

## Protein kinase C 및 MAPK pathway가 Runx2의 전사 활성화에 미치는 영향

김은정 · 김현정\* · 류현모\* · 김현정 · 김영진 · 남순현

경북대학교 치과대학 소아치과학교실, 구강생화학교실\*

### 국문초록

조골 세포의 분화에 중요한 역할을 하는 전사 인자인 Runx2는 그 역할은 많이 알려져 있지만, 이를 조절하는 신호 전달 체계에 대해서는 많이 알려지지 않았다. 이에 본 연구에서는 조골 세포의 분화 및 증식에 영향을 미친다고 알려진 PKC 및 MAPK pathway가 Runx2에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. PKC 활성화에 따른 Runx2의 전사 활성화 및 발현 양상을 관찰하기 위해 6XOSE2-C2C12 cell에 PKC 활성제를 처리하여 luciferase assay와 Northern blot analysis를 시행하였다. MAPK 활성화에 따른 Runx2의 전사 활성을 관찰하기 위해 MAPK 활성제를 6XOSE2-C2C12 cell에 처리하여 luciferase assay를 시행하였다. 두 신호 전달 체계의 활성화에 따른 골 표지 유전자의 전사 양상을 관찰하기 위해 osteocalcin과 osteopontin을 transient transfection한 C2C12 cell에 각 신호 전달 체계의 활성제를 처리하여 luciferase assay를 시행하였다. 또한 각 신호 전달 체계가 상호 작용하는지 알아보기 위하여 MAPK 억제제를 전 처리하여 MAPK pathway를 차단한 1 시간 뒤 PKC 활성제를 처리하고 luciferase assay를 시행하여 Runx2의 전사 활성을 관찰하였다.

이상의 실험으로 다음과 같은 결론을 얻었다.

- PKC pathway의 활성화는 Runx2의 전사 활성화 및 발현을 증가시키고 이로 인해 그의 영향을 받는 골 표지 유전자 (osteopontin, osteocalcin)의 전사도 증가한다.
- MAPK pathway의 활성화는 Runx2 및 골 표지 유전자 (osteopontin, osteocalcin)의 전사활성을 증가시킨다.
- PKC pathway는 MAPK pathway를 경유하여 Runx2의 전사 활성을 조절한다.

**주요어 :** Runx2, PKC, MAPK, 조골세포, 전사활성

### I. 서 론

골 조직은 일생동안 골 흡수와 골 형성의 과정을 통해 개조가 일어나게 되며, 분화된 조골 세포는 골 형성에 관여한다. 그러나 골 개조 과정에서 파골 세포의 골 흡수에 이은 골 형성이 조골 세포의 기능적 혹은 수적 이상으로 제대로 이루어지지 않는다면 발육 이상, 골 연화 또는 골다공증과 같은 대사성 골 질환 등이 발생하게 된다. 따라서 조골 세포에 의한 골 형성의 기전을 이해하고 이를 조절하는 물질을 연구하는 것이 대단히 중요할 것으로 생각된다.

조골 세포를 조절하는 인자 중 하나인 Runt-related transcription factor 2 (Runx2)는 조골 세포의 분화 및 골격 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 또한, Runx2는 osteocalcin, osteopontin, type I collagen과 같은 중요한 os-

teoblast-specific gene들의 promotor에 존재하는 OSE 2 element (osteoblast specific element 2)와 결합하여 이러한 유전자들의 발현을 조절한다<sup>2,3)</sup>. Komori 등<sup>4)</sup>은 Runx2를 불활성화시킨 homozygous mutant mice에서는 성숙한 조골 세포가 존재하지 않고, 골격 형성이 완전히 억제되는 것을 보고하였으며, Mundlos 등<sup>5)</sup>은 인간에서 나타나는 autosomal dominant disorder인 쇄골두개 이형성증 (cleidocranial dysplasia; 이하 CCD)이 Runx2 유전자의 돌연변이에 의해 나타난다고 하였다. 그리고, Otto 등<sup>6)</sup>에 의해 Runx2의 heterozygous mutant animals에서도 CCD가 나타난다고 보고되었다. 또한 조골 세포의 배양시 antisense oligonucleotides에 의한 Runx2의 차단으로 인해 조골 세포 분화의 표지 인자들의 발현과 석회화된 결절의 형성이 억제되며<sup>4,7,8)</sup>, 비조골 세포에서 Runx2를 인위적으로 발현시키면 bone sialoprotein, osteo-

\*이 연구는 한국학술진흥재단 과제번호 KRF-F00281의 지원에 의해 이루어졌음을 알립니다.

pontin, 그리고 osteocalcin과 같은 주요한 osteoblast-specific gene들의 발현이 유도된다<sup>8)</sup>.

한편, 조골 세포는 세포 내 여러 종류의 신호 체계들의 활성화에 의해 성장이 조절되는데, 이 중 PKC pathway는 조골 세포의 증식과 유전자 발현을 조절하는 부갑상선 호르몬의 작용을 중간에서 매개하는 역할을 하여 이들이 활성화됨에 따라 조골 세포의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있으며<sup>9-12)</sup>, 또한 osteocalcin의 발현을 활성화시키는 것이 보고되었다<sup>13)</sup>.

