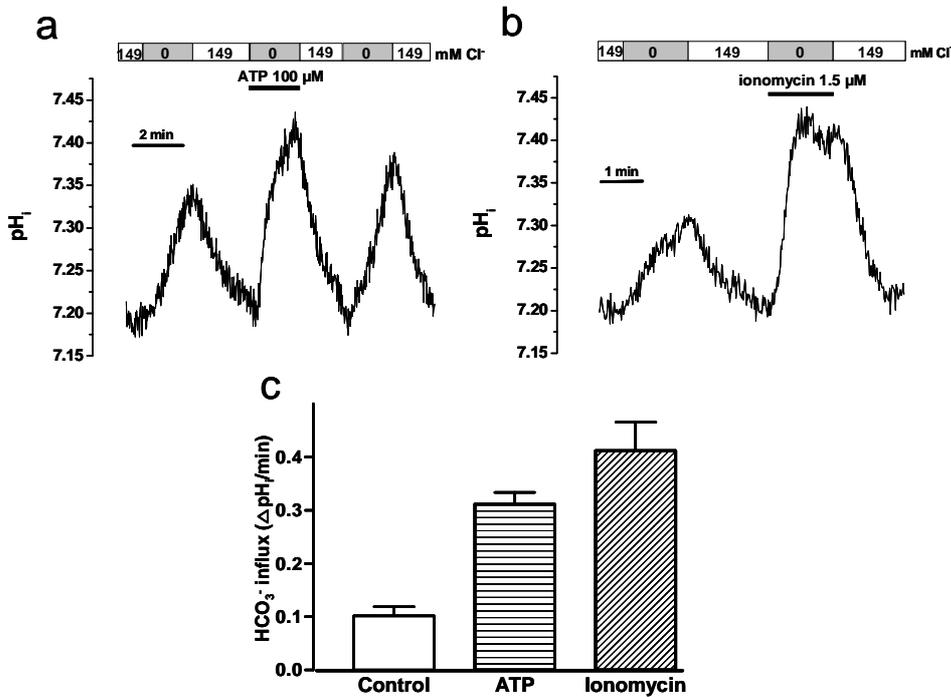


그림 1. CAPAN-1 세포주에서 ATP와 ionomycin에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환변화.

CAPAN-1 세포에서 BCECF를 사용하여 pH_i 변화를 측정하였다. ATP(a)와 ionomycin(b)에 의해 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 현저히 증가하였다. T:표준오차

정상 CFTR을 발현하는 사람 췌관세포인 CAPAN-1 세포를 cover slip에 배양한 후 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화를 측정하였다. CAPAN-1 세포는 칼슘신호에 의해 활성화될 수 있는 K^+ channel과 CaCC(Ca^{2+} activated Cl^- channel)가 발현하고 있기 때문에 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 변화에 대한 칼슘신호의 영향을 정확히 측정할 수가 없다. 따라서 K^+ channel과 Cl^- channel을 통한 전기생성적인 이온의 이동을 억제할 수 있는 100 mM K^+ 을 포함하는 HCO_3^- 관류액 상황 하에서 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 측정하였다. 149 mM Cl^- 를 포함하는 HCO_3^- 관류액을 흘려주다가 Cl^- free HCO_3^- 관류액을 흘려주게 되면 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger가 정상적 상황과 반대방향으로 작동하여 Cl^- 가 세포 밖으로 이동하고 HCO_3^- 가 세포 안으로 들어가 pH_i 가 상승하게 되는데, 이때 pH_i 가 상승하는 정도로 AE의 활성을 측정하였다.

CAPAN-1 세포주에 고농도(100 μM)의 ATP 자극을 주었을 때 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 증가하였다. 또한 칼슘 이온투과체(ionophore)인 ionomycin 0.5 μM 을 이용하여 칼슘신호를 일으켰을 때에도 AE의 교환이 현저히 증가하였다(그림1).

2. CAPAN-1 세포에서 발현하는 AE 아형 검색

CAPAN-1 세포에서 발현하는 AE 아형을 검색하기 위하여 지금까지 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능이 있다고 알려진 SLC4 family의 AE1(SLC4A1), AE2(SLC4A2), AE3(SLC4A3), AE4(SLC4A9)와 SLC26 family의 DRA(SLC26A3), Pendrin(SLC26A4), SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11를 대상으로 RT-PCR을 수행하였다.¹⁹⁻²⁸ 그 결과 CAPAN-1 세포는 SLC4 family의 AE1~AE4, SLC26A6 family의 Pendrin, SLC26A6, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11등이 발현하였다(그림 2). CAPAN-1 세포에서 발현하지 않는 DRA와 SLC26A7은 양성 대조군인 T84 세포에서 발현하고 있음을 확인하였다. DRA의 경우 실제

췌관세포에서는 발현하고 있다고 알려져 있지만,²¹ 사람 췌관세포인 CAPAN-1 세포에서는 발현하지 않았다.

