

2007년 2월
박사 학위논문

Protein microarray를 이용한
APin 단백질의 상호작용

조선대학교 대학원

치의공학과

박 선 화

Protein microarray를 이용한 APin 단백질의 상호작용

APin protein interactions using protein microarray

2007년 2월 일

조선대학교 대학원

치의공학과

박 선 화

Protein microarray를 이용한 APin 단백질의 상호작용

지도교수 김 홍 중

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로 제출함.

2006년 10월 일

조선대학교 대학원

치의공학과

박 선 화

박선화의 박사학위 논문을 인준함

위원장 조선대학교 교 수 김 종 중 인

위 원 전북대학교 교 수 박 병 건 인

위 원 조선대학교 교 수 김 동 기 인

위 원 조선대학교 교 수 박 주 철 인

위 원 조선대학교 교 수 김 흥 중 인

2006년 12월 일

조선대학교 대학원

목 차

표목차.....	ii
도목차.....	iii
<i>ABSTRACT</i>	iv
<i>I. 서론</i>	1
<i>II. 재료 및 방법</i>	3
<i>III. 결과</i>	7
<i>IV. 고찰</i>	13
<i>V. 결론</i>	17
<i>VI. 참고문헌</i>	18

표 목 차

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR	6
Table 2. Four high expression proteins related to the functional characteristics such as tumorigenesis, organ development and mineralization.....	10

도 목 차

Fig. 1. Detection of the APin protein using protein microarray.....	8
Fig. 2. Relative affinity ranking with the APin protein.....	9
Fig. 3. RT-PCR amplification of the APin in ameloblast cell line after over-expression and inactivation.....	10
Fig. 4. RT-PCR amplification of MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB and EF-hand calcium binding protein	11
Fig. 5. The amplification for the APin reactions in control, over-expression, inactivation and mock groups	12

ABSTRACT

APin protein interactions using protein microarray

Park, Sun-Hwa

Advisor: Kim, Heung-Joong, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Dental Engineering,

Graduate School of Chosun University

Protein microarray or protein chips is potentially powerful tools for analysis of protein-protein interactions. APin cDNA was previously identified and cloned from a rat odontoblast cDNA library. The purpose of this study was to investigate the APin protein interactions during ameloblast differentiation.

Protein microarray was carried with recombinant APin protein and MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB and EF-hand calcium binding protein were selected among 74 interacting proteins. Immortalized ameloblast cells(ALCs) were transfected with pCMV-APin construct and U6-APin siRNA construct. After transfection, the expression of the mRNAs for four proteins selected by protein microarrays were assessed by RT-PCR.

The results were as follows:

1. APin expression increased and decreased markedly after its over-expression and inactivation, respectively.
2. Over-expression of the APin in the ALCs markedly down-regulated the expression of MEF2 and Aurora kinase A, whereas their expression remained unchanged by its inactivation.
3. Over-expression of the APin in the ALCs markedly up-regulated the expression of MEF2 and Aurora kinase A, whereas expression of BMPR-IB remained unchanged and expression of EF-hand calcium binding protein was markedly down-regulated by its inactivation.

These results suggest that APin plays an important role in ameloblast differentiation and mineralization by regulating the expression of MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB and EF-hand calcium binding protein.

I. 서론

치아의 형성은 치성상피와 외배엽성 간엽세포 사이의 상피-간엽간의 상호작용을 통해 조절되어지는 복잡한 발생과정을 통해 이루어진다²⁰⁾. 치성상피는 치아기(dental organ)를 형성하여 법랑모세포(ameloblast)로 분화하여 법랑질을 형성하고, 외배엽성 간엽세포는 치유두(dental papilla)를 형성하여 상아모세포(odontoblast)와 치수세포(pulp cell)로 분화하여 상아질과 치수를 형성한다¹³⁾.

Dey 등¹²⁾은 상아모세포의 분화와 상아질 형성과정에 관여하는 유전자로 OD314를 보고하였는데, 이는 흰쥐의 상아모세포(odontoblast)에서 특이하게 발현되고 두개골의 골모세포(calvarial osteoblast)와 치유두 세포(dental papilla cell)에서는 발현되지 않는다고 하였다. 김 등¹⁾은 OD314가 154아미노산을 합성하는 그 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자로 주로 세포질에 존재하며, mRNA와 그 합성 단백질이 상아모세포에서 선택적으로 발현된다고 하였다. 또 사람 치수세포의 분화과정에서 OD314는 치수세포가 상아모세포로 분화하는 초기 과정에 발현되어 그 발현이 유지되다가 석회화과정에서 더욱 증가한다고 보고하였는데, 이러한 사실은 OD314가 상아질의 석회화과정에 관여함을 시사하였다.