최근에는 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)가 다양한 세포 종류에서 여러 성장 신호들을 통합하는 신호 전달 체계의 중요한 요소로 알려져 있는데, 이 MAPK pathway가 조골 세포의 성장, 분화 및 integrin의 발현 등에 중요한 역할을 한다고 보고되었다<sup>14)</sup>. 또한, Xiao 등<sup>15)</sup>은 MAPK pathway가 Runx2를 활성화시키고, 인산화시키는 것을 관찰하여 이 신호 전달 체계가 osteoblast-specific gene의 발현에 중요한 역할을 한다는 것을 제시하였다.

이와 같이 Runx2가 조골 세포의 분화와 골격 형성에 미치는 영향들에 대해서는 많은 연구가 있었으나, Runx2를 조절하는 신호 전달 체계에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 이에 본 연구에서는 PKC pathway와 MAPK pathway가 Runx2 및 그의 조절을 받는 골 표지 유전자들에 영향을 미칠 수 있다고 생각하여, PKC pathway와 MAPK pathway 각각의 활성화 및 억제제를 이용해 각 신호 체계를 활성화 또는 불활성화시켜 Runx2와 골 표지 유전자 (osteopontin, osteocalcin)의 전사 활성 및 발현 양상의 변화를 관찰함으로써, 외부 신호에 의한 세포의 신호 전달 체계의 활성화의 turn on/off가 조골 세포의 분화에 미치는 영향을 알고자 한다.

## II. 연구 재료 및 방법

### 1. Cell culture

Mouse muscle myoblast cell line인 C2C12 cell과 Runx2의 결합 부위 (OSE2)를 6 copy 붙여서 만든 6XOSE2-Luciferase reporter가 stably transfection된 cell line (이하 6XOSE2-C2C12)을 이용하였다. 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 seeding하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양액으로는 15% fetal bovine serum (이하 FBS, GibcoBRL, U.S.A)과 항생제인 100 U/ml penicillin G와 100 µg/ml streptomycin을 포함하는 Dulbecco modified Eagle medium high glucose (이하 DMEM, GibcoBRL, U.S.A)배지를 사용하였다.

PKC, MAPK pathway 활성화에 따른 Runx2의 전사 활성을 관찰하기 위하여 5% bovine serum albumin (이하 BSA)과 PKC 활성화제인 phorbol 12-myristate 13-acetate (이하 PMA, Sigma, U.S.A) 또는 MAPK 활성화제인 okadaic acid (Boeinger margeim, Germany)를 농도별로 첨가한 DMEM

배지로 교환하여 18시간 배양하였다. 또한 PKC pathway의 MAPK pathway 경유 여부를 관찰하기 위해서 Erk pathway의 억제제인 PD98059 (Tocris, U.K)나 P38 pathway의 억제제인 SB203580 (Tocris, U.K)와 5% BSA가 첨가된 DMEM으로 배지를 교환하고 1시간 뒤 PMA (50 nM)를 첨가하여 18시간 배양하였다.

### 2. Transient transfection

Transfection 하루 전 6 well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well의 밀도로 seeding하였으며, 50~80%의 밀생 상태가 될 때 LipoFECTAMINE PLUS reagent (GibcoBRL, U.S.A)를 이용하여 transfection시켰다. Well 당 plasmid DNA (OP955-pGL3, OC1050-pGL3)는 1 µg, PLUS reagent 4.5 µl, LipoFECTAMINE reagent 3 µl, serum이 포함되지 않은 DMEM 배지 100 µl를 사용하며, 우선 DNA와 PLUS reagent를 serum이 포함되지 않은 DMEM 배지와 혼합하여 15분간 둔 뒤 LipoFECTAMINE과 DMEM 배지를 혼합한 용액을 첨가한 후 다시 15분 동안 상온에 방치하였다. 배양 중이던 세포의 배지를 serum이 포함되지 않은 DMEM 배지 (800 µl/well)로 교환 후 transfection 용액 (DNA-LipoFECTAMINE)을 각 well에 200 µl씩 첨가하였다. 3시간동안 transfection 시킨 후 정상 농도로 serum을 첨가하여 24시간 배양한 뒤 PMA (50 nM), 또는 okadaic acid (50 ng/ml)를 첨가하고 다시 18시간 배양하였다.

### 3. Luciferase assay

세포의 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (이하 PBS)로 2회 씻은 후 luciferase assay system kit (Promega, WI, U.S.A)의 reporter lysis buffer를 well당 250 µl씩 첨가하여 세포의 lysate를 얻었다. 이들 lysate를 15초간 12000 g으로 원심분리를 시행하여 상층액 100 µl를 luminometer로 luciferase activity를 측정하여 SigmaPlot program으로 도표화하였다.