3. HEK293 세포에서 칼슘신호 측정

각 AE 아형의 칼슘 신호에 의한 활성변화를 알아보기 위하여 다른 세포에 비하여 내재적인 AE 활성이 적고 CFTR을 발현하지 않는 HEK293 세포를 사용하였다. HEK293 세포가 P2R을 발현하고 있는지 알아보기 위하여 ATP 자극에 의한 칼슘 신호를 측정하였다. HEK293

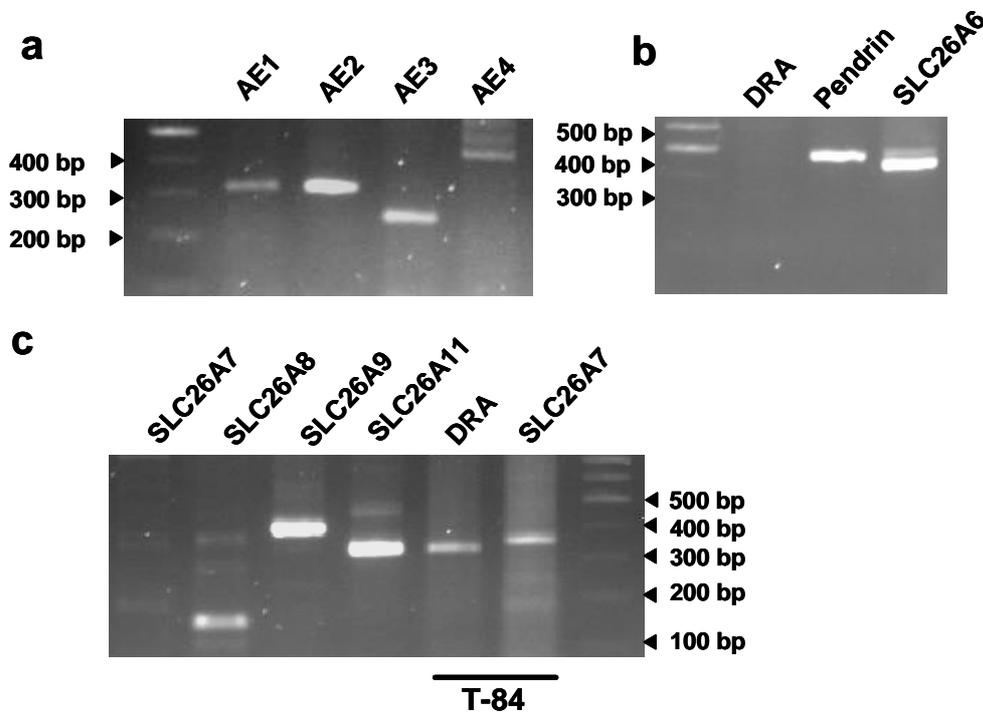


그림 2. CAPAN-1 세포에서 발현하는 AE 아형. CAPAN-1 세포로부터 얻은 cDNA를 이용하여 RT-PCR을 수행한 결과 CAPAN-1 세포는 SLC4 family의 AE1~AE4, SLC26 family의 Pendrin, SLC26A6, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11을 발현하였다.

세포에 100 μM 의 ATP 자극을 주었을 때 높은 칼슘의 증가를 나타내었다.³⁰ 칼슘 이온투과체인 ionomycin을 0.5 μM 처리하였을 때에도 역시 칼슘의 증가를 확인할 수 있었다(그림 3).

4. 칼슘신호에 의한 SLC4 family Anion Exchanger의 기능 변동

칼슘신호에 의한 각 AE 아형의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능 변동을 측정하기 위해서 각 AE 아형을 HEK293세포에 발현시켰다. Cover slip 위에서 배양한 HEK293 세포에 Lipofectamine과 Plus Reagent를 이용하여 transfection한 후 48~72시간이 지나면 충분한 양의 AE가 발현하게

