

Bone Morphogenetic Protein 2-induced MAPKs Activation Is Independent of the Smad1/5 Activation

Ji Hae Jun, Hyun-Mo Ryoo, Kyung Mi Woo, Gwan-Shik Kim, and Jeong-Hwa Baek*

Department of Cell & Developmental Biology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University

(received June 8, 2009 ; revised June 10, 2009 ; accepted June 12, 2009)

Bone morphogenetic protein (BMP) 2 is a potent osteogenic factor. Although both Smad1/5 and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are activated by BMP2, the hierarchical relationship between them is unclear. In this study, we examined if BMP2-stimulated MAPK activation is regulated by Smad1/5 or vice versa. When C2C12 cells were treated with BMP2, the activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 MAPK and c-Jun-N-terminal kinase was evident within 5 min. The knockdown of both Smad1 and Smad5 by small interfering RNA did not affect the activation of these MAPKs. In addition, neither the overexpression of Smad1 nor Smad5 induced ERK activation. When ERK activation was induced by constitutively active MEK1 expression, the protein level and activation of Smad1 increased. Furthermore, the inhibition of constitutively active BMP receptor type IB-induced ERK activation significantly suppressed Smad1 activation. These results indicate that Smad1/5 activation is not necessary for BMP2-induced MAPK activation and also that ERK positively regulates Smad1 activation.

Key words : Bone morphogenetic protein 2, Smad1, Smad5, Mitogen-activated protein kinase (MAPK)

서 론

Bone morphogenetic protein(BMP)은 transforming growth factor(TGF)- β superfamily의 일원으로 조골세포 전구세포로부터 조골세포로의 분화를 촉진하고 *in vivo*와 *in vitro* 모두에서 뼈 형성을 증가시키는 효과를 나타낸다. BMP가 다양한 생물학적 효과를 나타내는 데는 세포막에 존재하는 제1형(BMPRI)과 2형 BMP수용체(BMPRII)에 대한 결합이 필요하다. BMP가 수용체에 결합하면 BMPRI의 serine/threonine kinase가 활성화되어 R-Smads(Smad1, 5, 8)의 카르복실 말단이 인산화되며 이것이 co-Smad인 Smad4와 결합하여 핵 내로 이동하여 다양한 전사인자 및 coactivator 등과의 상호작용을 통해 여러 타겟 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다(Miyazono et al., 2005; Ryoo et al., 2006). Smad1과 Smad5가 BMP2에 의한 조골세포 분화과정에 주요한 신호전달 물질로 알려져 있으며, 이들을 C2C12세포에 과발현시키면 조골세포 분화가 유도된다(Yamamoto et al., 1997; Fujii et al., 1999). 그러나 이러한 분화효과는 BMP 처리 또는 constitutively active(*ca*) BMPRI 발현시 보다 덜 효과적이어서 Smad 신호경로외에 추가적 신호경로가 작용할 것으로 생각되어왔다.

BMP에 의한 조골세포 분화작용에서 non-Smad 경로의 중요성에 대한 다수의 보고가 이루어졌으며, BMP2에 의해 활성화되는 것으로 알려진 주요 non-Smad 신호전달 경로는 p38 mitogen-activated protein kinase(MAPK), c-Jun-N-terminal kinase(JNK), extracellular signal-regulated kinase(ERK)를 포함하는 MAPKs 경로이다(Kozawa et al., 2002; Guicheux et al., 2003; Hassel et al., 2003). 발표된 논문에 따라 서로 상반된 결과를 보이기도 했지만, 많은 경우 이러한 non-Smad 경로를 차단하면 BMP2에

*Corresponding author: Jeong-Hwa Baek, Department of Cell and Developmental Biology, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul 110-749, Korea. Tel.: +82-2-740-8688, Fax.: +82-2-741-3193, E-mail : baekjh@snu.ac.kr

의한 조골세포 분화 및 석회화결절 형성이 억제되었기 때문에 BMP2의 작용이 효과적으로 나타나기 위해서는 Smad 경로 활성화와 더불어 이러한 non-Smad 경로의 활성화가 필수적인 것으로 보여 진다. BMPR 을 통한 MAPKs 활성화 경로에 대해 아직 잘 알려져 있지 않지만, 일부 보고에서 p38 MAPK 및 JNK 활성화 경로를 설명하였다. 신경전구세포에 BMP4를 처리하면 BMPRI 에 X-linked inhibitor of apoptosis protein(XIAP)이 결합하고 XIAP에 TGF- β activated kinase 1(TAK1) binding protein 1(TAB1)이 결합하며 그 하위로 p38 MAPK가 활성화됨이 보고되었다(Yamaguchi et al., 1999; Jordan et al., 2001). TAK1은 MAPKK6와 MAPKK3를 활성화하여 p38과 JNK를 활성화시킬 수 있으므로 JNK도 이런 경로를 통해 활성화될 가능성이 있을 것으로 생각된다(Shirakabe et al., 1997). 한편 또 다른 보고에 따르면 정상적으로 세포막에는 BMPRI과 BMPRII가 homomer 복합체 또는 heteromer 복합체의 상태로 존재하고 있으며, homomer 복합체 형태로 존재하는 경우에는 BMP2가 BMPRI 복합체에 붙은 후 BMPRII와의 heteromer 복합체를 형성하여 p38 MAPK를 활성화하지만 이미 BMPRI 과 BMPRII가 heteromer 복합체 상태로 존재하는 경우에는 BMP2가 결합하면 바로 R-Smad활성화가 유도되는 것으로 설명하였다(Nohe et al., 2002). 이러한 보고는 BMPR에 의한 p38 MAPK 활성화가 R-Smads 활성화와는 독립적으로 이루어짐을 제시하고 있지만, ERK와 JNK 같은 다른 MAPKs 활성화와 R-Smads 활성화 간의 관계는 아직 잘 알려져 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 C2C12 세포에서 BMP2에 의한 이들 MAPKs의 활성화를 확인하고, 그 과정에서 R-Smad인 Smad1과 Smad5 이 관여하는지를 확인하고자 하였다.