### 4. RNA preparation and Northern blot analysis

100mm<sup>2</sup> plate에  $1 \times 10^6$  cells의 밀도로 seeding한 후 2일 뒤 5% BSA와 50 nM PMA를 첨가 또는 첨가하지 않고 24시간 배양한 후, 세포의 배지를 제거하고, PBS로 2회 씻은 다음 Chomczynski와 Sacchi 방법으로 RNA를 추출하였으며, spectrophotometer로 정량하였다. 정량된 RNA에서 10 µg의 total RNA를 취해 50% formamide, 40 mM MOPS (3-[morpholino] propane-sulfonic acid), 10 mM sodium acetate, 1 mM EDTA, 0.1 mg/ml ethidium bromide를 첨가하여, 65°C에서 15분간 방치한 후 얼음에서 냉각하였고 1%

agarose, 5.5% formaldehyde의 gel상에서 전기영동하였다. 이들 RNA를 Hybond-N-membrane (BIORAD, U.S.A)으로 전사시켰고, membrane을 UV light에 노출시켜 RNA를 cross-link시켰다. Probe는 Megaprime DNA labelling system kit (Amersham pharmacia biotech, U.S.A)을 이용하여 [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP를 부착하였다. Membrane은 ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech, CA, U.S.A)으로 prehybridization을 3시간,  $1 \times 10^6$  cpm의  $^{32}$ P-labeled Runx2 cDNA probe<sup>17)</sup>로 16시간동안 hybridization을 시켰다. Sol I (0.1% SDS, 2XSSC), Sol II (0.5% SDS, 0.1% SSC)로 세척한 후 -70℃에서 Kodak X-ray film에 감광시켰다.

### III. 연구 성적

#### 1. PKC pathway의 활성화는 Runx2의 전사 활성 및 발현을 증가시킨다.

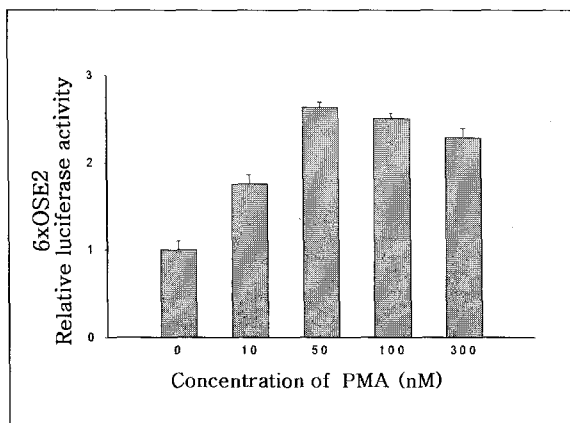
PKC pathway의 활성화가 Runx2의 전사 활성에 미치는 영향을 평가하기 위해 6XOSE2-C2C12 cell에 PKC pathway의 활성제로 알려진 PMA를 0, 10, 50, 100, 300 nM의 농도로 처리하여 luciferase activity를 측정한 결과, PMA 농도에 의존적으로 6XOSE2 promotor activity가 증가하였으며, PMA 농도가 50 nM일 때 Runx2의 전사 활성이 가장 증가하는 것을 관찰하였다 (Fig. 1a). 또한, PKC pathway의 활성화로 인한 Runx2의 발현 양상을 관찰하기 위해 Northern blot analysis를 시행한 결과 PMA (50 nM)를 첨가한 군에서 대조군보다 Runx2의 발현이 증가하였다 (Fig. 1b).

#### 2. PKC pathway의 활성화는 골 표지 유전자 (osteopontin, osteocalcin)의 전사를 증가시킨다.

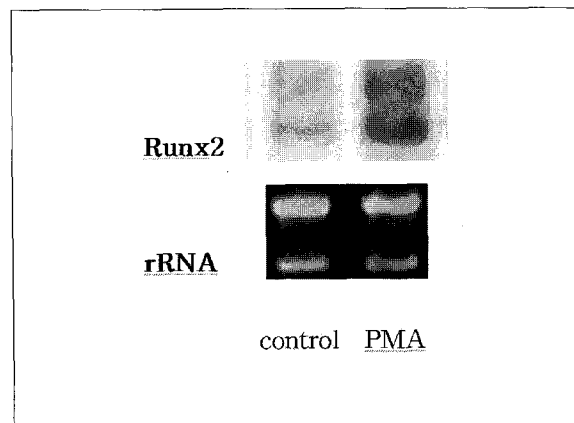
Osteocalcin과 osteopontin promotor를 각각 transient transfection 시킨 C2C12 cell들에 PMA (50 nM)를 첨가하여 luciferase activity를 측정한 결과 osteopontin promotor activity가 대조군에 비해 약 2배정도 증가하였으며 (Fig. 2a), osteocalcin의 경우에는 대조 군에 비해 promotor activity가 1.5배정도 증가하였다 (Fig. 2b).

#### 3. MAPK pathway의 활성화는 Runx2 전사 활성과 골 표지 유전자(osteopontin, osteocalcin)의 전사를 증가시킨다.

MAPK pathway의 활성화가 Runx2의 전사 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해, 6XOSE2-C2C12 cell에 MAPK pathway의 활성제인 okadaic acid를 0, 5, 10, 30, 50 ng/ml로 처리하여 18시간 배양 후, luciferase assay를 시행하였다. Okadaic acid를 처리한 그룹에서는 대조 군에 비해 6XOSE2 promotor activity가 증가하였다 (Fig. 3a). 또한, MAPK pathway의 활성화가 골 표지 유전자의 전사 조절에 미치는 영향을 알기 위해 osteopontin과 osteocalcin promotor를 transient transfection한 C2C12 cell들에 okadaic acid를 50 ng/ml로 처리하여 luciferase activity를 측정한 결과 okadaic acid를 첨가한 osteopontin promotor activity가 대조군의 약 4배, osteocalcin의 경우에는 okadaic acid를 첨가한 군의 promotor activity가 대조군에 비해 약 2.4배 정도 증가하였다 (Fig. 3b, 3c).