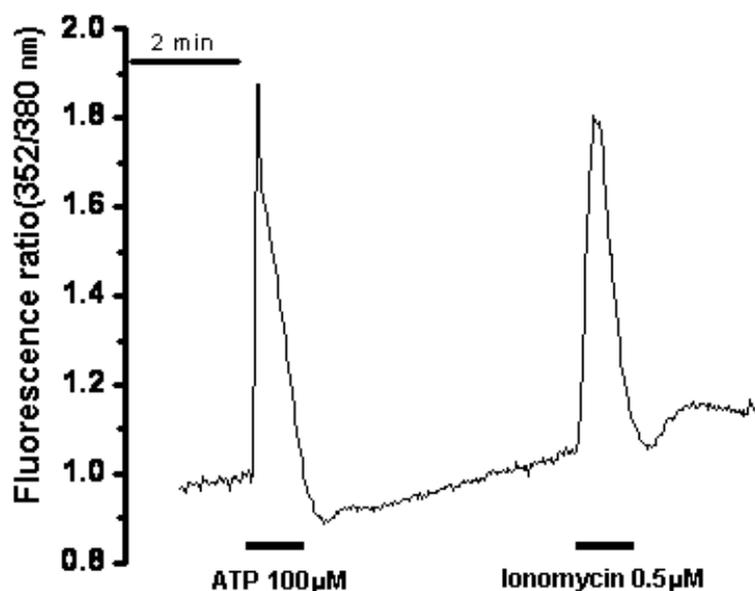


그림 3. HEK293 세포에서 ATP와 ionomycin에 의한 칼슘신호 측정. HEK293 세포를 cover slip 위에서 하루동안 배양한 후 칼슘형광물질인 Fura2-AM을 30분간 상온에서 loading 한 후 칼슘신호를 측정하였다. HEK293 세포는 ATP와 ionomycin에 의해 높은 칼슘 증가를 나타내었다.

된다. AE 발현의 확인은 GFP(Green Fluorescent Protein)를 cotransfection하여 GFP의 형광으로 확인 할 수 있고 또한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능이 mock vector를 transfection한 HEK293의 basal 교환기능보다 향상된 것으로 판별하였다. SLC4 family의 AE1, AE2, AE3 clone 1 μg 을 transfection 하여 HEK293 세포에 발현시켰을 경우 HEK293 세포의 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환보다 4~10배까지 상승하였다. 특히 AE1과 AE2의 경우 아주 높은 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능을 보였다. AE1~AE3를 발현하는 HEK293 세포는 100 μM 의 ATP 자극에 의하여 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능의 변동을 보이지 않았다(그림 4).

CAPAN-1, CFPAC-1 세포 등의 췌관세포에서 칼슘신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성 증가에는 CFTR의 발현이 중요한 역할을 한다.¹⁵ 각 AE 아형의 칼슘신호에 의한 활성증가에 CFTR의 영향을 알아보기 위해 HEK293 세포에 AE와 CFTR을 동시 발현시킨 후 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 측정하였다. HEK293세포에 AE1(0.2 μg), AE2(0.2 μg), AE3(1 μg)과 CFTR(1 μg)을 cotransfection하였을 경우에도 ATP에 의한 AE1, AE2, AE3의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 기능 변동에 영향을 주지 않았다(그림 5).

