

Smad에 의한 alkaline phosphatase 유전자의 발현 조절기전

김난진 · 류현모* · 김현정 · 김영진 · 남순현

경북대학교 치과대학 소아치과학교실, 구강생화학교실*

국문초록

본 실험은 탁월한 골유도능으로 관심의 대상이 되고 있는 BMP의 세포내 신호 전달자로 알려진 Smad 1과 Smad 5가 조골세포 초기 분화표지인자인 ALP 유전자의 발현에 미치는 영향 및 그 조절기전을 알아보려 하였다. BMP 처리 없이도 Smad에 의해 ALP가 발현되는가를 알아보기 위해 Smad 1과 Smad 5가 각각 stably transfection된 C2C12 세포를 3일간 배양후 histochemical assay를 하였고, Smad 1과 Smad 5의 expression vector와 ALP promoter vector를 transient co-transfection한 후 ALP promoter activity를 측정하였다. Smad에 의한 BMP의 효과를 알아보기 위해서 100ng/ml의 BMP-2를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 세포를 배양한후 ALP 유전자의 발현을 northern blot analysis로 확인 하였다. Smad가 ALP 유전자의 발현을 직접적으로 조절하는가를 알아보기 위해서는 단백질 합성억제제인 cycloheximide를 전처리하여 ALP 유전자의 발현을 northern blot analysis하였다.

이상의 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- Smad 1과 Smad 5가 과발현된 세포에서는 BMP 처리없이도 ALP가 발현된다.
- Smad 1과 Smad 5가 과발현된 세포에서 BMP 처리후 ALP 발현 증가율이 대조군 보다 현저히 높게 나타나 Smad가 BMP 효과를 증가시킨다는 것을 알수있다.
- Smad는 새로운 단백질의 합성을 통해 ALP 유전자를 발현시킨다.

주요어 : BMP, osteoblast, Smad, alkaline phosphatase, 신호전달

I. 서 론

골개조는 일생을 통해 일어나며 병적인 경우를 제외하고는 골흡수와 골형성이 조화를 이루어 골의 항상성을 유지한다. 이러한 골개조 현상은 다양한 골질환의 치료와 치과 영역에서는 치조골 흡수, implant의 안정성, 외상과 연관된 골흡수 및 재생, 교정력에 의한 치아이동과 같은 임상적인 관점에서 많은 연구의 대상이 되어 왔다. 골개조는 osteoprogenitor cell의 증식과 분화를 동반하는데¹⁾, 조골세포는 pluripotent mesenchymal stem cell에서 분화되고 이런 미분화된 세포는 호르몬 혹은 성장인자들의 자극에 의해 조골세포, 연골세포, 근육세포등의 특정세포로 분화되어 가며 각각 특이한 분화 표지인자를 합성하게 된다²⁻⁴⁾.

조골세포 배양시 나타나는 조골세포 분화표지 인자들은 세포의 증식 및 분화의 정도에 따라 달리 발현되며, 일반적으로 증

식기, 기질 성숙기, 석회화의 3단계 과정을 거쳐 골을 형성한다. 골표지 인자 중 특히 alkaline phosphatase(이하 ALP)는 조골세포의 분화 초기에 나타나는 표지인자로써 기질 성숙기에 나타나기 시작하여 기질 성숙기 후반에 최대로 발현되고 석회화 단계에서는 감소한다^{5,6)}. 골조직에 많이 존재하는 ALP는 tissue-nonspecific ALP로서 phosphate ester를 가수분해하며 인산의 대사를 조절하고, phosphoryl metabolite의 수준을 일정하게 유지 시키며, phosphoprotein phosphatase의 역할을 한다. 이들은 골석회화 과정에 있어서 hydroxyapatites정장을 저해하는 고농도의 inorganic pyrophosphate(PPi)가 존재시 pyrophosphatase의 역할을 수행하기도 하며, 인산의 plasma membrane transport역할 또는 extracellular calcium binding protein의 역할을 수행하여 osteoid내로 calcium phosphate의 침착을 도와주며^{7,8)} 조골세포의 석회화에 선행하여 나타나서 extracellular matrix가 석회화 할 수 있는 조건을 만드는데 관여한다고 알려져 있다⁹⁾.

조골세포의 분화에 관계하는 조절인자 중에서도 탁월한 골유도능이 있는 것으로 알려진 bone morphogenetic protein(BMP)는¹⁰⁻¹³ 최근까지 최소한 15종류가¹⁴⁻¹⁶ 발견되었고 이들 중, BMP 2, 4, 7이 골유도능을 강하게 나타낸다고 보고되었다. 특히 BMP-2를 mouse premyoblastic cell line인 C2C12 세포에 가하면 근육세포로의 분화는 억제되고, 조골세포로 분화됨이 보고되었다¹⁷. 이러한 BMP의 세포내 신호전달은 BMP type I 수용체의 serine/threonine kinase가 수용체-리간드 결합에 의해 활성화 되고, 세포내의 단백질질을 인산화시킴으로써 그 신호를 세포핵 내로 전달하게 되는데 그중 가장 널리 알려진 signaling molecule은 Smad이다^{18,19}.