(A)

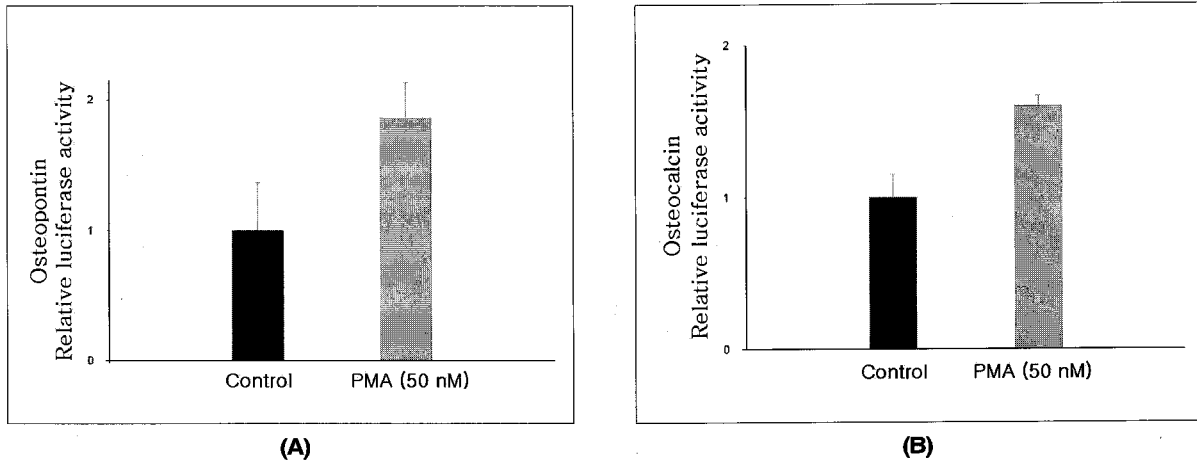


(B)

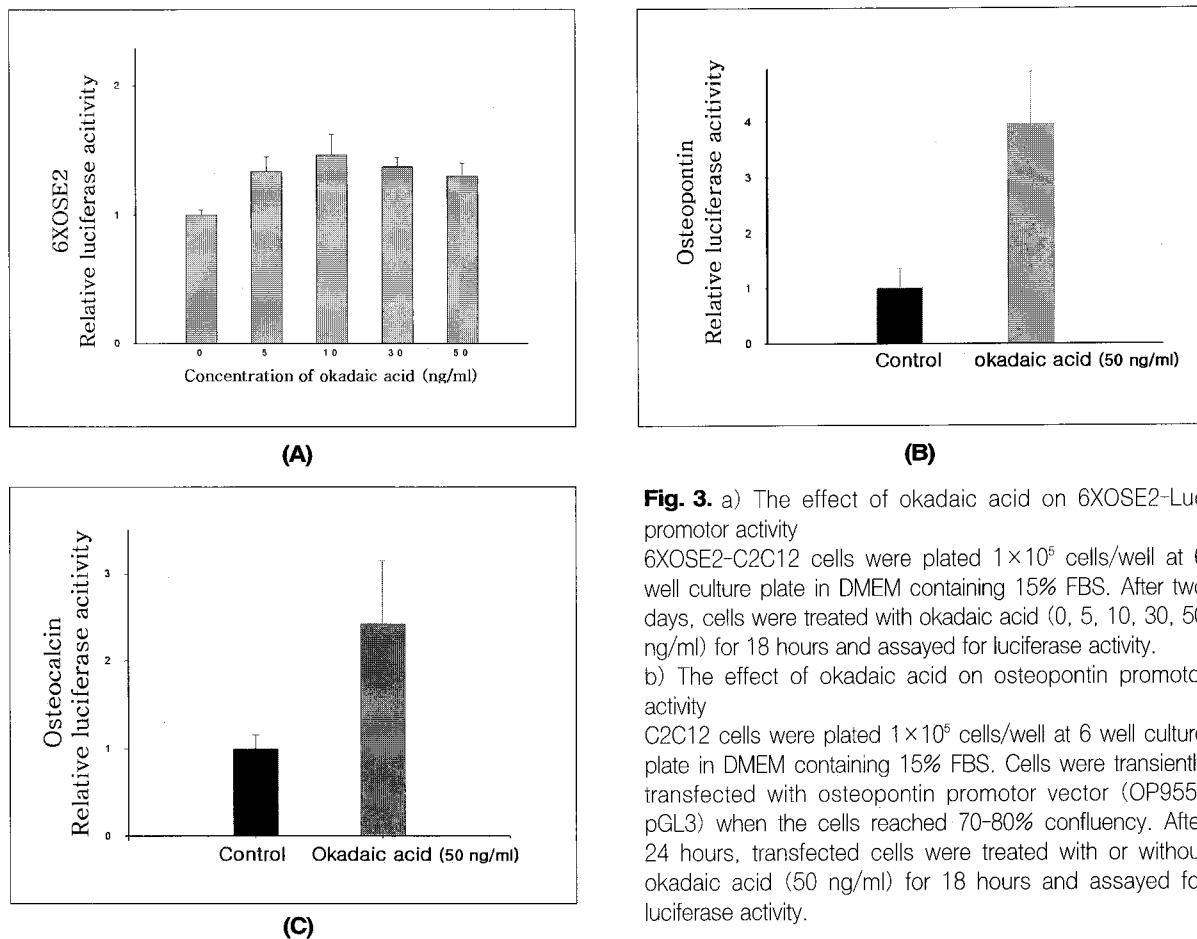
**Fig. 1.** The effect of PMA on 6XOSE2-Luc promotor activity and Runx2 gene expression

a) 6XOSE2-C2C12 cells were plated  $1 \times 10^5$  cells/well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. After two days, cells were treated with PMA (0, 10, 50, 100, 300 nM) for 18 hours and assayed for luciferase activity. \* 6XOSE2-C2C12 : cell lines which were stably transfected with 6XOSE2 (6 copies of osteoblast specific element 2)-Luciferase reporter.