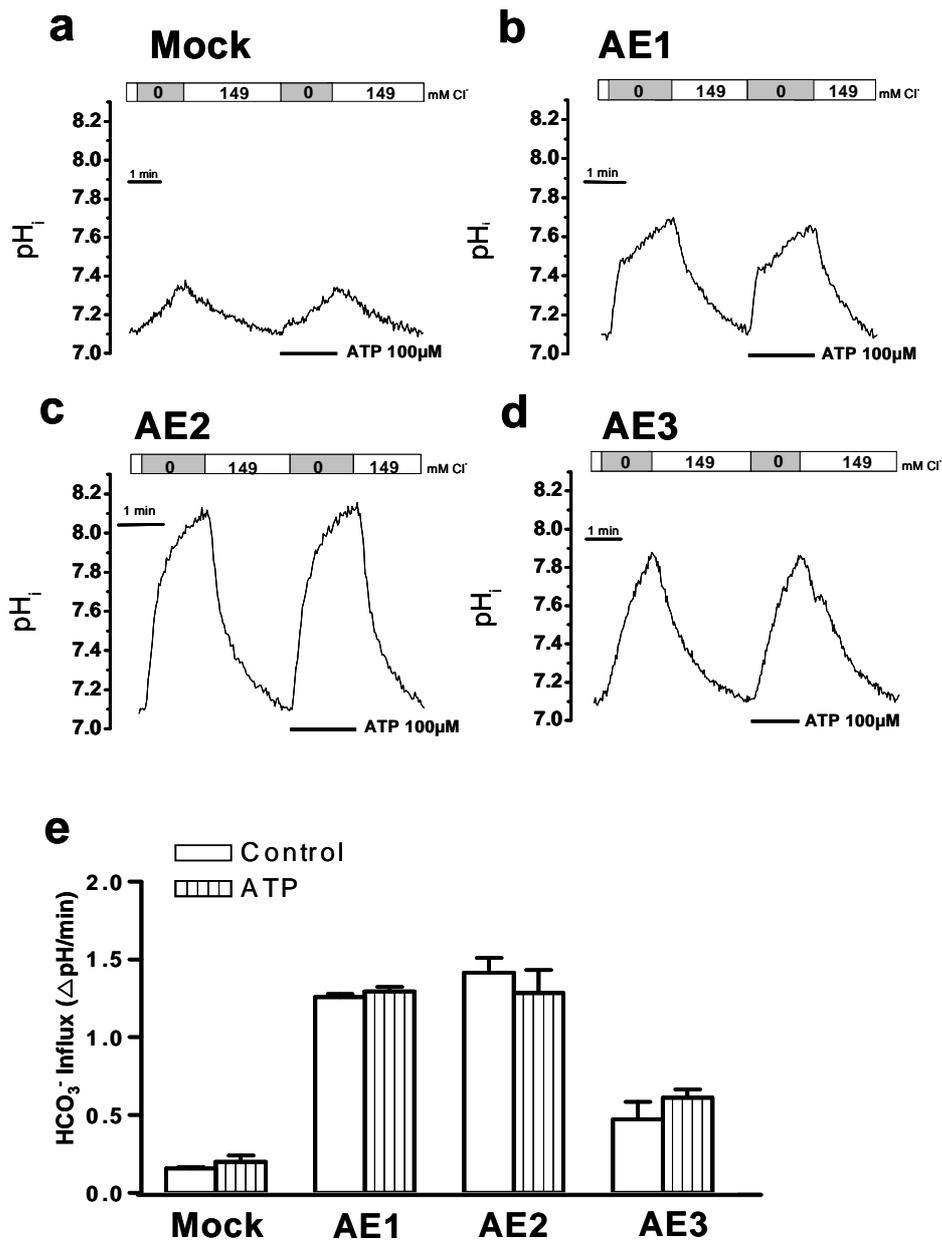


그림 4. SLC4 family AE 아형의 칼슘신호에 의한 기능 변동. SLC4 family의 AE를 HEK293세포에 transfection한 후 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능을 측정하였다. AE1(b), AE2(c), AE3(d)에서 ATP에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 활성은 보이지 않았다. T:표준오차

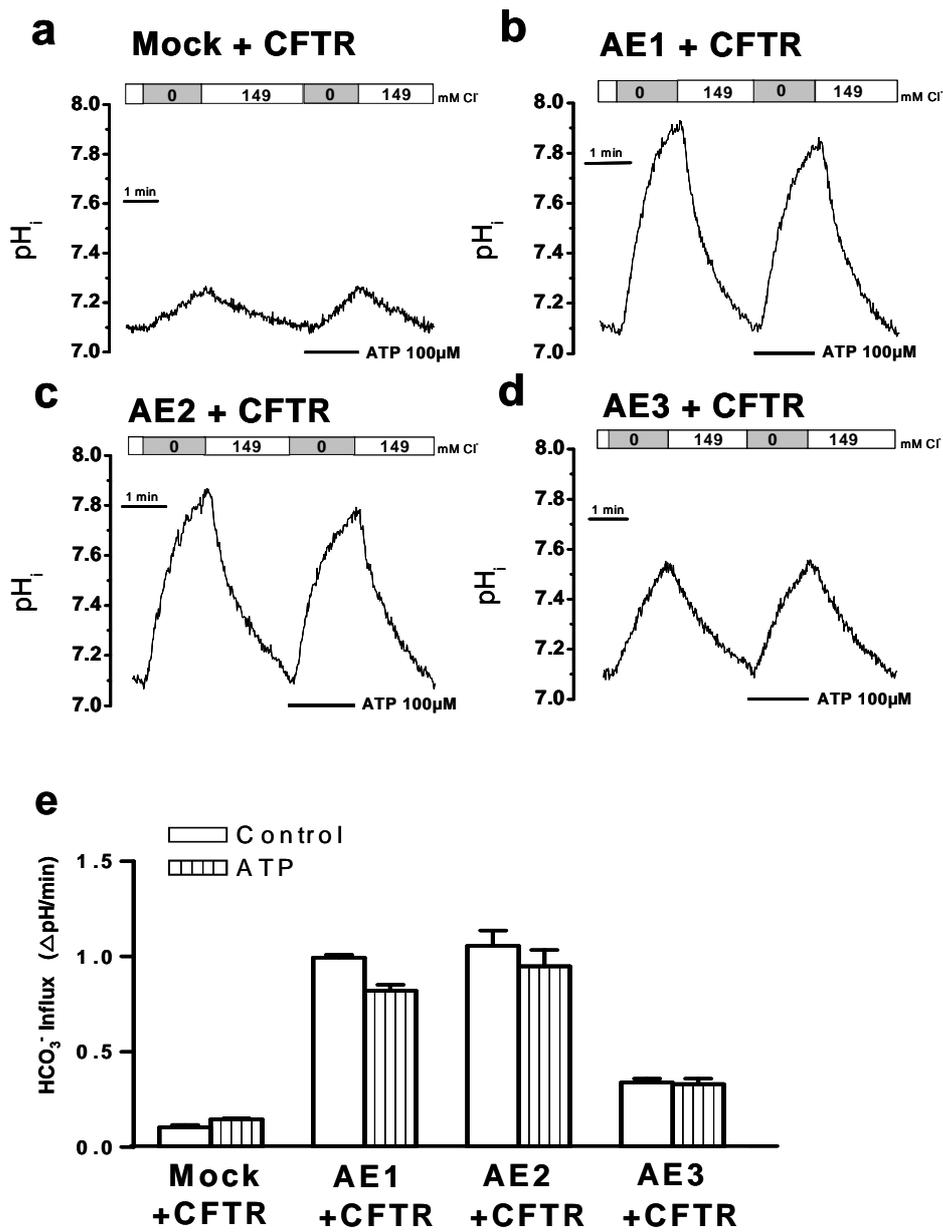


그림 5. CFTR 발현시 SLC4 family AE 아형의 칼슘신호에 의한 기능 변동. HEK293 세포에 각각의 AE와 CFTR을 cotransfection 시킨 후 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 기능을 측정하였다. CFTR의 발현이 AE1(b), AE2(c), AE3(d)의 칼슘신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환변동에 영향을 주지 않았다. T:표준오차