Smad는 receptor regulated Smad인 Smad 1, 2, 3, 5, 8 과 common partner Smad인 Smad 4, inhibitory Smad인 Smad 6, 7로 분류된다¹⁸. Dwarfin-A로 명명되기도 하는 Smad1은 BMP 2/4의 세포내 신호 전달체라는 보고가 있어왔으며, Smad 5는 Smad 1과 구조적으로 95% 동일성이 있어 BMP signal에 관계할 것이란 추측이 있어왔다. 이런 Smad1과 Smad5에 관하여 Yamamoto(1997)²⁰ 등은 C2C12 세포는 Smad 1, 2, 4, 5를 발현 시키며, Smad 1 혹은 Smad 5를 C2C12 세포에 과발현 시키면 BMP-2 없이도 조골세포의 표지인자인 ALP는 발현되고 myogenin의 발현은 억제 된다고 하였다. 반면 인산화되는 C-terminal을 제거한 Smad1과 5를 과발현 시키면 BMP signal이 차단됨을 밝히면서 Smad 1과 Smad 5가 BMP signal에 관여한다는 것을 보고하였다.

BMP에 의해 Smad 1과 Smad 5가 인산화되면 Smad 4라는 Co-Smad와 결합하게 됨으로써 핵내로 이동하여 BMP 신호를 전달하게되는 것으로 알려져 있으나, 현재까지 핵내로 이동한 Smad 1, 5가 조골세포의 초기분화에 어떻게 영향을 주는가에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 BMP signal에 관여한다고 밝혀진 Smad 1과 Smad 5가 조골세포의 초기 분화에 미치는 영향을 알고자 Smad 1과 Smad 5가 과발현된 C2C12세포에서의 ALP의 발현양상 및 조절기전을 관찰하고자 하였다.

II. 연구 재료 및 방법

1. Alkaline phosphatase activity의 histochemical analysis

Mouse muscle myoblast cell line인 C2C12 cell과 Lee 등²¹의 방법에 의해 Smad 1과 5가 각각 stably transfection된 cell line을 fetal bovine serum(이하 FBS, GibcoBRL, U.S.A.)과 항생제인 100U/ml penicillin G와 100 μ g/ml streptomycin을 포함하는 Dulbecco modified Eagle medium-high glucose(이하 DMEM, GibcoBRL, U.S.A.) 배지에 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 2 \times 10⁴cell/cm²의 밀도로 12 well plate에 seeding 한후, 배양 하루 뒤 5% FBS를

포함하는 DMEM배지로 교환하고 recombinant human BMP-2(Genetic Institute, U.S.A.)를 농도별(0, 5, 10, 50, 100, 300 ng/ml)로 배지에 첨가한 후 3일간 배양하였다.

배양된 세포의 배지를 제거하고 phosphate buffered saline(이하 PBS)로 2회 씻은 후 citrate-acetone-formaldehyde fixative solution에 30초동안 고정시켜 증류수 45ml에 alkaline phosphatase staining kit(Sigma Diagnostics, U.S.A.)에 포함된 sodium nitrate, FRV-Alkaline, naphthol AS-BI alkaline solution을 각 1ml씩 순서대로 첨가하여 well당 약 1ml 정도 처리하고 빛이 차단되게 15분정도 상온에서 방치한후 PBS로 씻고 건조시켜 관찰하였다.

2. Transient transfection and luciferase assay

Transient transfection

Transfection 하루전 6 well plate에 well당 1 \times 10⁵cell을 seeding하여 50~80% confluent 해질 때 LipoFECTAMINE PLUS reagent(Life technologies)을 이용하여 transfection을 시행하였다. Well당 plasmid DNA(ALP promoter-luciferase reporter vector 및, Smad 1, 5의 expression vector, pcDNA3)는 0.5 μ g, PLUS reagent 2 μ g, LipoFECTAMINE reagent 3 μ g, serum이 포함되지 않은 DMEM 배지 100ml를 사용하며, 우선 DNA와 PLUS reagent를 serum이 포함되지 않은 DMEM배지와 혼합하여 15분 뒤 LipoFECTAMINE 과 DMEM 배지를 혼합한 용액을 첨가한 후 다시 15분동안 상온에 방치하였다. 배양중이던 세포의 배지를 serum 이 포함되지 않은 DMEM 배지로 교환후, transfection 용액 (DNA-LipoFECTAMINE)을 각 well에 200ml 첨가하고, transfection 3시간후 정상 농도로 serum을 첨가하여 48시간 배양한 후 세포를 회수하였다. 이 실험에서의 Smad expression vector plasmid는 Miyazono 박사 (Cancer Institute of the Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan)로 부터, ALP-luciferase reporter vector는 Harada 박사(Sumimoto Pharmaceuticals, Japan)로 부터 받은 것을 사용 하였으며, 각 plasmid의 DNA는 Qiagen Midi Kit을 이용하여 추출하였다.

3. Luciferase Assay

세포의 배지를 제거하고 luciferase assay system kit (Promega, WI, U.S.A.)의 reporter lysis buffer를 well당 200ml를 첨가하여 세포의 lysate를 얻은 다음, 1분정도의 원심분리를 시행하여 상층액 100ml를 luminometer로 luciferase activity를 측정하여 SigmaPlot program으로 도표화 하였다.

4. Northern blot analysis

1) 세포배양

C2C12, Smad 1과 Smad 5가 각각 stably transfection된 cell을 100mm² plate에 1.1×10⁶cell의 밀도로 seeding 한 후 15% FBS가 포함된 DMEM배지에 배양했다. 하루 뒤 각 cell들을 5% FBS를 포함한 배지에 BMP-2를 100ng/ml 첨가한 군과 첨가하지 않은 군으로 나누어 3일간 배양했다.

BMP의 ALP 발현 조절기전을 알아보기 위한 cycloheximide 처리 실험은 C2C12 cell을 동일한 방법으로 seeding 한 후, 대조군과 실험군 모두 하루 뒤 5% FBS를 포함한 배지로 교환하였고, 실험군은 BMP-2 (100ng/ml) 첨가 30분전 cycloheximide (10μl/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다.