b) C2C12 cells were plated at  $1 \times 10^5$  cells/100 mm<sup>2</sup> culture plate in 15% FBS. After two days, cells were treated with or without 50 nM PMA. Total RNA (10  $\mu$ g) were analyzed by Northern blot hybridization with cDNA probe for Runx2. The amount of rRNA in the same samples was visualized by ethidium bromide staining.

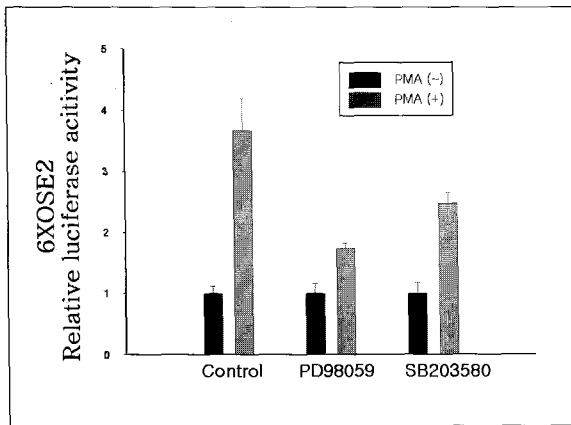


**Fig. 2** a) The effect of PMA on osteopontin promoter activity  
 C2C12 cells were plated  $1 \times 10^5$  cells/well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. Cells were transiently transfected with osteopontin promoter vector (OP955-pGL3) when the cells reached 70-80% confluency. After 24 hours, transfected cells were treated with or without PMA (50 nM) for 18 hours and assayed for luciferase activity.  
 b) The effect of PMA on osteocalcin promoter activity  
 C2C12 cells were plated  $1 \times 10^5$  cells/well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. Cells were transiently transfected with osteocalcin promoter vector (OC1050-pGL3) when the cells reached 70-80% confluency. After 24 hours, transfected cells were treated with or without PMA (50 nM) for 18 hours and assayed for luciferase activity.



**Fig. 3** a) The effect of okadaic acid on 6XOSE2-Luc promoter activity  
 6XOSE2-C2C12 cells were plated  $1 \times 10^5$  cells/well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. After two days, cells were treated with okadaic acid (0, 5, 10, 30, 50 ng/ml) for 18 hours and assayed for luciferase activity.  
 b) The effect of okadaic acid on osteopontin promoter activity  
 C2C12 cells were plated  $1 \times 10^5$  cells/well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. Cells were transiently transfected with osteopontin promoter vector (OP955-pGL3) when the cells reached 70-80% confluency. After 24 hours, transfected cells were treated with or without okadaic acid (50 ng/ml) for 18 hours and assayed for luciferase activity.

c) The effect of okadaic acid on osteocalcin promoter activity  
 C2C12 cells were plated  $1 \times 10^5$  cells/well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. Cells were transiently transfected with osteocalcin promoter vector (OC1050-pGL3) when the cells reached 70-80% confluency. After 24 hours, transfected cells were treated with or without okadaic acid (50 ng/ml) for 18 hours and assayed for luciferase activity.



**Fig. 4.** The effect of PMA on 6XOSE2-Luc promoter activity in combination with MAPK pathway inhibitor  
6XOSE2-C2C12 cells were plated  $1 \times 10^5$  cells/well at 6 well culture plate in DMEM containing 15% FBS. After two days, cells were pretreated with/without PD98059 (50  $\mu$ M) or SB203580 (25  $\mu$ M) for 1 hour and treated with PMA (50 nM) for additional 18 hours. Cells were harvested and assayed for luciferase activity.

#### 4. PKC pathway는 MAPK pathway를 경유하여 Runx2의 전사 활성을 조절한다.

6XOSE2-C2C12 cell을 배양한 후 PD98059 (Erk pathway 억제제) 50  $\mu$ M을 첨가하거나, SB203580 (P38 pathway 억제제) 25  $\mu$ M을 첨가한 군과 아무 것도 첨가하지 않은 군으로 나눠 처리하여 MAPK signal pathway를 차단한 1시간 뒤에 PMA 50 nM을 처리한 후 6XOSE2의 promoter activity를 측정하였다. 전 처리를 하지 않은 대조군에서의 PMA에 의한 6XOSE2 promoter activity의 증가 정도에 비해 PD98059나 SB203580 전 처리 군에서의 PMA에 의한 활성의 증가 정도가 감소하였다 (Fig. 4).