5. 칼슘신호에 의한 SLC26 family Anion Exchanger의 기능 변동

SLC26 family AE에는 10개의 아형이 존재한다.²¹ 10개의 아형 중 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능이 있다고 알려져 있는 것은 DRA, Pendrin, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A8, SLC26A9이다. HEK293 세포에 DRA, Pendrin, SLC26A6, SLC26A7, SLC26A9의 AE 아형을 transfection하여 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 측정하였으나 DRA를 제외한 나머지 아형에서는 HEK293 세포의 basal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능과 비교해 많은 증가를 보이지 않았다(자료 표시 없음). DRA는 basal 교환기능에 비해 4배정도 높은

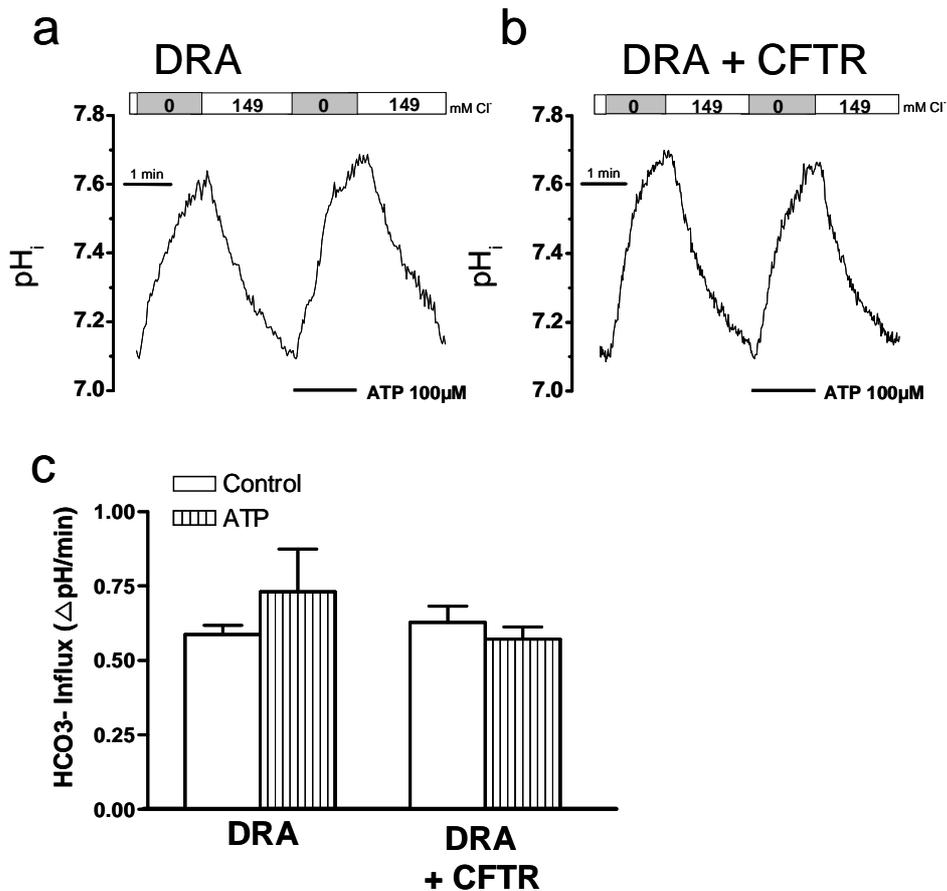


그림 6. DRA의 칼슘신호에 의한 기능 변동. HEK293 세포에 DRA를 transfection하거나 DRA와 CFTR을 cotransfection하여 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능을 측정하였다. DRA는 칼슘신호에 의하여 기능변동을 보이지 않았다. T:표준오차

$\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능을 나타내었다. DRA를 발현하고 있는 HEK293 세포에 ATP 자극을 주고 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능을 측정한 결과 ATP에 의해 유발된 칼슘신호에 의한 활성변동은 보이지 않았다(그림 6a).

DRA는 CFTR과 상호작용하며 cAMP 신호에 의하여 CFTR 의존적으로 활성화된다고 알려져 있다.⁹ HEK293 세포에 DRA(0.2 μg)를 CFTR(1 μg)과 cotransfection 하여 동시 발현시켰을 때, DRA의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능이 cAMP 신호에 의해 활성화되는 것을 확인할 수 있었다.(자료 표시 없음) 하지만 칼슘신호를 일으키는 ATP에 의해서는 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환기능에 변동을 보이지 않았다(그림 6b).

