[UCI]I804:24011-200000233865

2007년2월
석사학위논문

# NFI-C가 Smad와 TGF-βR1의 발현에 미치는 영향

조선대학교 대학원

치의공학과

윤 성 호

2007년2월 석사학위논문 NFI-C가 Smad와 TGF-βR1의 발현에 미치는 영향 윤 성 호

# NFI-C가 Smad와 TGF-βR1의 발현에 미치는 영향

*Effect of NFI-C on the expression of Smad and TGF-βR1*

2007년 2월 일

조선대학교 대학원

치의공학과

윤 성 호

# NFI-C가 Smad와 TGF-βR1의 발현에 미치는 영향

지도교수 박 주 철

이 논문을 치의학 석사학위 신청 논문으로 제출함.

2006년 10월 일

조선대학교 대학원

치의공학과

윤 성 호

윤성호의 석사학위 논문을 인준함

| | | | |
|---|---|---|---|
| 위원장 | 조선대학교 교 수 | 김 생 곤 | 인 |
| 위원 | 조선대학교 교 수 | 고 영 무 | 인 |
| 위원 | 조선대학교 교 수 | 박 주 철 | 인 |

2006년 11월 일

조 선 대 학 교 대 학 원

# 목 차

ABSTRACT ····· iii

Ⅰ. 서 론 ····· 1

Ⅱ. 실험재료 및 방법 ····· 3

1. 조직표본 제작

2. 세포 배양 및 confocal microscopy

1) 세포 배양

2) Confocal microscopy

3. Smad2/3와 TGF-βR1 항체를 이용한 면역조직화학적 염색

Ⅲ. 실험결과 ····· 7

1. NFI-C와 Ask-1 그리고 Cdc-2 항체를 이용한 면역형광 염색 소견

2. Smad2/3와 TGF-βR1 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 소견

Ⅳ. 총괄 및 고안 ····· 10

Ⅴ. 결 론 ····· 14

참고문헌 ····· 15

# 도 목 차

Fig. 1. Immunofluorescent localization of NFI-C in the pulp cells of normal mice.
---------- 25

Fig. 2. Immunofluorescent localization of Ask-1 in the pulp cells of normal (WT) and NFI-C (K/O) mice.
---------- 26

Fig. 3. Immunofluorescent localization of CDC-2 in the pulp cells of normal (WT) and NFI-C (K/O) mice.
---------- 26

Fig. 4. Immunohistochemical localization of Smad2/3 in tissue sections from P10 and P17 wild type (A, B) and knockout mice (C, D).
---------- 26

Fig. 5. Immunohistochemical localization of TGF-βR1 in tissue sections from P10 incisors of wild type (A) and knockout mouse (B).
---------- 27

# *ABSTRACT*

## Effect of NFI-C on the expression of Smad and TGF-βR1

Yun, Seong Ho

Advisor : Prof. Park, Joo-Cheol, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dental Engineering,

Graduate School of Chosun University

NFI-C null mice demonstrated aberrant odontoblast differentiation, abnormal dentin formation, and thus molar lacking roots while other tissues/organs in the body, including ameloblasts appear to be unaffected and normal. Abnormal denin in NFI-C null mice shared morphological similarities to osteodentin that is formed as a result of dental caries. However, little is known about the interrelationship between NFI-C and osteodentin formation.

In this study, in order to elucidate the molecular characteristics of abnormal odntoblast in NFI-C null mice, we examined the expression of Ask-1, Cdc-2, Smad2/3, and TGF-βR1 in the cell culture and tissue sections of NFI-C null mice using immunofluorescence and immunohistochemistry.

The results were as follows:

1. NFI-C protein was localized in the nucleus and cytoplasm of the normal odontoblasts *in vitro*.

2. Ask-1 and Cdc-2 protein was expressed in the perinuclear cytoplasm of both normal and NFI-C null mice. There were any differences in the expression pattern of Ask-1 and CDc-2 protein between normal and NFI-C null mice.

3. Smad2/3 was not expressed in the odontoblast and subodontoblastic cells of the normal mice, whereas NFI-C null mice expressed the Smad2/3 immunoreactivity in the odontoblast and subodontoblastic cells of the tooth pulp.

4. TGF-βR1 was also nearly expressed in the odontoblast and subodontoblastic cells of the normal mice, whereas TGF-βR1 immunoreactivity was strongly detected in the subodontoblastic cells of the NFI-C null mice.

These results suggest that disruption of NFI-C increased the expression of Smad2/3 and TGF-βR1 in developing odontoblasts and consequently caused the abnormal dentin formation which is similar to osteodentin.