#### IV. 총괄 및 고찰

Runx2는 runt family에 속하는 전사 인자로 Core binding factor  $\alpha$  1 (Cbfa1) 혹은 Polymovirus enhancer binding protein 2  $\alpha$  A (PEBP 2  $\alpha$  A)로도 알려져 있다. Runt와 관련된 유전자들은 조절 작용, 신경 형성, 눈의 발달 및 골격 발달과 같은 다양한 기능들을 조절한다<sup>4,17-19</sup>. Runx2는 스스로의 발현 뿐만 아니라 조골 세포에 중요한 역할을 하는 다른 유전자들의 multiple OSE2 (osteoblast specific element 2)에 결합함으로써 이들 유전자들의 발현들도 조절하게 된다<sup>21</sup>. 또한, Runx2 knockout animals에서 성숙된 조골 세포가 보이지 않고 골 형성이 완전히 억제되며, heterozygous mutant animals에서는 CCD가 야기되는 것을 보여준 Komori 등과 Otto 등의 연구들은 조골 세포의 분화와 골 형성에 Runx2가 아주 중요한 역할

을 담당하고 있는 것을 시사한다<sup>4,6,20</sup>.

그러나, Runx2를 조절하는 신호 전달 기전에 대해서는 거의 알려진 바가 없어, 본 연구에서는 조골 세포의 성장 및 분화를 촉진시킨다고 알려진 PKC와 MAPK pathway가 Runx2의 활성을 조절하여 조골 세포의 분화를 활성화시킬 수 있다는 가설을 세우고 각 신호 전달 체계의 활성제를 사용하여 Runx2 및 골 표지 유전자의 전사 활성 양상을 관찰하였다.

먼저 PKC pathway 활성화에 따른 변화 양상을 관찰하기 위해 PMA (PKC pathway의 활성제)를 6XOSE2-C2C12 cell에 처리하거나 osteopontin 혹은 osteocalcin promotor가 transfection된 세포에 처리하였을 때 이들의 전사 활성이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 PKC 활성화에 따라 Runx2의 발현이 증가하는 것을 Northern blot analysis에서 관찰할 수 있었다. 이상의 결과들로 PKC pathway의 활성화는 Runx2의 발현이나 전사 활성을 조절하여 Runx2의 영향을 받는 osteopontin 및 osteocalcin과 같은 osteoblast-specific target gene들의 발현을 조절함으로써 조골 세포의 분화에 중요한 역할을 담당하는 것으로 생각된다.

MAPKs는 tyrosine과 threonine의 인산화에 의해 조절되는 multigene protein family로 Ras, Raf-1 (MAP kinase kinase (MEKK))와 MAP kinase kinase (MKK 또는 MEK로도 불린다)의 순차적인 활성화에 의해 MAPK이 활성화된다<sup>21-23</sup>. Lai 등<sup>14</sup>은 ERK dominant negative osteoblast cell의 분화, 증식이 억제되는 것을 관찰하여 ERK/MAPK pathway가 조골 세포의 분화 및 증식에 중요한 신호 전달 체계인 것을 보고하였다.

MAPK pathway가 Runx2의 전사 활성에 미치는 영향을 관찰하기 위해 okadaic acid를 이용하여 MAPK pathway를 활성화시킨 결과 Runx2의 전사 활성 및 Runx2에 의해 조절받는 osteopontin, osteocalcin의 전사가 증가되었다. 이는 MAPK pathway가 조골 세포 분화 조절에 관여함을 나타낸다고 사료된다. 본 실험 결과에서는 MAPK pathway의 활성화에 의한 osteopontin이나 osteocalcin의 전사 증가 정도가 Runx2 활성의 증가 정도보다 크게 나타났는데, 이는 MAPK pathway가 Runx2뿐만 아니라 type I collagen, osteocalcin과 osteopontin의 발현에 영향을 미치는 AP-1<sup>24-26</sup>과 같은 다른 전사 인자들에 게도 영향을 미쳐 이들 전사 인자들의 상호 작용을 배제할 수 없고, Runx2와 함께 이들 유전자에 작용하기 때문인 것으로 생각되어진다.

Siddhanti 등<sup>27</sup>은 MC3T3-E1 조골 세포에서 PMA로 PKC를 활성화시켜 Raf-1, MKK, MAPK (ERK1과 ERK2) cascade에 미치는 영향을 실험한 결과, Raf-1/ MKK / MAPK 신호전달 체계와 상호 작용하여 조골 세포에서 DNA의 합성을 조절한다고 하였다. 또한, Swarthout 등<sup>11</sup>은 ERK2의 활성화와 부갑상선 호르몬에 의한 백서 조골 세포의 증식이 PKC pathway에 의존적이라고 보고하였다.

이에 PKC pathway가 Runx2를 활성화시킬 때도 MAPK

pathway와 연관되어 조절하는지 혹은 두 신호 전달 체계가 독립적으로 Runx2를 활성화시키는지 알아보기 위해 MAPK pathway중 Erk pathway와 P38 pathway의 억제제인 PD98059와 SB203580을 각각 전 처리하여 MAPK pathway를 차단하고 1시간 뒤에 PMA를 첨가하여 PKC pathway를 활성화시킨 뒤 Runx2의 전사 활성을 관찰하였다. 그 결과, MAPK pathway가 억제될 경우, PKC pathway의 활성화에 의해 유도되는 Runx2의 전사 활성의 증가 정도가 감소하였다. 이상의 결과는 PKC pathway와 MAPK pathway는 서로 독립적으로 Runx2를 조절할 수도 있지만, PKC pathway의 활성화에 의한 Runx2의 전사 활성의 증가는 MAPK pathway를 경유하여 조절될 수 있음을 시사하고 있다.