2) RNA 추출 및 전기영동

RNA는 Chomczynski와 Sacchi 방법으로 추출하고 spectrophotometer로 정량하였고, 정량된 RNA에서 10μg의 total RNA를 취해 50% formamide, 40mM MOPS(3-(morpholino)propanesulfonic acid), 10mM sodium acetate, 1mM EDTA, 0.1mg/ml ethidium bromide를 첨가하여, 65℃에서 15분간 방치한 후 얼음에서 냉각하였고 1% agarose, 5.5% formaldehyde의 gel상에서 전기영동하였다. 이들 RNA를 Hybond-N-membrane(BIO RAD, U.S.A.)으로 transfer 시켰고, membrane을 UV light에 노출 시켜 RNA를 cross-link 시켰다.

Probe는 Megaprime DNA labelling system kit (Amersham pharmacia biotech, U.S.A.)을 이용하여(α-³²P)dCTP를 부착하였다.

Membrane은 ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech, CA, U.S.A.)으로 prehybridization을 3시간, 1×

10⁶cpm의 ³²P-labeled cDNA probe로 16시간동안 hybridization을 시켰다. Sol I (0.1% SDS, 2XSSC), Sol II (0.5% SDS, 0.1% SSC)로 washing한 후 -70℃에서 Kodak X-ray film에 autoradiography를 시켰다.

Ⅲ. 연구 성적

1. Smad가 과발현된 C2C12세포에서는 BMP 처리없이도 ALP가 발현된다.

BMP에 의해 활성화되는 Smad에 의한 조골세포 분화를 관찰하기 위해 Smad 1과 Smad 5를 stably transfection한 C2C12 세포에서 조골세포 분화의 초기 표지인자인 ALP의 활성을 histochemical assay로 확인 하였다. Smad 1, Smad 5가 stably transfection된 세포들은 histochemical assay 결과 BMP처리 없이도 ALP가 발현되었으며, Smad 1이 과발현된 군에서의 ALP 발현 농도가 Smad 5에 비해서 현저히 높았다 (Fig. 1).

C2C12 세포에 Smad 1, Smad 5와 ALP promoter-luciferase vector 를 각각 co-transfection 시킨후 ALP promoter activity를 측정할 결과 BMP 처리 없이도 Smad1과 Smad 5가 transfection된 군에서는 대조군 보다 ALP promoter activity가 2배정도 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2).

2. Smad가 과발현된 C2C12세포에 BMP를 처리하면 ALP 발현이 증가한다.

Smad 1, Smad 5를 각각 stably transfection한 세포에 BMP를 농도별로 처리하여 histochemical assay를 한 결과 5, 10ng BMP/ml농도에서 C2C12와 Smad 5가 과발현된 군 사

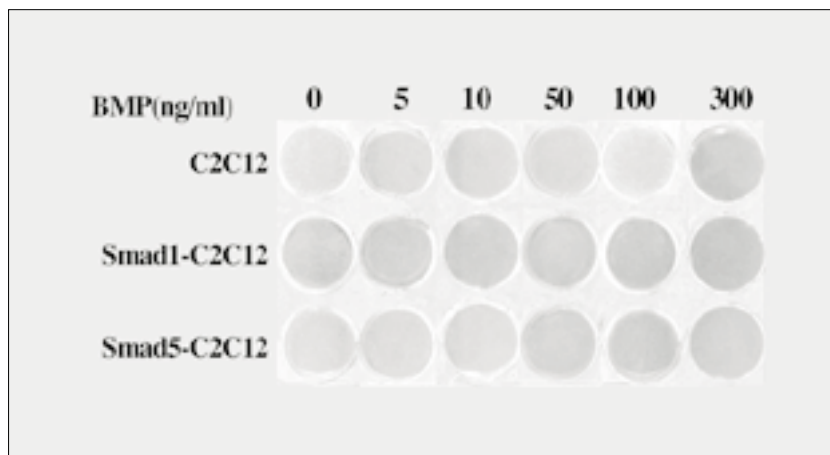


Fig. 1. Histochemical assay of ALP in overexpressed Smad 1, Smad 5 cells.

C2C12, Smad 1-C2C12 and Smad 5-C2C12 cells were plated in DMEM containing 15% FBS, media containing 5% FBS were changed on day 1 and cells cultured for 3 days in the absence or presence (5, 10, 50, 100, 300 ng/ml) of BMP-2.

Cells were stained with alkaline phosphatase staining kit (Sigma Diagnostics, U.S.A.). Smad 1-C2C12, Smad 5-C2C12: Cell lines which were stably transfected with each Smad 1 and Smad 5 expression vectors, respectively.

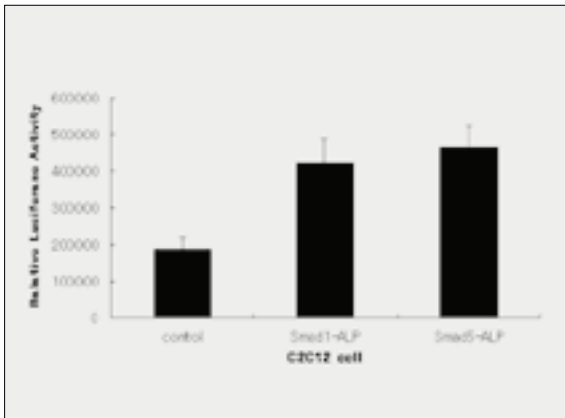


Fig. 2. Activation of ALP promoter activity in response to Smad 1 or Smad 5. C2C12 cells were plated 1×10^5 cells/ well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. Cells were transiently co-transfected with each pcDNA3-ALP (control group), Smad 1-ALP, Smad 5-ALP when the cells reached 50-80% visual confluency. Transfected cells were cultured for 48 hours. Transient transfection and luciferase assay of ALP were performed as described previously.