Key words: NFI-C, odontoblast, Smad2/3, TGF-βR1, osteodentin

# Ⅰ. 서 론

치아의 형성은 치성상피와 외배엽성 간엽세포 사이의 상피-간엽 상호작용을 통해 조절되어지는 복잡한 과정이다[1]. 치아발생에 대한 연구는 세포 및 분자 생물학적 수준까지 많이 진행되어 초기의 치아발생에는 BMP, FGF, Msx1, Pax9 및 Cbfa1 등의 여러 유전자 들이 관여하는 것으로 알려지고 있으며, 그들의 신호전달경로들도 밝혀지고 있다[2,3,4,5,6]. 치아의 초기 발생과는 대조적으로 후기 치아발생, 즉 치근의 발생에 관여하는 인자들에 대한 연구는 cadherin 같은 부착단백질과 osteocalcin, osteonectin 및 dentin sialoprotein 등과 같은 비교원성 단백질과 관련된 연구를 제외하고는 미진한 상태이다[7,8]. 치근, 특히 치근 상아질의 발생기전의 이해는 치주조직의 재생뿐만 아니라 의도적 치아의 재이식 등의 임상적 적용에 중요하기 때문에 치근 상아질의 발생에 대한 연구는 기초치의학 뿐만 아니라 임상적으로도 매우 중요하다고 할 수 있다.

Nuclear factor I (NFI) family는 전사-복제 인자들로 닭, 생쥐, 햄스터, 돼지 및 사람에서는 NFI-A, NFI-B, NFI-C 그리고 NFI-X의 네 가지 유전자들로 이루어져 있으나, *Drosophila melanoster*와 *Caenorhabditis elegans*에서는 하나의 유전자로 구성되어 있다[9,10,11]. NFI은 시험관에서 adenovirus의 DNA 복제에 필요한 단백질로 처음 발견되었으나, 최근에는 많은 세포성 유전자들의 발현에 중요한 역할을 하는 단백질로 알려지고 있다[12,13,14,15]. 예를 들어, NFI-A 유전자가 없으면 뇌의 발생에 이상이 생기며[16], NFI-B가 상실되면 뇌와 폐의 발생 이상이 초래된다[17]. NFI-C에 관하여는 최근에 Steele-Perkins 등[18]이 NFI-C를 knock out하면 하악전치는 부러지기 쉽게 변형되고, 상악전치에도 약간의 이상이 발생한다고 하였다. 특히 구치의 치관부는 정상이지만 치근이 짧거나 비정상적으로 형성된다고 하여, NFI-C가 치근 상아질 형성과정 즉 상아모세포의 분화과정에서 중요한 역

할을 함을 시사하였다.

Thyagarajan 등[19]이 TGF-β1을 과발현 시킨 transgenic mice에서 상아모세포가 세포 극성이 상실되며, 골양상아질과 유사한 상아질에 세포가 함입되고, DSPP mRNA가 발현되지 않는다고 하였다. 이는 NFI-C K/O mice의 상아모세포의 변화와 유사한 것이다. 이 결과는 TGF-β1을 과발현 시킨 transgenic mice와 NFI-C K/O mice에서 모두 상아모세포에서 골모세포로 표현형 변환이 나타남을 의미한다.

이 연구는 NFI-C 결손 생쥐에서 상아질이 비정상적으로 형성되는 것이 NFI-C 결손이 TGF-β1을 과발현 시킨 결과로 나타나는지 알아보기 위하여 TGF-β1을 세포표면에서 인지하는 TGF-βR1과 TGF-β1에 의하여 세포내에서 형성되는 Smad의 발현을 면역조직화학적으로 연구하였다. 또한, NFI-C 결손 생쥐의 비정상적인 상아모세포가 TGF-β1과 Smad 경로를 통한 세포분열정지(cell-cycle arrest) 과정을 통하여 세포사멸의 조절을 받는지 규명하기위하여 세포분열정지에 연관되는 Ask-1과 Cdc-2의 발현을 면역형광염색법으로 연구하였다.

# Ⅱ. 실험재료 및 방법

## *1.* 조직표본 제작

생후 10일과 17일의 정상 생쥐(wild type)와 NFI-C (K/O) 생쥐(Dr. Gronostajski, Department of Biochemistry, School of Medicine, State University of New York at Buffalo)를 4% paraformaldehyde 용액을 이용하여 관류 고정 시킨 후 상, 하악골을 포함한 머리뼈를 적출하여 동일 고정액에서 하룻밤 동안 재고정하였다. 10% ethylene diamine tetra- acetic acid (EDTA)-1% paraformaldehyde(pH 7.4) 용액에서 2주간 탈회하고 수세, 탈수 등의 과정을 거친 다음 파라핀 포매 하여 8μm 두께로 전치부를 중심으로 시상절단하고 또한 전치부에서부터 구치부까지 전방에서 후방으로 관상으로 절단하였다. 박절한 절편은 면역조직화학적염색을 위해 4℃에 보관하였고 일부는 통법에 따라 hematoxylin-eosin으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

## *2.* 세포 배양 및 *confocal microscopy*

1) 세포 배양

정상 생쥐와 NF-I C (K/O) 생쥐의 대구치에서 얻은 치수조직을 무균상태에서 항생제가 함유된 Hank's Balanced Salt Solution (Gibco BRL, Rockville, USA) 용액으로 수회 세척한 후 해부현미경하에서 1-2$mm^3$ 정도의 크기로 자른 다음, 10% 열 불활성화된 fetal bovine serum (Gibco BRL, Rockville, USA) 및 항생제(penicillin 100 U/㎖, streptomycin 100μg/㎖, gentamycin 50㎍μg/㎖ 및 fungizone 2.5μg/㎖)가 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, USA)을 이용하여 5% $CO_2$, 37℃, 100% 습도 상태의 세포 배양기에서 일차배양 하였다.