IV. 고찰

사람의 췌관세포는 140 mM에 이르는 고농도의 중탄산염을 분비한다. 고농도 중탄산염의 분비는 mucin plugging에 의해 췌관이 막히거나 부적절한 소화효소 활성화에 의해 췌관이 손상되는 것을 방지한다. 췌관에서 중탄산염의 분비에 대한 많은 연구가 진행되고 있지만, 아직 중탄산염 분비의 정확한 기전은 밝혀지지 않았다.⁴ 대부분의 중탄산염의 분비는 췌관 내강막에 존재하는 AE에 의해 이루어지며, CFTR이 AE의 기능 조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.^{2,5,6,9} CFTR 유전자에 돌연변이가 생긴 낭포성 섬유증(cystic fibrosis) 환자에서는 췌관 중탄산염 분비가 제대로 이루어지지 않아 췌액의 중탄산염 결핍 현상을 보인다.

지금까지 CFTR-의존적 중탄산염 분비에 대한 많은 연구들은 secretin 또는 vasoactive intestinal peptide(VIP) 등에 의한 cAMP 신호를 중심으로 이루어졌다.¹¹ cAMP 신호는 CFTR 의존적 중탄산염 분비를 증가시키며, DRA, Pendrin, SLC26A6 등의 AE가 cAMP 신호에 의해 CFTR 의존적으로 활성화될 수 있다. cAMP 신호 뿐만이 아니라 칼슘신호를 일으키는 콜린성 수용체, PAR2(protease-activated receptor 2), P2R 등의 활성이 췌액과 중탄산염의 분비를 증가시킬 수 있다. 췌관세포인 CAPAN-1의 측저막에 trypsin을 처리하거나 내강막에 ATP를 주었을 때, 내강막의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환이 현저히 증가하는 것을 관찰하였다.¹⁵ 이러한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환의 증가는 cAMP 신호에 의한 PKA 경로를 통하지 않고 칼슘신호에 의존적이며, 정상적인 CFTR의 발현을 필요로 한다. 본 실험에서는 현재까지 알려진 여러 가지 AE의 아형들에 대하여 각각 칼슘신호에 의한 활성 변화를 관찰하여 췌관세포에서 칼슘신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환의 증가를 분자적인 관점에서 설명하고자 하였다.

CAPAN-1 세포에서 칼슘신호에 의한 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환활성의 증가를

확인하였다. CAPAN-1 세포에 칼슘신호를 일으키는 물질로는 ATP와 ionomycin을 사용하였다. CAPAN-1 세포는 P2R을 발현하고 있어 ATP에 의해 세포내 칼슘신호가 일어나며, 칼슘 ionophore인 ionomycin도 세포내 칼슘신호를 일으킨다.¹⁵ $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환의 측정은 CaCC와 CFTR을 통한 전기생성적인 Cl^- 의 이동을 막기 위하여 고농도의 K^+ (100 mM K^+) 관류액에서 수행하였다. CAPAN-1 세포는 측저막과 내강막으로 분화되지 않은 상태에서도 ATP와 ionomycin 자극에 의해 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환의 증가를 나타내었다(그림 1).

CAPAN-1 세포에서 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환은 AE에 의해 이루어진다. AE에는 여러 가지 아형들이 존재하는데, 지금까지 SLC4 family와 SLC26 family가 알려져 있다.^{20,21} 각각의 AE 아형들이 CAPAN-1 세포에서 어떻게 발현하고 있는지를 알아보기 위하여 각 아형들에 대하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 CAPAN-1 세포는 AE1~AE4, Pendrin, SLC26A6, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11 등을 발현하였다. 췌장관의 내강막에는 DRA와 SLC26A6가 다량 발현하고 있어 중탄산염의 분비에 중요한 역할을 하고 있다고 알려져 있다.¹⁰ 하지만 CAPAN-1 세포에서는 DRA는 발현하고 있지 않았다(그림 2).

각각의 AE 아형의 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 성질을 알아보기 위하여 HEK293 세포를 사용하였다.⁹ HEK293 세포는 내재적인 AE 활성이 낮으며, CFTR을 발현하고 있지 않다. 칼슘 신호를 일으키는 효현제로는 ATP를 사용하였다. HEK293 세포도 P2R을 발현하고 있어 ATP에 의해 높은 칼슘신호를 나타내었다(그림 3). 각각의 AE 아형을 lipofectamine과 plus reagent를 이용하여 transfection하여 HEK293 세포에 발현시킨 후 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환 성질을 측정하였다. AE clone의 발현 확인은 GFP를 cotransfection하여 GFP 형광과 AE transfection시 나타나는 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환의 증가로 확인하였다. 본 실험에서 사용한 AE1, AE2, AE3, DRA의 네가지 아형은 모두 HEK293 세포에 발현하였을 때 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환의 증가를 나타내었다.