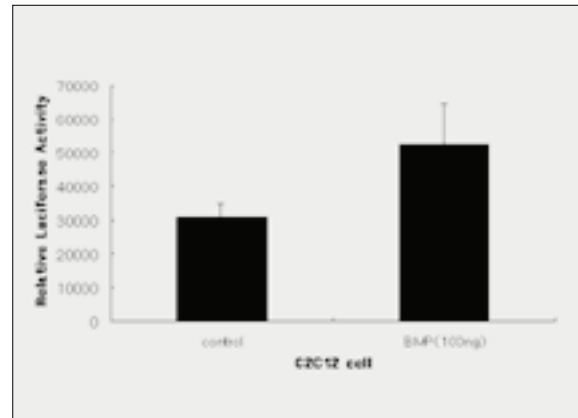


Fig. 3. Activation of ALP promoter activity in response to BMP-2. C2C12 cells were plated 1×10^5 cells/ well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. Cells were transiently co-transfected with each pcDNA3-ALP when the cells reached 50-80% visual confluency. After 24 hours, transfected cells were treated with or without BMP-2 (100ng/ml) for 24 hours. Transient transfection and luciferase assay of ALP were performed as described previously.

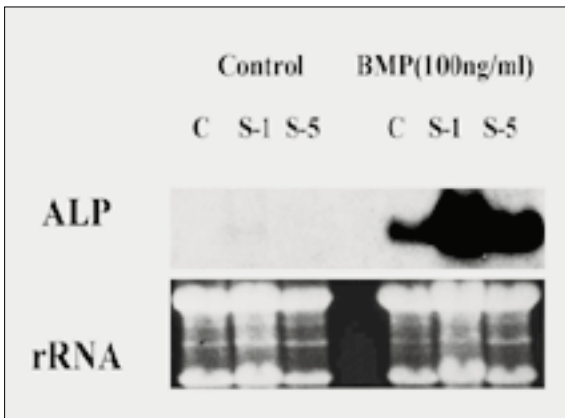


Fig. 4. The effect of BMP-2 in overexpressed Smad 1, Smad 5 cells. C2C12(C), Smad 1-C2C12 (S-1), Smad 5-C2C12(S-5) cells were plated in DMEM containing 15% FBS. Media containing 5% FBS were changed on day 1 and cells were cultured with or without BMP-2 for 3 days. Total RNA(10 μ g) were analyzed by northern blot hybridization with cDNA for ALP. The amount of rRNA in the same samples was visualized ethidium bromide staining

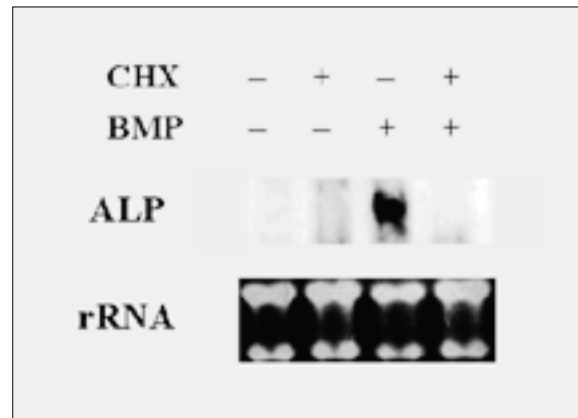


Fig. 5. ALP expression by BMP-2 in C2C12 cells was dependent on de novo protein synthesis. C2C12 cells were cultured for 3 days, and treated for final 24 hours with or without BMP-2 (100ng/ml) alone or in combination with 10 μ g/ml cycloheximide(CHX) pre-treatment. Total RNA(10 μ g) were analyzed by northern blot hybridization with cDNA for ALP. The amount of rRNA in the same samples was visualized ethidium bromide staining

이에서는 ALP 발현농도 차이가 유의하지 않았으며, Smad 1 과는 발현의 차이가 있었다. 50, 100ng BMP/ml의 농도에서는 대조군의 ALP 발현 농도가 낮게 나타났으며 300ng의 BMP 농도에서는 세 군 모두 비슷한 발현양상을 나타내었다 (Fig. 1). BMP 100ng/ml를 처리한 C2C12 세포에서 ALP promoter activity를 측정 한 결과 2배 정도의 ALP activity

증가를 나타내었으며(Fig. 3), C2C12, Smad 1, Smad 5가 과발현된 세포에서의 northern blot analysis를 한 결과 세 군 모두 BMP (100ng/ml) 처리후 ALP의 mRNA 발현이 증가되었음을 확인 할 수 있었고, 특히 Smad 1과 Smad 5가 과발현된 군에서 ALP 발현증가가 대조군보다 유의하게 커짐을 확인 할 수 있었다(Fig. 4).

3. Smad에 의한 ALP유전자의 발현에는 새로운 단백질의 합성이 필요하다.

BMP-2에 의한 ALP의 발현 증가가 Smad signaling을 통한 직접적인 현상인지, Smad에 의해 새로이 합성된 단백질에 의한 것인지를 확인하기 위해 C2C12 세포에 단백질 합성 억제제인 cycloheximide(10 μ g/ml)를 30분간 전처리한 후 BMP-2를 처리한 세포의 ALP mRNA 발현을 확인 해본 결과 ALP가 발현되지 않았다(Fig. 5). 이 결과를 통해 ALP 유전자 발현이 Smad에 의해 직접적으로 유도되는 것이 아니라, 어떤 특정한 단백질의 합성을 통해 2차적으로 유도된다는 것을 알 수 있었다.