2) Confocal microscopy

일차배양 된 세포들을 chambered coverglass (Nunc, Rochester, NY, USA)에서 50-60% confluence 상태가 되도록 배양한 후 배양액을 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 다음 4% paraformaldehyde로 실온에서 20분간 고정하고 다시 PBs로 5분간 3회 세척하였다. 0.15% TritonX-100/PBS로 10분간 처리 한 후 1% BSA(Bovine Serum Albumin)/PBS 용액을 사용하여 실온에서 20분간 blocking 하였다. 일차항체는 조선대학교 치과대학 구강조직학 교실에서 Labfrontier (Seoul, Korea)에 의뢰하여 제작한 rabbit polyclonal NFI-C (1 : 100 dilution)와 구입한 Ask-1 (1 : 100 dilution)과 Cdc-21 (1 : 50 dilution) (Santa Cruze Biotec., Santa Cruze, CA, USA) 항체들을 사용하여 실온에서 30분 동안 처리 하였다. PBS로 10분간 3회 세척한 후 propidium iodide 용액 (10 ㎍/㎖, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 사용하여 대조염색하였다. PBS로 10분간 3회 세척 한 후 fluorescent mounting media (Calbiochem, Darmstadt, Germany)로 봉입하여 confocal microscope (Olympus, Japan)으로 관찰하였다.

### *3. Smad2/3와 TGF-βR1* 항체를 이용한 면역조직화학적 염색

보관된 절편을 탈파라핀과 함수과정을 거친 다음에 0.6% $H_2O_2$가 함유된 methanol 용액에 20분간, 2% non fat milk로 20분간 처리하였다. 절편을 1-2 mg/ml 농도의 단백분해효소(Zymed Lab. Inc, CA, USA) 용액을 이용하여 37℃에서 10분간 처리한 후 1:20의 비율로 희석한 polyclonal rabbit anti-Smad antibody (Zymed Lab. Inc, CA, USA)와 polyclonal rabbit anti-TGF-βR1 antibody (Zymed Lab. Inc, CA, USA)로 4℃에서 하룻밤 처리하고 PBS로 20분 동안 3회 세척하였다. 2차 항체로서 mouse anti-rabbit IgG (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)를 실온에서 45분 동안 처리하고 PBS로 수세하였다. ABC reagent (Vector Lab, Burlingame, CA, USA)를 이용하여 30분 동안 반응시킨 후

수세하였다. 0.05% DAB (deaminobenzidine tetrahydrochloride)를 이용하여 발색하고 절편을 수세, 탈수와 건조 후에 봉입하여 광학 현미경으로 관찰 하였다.

# Ⅲ. 실험결과

### *1. NFI-C와 Ask-1 그리고 Cdc-2* 항체를 이용한 면역형광 염색 소견

NFI-C는 정상 생쥐의 상아모세포의 핵과 세포질에서는 강하게 발현되었으나 (Fig. 1), NFI-C K/O 생쥐의 비정상적인 상아모세포에서는 NFI-C의 발현이 관찰되지 않았다.

Ask-1은 정상 생쥐와 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포의 핵주위와 세포질에서 발현되었으며 정상 생쥐와 NFI-C K/O 간의 발현의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

Cdc-2도 정상 생쥐와 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포의 핵주위와 세포질에서 약하게 발현되었으나 정상 생쥐와 NFI-C K/O 간의 발현의 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 3).

### *2. Smad2/3와 TGF-βR1* 항체를 이용한 면역조직화학적 염색 소견

정상 생쥐에서는 치수의 상아모세포와 상아모세포하세포층에서 Smad2/3의 발현이 관찰되지 않았으나(Fig. 4A, B), NFI-C K/O 생쥐에서는 전치부 비정상적인 상아질 아래의 상아모세포하세포들 (subodontoblast cells)에서 Smad2/3의 발현이 관찰되었다(Fig. 4C). NFI-C K/O 생쥐의 구치부에서는 상아모세포에 Smad2/3의 강한 발현이 관찰되었다(Fig. 4D).

정상 생쥐의 치아에서는 어떤 세포에서도 TGF-βR1의 발현을 뚜렷이 관찰 할 수 없었으나(Fig. 5A), NFI-C K/O 생쥐의 비정상적인 상아질 아래의 세포들에서는 TGF-βR1의 발현을 관찰 할 수 있었다(Fig 5B).