실험 재료 및 방법

세포 배양

C2C12세포와 HEK293 세포를 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco Invitrogen; Grand Island, NY, USA), antibiotics(100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, Gibco Invitrogen)가 함유된 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM; Hyclone; Logan, UT, USA)에서 계대 배양하여 유지하였다.

Alkaline Phosphatase 염색

BMP2에 의해 유도되는 조골세포 분화과정에서 MAPKs 의 역할을 알아보기 위하여 alkaline phosphatase(ALP) 염색을 시행하였다. C2C12세포를 24-well plate에 1.3×10^5 cells/well의 밀도로 세포를 분주한 후 90% 정도 세포가 confluent해질 때까지 배양하였다. 그 후 배양액을 5%

FBS가 함유된 DMEM으로 교체하고 MAPKs 활성을 저해하는 그룹에서는 각 MAPK의 억제제를 1시간 동안 전처리하였으며, 그 후 100 ng/ml BMP2(Cytolab; Rehobot, Israel)를 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)으로 2회 세척하고 2% paraformaldehyde로 고정된 후 Alkaline Phosphatase Stain Kit(Sigma; St. Louis, MO, USA)를 이용하여 염색을 시행하였다. 사용된 MAPK 억제제는 ERK 억제제로 40 μ M U0126(Cell Signaling Technology; Beverly, MA, USA), p38 MAPK 억제제로 10 μ M SB253580 (Calbiochem-Novabiochem; La Jolla, CA, USA), JNK 억제제로 10 μ M SP600125(Sigma)를 사용하였다.

Semiquantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

조골세포 분화관련 전사인자 및 표지유전자의 발현에 미치는 영향을 관찰하기 위해 reverse-transcription polymerase chain reaction(RT-PCR)을 시행하였다. 이를 위해 C2C12세포를 5×10^5 cells/60 mm dish가 되도록 분주하고 세포가 70~80% confluent 해진 후 5% FBS가 함유된 DMEM으로 교체하였다. MAPKs 저해제를 1시간동안 전처리하거나 하지 않고 100 ng/ml BMP2를 첨가한 후 48시간 배양하였다. 배양된 세포로부터 easy-blue RNA Extraction Reagent(iNtRON Biotechnology; Sungnam, Korea)를 이용하여 total RNA를 준비하고 AccuPower RT Premix(Bioneer; Daejeon, Korea)로 cDNA를 제작한 후 i-star Taq DNA polymerase(iNtRON Biotechnology)를 이용하여 PCR을 시행하였다. 얻어진 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. PCR에 사용한 primer는 TaKaRa Korea (Seoul, Korea)에서 제작하여 사용하였으며, PCR 산물의 크기 및 primer 서열은 아래와 같다. ALP(439 bp) F: 5'-AGGCAGGATTGACCACGG-3', R: 5'-TGTAGTTC-TGCTCATGGA-3'; Runx2 (289 bp) F:5'-CCGCACGAC-AACCGCACCAT-3', R: 5'-CGTCCGGCCCAAAATCTC-3'; Dlx5(491 bp) F: 5'-GGCCACCGATTCTGACTACTACA-3', R: 5'-GCTCCGGGGGCATCTCC-3'; Osteocalcin(300 bp) F: 5'-ATGAGGACCCTCTCTCTGCT-3', R: 5'-CCGTAGATGCGTTTGTAGGC-3'; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (452 bp) F: 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3', R: 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'.

Small Interfering RNA Transfection 및 BMP2에 의한 MAPKs 활성화 관찰

R-Smad가 BMP2에 의한 MAPKs 활성화에 미치는 영향을 알아보기 위해 Smad1 및 Smad5에 대한 small interfering(si) RNA를 이용하여 R-Smad 발현을 억제하고 BMP2의 효과를 관찰하였다. 이를 위해 C2C12세포를 5×10^5 cells/60 mm dish가 되도록 분주하고 다음 날

Smad1 및 Smad5에 대한 siRNA 또는 random control siRNA를 DharmaFECT(Dharmacon; Lafayette, CO, USA)를 이용하여 transfection하고 밤새 회복시킨 후 다음날 혈청이 없는 배지로 교환하여 6시간 배양하였다. 그 후 100 ng/ml BMP2를 처리하고 1, 5, 30, 60분 후에 세포를 수집하여 단백질 시료를 준비하고 Western blot 분석을 시행하였다. 실험에 사용된 siRNA는 Dharmacon에서 구매하여 사용하였고, Smad1과 Smad5의 발현감소 효과는 단백질 수준에서 확인하였다.