IV. 총괄 및 고찰

Bone morphogenetic protein(BMP)는 이소골 형성의 능력으로 Urist¹⁰⁾(1965)에 의해 처음 동정되어 현재까지 적어도 15개의 TGF- β superfamily¹⁶⁾에 속하는 BMP들이 발견되었다. 이들중 BMP 2, 4, 7은 골유도능을 강하게 나타내어 정제된 단백질 자체만으로도 탈회된 골기질이 가지는 골유도능을 보여 주었으며 특히 BMP-2의 경우는 in vitro상 premyoblastic cell line인 C2C12 세포를 조골세포로 변환시키는 능력¹⁷⁾이 있음이 밝혀짐으로써 이 실험모델을 이용하여 BMP에 의한 이소골 형성의 기전뿐만 아니라 조골세포의 분화기전에 대한 연구가 진행될 수 있게 되었다.

TGF- β superfamily의 신호 전달 체계에서 수용체는 세포막을 1회 관통하며 그 세포질쪽에 serine/threonine kinase 활성을 가진다. 리간드인 TGF- β superfamily 사이의 유사성과 마찬가지로 이들의 수용체 역시 서로간에 유사성을 가지고 있다. 이들의 수용체는 type I과 type II의 두종류로 분류되고 특히 type I 수용체에는 L45 부위가 있어 수용체가 리간드에 특이적으로 결합할수 있게 한다²²⁾. 리간드와 수용체 사이의 결합양상은 크게 두가지 방법으로 대별 되는데 첫째는 TGF- β 와 activin이 취하는 전달양식으로 먼저 리간드가 type II 수용체에 결합하여 인산화되는 방법이며 이때 type I 수용체는 type II 수용체의 매개없이 리간드와 결합하지 않는다^{23,24)}. 둘째는 리간드가 각각의 수용체와도 결합을 하기는 하나 그 결합력이 약한 것에 반하여, 두종류의 수용체가 동시에 존재할 경우 아주 높은 결합능을 발휘하는 방법이다. 이것은 전형적인 BMP 수용체의 신호전달 방법으로 BMP 수용체가 전혀 발현되지 않는 세포에 각각의 수용체를 발현시킴으로써 확인 되었다²⁵⁻²⁷⁾.

BMP의 신호전달 체계에서 수용체는 type I과 type II가 있으며 type I 수용체에는 type IA와 type IB 두종류가 있다. BMPR II에 BMP가 결합하여 수용체-리간드 복합체를 형성하면 BMPR I의 serine threonine kinase가 활성화되고 세포내의 단백질을 인산화시킴으로써 BMP의 신호를 세포핵내로 전달하게 되는데^{28,29)} 그중 가장 널리 알려진 단백질이 Smad이다.

Smad는 C. elegance에서 발견된 Sma라는 유전자와 drosophil에서 발견된 Mad(Mother aganinst dpp)라는 유전자가 동일한 유전자임이 밝혀진 후 Sma와 Mad의 합성어로 명명된 것이다. Smad 1, 2, 3, 5는 TGF- β , BMP와 같은 리간드에 특이적으로 반응하는 receptor regulated Smad(R Smad), Smad 4는 R-Smad와 함께 핵막을 통과하는 common partner Smad(Co Smad)로 명명되며³⁰⁾, Smad 6, 7은 type I 수용체에 결합하거나 R Smad와 결합하여 R Smad가 Co Smad와 결합을 하지 못하게 함으로써 TGF- β signaling을 억제하는 작용을 나타내어 inhibitory smad(I Smad)로 분류된다^{30,31)}.

R Smad와 Co Smad의 구조는 linker region으로 연결된 두 개의 잘 보존된 MH1 domain(N-terminal)과 MH2 domain(C-terminal)이 있으며, MH1 domain과 MH2 domain은 상호 억제 작용을 한 상태로 세포질에 존재한다. R Smad의 C-terminal쪽 MH2 domain에는 BMPR I과 접촉하여 인산화되는 SSXS motif가 있고, Co Smad인 Smad4와 결합하는 부위가 있어서, BMP signal에 의해 SSXS motif가 인산화되면 MH1 domain에 의한 MH2 domain의 상호 억제 작용이 풀리면서 R Smad가 Smad 4와 hetero oligomerization을 형성하여 핵내로 이동 가능하게 됨으로써 BMP signal이 세포내로 전달되는 것이다^{22,32,33)}. 그리고 핵내로 이동한 Smad 복합체는 전사조절인자로 작용하게된다. 전사인자로서의 Smad의 작용기전에 관하여 Smad가 FAST-1, AP1, TEF3, CBP/300등 다른 전사인자와 함께 특정 유전자 발현을 조절한다고³⁴⁾ 생각되었으나 최근에는 Smad 3-Smad 4 복합체가 직접 결합할수 있는 DNA specific sequence인 Smad binding element(SBE)³⁵⁾가 밝혀져서 Smad가 독자적으로도 다른 유전자의 발현을 조절할 수 있다는 가능성이 알려지게 되었다. 그러나 현재까지 BMP signal의 전달자인 Smad 1과 Smad 5의 binding site에 대한 보고는 없는 실정이다.