결론적으로 PKC pathway와 MAPK pathway가 활성화되면 Runx2의 전사 활성 및 발현이 증가되어 이의 영향을 받는 골 표지 유전자 (osteopontin, osteocalcin) 또한 전사가 증가하게 되어 조골 세포의 분화 및 골 형성이 촉진되며, 이 때 PKC pathway는 MAPK pathway를 경유하여 Runx2의 전사 활성을 조절하는 것으로 생각된다.

그러나, 본 실험에서는 PKC pathway가 MAPK pathway를 경유하여 Runx2뿐 아니라 그의 조절을 받는 골 표지 유전자들의 전사 또한 조절할 수 있는지 관찰하지 못하여 향후 이에 대한 연구가 필요하리라 생각되며, 아울러 PKC 및 MAPK pathway가 Runx2 및 골 표지 유전자들의 전사 활성을 증가시키는 정확한 기전을 파악하는 연구가 계속적으로 진행되어야 할 것으로 사료된다.

### V. 요약

Runx2는 runt family에 속하는 전사 인자로 조골 세포의 분화와 골격 형성에 아주 중요한 역할을 담당하고 있는 것으로 알려져 있다. Runx2는 스스로의 발현뿐만 아니라 조골 세포에 중요한 역할을 하는 다른 유전자들의 발현들도 조절하여 조골 세포의 분화를 촉진하여 골 형성을 유도한다. 그러나, Runx2를 조절하는 신호 전달 기전에 대해서는 거의 알려진 바가 없어, 본 연구에서는 조골 세포의 성장 및 분화를 촉진시킨다고 알려진 Protein Kinase C (PKC) pathway와 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) pathway가 Runx2에 미치는 영향을 관찰하였다.

PKC pathway의 활성화가 Runx2의 전사 활성 및 발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 6XOSE2-C2C12 cell에 PKC pathway의 activator인 PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)를 처리하여 luciferase assay와 Northern blot analysis를 시행한 결과 Runx2의 전사 활성 및 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 C2C12 cell에 osteopontin 또는 osteocalcin promoter를 transient transfection 후 PMA를 처리한 결과 골 표지 유전자 (osteopontin; OP, osteocalcin; OC)의 전사가 증가하였다. MAPK pathway의 활성화제인

okadaic acid를 6XOSE2-C2C12 cell에 농도별로 처리하여 luciferase activity를 측정된 결과 MAPK이 활성화됨에 따라 Runx2의 전사 활성이 증가하는 것을 관찰하였고, osteopontin 또는 osteocalcin promoter가 transient transfection된 C2C12 cell에 okadaic acid를 처리한 결과 OP, OC의 전사가 증가하였다. PKC pathway가 MAPK pathway를 경유하여 Runx2의 전사 활성을 조절하는지 알아보기 위하여 6XOSE2-C2C12 cell에 PD98059 (Erk pathway inhibitor) 또는 SB203580 (P38 pathway inhibitor)를 첨가하여 MAPK pathway를 차단시킨 1 시간 뒤에 PMA를 처리하여 luciferase activity를 측정된 결과 MAPK pathway가 차단된 경우에는 PMA에 의한 전사 활성 증가 정도가 감소하였다.

이상의 실험 결과들로 다음과 같은 사실들을 알 수 있었다.

- PKC pathway의 활성화는 Runx2의 전사 활성 및 발현을 증가시키고 이로 인해 그의 영향을 받는 골 표지 유전자 (osteopontin, osteocalcin)의 전사도 증가한다.
- MAPK pathway의 활성화는 Runx2 및 골 표지 유전자 (osteopontin, osteocalcin)의 전사 활성을 증가시킨다.
- PKC pathway는 MAPK pathway를 경유하여 Runx2의 전사 활성을 조절한다.

### 참고문헌

1. Yamaguchi A, Komori T, Suda T : Regulation of osteoblast differentiation mediated Bone Morphogenic Proteins, Hedgehogs, and Cbfa1. *Endocrine Reviews* 21:393-411, 2000.
2. Ducy P, Starbuck M, Driemel M, et al. : A Cbfa1-dependent genetic pathway controls bone formation beyond embryonic development. *Genes Dev* 13:1025-1036, 1999.
3. Kern B, Shen J, Starbuck M, et al. : Cbfa1 contributes to the osteoblast-specific expression of type I collagen genes. *J Biol Chem* 276:7101-7107, 2001.
4. Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. : Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 89:755-764, 1997.
5. Mundlos S, Otto F, Mundlos C, et al. : Mutations involving the transcription factor CBFA1 cause cleidocranial dysplasia. *Cell* 89:773-779, 1997.
6. Otto F, Thornell AP, Crompton T, et al. : Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome, is essential for osteoblast differentiation and bone development. *Cell* 89:765-771, 1997.
7. Banerjee C, McCabe LR, Choi JY, et al. : Runt homology domain proteins in osteoblast differentiation