Western blot 분석 과정을 간단히 설명하면 배양된 세포를 PBS로 세척하고 RIPAbuffer(10 mM Tris-HCl [pH 7.5], 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 2% SDS, 1% sodium deoxycholate, 50 mM NaF, 0.2 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, protease inhibitor cocktail)에 용해하여 단백질 시료를 준비하였다. 단백질 정량은 BCA reagent(Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하였으며, 50 µg 단백질을 5X Laemmli sample buffer에 섞은 후 10% gel을 이용하여 SDS-PAGE를 시행하고 PVDF 막에 옮긴 후 적절한 일차 및 이차항체로 반응시키고, WEST-ZOL plus(iNtRON Biotechnology)를 이용하여 해당 단백질 밴드를 관찰하였다. Anti-phospho-ERK, anti-ERK, anti-phospho-p38 MAPK, anti-p38 MAPK, anti-phospho-JNK, anti-JNK, anti-Smad1 및 anti-Smad5 항체는 Cell Signaling Technology 제품을 사용하였고, anti-Actin, immunopure goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase(HRP)-conjugated, goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated, bovine anti-goat IgG HRP-conjugated antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하여 사용하였다.

R-Smad 활성화가 ERK 활성화에 미치는 영향 관찰

R-Smad 활성화만으로 ERK 활성화를 유도할 수 있는지 알아보기 위해 Smad1 또는 Smad5를 과발현하고 ERK 인산화 정도를 확인하였다. 이를 위해 HEK293 세포에 Flag-tagged Smad1, Flag-tagged Smad5 발현벡터를 WelFect-Ex PLUS(WelGene, Seoul, Korea)를 이용하여 transient transfection하고 24시간동안 회복시켰다. 그 후 혈청이 없는 배지 또는 혈청이 포함된 배지에서 24시간 더 배양한 후 세포를 수집하여 Western blot 분석을 시행하였다. ERK 활성화를 유도하기 위해 일부 세포에는 caMEK1 발현벡터(Stratagen; La Jolla, CA, USA)를 같이 transfection하였다. 과발현시킨 Smad 단백질은 mouse anti-Flag M2-HRP-conjugated antibody(Sigma)로 관찰하였고, Smad1/5 활성화를 확인하기 위해서는 R-Smad 카르복실 말단의 SXS 모티프가 인산화된 부분에 결합하는 anti-phospho Smad1/5/8 antibody(Cell Signaling Technology)를 일차항체로 사용하였다.

BMP 신호에 의한 R-Smad 활성화에 대해 ERK의 조절작용이 있는지 알아보기 위해 caBMPRII를 과발현시

키고 ERK 억제제를 처리한 후 Smad 활성화 정도를 관찰하였다. 이를 위해 HEK293세포에 caBMPRII 및 Flag-tagged Smad1, Flag-tagged Smad5의 transient transfection을 시행하고 24시간 동안 회복시킨 후, 하루 동안 혈청이 없는 배지에서 배양하고 단백질 시료를 준비하여 Western blot 분석을 시행하였다. ERK 활성을 저해하는 그룹에서는 단백질 시료 준비 전 3시간동안 40 µM U0126을 처리하였다.

실험 결과

조골세포 분화 유도 기전을 연구하기 위해 흔히 사용되는 모델시스템 중 하나는 C2C12 세포주 같은 근육전구세포(premyoblast)가 조골세포로 분화가 유도되는지를 확인하는 것으로 조골세포 분화 표지인자로는 ALP, osteocalcin의 발현을 주로 관찰한다(Lee et al., 2000). 따라서 본 연구에서도 BMP2에 의한 조골세포 분화 유도 과정에서 MAPKs 활성화의 역할을 알아보기 위해 C2C12 세포를 이용하였다. C2C12세포에 ERK, p38, JNK의 억제제를 1시간 동안 전 처리 한 후 이들 억제제 존재 하에 100 ng/ml BMP2를 48시간 동안 처리하고 조골세포 초기 분화 표지인 ALP 활성을 관찰한 결과 ERK와 p38 억제제는 BMP2에 의해 유도되는 ALP 활성을 감소시켰지만 JNK 억제제는 별다른 억제 효과를 나타내지 못하였다(Fig. 1A). 동일한 농도의 SP600125는 BMP2에 의해 유도되는 Dlx5 mRNA의 발현을 저해하는 효과를 나타냈으므로 JNK 억제제의 농도가 낮아서 ALP에 영향을 나타내지 못한 것은 아닌 것으로 생각된다(결과 보이지 않음). ERK와 p38 경로의 효과를 좀 더 살펴보기 위해 ALP와 더불어 조골세포 분화 초기에 중요한 전사인자로 작용하는 Runx2와 Dlx5, 조골세포 분화 후기 표지인자인 osteocalcin의 mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR로 확인하였다. C2C12세포에 100 ng/ml BMP2를 처리하고 48시간 후 ALP, Dlx5 mRNA의 발현이 강력히 유도되었으며 Runx2와 osteocalcin mRNA의 발현은 약간 증가하는 경향을 보였다(Fig. 1B, C). 여기에 ERK 억제제를 처리한 경우 Runx2를 제외한 모든 유전자의 발현이 억제되었고 특히 Dlx5는 거의 완전히 발현이 차단되는 양상을 보였다(Fig. 1B). 그러나 p38 MAPK 억제제를 처리한 경우에는 ALP mRNA 발현은 감소시켰지만 Runx2, Dlx5에는 별다른 영향을 미치지 못했으며 osteocalcin의 경우에는 오히려 발현을 더욱 촉진하는 결과를 나타내었다(Fig. 1C).