# Ⅳ. 총괄 및 고안

상아질을 형성하는 상아모세포는 외배엽성 간엽세포로부터 분화하는데 이 과정에서 법랑모세포 전구세포의 존재가 필수적이다[20]. 외배엽성 간엽세포가 상아모세포 전구세포로 분화하면 세포가 길어지고, 세포가 극성을 띔에 따라 핵이 기저부에 위치하며, 골지체가 핵 위에 위치하고, 조면내형질세망이 핵에서 먼 세포의 가장자리 쪽에 위치하게 된다. 상아모세포는 제I형과 II형 교원질과 같은 유기기질과 당단백 그리고 dentin sialophosphoprotein (DSPP) 등을 합성 분비 한다[21]. 상아질의 기질이 침착됨에 따라 상아모세포가 세포질 돌기들을 원심 쪽으로 내어 상아세관에 묻히게 되고, 결과적으로 상아모세포는 치수 가장자리 상아질의 내면에 위치해서 상아질을 유지하게 된다[20]. 그러나 이러한 상아모세포의 분화과정에 대한 분자생물학적 기전은 아직까지 잘 알려져 있지 않다.

상아모세포는 세포체와 세포질 돌기를 갖고 있는 키가 크고 극성을 띄는 세포로 상아전질과 상아질을 형성하고 유지한다. 이와 같이 상아모세포는 그 근심 끝단으로 기질 단백질을 분비하는 고도의 극성을 띄는 결합조직-합성 세포이다. 골세포나 연골세포와는 달리 상아모세포는 석회화된 기질에 함입되어 있지 않고 항상 상아질의 치수측에 자리한다. 또한 다른 특징으로 상아모세포는 세포의 근심 끝단에 액틴 (actin) 미세사로 이루어진 terminal web이 발달하며 치밀과 부착 결합장치들도 세포들 사이에서 잘 관찰 되는 것으로 알려져 있다[22,23,24]. 이 결합장치들이 상아모세포가 상아질 내면을 따라서 한 층으로 배열 할 수 있게 하며, 상아전질에 세포들이 함입되지 못하도록 세포들 끼리 붙잡는 역할을 한다[25,26]. 또한, 이런 결합장치들이 상아전질과 상아질을 평탄한 양상으로 형성하고 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 추측된다.

Dentin sialophosphoprotein (DSPP)은 비교원질성 단백질에 속하는 대표적인

상아질-특이 단백질로 하나의 유전자로부터 dentin sialoprotein (DSP)과 dentin phosphoprotein (DPP)의 두 가지 단백질을 합성하며 상아질의 석회화 과정에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[27,28]. 반면에 BSP (Bone sialoprotein)는 골의 석회화 과정에 관여하는 인자로 알려져 있어[21], BSP와 DSPP가 상아질과 골을 구분하는 실험에 많이 이용된다.

배 등[29]은 최근에 상아모세포주인 MDPC-23 세포에 NFI-C를 과발현 또는 발현 억제시킨 후 DSPP와 BSP mRNA의 발현 확인을 통하여 상아모세포 분화과정에서 NFI-C의 역할을 규명하고자 하였다. 연구결과에 의하면 MDPC-23 세포에 NFI-C를 과발현 시킨 3일 후에 DSPP mRNA의 발현이 확인되었다. 이는 정상적으로는 MDPC-23 세포가 배양 14일후에 DSPP mRNA를 발현한다는 사실을 생각하면, NFI-C에 의해 DSPP mRNA의 발현이 촉진되었음을 나타낸다. 이 결과는 NFI-C가 상아모세포-특이 유전자인 DSPP의 전사와 상아모세포의 분화 과정에서 중요한 역할을 함을 시사한다. 또한, MDPC-23 세포에 NFI-C를 발현 억제 시킨 3일후에는 BSP mRNA의 발현이 확인되었다. 이 결과는 NFI-C의 기능이 상실되면 MDPC-23 세포의 표현형이 상아모세포에서 골모세포로 변화될 수 있음을 시사하는 연구 결과이다. 따라서 이 연구에서는 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포가 형태학적으로 골모세포와 유사한 특성을 나타낸다는 사실에 기초하여 NFI-C가 TGF-β1과 상호 관계 속에서 상아모세포를 골모세포의 특징을 나타나게 하는 기전을 알아보고자 하였다.