BMP가 조골세포의 분화에 미치는 영향을 살펴보면 Katagiri 등(1994)¹⁷⁾이 premyoblast cell line인 C2C12 세포에 300ng/ml의 BMP-2를 처리하여 배양하면 근육세포로 분화하지 않고 조골세포의 분화표지인자인 ALP, osteocalcin, osteopontin 등이 발현되는 것을 보고하였고 Ryoo 등(1998)³⁸⁾은 preosteoblast인 MC3T3-E1 세포를 300ng/ml의 BMP-2 하에서 배양하면 조골세포로의 분화를 1주일 이상 앞당기는 효과를 나타내며, MC3T3-E1세포를 20일간 배양하면서 배양 1일 부터 3일까지 BMP-2를 처리한 군에서 골결절 형성이 유의하게 촉진되는 결과를 관찰하면서 BMP-2는 조골세포의 초기 분화 조절에 중요한 역할을 한다는 것을 보고하였다.

BMP signal의 전달자인 Smad 1, Smad 5와 조골세포의 분화와의 관계에 대하여서는 Yamamoto 등(1997)²⁰⁾은 C2C12 세포에 Smad 1 혹은 Smad 5를 과발현 시키면 BMP-2 없이도 C2C12 세포가 ALP activity를 나타내고 myogenin activity는 억제되며, BMPR-IA의 인산화되는 부위를 제거시

V. 결 론

킨 C2C12 세포에 Smad 1과 Smad 5를 과발현 시키면 위와 동일하게 ALP가 발현되고 myogenin은 억제된다고 하였다. 그리고 C-terminal의 인산화되는 부위를 제거한 Smad 1과 Smad 5를 과발현 시키면 myogenin activity가 증가 하면서 BMP signal이 차단됨을 관찰하면서, C2C12 세포에서는 BMPR-IA를 경유하는 다른인자나 endogenous BMP와 관계 없이 exogenous Smad 1과 Smad 5의 과발현만으로도 ALP가 발현됨을 보고했다.

Smad가 조골세포 분화의 초기 표지인자인 ALP 발현에 미치는 영향을 알아보기 위한 본 실험에서, Smad 1과 Smad 5를 transient transfection한 세포에서 ALP promoter activity가 대조군에 비해 2배정도 높게 나타난 것과 histochemical assay 상 Smad 1, Smad 5가 stably transfection된 세포에서 BMP 없이도 ALP가 발현된 것을 통해 Smad 1과 Smad 5가 과발현된 세포에서는 BMP 처리없이도 ALP가 발현됨을 확인 할 수 있었다. histochemical assay 결과 Smad 5가 transfection된 세포에서의 ALP 발현 농도가 Smad 1의 세포에 비해 현저히 낮게 나타났는데 이것은 stably transfection시 각 Smad의 expression vector가 세포의 염색체에 들어간 위치가 다르고 그 위치에 따라 Smad의 발현정도가 달라져서 나타난 결과라고 사료된다.

Smad 1, Smad 5가 stably transfection된 세포에 BMP를 처리했을때의 ALP 발현 증가가 대조군에 비해 현저히 큰 것으로 나타나서, Smad는 BMP의 효과를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 그러나 BMP가 5, 10ng/ml 정도로 낮은 농도인 경우 그 증가효과가 ALP staining상으로 확인될 만큼 크게 나타나지는 않았다. 이상의 결과에서 볼때 일정 농도 이상의 BMP signal이 있어야만 stably transfection된 Smad의 발현이 증폭되고 이에 의해 ALP 발현이 크게 증가 되는 것이라고 생각된다.

핵내로 이동한 후의 Smad가 ALP발현에 미치는 작용기전에 대해서는 정확한 자료가 없는 실정이어서 본 실험에서는 핵내로 이동한 Smad가 ALP를 직접적으로 발현 시키는지 알아보기 위해 cycloheximide를 전처리 한 결과 cycloheximide전처리 군에서는 northern blot analysis시 ALP mRNA가 발현되지 않음을 확인하였다. Smad에 의해 ALP 유전자가 직접적으로 유도된다면 단백질 합성억제제인 cycloheximide의 처리 후에도 ALP 유전자의 전사는 영향을 받지 않아야 하지만, cycloheximide 처리후에 ALP 유전자가 유도되지 않은 것은 Smad에 의해 새로운 단백질이 합성되고 이 단백질이 ALP의 전사를 조절 하는 것으로 사료된다.

이상의 결과에서 Smad 1, Smad 5 모두가 BMP의 신호전달에 관계한다는 것은 알 수 있었지만 두 Smad간의 기능적 차이는 확인 할 수 없어서 이에 대한 연구가 더 필요할 것이라 사료되며, 아울러 Smad가 ALP외에 다른 조골세포의 표지인자들의 발현에 작용하는 기전을 밝히는 연구도 계속적으로 진행되어야 할 것이라 생각된다.

Bone morphogenetic proteins(BMPs)는 TGF- β super-family의 일종으로 탁월한 골유도능으로 관심의 대상이 되어왔다. 특히 BMP-2는 조골세포의 초기 분화조절에 관여한다는 보고가 있어왔다. BMP-2는 이종이량체의 BMP 수용체와 결합하여 수용체의 세포질쪽의 serine/threonine kinase활성을 자극하고 이는 다시 세포질에 존재하는 Smad 1과 Smad 5를 활성화하여 이들이 Smad 4와 결합 후 핵속에서 작용하도록 조절한다. 그러나 BMP에 의해 활성화된 Smad 1, Smad 5가 핵속으로 이동한 후의 작용기전과 조골세포의 초기분화에 미치는 영향에 대해서는 아직 잘 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 Smad 1과 Smad 5가 조골세포 초기 분화표지인자인 ALP 유전자 발현에 미치는 영향 및 그 조절기전을 알아보 고자 하였다.