BMP2에 의한 MAPKs 활성화 과정에서 R-Smads를 필요로 하는지 알아보기 위해 BMP2 신호의 대표적 R-Smad인 Smad1과 Smad5에 대한 siRNA를 처리한 후 이들 MAPKs의 활성화 양상을 관찰하였다. Smad siRNA의

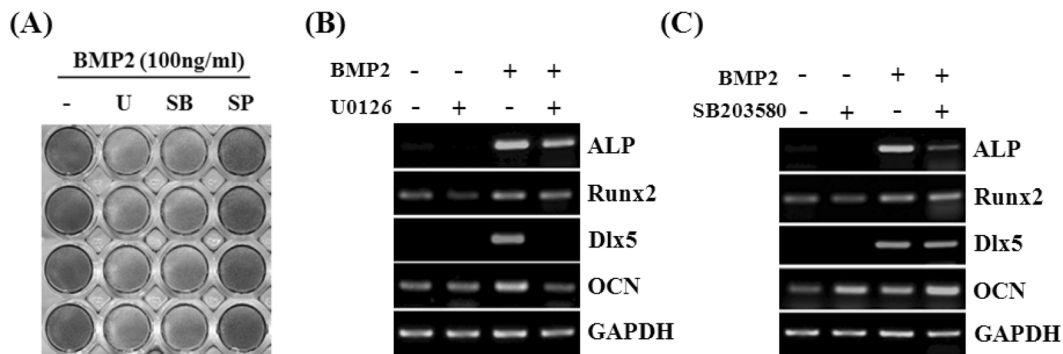


Fig. 1. MAPKs activation is involved in BMP2-stimulated osteoblast differentiation. (A) C2C12 cells were treated with BMP2 in the absence or presence of MAPKs inhibitors for 2 days and alkaline phosphatase histochemical staining was performed. U, 40 μ M U0126; SB, 10 μ M SB203580; SP, 10 μ M SP600125. (B, C) C2C12 cells were treated with BMP2 (100 ng/ml) and/or MAPKs inhibitor (40 μ M U0126 or 10 μ M SB203580) for 2 days and semi-quantitative RT-PCR was performed. ALP, alkaline phosphatase; OCN, osteocalcin; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

효과를 확인하기 위해 Smad1과 Smad5의 단백질양을 확인한 결과 random control siRNA를 처리한 경우에 비해 두 단백질 모두 발현 수준이 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2). Control siRNA를 transfection하고 100 ng/ml BMP2를 처리한 후 ERK, p38, JNK의 활성화를 관찰한 결과 ERK와 JNK는 5분 후에 일시적으로 활성화가 관찰된 후 다시 불활성화 되는 양상을 보였다(Fig. 2). 반면 p38의 경우 1시간 후까지 지속적으로 활성화되는 양상을 보였다. Smad1/5의 발현을 감소시킨 세포에서도 BMP2를 처리한 후 이들 MAPK의 활성화가 관

찰되었으나, p38 MAPK의 경우 활성화 속도가 지연되는 양상을 보였다(Fig. 2). 특히하게 ERK의 경우 대조군 세포에서는 30분 이후에는 basal level의 ERK 활성화도 억제된 것으로 나타난 반면, Smad1/5 발현이 감소된 세포에서는 BMP2 처리 30분 후에도 여전히 어느 정도 활성화 상태가 유지되는 것으로 나타났다. 이는 Smad1/5가 ERK 활성화에 대해 억제적 조절 효과를 나타낼 가능성이 있음을 시사하였다.

ERK 활성화와 Smad와의 관계를 좀 더 살펴보기 위해 HEK293 세포에 Smad1 또는 Smad5를 과발현시키고 ERK 활성화에 미치는 영향을 살펴보았다. 또한 ERK 활성화를 유도하기 위해 *ca*MEK1을 동시에 과발현 시키기도 하였다. 혈청이 없는 상태에서 세포를 배양한 경우 Smad1 또는 Smad5의 과발현에 의한 Smad 활성화 효과는 미약하였고, 이 상태에서 ERK 활성화는 관찰되지 않았다(Fig. 3A). Smad와 *ca*MEK1을 동시에 과발현시킨 세포에서는 예상대로 ERK 활성화가 관찰되었다. 특히하게 Smad1과 *ca*MEK1을 동시에 과발현시킨 경우 Smad1 단백질의 발현양이 크게 증가되었으며 그 상태에서는 Smad1의 활성화가 관찰되었다. 혈청이 있는 상태에서 세포를 배양한 경우에는 Smad1 또는 Smad5의 과발현에 의해 Smad 활성화가 관찰되었다(Fig. 3B). 그러나 Smad가 활성화된 상태에서도 ERK 활성화는 관찰되지 않았으며, *ca*MEK1을 발현시킨 세포에서만 ERK 활성화가 유도되었다. 혈청이 없는 상태에서와 마찬가지로 *ca*MEK1이 과발현된 경우 Smad1 단백질양이 크게 증가되었고 활성화된 Smad1도 증가하였다. ERK 활성화에 의한 Smad1 단백질 증가효과는 반복 실험에서 일정하게 관찰된 반면 Smad5의 경우에는 그 결과가 일정하게 나오지 않았다(결과 보이지 않음).