이 연구에서 NFI-C가 결손 되면 수용체인 TGF-βR1이 증가하고 TGF-β1 의 세포내 신호전달 물질인 Smad 단백질이 증가하여 비정상적인 상아질이 형성되고 이들이 골양상아질의 특징을 나타내게 한 것으로 볼 수 있다. 이와 관련하여 NFI-C와 Smad3와 같은 TGF-β 신호전달 물질사이에 기능적 관련성이 있음을 시사하는 다양한 연구 결과들이 보고되고 있는데, 기능적 관련성을 뒷받침하는 논리적 근거들은 크게 다섯 가지로 분류할 수 있다. 첫째로는 상아모세포 전구세포나 골모세포 전구세포에서 모두 CBFA1이 발현된다는 것은 상아모세포 전구세포가 상아모세포나 골모세포

로 분화가 가능한 능력을 가진 세포인데[30,31,32], 예를 들어 골모세포로 분화하면 DSPP의 발현이 줄어들고 BSP 발현이 증가 된다는 사실이다. 둘째로는 상아모세포나 골모세포 모두 TGF-β1을 합성하고 분비한다는 점이다[33]. 셋째로는 생쥐 상아모세포에 제 I형과 II형의 TGF-β 수용체와 TGF-β 신호전달과정에 관여하는 Smad2, Smad3, Smad4 수용체가 존재한다는 것이다[34]. 넷째로는 TGF-β1 이 골모세포에서 BSP의 발현은 증진시키지만 상아모세포에서 DSPP의 발현은 억제 시킨다는 점이다[35,36]. 다섯째로는 흰쥐 BSP 유전자의 promoter에 NFI-C binding site와 TGF-β responsive element가 동일한 부위에 존재해서 서로 중첩 (overlap)되어 있다는 사실이다[35]. 이는 DSPP 유전자의 promoter도 이와 동일한 구조를 가지고 있음을 시사한다. 결과적으로 NFI-C가 존재할 때는 NFI-C가 DSPP promoter의 NFI-C binding site에 결합하여 DSPP의 발현을 촉진하고, NFI-C가 존재하지 않을 때에는TGF-β1이 BSP와 DSPP promoter의 TGF-β responsive element에 결합하여 BSP의 발현을 촉진하고 DSPP의 발현을 억제한다고 추정 할 수 있다.

TGF-β는 세포의 proliferation, differentiation, migration 그리고 apoptosis 의 조절을 통하여 발생과 조직의 항상성유지를 위한 중요한 역할을 수행하는 인자이다. 최근에 다양한 세포에서 TGF-β가 cell cycle arrest와 apoptosis를 유도한다고 보고하였다[37,38]. TGF-β는 Smad signaling pathway를 통하여 cyclin dependant kinase(Cdk) inhibitor인 p15, p21 그리고 p27등을 활성화 시킴으로써 cell cycle arrest를 유도한다[39]. p21은 cyclin/CDK complex에 직접 결합하여 Cdk inhibitor와 같은 역할을 수행하며, Cdc2/cyclinB, Cdk2/cyclinE 등의 활성을 억제한다. Cdc2 (or p34, Cyclin-dependant kinase 1(Cdk-1))는 cyclin B와 작용하여 cell cycle이 G2기에서 M기로 진행하게 한다. 이들 complex는 Cdc25c의 작용에 의해 활성화 되어진다[40]. Smad는 p21과 같은 Cdk inhibitor을 활성화 시킬 뿐만 아니라 Cdc25c의 활성을 억제함으로써 cell cycle arrest를 유도한다[41]. 최근에 TGF-β는 gastric epithelial cells에서 Smad signaling pathway와 mitochondrial

dysfunction을 통하여 caspase-9을 활성화 시킴으로써 apoptosis를 유도한다고 보고 하였다[42]. 또한 TGF-β는 MAPK (mitogen-activated protein kinase) signaling을 통하여 apoptosis를 유도 할 수 있다[38]. TGF-β는 TGF-β receptor I 과 TGF-β receptor II 의 heteromeric complex에 의해 세포내 신호전달을 활성화 시킨다. TGF-β receptor II는 Fas associated protein인 Daxx와 작용하여 MAPKKK중 하나인 ASK1을 활성화 시켜 MAPK cascade를 통하여JNK (Jun amino-terminal kinase)을 활성화 시켜 apoptosis가 유도 되어진다[38,4344,45)].

이 연구에서 NFI-C의 결손이 Smad 단백질의 발현을 증진 시켰으나 Smad signaling pathway를 통한 cell cycle arrest와 관련되는 Ask-1과 CDc-2의 발현이 정상 상아모세포와 NFI-C의 결손 생쥐의 상아모세포에서 차이가 없는 결과로 보아 NFI-C의 결손에 의한 상아모세포의 apoptosis는 cell cycle arrest와 관련이 없는 것으로 생각 할 수 있다.

결론적으로 NFI-C는 상아모세포의 분화와 상아질의 형성 과정에 중요한 역할을 하며, 특히 TGF-β1의 Smad pathway를 통한 DSPP와 BSP 유전자의 조절과 apoptosis가 상아모세포의 표현형 결정에 영향을 미쳐 NFI-C가 결손되면 치수손상에 의한 수복상아질의 형성 때와 유사한 골양상아질이 형성되는 것으로 사료되나, 이를 명확히 구명하기 위해서는 유전자 전사인자와 구조분석 등의 다양한 연구가 필요할 것이다.