AE1, AE2, AE3, DRA는 ATP에 의해 유발된 칼슘신호에 의해 활성 변화를 보이지 않았다.(그림4). 또한 각 AE를 CFTR과 동시발현시킨 후 CFTR 의존적인 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 교환을 측정하였을 경우에도 ATP에 의한 AE의 활성 변화는 나타나지 않았다(그림5).

cAMP 신호는 CFTR 의존적으로 DRA, SLC26A4, SLC26A6를 활성화한다.⁹ 따라서 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비의 증가는 cAMP 신호와 다른 분자기전에 의하여 이루어진다고 생각된다. 또한 지금까지 췌관 내강막의 중탄산염 분비에 DRA, SLC26A6 등이 중요한 역할을 한다고 생각되었지만, 칼슘 신호에 의한 중탄산염 분비의 증가에는 SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11 등의 AE가 중요한 역할을 하리라 생각된다.

V. 결 론

본 연구에서는 췌관세포의 중탄산염 분비에 있어서 칼슘신호의 역할을 분자적인 관점에서 살펴보았으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 고농도 K^+ 함유 관류액에서 CAPAN-1 세포는 칼슘신호를 일으키는 ATP와 ionomycin에 의해서 Cl^-/HCO_3^- 교환 기능이 현저히 증가하였다.
2. CAPAN-1 세포에 발현하고 있는 AE 아형을 RT-PCR을 통하여 확인한 결과, SLC4 family의 AE1, AE2, AE3, AE4 와 SLC26 family의 Pendrin, SLC26A6, SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11이 발현함을 확인하였다.
3. HEK293 세포에 AE1, AE2, AE3를 transfection 후 칼슘 신호에 의한 AE 활성변화를 측정된 결과 ATP 자극에 의하여 교환기능에 변화가 없었다. 또한 CFTR을 동시발현한 후 칼슘신호에 의한 활성변화를 측정하였을 때에도 ATP 자극에 의하여 교환기능이 증가하지 않았다.
4. DRA는 ATP 자극에 의해 교환기능이 증가하지 않았으며, DRA와 CFTR을 동시 발현하였을 경우에도 ATP에 의해 교환기능이 증가하지 않았다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비의 증가는 AE1, AE2, AE3, DRA를 통해서 이루어지지 않는다. 칼슘신호에 의한 중탄산염 분비의 증가는 cAMP와는 다른 분자적 기전으로 일어난다고 생각할 수 있으며 SLC26A8, SLC26A9, SLC26A11 등 본 실험에서 기능을 검색하지 않은 다른 AE가 관여하고 있다고 생각된다.

참고문헌

1. Argent BE, and Case RM Physiology of the Gastrointestinal Tract 3rd Ed. New York: Raven Press 1994;1473-1497.
2. Quinton PM. The neglected ion : HCO_3^- . Nat Med 2001 ;7:292-293.
3. Bansil R, Stanley E, Lamont JT. Mucin Biophysics. Annu Rev Physiol 1995;57:635-657.
4. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanism of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. Annu Rev Physiol 2005;67:377-409.
5. Sohma Y, Gray MA, Imai Y, Argent BE. HCO_3^- transport in mathematical model of the pancreatic ductal epithelium. J Membr Biol 2000;176:77-100.
6. Whitcomb DC, Ermentrout GB. A mathematical model of the pancreatic duct cell generating high bicarbonate concentrations in pancreatic juice. Pancreas 2004;29:e30-e40.
7. Lee MG, Wigley WC, Zeng W, Noel LE, Marino CR, et al. Regulation of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expressed in NIH 3T3 and HEK 293 Cells J Biol Chem 1999;274:3414-3421.
8. Lee MG, Choi JY, Luo X, Strickland E, Thomas PJ, Muallem S. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates luminal $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in mouse submandibular and pancreatic ducts. J Biol Chem 1999;274:14670-14677.
9. Ko SB, Shcheynikov N, Choi JY, Luo X, Ishibashi K, Thomas PJ, et al. A molecular mechanism for aberrant CFTR-dependent HCO_3^- transport in cystic fibrosis. EMBO J 2002 ;21:5662-5672.
10. Ko SB, Zeng W, Dorwart MR, Luo X, Kim KH, Millen L, et al. Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. Nat Cell Biol 2004;6:343-350.