ERK 활성화가 Smad1 단백질 양 및 활성화를 증가시키는 것으로 관찰되었기 때문에 BMPR에 의해 유도된 ERK 활성화가 R-Smad 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다.

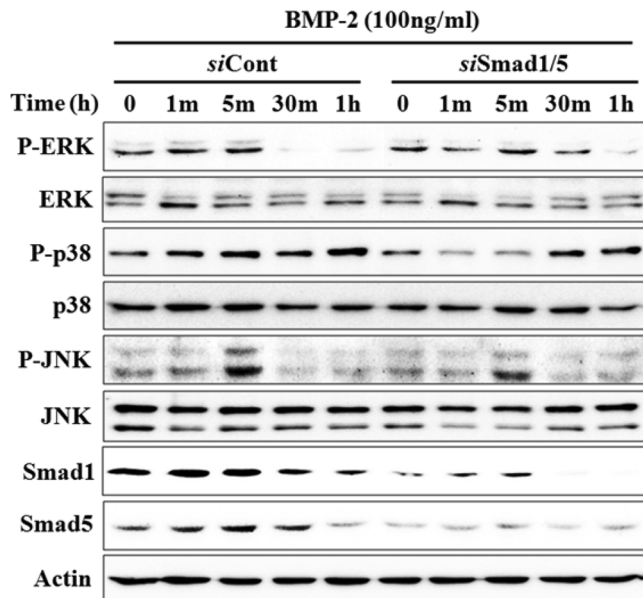


Fig. 2. Smad1/5 knock-down does not inhibit BMP2-induced MAPKs activation. C2C12 cells were transfected with random control siRNA or siRNAs for Smad1 and Smad5, serum-starved for 6 hours, and treated with BMP2 for the times indicated. Then, the whole cell lysates were subjected to Western blot analysis with the antibodies indicated. Knock-down of Smad1 and Smad5 was confirmed in the protein level by Western blot analysis.

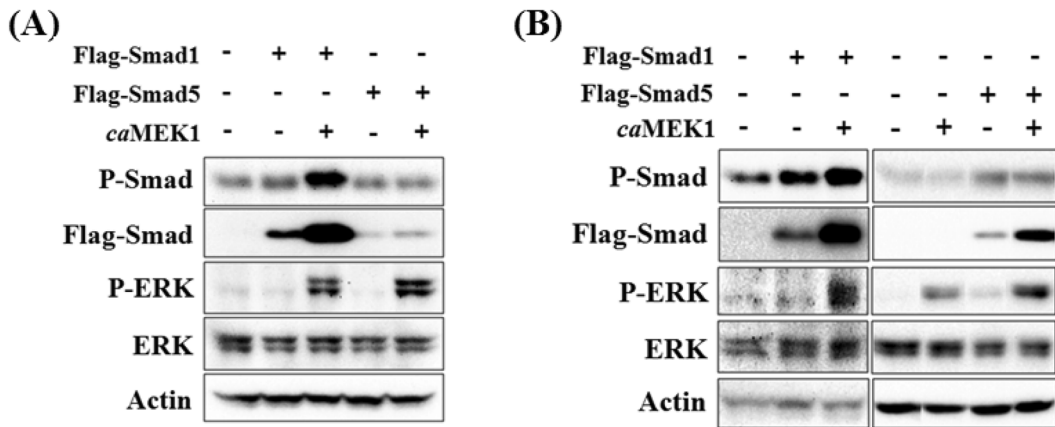


Fig. 3. Activation of Smad1 or Smad5 does not induce ERK activation. HEK293 cells were transiently transfected with Flag-tagged Smad1, Flag-tagged Smad5 and/or *caMEK1* expression vectors. After recovery, cells were incubated in the serum-free medium (A) or 10% FBS containing medium (B) for 24 hours. Then cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed. P-Smad; Phosphorylated Smad1/5/8 at carboxyl terminal SXS motif.