# V. 결 론

NFI-C는 정상적으로 상아모세포에 존재하는데, NFI-C가 없으면 치근 상아질 형성과정과 상아모세포의 분화과정에 이상이 초래되어 비정상적인 상아질이 형성되는 것으로 알려져 있다. 또한 NFI-C가 결손된 치아의 비정상적인 상아질은 치아 손상 후에 나타나는 수복상아질과 유사한 특징을 나타낸다. 그러나 NFI-C의 결손으로 수복상아질과 유사한 비정상적인 상아질이 형성되는 형성 기전에 관하여는 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포의 특성을 규명하기위하여 NFI-C K/O생쥐에서 발생한 비정상적인 상아모세포들에서 Ask-1, Cdc-2, Smad2/3 및 TGF-βR1의 발현을 면역형광과 면역조직화학적 염색을 통하여 배양 상아모세포와 치수조직에서 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. NFI-C는 정상 생쥐의 상아모세포의 핵과 세포질에서는 강하게 발현되었다.
2. Ask-1과 Cdc-2는 정상 생쥐와 NFI-C K/O 생쥐의 상아모세포의 핵 주위와 세포질에서 발현되었으나, 생쥐와 NFI-C K/O 간의 발현의 차이는 관찰되지 않았다.
3. 정상 생쥐에서는 치수의 상아모세포와 상아모세포하세포층에서 Smad2/3의 발현이 관찰되지 않았으나, NFI-C K/O 생쥐에서는 전치부 비정상적인 상아질 아래의 상아모세포하세포들 (subodontoblast cells)과 구치부 상아모세포에서 Smad2/3의 발현이 관찰되었다.
4. 정상 생쥐의 치아에서는 TGF-βR1의 발현을 뚜렷이 관찰 할 수 없었으나, NFI-C K/O 생쥐의 비정상적인 상아질 아래의 세포들에서는 TGF-βR1의 발현을 관찰 할 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 보면 상아모세포의 분화와 상아질의 형성과정에서 NFI-C K/O의 결손이 Smad2/3와 TGF-βR1의 발현을 증진시키고 이에 따라 상아질이 비정상적인 골양상아질의 특징을 나타내는 것으로 사료된다.

# 참고문헌


1. Mina M., Kollar E.J. "The induction of odontogenesis in non-dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium." *Arch. Oral. Biol.* ***32***(2): 123-127, 1987.

2. Bronckers A.L., Engelse M.A., Cavender A. "Cell-specific patterns of Cbfa1 mRNA and protein expression in postnatal murine dental tissues." *Mech Dev* ***101***: 255-258, 2001.

3. D'Souza R.N., Alerg T, Gaikwad J."Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice." *Development* ***126***: 2911-2920, 1999.

4. Jiang H., Sodek J., Karsenty G., Thomas H., Ranly D., Chen J. "Expression of core binding factor Osf2/Cbfa-1 and bone sialoprotein in tooth development." *Mech Dev* ***81***: 169-173, 1999.

5. Peter H, Balling R. "Teeth: where and how to make them." *Tooth Development* ***15***: 59-65, 1999.

6. Young C.S., Terada S, Vacanti J.P. "Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds." *J Dent Res* ***81***: 695-700, 2002.

7. Obara N., Suzuki Y., Nagai Y. "Immunofluorescence detection of cadherins in mouse tooth germs during root development." *Arch Oral Biol* ***44***: 415-421, 1999.

8. Papagerakis P., Berdal A., Mesbah M., Peuchmaur M., Malaval L., Nydegger J., Simmer J., Macdougall M. "Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth." *Bone* ***30***: 377-385, 2002.

9. Chaudhry A.Z., Lyons G.E., Gronostajski R.M. "Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development." Dev. Dyn. 208(3): 313-325, 1998.

10. Chaudhry A.Z., Vitullo A.D., Gronostajski R.M. "Nuclear factor I (NFI) isoforms differentially activate simple versus complex NFI-responsive promoters." J. Biol. Chem. 273(29):18538-18546, 1999.

11. Mukhopadhyay S.S., Wyszomierski S.L., Gronostajski R.M., Rosen J.M. "Differential interactions of specific nuclear factor I isoforms with the glucocorticoid receptor and STAT5 in the cooperative regulation of WAP gene transcription. Mol. Cell Biol. 21: 6859-6869, 2001.

12. Chaudhry A.Z., Vitullo A.D., Gronostajski R.M. "Nuclear factor I-mediated repression of the mouse mammary tumor virus promoter is abrogated by the coactivators p300/CBP and SRC-1." J. Biol. Chem. 274(11): 7072-70,81. 1998.

13. Elateri I., Muller-Weeks S., Caradonna S. "The transcription factor, NFI/CTF plays a positive regulatory role in expression of the hSMUG1 gene." DNA Repair 2: 1371-1385, 2003.