BMP 처리 없이도 Smad에 의해 ALP가 발현되는가를 알아보기 위해 Smad 1과 Smad 5가 각각 stably transfection된 C2C12 세포를 3일간 배양후 histochemical assay를 하였고, Smad 1과 Smad 5의 expression vector와 ALP promoter vector를 transient co-transfection한 후 ALP promoter activity를 측정하였다. Smad에 의한 BMP의 효과를 알아보기 위해서 100ng/ml의 BMP-2를 처리한 군과 처리하지 않은 군으로 나누어 세포를 배양한후 ALP 유전자의 발현을 northern blot analysis로 확인 하였다. Smad가 ALP 유전자의 발현을 직접적으로 조절하는가를 알아보기 위해서는 단백질 합성억제제인 cycloheximide를 전처리하여 ALP 유전자의 발현을 northern blot analysis하였다.

이상의 실험결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Smad 1과 Smad 5가 과발현된 세포에서는 BMP 처리없이도 ALP가 발현된다.
2. Smad 1과 Smad 5가 과발현된 세포에서 BMP 처리후 ALP 발현 증가율이 대조군 보다 현저히 높게 나타나 Smad가 BMP 효과를 증가시킨다는 것을 알 수 있다.
3. Smad는 새로운 단백질의 합성을 통해 ALP 유전자를 발현시킨다.

참고문헌

1. Owen M, Friedenstein AJ : Stromal stem cells : Marrow-derived osteogenic precursors. In cell and Molecular Biology of vertebrate Hard Tissues Chickester Ciba Foundation Symposium (Evered D and Harnett S eds) 136:42-60, 1988.
2. Grigoriadis AE, Heershe JNM, Aubin JE : Continuously growing bipotential and monopotential myogenic, andipogenic and chondrogenic subclones

- isolated from the multipotential RCJ 3.1 Clonal cell line. *Dev Biol* 142:313-318, 1990.
3. Taylor SM, Fones PA : Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T2 cells treated with 5-azacytidine. *Cell* 17:771-779, 1979.
 4. Yamaguchi A, Kahn AI : Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipogenic developmental potential. *Calcif Tissue Int* 49:221-225, 1991.
 5. Aronow MA, Gerstenfeld LC, Owen TA, et al. : Factors that promote progressive development of the osteoblast phenotype in cultured fetal rat calvaria cells. *J Cell Physiol* 143:213-221, 1990.
 6. Lian JB, Sten GS : Concepts of osteoblast growth and differentiation: Basis for modulation of bone cell development and tissue formation. *Crit Rev Oral Biol and Med* 3:269-305, 1992.
 7. deBernar B, Bianco P, Bonucci E, et al. : Biochemical and immunochemical evidence that in cartilage an alkaline phosphatase is a Ca²⁺ binding glycoprotein. *J Cell Biol* 103:1615-1623, 1986.
 8. Bellow CG, Aubin JE, Heersche JNM : Initiation and progression of mineralization of bone nodules formed in vitro the role of alkaline phosphatase and organic phosphate. *Bone and Mineral* 14:27-40, 1991.
 9. Owen TA, Aronow MA, Shalhoub V, et al. : Progressive development of the rat osteoblast phenotype in vitro : Reciprocal relationships in expression of genes associated with osteoblast proliferation and differentiation of the bone extracellular matrix. *J Cell Physiol* 143:420-430, 1990.
 10. Urist MR : Bone : formation and autoinduction. *Science* 150:893-899, 1965.
 11. King GN, King N, Cruchley AT, et al. : Recombinant human BMP2 promotes wound healing in rat periodontal fenestration defects. *J Den Res* 76:1460-1470, 1997.
 12. Howell TH, Fiorellini J, Jones A, et al. : A feasibility study evaluating BMP2/absorbable collagen sponge device for local alveolar ridge preservation or augmentation. *Int. J Periodontics Restorative Dent* 17(2):124-39, 1977.
 13. Koempel JA, Patt BS, O'Grady K, et al. : The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on the integration of porous hydroxyapatite implants with bone. *J Biomed Mater Res* 41(3):359-63, 1998.
 14. Celeste AI, Ross AJ, Yamaji N et al. : The molecular cloning of human bone morphogenetic proteins-10, 11, and 12, three new members of the transforming growth factor- β superfamily. *J Bone Mineral Res* 10(suppl.1):S-336, 1995.
 15. Dube JL, Celeste AJ : Human bone morphogenetic protein-13, a molecule which is highly related to human bone morphogenetic protein-12. *J Bone Mineral Res* 10(Suppl.1):S-336, 1995.
 16. Yamaguchi A, Komori T, Suda T : Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, Hedgehogs and Cbfa1. *Endocrine Rev* 21(4):393-411, 2000.
 17. Katagiri T, Yamaguchi A, Komaki M, et al. : Bone Morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J Cell Biol* 127:1755-1766, 1994.
 18. ten Dijke P, Miyazono K, Heldin CM : Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF- β signaling. *Trends Biochem Sci* 25(2):64-70, 2000.
 19. Derynck R, Gelbart WM, Harland RM, et al. : Nomenclature : vertebrate mediators of TGF- β family signals. *Cell* 87(2):173, 1996.
 20. Yamamoto N, Akyama S, Katagiri T, et al. : Smad1 and Smad5 act downstream of intracellular signalings of BMP-2 that inhibits myogenic differentiation and induces osteoblast differentiation in C2C12 myoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 238(2):574-80, 1997.
 21. Lee KS, Kim HJ, Li QL, et al. : Runx2 is common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2 and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Mol Cell Biol* 20(23):8783-8792, 2000.
 22. Piek E, Heldin CH, ten Dijke P : Specificity, diversity, and regulation in TGF- β superfamily signaling. *FASEB J* 13:2105-2124, 1999.
 23. Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, et al. : Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF beta type II receptor. *Cell* 75(4):681-92, 1993.
 24. Ebner R, Chen RH, Shum L, et al. : Cloning of a type I TGF β receptor and its effect on TGF β binding to the type II receptor. *Science* 260:1344-1348, 1993.
 25. Liu F, Ventura F, Doody J, et al. : Human type II