C2C12세포에 *caBMPRIIB*를 과발현시킨 경우 MEK1/ERK 경로가 활성화됨이 확인되었으므로(Fig. 4A), HEK293세포에 Smad1/5와 *caBMPRIIB*를 같이 발현하고 U0126으로 처리하여 ERK 활성화를 억제한 후 Smad1/5 활성화에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 3A의 결과와 마찬가지로 혈청이 없는 배지에서 세포를 배양했기 때문에 Smad1 또는 Smad5 과발현만으로 Smad 활성화 정도는 미미했지만 *caBMPRIIB*를 같이 발현시키면 Smad 활성화가 뚜렷하게 관찰되었고 ERK 활성화도 같이 관찰되었다(Fig. 4B). 한편 ERK 억제제를 처리한 경우 *caBMPRIIB*에 의한 ERK 활성화 저해효과 뿐 아니라 Smad1의 활성화 감소도 뚜렷하게 나타났다. Smad5의 경우에도 정도는 적지만 유사한 현상이 관찰되었다. 이러한 결과는 BMP에 의해 활성화된 ERK가 R-Smad 특히 Smad1의 활성화를 촉진하는 작용을 가지고 있음을 시사하였다.

고 찰

조골세포의 분화를 유도하는 데 있어 BMP뿐 아니라 다른 성장인자나 세포외기질도 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려져 있으며 이들은 MAPKs를 포함한 여러 신호전달 경로를 활성화시켜 그 효과를 나타낸다. BMP의 경우에도 R-Smad의 활성화를 통한 신호전달이 주요 신호전달경로로 작용하기는 하지만 동시에 MAPKs, protein kinase C 및 D, phosphatidyl inositol 3 kinase 등 여러 non-Smad 신호전달 경로를 활성화시키며 이들은 Smad 경로 작용을 촉진, 보완, 또는 억제하는 다양한 효과를 나타내는 것으로 생각되고 있다. 따라서 본 연구에서는 BMP2에 의해 활성화되는 non-Smad 신호전달물질 중 특히 MAPKs와 R-Smads 활성화간의 상관관계를 살펴보았으며 그 결과 R-Smads 활성화가 BMP2에 의한 ERK,

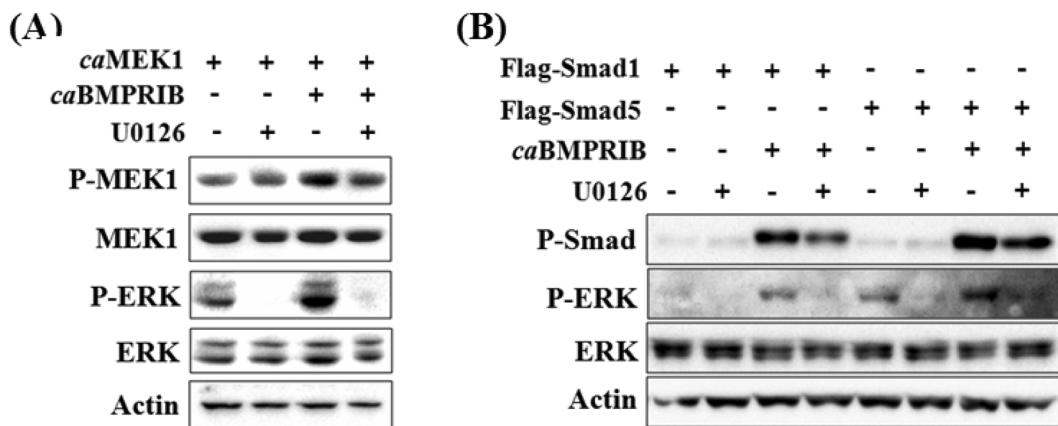


Fig. 4. Inhibition of ERK activity reduces BMPR-induced R-Smads activation. C2C12 (A) or HEK293 cells (B) were transiently transfected with *caMEK1*, Flag-tagged Smad1, Flag-tagged Smad5 and/or *caBMPRIIB* expression vectors and incubated in the serum-free medium for 24 hours. Then, cell lysates were prepared and Western blot analysis was performed. When indicated, cells were treated with 40 μ M U0126 for the last 3 hours.

p38 MAPK, JNK 활성화 유도에 필요하지 않고 ERK는 Smad1 활성화를 촉진함을 확인하였다.

조골세포에서 BMP2에 의한 MAPKs 활성화의 역할에 대해 보고된 주요 내용을 정리해보면, 생쥐 조골세포 전구세포(MC3T3-E1) 또는 C2C12 세포에서 i) p38 MAPK 활성화가 BMP2에 의한 조골세포 분화에 관여하며(Gallea et al., 2001; Guicheux et al., 2003), ii) ERK 활성화는 조골세포 분화를 촉진하거나(Gallea et al., 2001) 억제하고(Kozawa et al., 2002; Higuchi et al., 2002), iii) JNK 활성화는 osteocalcin 발현을 촉진한다고 하였다(Guicheux et al., 2003). 또한 사람의 골수간엽세포 또는 조골세포를 이용한 연구에서는 ERK 활성을 억제하면 BMP2에 의한 ALP 발현이 촉진되며(Osyczka et al., 2005), p38 MAPK의 활성화가 BMP2에 의한 조골세포 분화에 관여한다는 보고가 있었다(Noth et al., 2003). 본 연구에서 C2C12 세포에 BMP2를 처리하면 수분 이내에 세 가지 MAPK가 모두 활성화됨이 관찰되었고, 각 MAPK의 억제제를 사용하여 조골세포 분화관련 전사인자인 Runx2, Dlx5, 조골세포 분화표지 유전자인 ALP, osteocalcin의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과 MAPK의 종류에 따라 조절 효과가 서로 다르게 나타났지만 전체적인 반응양상은 기존의 보고들과 유사하였다. ERK 억제제는 Dlx5, ALP, osteocalcin 발현을 감소시켰고 특히 BMP2에 의해 유도되는 Dlx5 발현을 완전히 차단한 반면, p38 MAPK 억제제는 ALP 발현만을 감소시켰다. JNK 억제제는 Dlx5의 발현을 감소시켰으나 ALP에는 별다른 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 이들 MAPKs가 각기 그 하위 신호전달물질 활성조절을 통해 BMP2 생리활성에 서로 다른 방식으로 기여함을 시사하였다.