11. Cohn JA, Friedman KJ, Noone PG, Knowles MR, Silverman LM, Jowell PS. Relation between mutations of the cystic fibrosis gene and idiopathic pancreatitis. *N Engl J Med* 1998;339:653-658.
12. Luo X, Zheeng W, Yan M, Lee MG, Muallem S. Multiple functional P2X and P2Y receptors in the luminal and basolateral membranes of pancreatic duct cells. *Am J Physiol* 1999;277:C205-C215.
13. Szalmay G, Varga G, Kajiyama F, Yang XS, Lang TF, Case RM. Bicarbonate and fluid secretion evoked by cholecystokinin, bombesin and acetylcholine in isolated guinea-pig pancreatic ducts. *J Physiol* 2001;535:795-807.
14. Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. Luminal ATP stimulate fluid and HCO_3^- secretion in guinea-pig pancreatic duct. *J Physiol* 1999;591.2:551-558.
15. NamKung W, Lee JA, Ahn WI, Han WS, Kwon SW, Ahn DS, et al. Ca^{2+} activates cystic fibrosis transmembrane conductance regulator- and Cl^- -dependent HCO_3^- transport in pancreatic duct cells. *J Biol Chem* 2003;278:200-207.
16. NamKung W, Han WS, Luo X, Muallem S, Cho KH, Kim KH, et al. Protease-activated receptor 2 exerts local protection and mediates some systemic complications in acute pancreatitis. *Gastroenterology* 2004;126:1844-1859.
17. Sorensen CE, Novak I. Visualization of ATP release in pancreatic acini in response to cholinergic stimulus. *J Biol Chem* 2001;276:32925-32932.
18. Kordas KS, Sperlagh B, Tihanyi T, Topa L, Steward MC, Varga G, et al. ATP and ATPase secretion by exocrine pancreas in rat, guinea pig, and human. *Pancreas* 2004;29:53-60.
19. Ko SB, Luo X, Hager H, Rojek A, Choi JY, Licht C, et al. AE4 is a DIDS-sensitive $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger in the basolateral membrane of the renal CCD and the SMG duct. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283:C1206-C1218.

20. Romero MF, Fulton CM, Boron, WF. The SLC4 family of HCO_3^- transporters. *Pflugers Arch* 2004;447:495-509.
21. Mount DB, Romero MF. The SLC26 gene family of multi-functional anion exchanger. *Pflugers Arch* 2004;447:710-721.
22. Jacob P, Rossmann H, Lamprecht G, Kretz A, Neff C, Gregor M, et al. Down-regulated in adenoma mediates apical $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange in rabbit, rat, and human duodenum. *Gastroenterology* 2002;122:709-724.
23. Xie Q, Welch R, Mercado A, Romero MF, Mount DB. Molecular characterization of the murine Slc26a6 anion exchanger: functional comparison with Slc26a1. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 ;283:F826-F838.
24. Lohi H, Lamprecht G, Markovich D, Heil A, Kujala M, Seidler U, et al. Isoforms of SLC26A6 mediate anion transport and have functional PDZ interaction domains. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003;284 :C769-C779.
25. Chernova MN, Jiang L, Friedman DJ, Darman RB, Lohi H, Kere J, et al. Functional comparison of mouse slc26a6 anion exchanger with human SLC26A6 polypeptide variants: differences in anion selectivity, regulation, and electrogenicity. *J Biol Chem* 2005;280:8564-8580.
26. Petrovic S, Barone S, Xu J, Conforti L, Ma L, Kujala M, et al. SLC26A7: a basolateral $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger specific to intercalated cells of the outer medullary collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol* 2004;286:F161-F169.
27. Lohi H, Kujala M, Makela S, Lehtonen E, Kestila M, Saarialho-Kere U, et al. Functional characterization of three novel tissue-specific anion exchangers SLC26A7, -A8, and -A9. *J Biol Chem* 2002;277:14246-14254.

28. Xu J, Henriksnas J, Barone S, Witte D, Shull GE, Forte JG, et al. SLC26A9 is expressed in gastric surface epithelial cells, mediates $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange and is inhibited by NH_4^+ . *Am J Physiol Cell Physiol* 2005;289:C493-C505.
29. Kauffman RF. Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J Biol Chem* 1978;253:5892-5894.
30. Joel BS, Susan MS, Robert AN, Harden TK. HEK293 human embryonic kidney cells endogenously express the P2Y1 and P2Y2 receptors. *Neuropharmacology* 1997;36:1181-1187.

Abstract

Modulation of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger activity by Ca^{2+} signal

Min Jae JO

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Associate Professor Min Goo Lee)

Pancreatic duct cells secrete bicarbonate (HCO_3^-)-rich fluid into pancreatic duct. High concentration of bicarbonate is important for digestive function and maintaining the patency of pancreatic ductal tree. Although the mechanisms of pancreatic bicarbonate secretion are not fully understood yet, it is widely accepted that cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger (anion exchanger, AE) play an important role in bicarbonate secretion. AEs such as DRA, SLC26A4, SLC26A6 can be activated CFTR-dependently by cAMP signal. Although calcium signal can also activate bicarbonate secretion, little is known about the molecular mechanism.

In this study, we investigated the molecular basis of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activation by calcium signal in pancreatic duct. It was confirmed that calcium signal evoked by ATP and ionomycin can

activate $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activity in CAPAN-1. Among AE1, AE2, AE3, and DRA which we tested, none of the above transporters were activated by calcium signal in HEK293 cell when expressed with or without CFTR. This result suggests that $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange activation by calcium signal is mediated through different molecular mechanism from that of cAMP signal and is mediated through other AEs than AE1, AE2, AE3 and DRA..

Key Words: bicarbonate, CFTR, anion exchanger, calcium