14. Gronostajski RM. "Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development." Gene 249: 31-45, 2000.

15. Gronostajski R.M., Knox J., Berry D., Miyamoto N.G. "Stimulation of transcription in vitro by binding sites for nuclear factor I." Nucleic Acids Res. 16(5): 2087-2098, 1988.

16. Ling G., Hauer C.R., Gronostajski R.M., Pentecost B.T., Ding X. "Transcriptional regulation of rat CYP2A3 by nuclear factor 1: identification of a novel NFI-A isoform, and evidence for tissue-selective interaction of NFI with the CYP2A3 promoter in vivo." J. Biol. Chem. 279(27): 27888-27895, 2004.

17. Shu T., Butz K.G., Plachez C., Gronostajski R.M., Richards L.J. "Abnormal development of forebrain midline glia and commissural projections in N*fi*a knock-out mice." J. Neurosci. 23(1):203-212, 2003.

18. Steele-Perkins G., Butz K.G., Lyons G.E., Zeichner-David M., Kim H-J., Cho M-I., Gronostajski R.M. "Essential Role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development." Mol. Cell. Biol. 23: 1075-1084, 2003.

19. Thyagarajan T., Sreenath T., Cho A., Wright J.T., Kulkarni A.B. ".Reduced expression of dentin sialophosphoprotein is associated with dysplastic dentin in mice overexpressing transforming growth factor-beta 1 in teeth." J. Biol. Chem. 276(14): 11016-11020. 2001.

20. Garant P.R. "The organization of microtubules within rat odontoblast processes revealed by perfusion fixation with glutaraldehyde." *Arch. Oral Biol. 17*: 1047-1058, 1972.

21. D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, et al. "Gene expression patterns of murine dentin matrix protein (DMP1) and dentin sialophophoprotein (DSPP) suggest distinct development function in vivo." *J Bone Miner Res 12*:2040-2047, 1997.

22. Garant P.R., Cho M.I. "Recent studies of dodntoblast structure and function: The secretory processes examined with a proline analog and the polyene antibiotic filipin." INSERM Symposia 125: 143-158, 1984.

23. Holland G.R. "The extent of the odontoblast process in the cat." J. Anat. 121: 133-149, 1976.

24. Sasaki T., Garant P.R. "Structure and organization of odontoblasts." Anat Rec. 245: 235-249, 1996.

25. Avery J.K. "Oral development and histology." 3rd ed., New York, 2001,

Thieme.

26. Linde A., Goldberg M. "Dentinogenesis." Crit. Rev. Oral Biol. Med. 4: 679-728, 1993.

27. Feng J.Q., Luan X., Wallace J., Jing D., Ohshima T., Kulkarni AB., D'Souza R.N., Kozak C.A., MacDougall M. "Genomic organization, chromosomal mapping, and promoter analysis of the mouse dentin sialophosphoprotein (DSPP) gene, which codes for both dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein." J. Biol. Chem. 273: 9457-9464, 1998.

28. Rutherford R.B., Wahle J., Tucker M., Rueger D., Charette M. "Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1." Arch. Oral Biol. 38: 571-576, 1993.

29. 배현숙, 김홍중, 정문진, 박민주, 안성민, Gronostajski R.M., 박주철. "상아모세포 분화과정에서 nuclear factor I-C의 역할" *대한구강병리학회지* ***29***(2): 83-82, 2005.

30. Alliston T., Choy L., Ducy P., Karsenty G., Derynck R. "TGF-β induced repression of CBFA1 by smad 3 decrease cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation." EMBO J. 20: 2254-2272, 2001.

31. Jiang H., Sodek J., Karsenty G., Thomas H., Ranly D., Chen J. "Expression of core binding factor Osf2/Cbfa-1 and bone sialoprotein in tooth

development." Mech. Dev. 81: 169-173, 1999.

32. Nakashima K., Zhou X., Kunkel G., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., Crombrugghe B., "The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation." Cell 108: 17-29, 2002.

33. Robey P.G., Young M.F., Flanders K.C., Roche N.S., Kondaiah P., Reddi A.H., Termine J.D., Sporn M.B., Roberts A.B. "Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) in vitro." J. Cell Biol. 105(1): 457-463, 1987.

34. Smith A.J., Matthews J.B., Hall R.C. "Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression." Eur. J. Oral Sci. 106(Suppl 1): 179-184, 1998.

35. Ogata Y., Niisato N., Furuyama S., Cheifetz S., Kim RH, Sugiya H., Sodek J. "Transforming growth factor-beta 1 regulation of bone sialoprotein gene transcription: identification of a TGF-beta activation element in the rat BSP gene promoter." J. Cell Biochem. 65(4): 501-512, 1997.

36. Unterbrink A., O'Sullivan M., Chen S., MacDougall M. "TGF beta-1 downregulates DMP-1 and DSPP in odontoblasts." Connect. Tissue Res. 43: 354-358, 1998.