- receptor for BMPs extension of the two-kinase receptor model to the BMPs. *Mol Cell Biol* 15: 3479-3486, 1995.
26. Rosenzweig BL, Imamura T, Okadome T, et al. : Cloning and characterization of human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(17):7632-6, 1995.
 27. Nishitoh H, Ichijo H, Kimura M, et al. : Identification of type I and type II serine/threonine kinase receptors for growth/differentiation factor-5. *J Biol Chem*. 271(35), 21345-52. 1996.
 28. Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, et al. : MADRI, a Mad-Related protein that functions in BMP-2 signaling pathways. *Cell* 85:489-500, 1996.
 29. Macias-silva M, Abdollah S, Hoodless PA, et al. : MADR2 is substrate of the TGF- β receptor and its phosphorylation is required for Nuclear Accumulation and signaling. *Cell* 87:1215-1224, 1996.
 30. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P : TGF- β signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 390:465-471, 1997.
 31. Imamura T, Takase M, Nishirara A, et al. : Smad6 inhibits signaling by the TGF- β superfamily. *Nature* 389: 622-626, 1997.
 32. Abdollah S, Macias-silvan, Tsukayaki T, et al. : T β RI phosphorylation of Smad 2 on Ser 465 and Ser 467 is required for Smad 2-Smad 4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 272:27678-27685, 1997.
 33. Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engström U, et al. : Phosphorylation of Ser 465 and Ser 467 in the C-terminus of Smad 2 mediates interaction with Smad 4 and is required for transforming growing factor- β signaling. *J Biol chem*. 272:28107-28115, 1997.
 34. Massague J: TGF- β signal transduction. *Annual Rev Biochem* 67:753-791, 1998.
 35. Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, et al. : Human Smad 3 and Smad 4 are sequence specific transcription activator. *Mol Cell* 1:611-617, 1998.
 36. Kretschmar M, Liu F, Hata A, et al. : The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Gene & Devel* 11:984-995, 1997.
 37. Nishimura R, Kato Y, Chen D, et al. : Smad5 and DPC4 are key molecules in mediating BMP-2 induced osteoblastic differentiation of the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *J Biol Chem* 273:1872-1879, 1998.
 38. Ryoo HM, Bae SC : Osteoblast 분화에 미치는 BMP-2 의 역할. *대한 골대사학회지* 5(2):83-95, 1998.

Abstract

THE EFFECT OF BMP REGULATED SMAD PROTEIN
ON ALKALINE PHOSPHATASE GENE EXPRESSION*

Nan-Jin Kim, Hyun-Mo Ryoo*, Hyun-Jung Kim, Young-Jin Kim, Soon-Hyeun Nam

Department of Pediatric Dentistry and Oral Biochemistry*
College of Dentistry, Kyungpook National University

Bone morphogenetic proteins(BMPs), members of the transforming growth factor β (TGF- β) superfamily were first identified as the factors that induce ectopic bone formation in vivo, when implanted into muscular tissue. Especially BMP-2 inhibits terminal differentiation of C2C12 myoblasts and converts them into osteoblast lineage cells. In the molecular mechanism of the signal transduction of TGF- β and related factors, intracellular signaling proteins were identified as Smad. In previous study, it has been reported that Smad 1 and Smad 5, which belong to the R-Smad family mediate BMP signaling, were involved in the induction of osteoblast differentiation in C2C12 cells.

To understand the role of Smads involved in osteogenic transdifferentiation in C2C12 cell, in present study, after we stably transfected C2C12 cells with each.

Smad(Smad 1, Smad 5) expression vector, cultured for 3 days and stained for alkaline phosphatase activity. ALP activity positive cells appeared in the Smad 1, Smad 5 stably transfected cell even in the absence of BMP.

After transiently co-transfected C2C12 cells with each Smad expression vector and ALP promoter, it was examined that Smad 1 and Smad 5 expression vector had increased about 2 fold ALP promoter activity in the absence of BMP. These results suggested that both Smad 1 and Smad 5 were involved in the intracellular BMP signals which induce osteoblast differentiation in C2C12 cells.

The effect of BMP on C2C12 cells with Smad 1, Smad 5 transfected were studied by using northern blot analysis. The treatment of BMP upregulated ALP mRNA level in three groups, especially upregulation of ALP was larger in Smad 1, Smad 5 transfected cell than control group.

Pretreatment with cycloheximide(10 μ g/ml), a protein synthesis inhibitor resulted in blocking the ALP gene expression even in BMP(100ng/ml) treated cell. These results suggested that Smad increased the level of ALP mRNA via the synthesis of a certain transcriptional regulatory protein.

Key words : BMP, TGF- β superfamily, Osteoblast, Smad, Alkaline phosphatase, Signal transduction