- : AML-3/CBFA1 is a major component of a bone specific complex. *J Cell Biol* 66:1-8, 1997.
8. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, et al. : *Osf2/Cbfa1* : A transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell* 89:747-754, 1997.
  9. Somjen D, Binderman I, Schluter KD, et al. : Stimulation by defined parathyroid hormone fragments of cell proliferation in skeletal-derived cell cultures. *Biochem J* 272:781-785, 1990.
  10. Sabatini M, Lesur C, Pacherie M, et al. : Effect of parathyroid hormone and agonists of the adenylyl cyclase and protein kinase C pathways on bone cell proliferation. *Bone* 18:59-65, 1996.
  11. Swarthout JT, Doggett TA, Lemker JL, et al. : Stimulation of extracellular signal-regulated kinases and proliferation in rat osteoblastic cells by parathyroid hormone is protein kinase C-dependent. *J Biol Chem* 276:7586-7592, 2001.
  12. Siddhanti SR and Quarles LD : Molecular to pharmacologic control of osteoblast proliferation and differentiation : differential regulation of bone formation. *J Cell Biochem* 55:310-320, 1994.
  13. Boguslawski G, Hale LV, Yu XP, et al. : Activation of osteocalcin transcription involves interaction of protein kinase A- and protein kinase C- dependent pathways. *J Biol Chem* 275:999-1006, 2000.
  14. Lai CF, Chaudhary L, Fausto A, et al. : Erk is essential for growth, differentiation, integrin expression, and cell function in human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 276:14443-14450, 2001.
  15. Xiao G, Jang D, Thomas P, et al. : MAPK pathways activate and phosphorylate the osteoblast-specific transcription factor, *Cbfa1*. *J Biol Chem* 275(6) :4453-4459, 2000.
  16. Park MH, Shin HI, Choi JY, et al. : Differential expression of *Runx2* isoforms in cranial suture morphogenesis. *J Bone Miner Res* 16:885-92, 2001.
  17. Okuda T, van Deursen J, Hiebert SW, et al. : AML1, the target of multiple chromosomal translocations in human leukemia, is essential for normal fetal liver hematopoiesis. *Cell* 84:321-330, 1996.
  18. Kania MA, Bonner AS, Duffy JB, et al. : The drosophila segmentation gene *runt* encodes a novel nuclear regulatory protein that is also expressed in the developing nervous system. *Genes Dev* 4:1701-1713, 1990.
  19. Daga A, Karlovich CA, Dumstrei K, et al. : Patterning of cells in the drosophila eye by *Lozenge*, which shares homologous domains with AML1. *Genes Dev* 10:1194-1205, 1996.
  20. Harada H, Tagashira S, Fujiwara M, et al. : *Cbfa1* isoforms exert functional differences in osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 274: 6972-6978, 1999.
  21. Anderson NG, Maller JL, Tonks NK et al. : Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 343:651-653, 1990.
  22. Crews DM, Alessandrini A, Erikson RL : The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product. *Science* 258:478-480, 1992.
  23. Hipskind RA, Bilbe G : MAP kinase signaling cascades and gene expression in osteoblasts. *Front Biosci* 3:804-816, 1998.
  24. Karin M, Liu Z, Zandi E : AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9:240-246, 1997.
  25. Takeshita A, Imai K, Kato S, et al. :  $1\alpha,25$  dehydroxyvitamin D<sub>3</sub> synergism toward transforming growth factor- $\beta$ 1-induced AP-1 transcriptional activity in mouse osteoblastic cells via its nuclear receptor. *J Biol Chem* 273:14738-14744, 1998.
  26. Katai H, Stephenson JD, Simkevich CP, et al. : An AP-1-like motif in the first intron of human pro $\alpha$ 1(I) collagen gene is a critical determinant of its transcriptional activity. *Mol Cell Biochem* 118:119-129, 1992.
  27. Siddhanti SR, Hartel JE 2nd, Quarles LD : Forskolin inhibits protein kinase C-induced mitogen-activated protein kinase activity in MC3T3-E1 osteoblasts. *Endocrinology* 136:4834-4841, 1995.

Abstract

THE EFFECT OF PKC PATHWAY & MAPK PATHWAY  
ON RUNX2 TRANSCRIPTIONAL ACTIVITY

Eun-Jung Kim, Hyun-Jung 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*

Runx2, a Runt-related osteoblast-specific transcription factor, is essential for osteoblast differentiation and function. Runx2 was identified as a key regulator of osteoblast-specific gene expression through its binding to the OSE2 element present in these genes. However, little is known about the signaling mechanism regulating Runx2 activity. This study examines the role of protein kinase C (PKC) pathway and mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in regulating Runx2 and bone marker genes (osteopontin; OP, osteocalcin; OC).

Luciferase assay and Northern blot analysis suggested that the stimulation of PKC by PMA increased transcription activity of Runx2 and bone marker genes (OP and OC) and also increased expression of Runx2. The stimulation of MAPK by okadaic acid increased transcription activity of Runx2 and bone marker genes (OP and OC). Pretreatment with PD98059 (Erk pathway inhibitor) and SB203580 (P38 pathway inhibitor) prior to PMA treatment decreased PMA stimulated Runx2 activity.

Together these results indicate that both PKC and MAPKs are involved in the regulation of Runx2 activity and also the stimulation of Runx2 transcriptional activity by the PKC pathway is through activation of MAPK pathway.

**Key words** : Runx2, PKC, MAPK, Osteoblast, Transcriptional activity