37. Kwang Youl Lee and Suk-Chul Bae (2002) TGF-β-dependant Cell Growth Arrest and Apoptosis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 35(1):47-53

38. Amelia Sa´nchez-Capelo (2005) Dual role for TGF-b1 in apoptosis. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 16 :15 - 34

39. Fang Liu (2006) Smad3 phosphorylation by cyclin-dependent kinases *Cytokine & Growth Factor Reviews* 17 :9-17

40. Smits VA and Medema RH (2001) Checking out the G2/M transition. *Biochim. Biophys. Acta* 1519:1-12

41. Pter Ten Dijke, Marie-Jose Goumans, Fumiko Itoh and Susumu Itoh (2002) Regulation of Cell Proliferation by Smad Protein. *Journal of Cellular Physiology* 191:1-16

42. Masatoshi Ohgushi, Shunsuke Kuroki, Hiroshi Fukamachi, Lorraine A. O'Reilly, Keisuke Kuida, Andreas Strasser, and Shin Yonehara (2005) Transforming Growth Factor ß-Dependent Sequential Activation of Smad, Bim, and Caspase-9 Mediates Physiological Apoptosis in Gastric Epithelial Cells. *Mol Cell Biol.* 25(22):10017-10028

43. Renae K. Barr, Marie A. Bogoyevitch(2001) The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs) *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 33:1047 - 1063

44. Claire R Weston and Roger J Davis (2002) The JNK signal

transduction pathway *Current Opinion in Genetics & Development* 12:14 - 21

45. Riki Perlman, William P. Schiemann, Mary W. Brooks, Harvey F. Lodish and Robert A. Weinberg (2001) TGF-b-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *NATURE CELL BIOLOGY* 3:708-714

# 사진부도 설명

Fig. 1. Immunofluorescent localization of NFI-C in the pulp cells of normal mice. (A) Expression of NFI-C (*green* fluorescence) using antibodies against NFI-C. (B) The cells were counterstained with propidium iodide to visualize the nucleus (*red* fluorescence). (C) Colocalization is evident when both images are superimposed.
---------- 25

Fig. 2. Immunofluorescent localization of Ask-1 in the pulp cells of normal (WT) and NFI-C (K/O) mice. (A) Expression of Ask-1 (*green* fluorescence) using antibodies against Ask-1. (B) The cells were counterstained with propidium iodide to visualize the nucleus (*red* fluorescence). (C) Colocalization is evident when both images are superimposed.
---------- 26

Fig. 3. Immunofluorescent localization of CDC-2 in the pulp cells of normal (WT) and NFI-C (K/O) mice. (A) Expression of Ask-1 (*green* fluorescence) using antibodies against CDC-2. (B) The cells were counterstained with propidium iodide to visualize the nucleus (*red* fluorescence). (C) Colocalization is evident when both images are superimposed.
---------- 26

Fig. 4. Immunohistochemical localization of Smad2/3 in tissue sections from P10 and P17 wild type (A, B) and knockout mice (C, D). (A) Immunostaining with Smad2/3 antibodies in a cross section from an incisor tooth of P10 wild type mouse. (B) Immunostaining with Smad2/3 antibodiesin a longitudinal

section from a molar tooth of P17 wild type mouse. (C) A longitudinal section from an incisor tooth of P10 wild type mouse. Smad2/3 immunoreactivity was observed in subodontoblastic cells (arrows) of the pulp. (D) A longitudinal section from a molar tooth of P17 wild type mouse. Smad2/3 immunoreactivity was strongly detected in odontoblasts. Am, ameloblast; E, enamel; De, dentin; OD, odontoblast.

---------- 26

Fig. 5. Immunohistochemical localization of TGF-βR1 in tissue sections from P10 incisors of wild type (A) and knockout mouse (B). (A) There was no TGF-βR1 immunoreaxtivity in normal odontoblasts. (B) Immunostaining with TGF-βR1 antibodies in a cross section from an incisor tooth of P10 knockout mouse. TGF-βR1 immunoreactivity was detected in subodontoblastic cells (arrows) of the pulp. s. Am, ameloblast; E, enamel; De, dentin

# 저작물 이용 허락서

| 학 과 | 치의공학과 | 학 번 | 20057308 | 과 정 | 석사 |
|---|---|---|---|---|---|
| 성 명 | 한글:윤성호 한문 : 尹星鎬 영문 :Yun Seong Ho | | | | |
| 주 소 | 서울시 노원구 중계본동 364 신안동진아파트 102-305 | | | | |
| 연락처 | 017-265-5652 E-MAIL : sey927@hanafos.com | | | | |
| 논문제목 | 한글 : NFI-C가 Smad와 TGF-βR1의 발현에 미치는 영향 | | | | |
| | 영문 :Effect of NFI-C on the expression of Smad and TGF-βR1 | | | | |

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

**동의여부 : 동의( V ) 반대( )**

2007년 2월 일

저작자: 윤 성 호 (서명 또는 인)

## 조선대학교 총장 귀하