현재까지 보고된 non-Smad 경로의 역할에 대해 BMP 보다는 TGF- β 시스템에서 좀 더 많이 알려져 있다. Moustakas et al.(2005)은 TGF- β 시스템에서 Smad와 non-Smad간의 관계에 대해 i) TGF- β 가 non-Smad를 활성화시키고 그들이 Smad를 타겟으로 조절작용을 나타내거나, ii) Smad가 non-Smad의 활성을 직접 조절하거나, iii) TGF- β 수용체가 Smad와 non-Smad 경로를 독립적으로 동시에 활성화시키고 non-Smad 신호전달물질이 Smad 활성화에 상협작용을 나타낼 수 있다고 설명하였다. BMP 시스템에서 Smad와 non-Smad 간 관계가 아직 잘 밝혀져 있지 않지만 세포막에 존재하는 BMPR의 조합에 따라 Smad와 p38 MAPK를 활성화시키는 수용체 풀이 따로 존재한다는 Nohe et al. (2002)의 보고는 BMP 수용체가 Smad와 non-Smad 경로를 독립적으로 동시에 활성화시켜 non-Smad 신호전달물질이 Smad 활성화에 상협작용을 나타낼 가능성을 시사한다. 그러나 TGF- β 의 경우 Smad 활성화 의존적으로 p38 MAPK 활성화가 이루어진다는 보고들이 있어(Takekawa et al., 2002; Ungefroren et al., 2003), 조골세포에서 BMP 수용체를 통한 MAPK 활성화와 R-Smad 활성화 간의 상

관관계를 살펴볼 필요가 있다. 앞서 언급된 연구들에서 조골세포에 BMP2 처리 후 MAPKs의 활성화 시기가 다양하게 나타나며 수분 이내에 활성화가 일시적으로 된다는 보고와 1시간 이후에 활성화가 시작되어 수시간 동안 활성화 상태가 유지된다는 보고가 있었다. 본 연구에서 MAPKs가 BMP2에 의해 주로 활성화되는 시간을 보면 5분 이내에 활성화가 시작되었고, p38 MAPK는 1시간 넘어서까지 활성화상태가 유지되었지만 ERK와 JNK는 곧바로 불활성화가 진행되는 것으로 나타났다. 이러한 MAPK 활성화 유도 시간은, R-Smad가 활성화되기 시작하는 시간으로 알려진 5~15분과 유사하므로(Noth et al., 2003; Guicheux et al., 2003) 이들 MAPK 활성화가 Smad의 활성화에 이차적으로 수반되는 현상은 아닌 것으로 생각된다. 또한 본 연구에서 Smad1과 Smad5의 siRNA를 이용하여 이들의 발현을 감소시킨 상태에서 세 가지 MAPKs 활성화가 모두 관찰되었고, Smad1과 Smad5의 과발현을 통해 Smad 활성화를 유도한 경우에는 ERK 활성화에 별다른 변화를 유도하지 않았으므로, 이러한 결과는 R-Smad와 MAPKs의 독립적 활성화 가능성을 지지하는 결과로 생각된다.

BMP2에 의해 활성화된 MAPKs가 Smad 경로에 미치는 조절작용에 대한 보고들을 살펴보면, Guicheux et al.(2003)은 p38 MAPK 또는 JNK의 억제제를 처리해도 BMP2에 의한 R-Smad 인산화에 아무런 영향을 미치지 않는다고 보고한 반면, Noth et al.(2003)은 BMP2에 의한 p38 MAPK 활성을 억제하면 Smad1의 인산화 및 핵 내 이동이 저하된다고 보고하여 MAPK가 Smad 경로에 조절작용을 보일 수 있음을 제시하였다. 한편 epidermal growth factor나 fibroblast growth factor가 각각의 수용체에 결합하여 ERK를 활성화시키면 Smad1의 linker 도메인에 인산화를 유도하고 그 결과 Smad1의 핵 내 이동을 억제하며, E3 ligase인 Smurf1과 Smad1의 결합을 증진시켜 Smad1의 파괴를 증진시키고 이를 통해 BMP의 활성을 저해한다는 보고가 있었다(Kretzschmar et al., 1997; Sapkota et al., 2007). 그러나 본 연구에서는 *caMEK1*을 과발현시켜 ERK 활성화를 유도한 경우 Smad1 단백질 양 및 활성화가 증가되었고, *caBMPRII*에 의한 ERK 활성화를 U1026으로 저해한 경우 Smad1의 활성화가 감소됨이 관찰되어 ERK가 Smad1의 활성화를 촉진하는 효과를 보이는 것으로 나타났다. 이는 MC3T3-E1세포에서 ERK 활성화가 BMP2에 의한 R-Smad 전사활성을 증가시킨다는 보고와 유사한 결과로 생각된다(Suzawa et al., 2002). 본 연구 결과가 Sapkota et al.(2007)의 결과와 다른 이유는 명확하지 않지만, 조골세포에서 BMP2에 의해 활성화되는 MAPK의 역할에 대한 기존의 보고들에서 p38 MAPK와 JNK는 BMP2에 의한 조골세포 분화 촉진효과에 관여하는 것이 일관적으로 나타났지만 ERK의 경우에는 조골세포 분화 촉진작용을 나타내기도 하고 오히려 억제작용을 나타내기도 하는 것으로 보고된 바 있는데, 이

는 사용한 세포 시스템에 따라 ERK에 의한 R-Smad 조절효과가 서로 상반되게 나타난 것과 관계가 있을 가능성을 시사하는 것으로 보이며 이에 대한 추가적 연구가 필요할 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-000-E00093)

참고 문헌

- Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, Kawabata M, Kato M, Ichijo H, Miyazono K. Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol Biol Cell*. 1999;10:3801-13.
- Gallea S, Lallemand F, Atfi A, Rawadi G, Ramez V, Spinella-Jaegle S, Kawai S, Faucheu C, Huet L, Baron R, Roman-Roman S. Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone*. 2001;28:491-8.
- Guicheux J, Lemonnier J, Ghayor C, Suzuki A, Palmer G, Caverzasio J. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res*. 2003;18:2060-8.
- Hassel S, Schmitt S, Hartung A, Roth M, Nohe A, Petersen N, Ehrlich M, Henis YI, Sebald W, Knaus P. Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 3:44-51.
- Higuchi C, Myoui A, Hashimoto N, Kuriyama K, Yoshioka K, Yoshikawa H, Itoh K. Continuous inhibition of MAPK signaling promotes the early osteoblastic differentiation and mineralization of the extracellular matrix. *J Bone Miner Res*. 2002;17:1785-94.
- Jordan BW, Dinev D, LeMellay V, Troppmair J, Gotz R, Wixler L, Sendtner M, Ludwig S, Rapp UR. Neurotrophin receptor-interacting mage homologue is an inducible inhibitor of apoptosis protein-interacting protein that augments cell death. *J Biol Chem*. 2001;276:39985-9.
- Kozawa O, Hatakeyama D, Uematsu T. Divergent regulation by p44/p42 MAP kinase and p38 MAP kinase of bone morphogenetic protein-4-stimulated osteocalcin synthesis in osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2002;84:583-9.
- Kretschmar M, Doody J, Massagué J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature*. 1997;389:618-22.
- Lee KS, Kim HJ, Li QL, Chi XZ, Ueta C, Komori T, Wozney JM, Kim EG, Choi JY, Ryoo HM, Bae SC. Runx2 is a common target of transforming growth factor beta1 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*. 2000;20:8783-92.
- Miyazono K, Maeda S, Imamura T. BMP receptor signaling: transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2005;16:251-63.
- Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci*. 2005;118:3573-84.
- Nohe A, Hassel S, Ehrlich M, Neubauer F, Sebald W, Henis YI, Knaus P. The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem*. 2002;277:5330-8.
- Noth U, Tuli R, Seghatolleslami R, Howard M, Shah A, Hall DJ, Hickok NJ, Tuan RS. Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts. *Exp Cell Res*. 2003;291:201-11.
- Osyczka AM, Leboy PS. Bone morphogenetic protein regulation of early osteoblast genes in human marrow stromal cells is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling. *Endocrinology*. 2005;146:3428-37.
- Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ. Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*. 2006;366:51-7.
- Sapkota G, Alarcón C, Spagnoli FM, Brivanlou AH, Massagué J. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell*. 2007;25:441-54.
- Shirakabe K, Yamaguchi K, Shibuya H, Irie K, Matsuda S, Moriguchi T, Gotoh Y, Matsumoto K, Nishida E. TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*. 1997;272:8141-4.
- Suzawa M, Tamura Y, Fukumoto S, Miyazono K, Fujita T, Kato S, Takeuchi Y. Stimulation of Smad1 transcriptional activity by Ras-extracellular signal-regulated kinase pathway: a possible mechanism for collagen-dependent osteoblastic differentiation. *J Bone Miner Res*. 2002;17:240-8.
- Takekawa M, Tatebayashi K, Itoh F, Adachi M, Imai K, Saito H. Smad-dependent GADD45beta expression mediates delayed activation of p38 MAP kinase by TGF-beta. *EMBO J*. 2002;21:6473-82.
- Ungefroren H, Lenschow W, Chen WB, Faendrich F, Kalthoff H. Regulation of biglycan gene expression by transforming growth factor-beta requires MKK6-p38 mitogen-activated protein Kinase signaling downstream of Smad signaling. *J Biol Chem*. 2003;278:11041-9.
- Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K. XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J*. 1999;18:179-87.
- Yamamoto N, Akiyama S, Katagiri T, Namiki M, Kurokawa T, Suda T. 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*. 1997;238:574-80.