최근에 박 등⁴⁾은 상아모세포 분화과정에서 OD314의 역할에 대한 연구 과정에서 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314가 치아 발생과정에서 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하여 OD314의 법랑질 형성에서의 역할을 시사하였다. OD314 cDNA는 Solomon 등²⁹⁾에 의해 상피성치성종양(calcifying epithelial odontogenic tumor)에서 amyloid 침전물의 분비성분으로 분리된 APin 단백질의 염기서열과 거의 유사함이 밝혀졌다. 최근에 Aung 등⁶⁾은 위암 특이유전자를 검색하여 APin이 위암세포에서 강하게 발현된다고 보고하였고, 흥미롭게도 Moffatt 등²¹⁾은 박 등⁴⁾의 결과와 유사하게 APin이 성숙기 법랑모세포에서 뿐 아니라 치아기에서도 발현된다고 하였다.

한편 단백질은 그 특성상 또다른 단백질과 상호작용을 통해 그 기능을 수행한

다. 단백질칩(protein chip)을 이용한 protein microarray는 단백질의 연구에 중요하게 사용되는 핵심기술로 질병의 진단 및 biomarker 발굴, 단백질의 발현 및 기능 연구, 단백질의 상호작용연구, 신약개발 등 다양한 응용분야를 가지고 있어 의학, 약학, 생명과학 분야에서 광범위하게 이용되고 있다^{17,18)}. 단백질칩을 이용한 APin의 protein microarray는 APin과 상호작용하는 단백질들을 분석하는데 가장 적합한 방법 중의 하나이다.

본 연구에서는 protein microarray를 이용하여 APin 단백질과 높은 친화성을 보이며, APin의 기능과 관련이 있는 단백질들인 MADS box transcription enhancer factor 2 (MEF2), Aurora kinase A, bone morphogenetic protein receptor IB (BMPR-IB)와 EF-hand calcium binding protein을 분석하였다. MEF2^{15,33)}와 Aurora kinase A^{8,9,16)}는 종양의 생성(tumorigenesis)과 증식(tumor proliferation)에 관계가 있고, BMPR-IB^{5,23)}는 여러 기관의 발생과, EF-hand calcium binding protein^{10,11)}은 석회화(mineralization) 과정에 연관이 있다.

RNAi(RNA interference)는 특정 유전자의 발현을 억제(inactivation)함으로써 나타나는 효과를 분석하여 역으로 그 기능을 추정하는 연구 방법으로, siRNA (small interfering RNA)를 이용하여 서열 특이적으로 mRNA의 분해를 유도함으로써 단백질 합성을 차단하고 그 결과 유전자의 발현을 간접 작용하는 최신 기법이다³⁰⁾. 본 실험에서는 김 등³⁾의 방법과 동일하게 APin 유전자의 발현을 억제할 수 있는 U6-APin siRNA construct와 APin 유전자를 과발현(over-expression)시킬 수 있는 CMV-APin construct를 제작 후 범람모세포주에 transfection하였다.

최근에 새롭게 알려진 APin 단백질의 기능분석을 위해 본 연구에서는 범람모세포주²⁵⁾에 APin의 과발현과 발현억제를 시킨 다음에 protein microarray를 시행하여 APin과 결합한 4개의 단백질들이 실제로 APin과 상호작용하는지를 유전자 발현을 통해서 비교, 분석하였다.

II. 재료 및 방법

1. APin 재조합 단백질(*recombinant Protein*)의 합성

APin 재조합 단백질의 합성은 김²⁾이 시행한 과정과 동일한 방법으로 합성하였다. 과정을 요약하면 다음과 같다.

사용된 균주 및 배양은 *E. coli* BL21(DE3)와 pLysS(pRSET-APin)을 사용하여, 주배양은 1 L LB 배지에 100 ml 배양액을 접종하여 OD 600이 0.4~0.6 사이 도달 시 최종농도가 1 mM이 되도록 isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside(IPTG)를 첨가하여 3~6시간 배양하였다. Cell lysate 준비는 발현이 유도된 균체를 원심분리한 후, lysis buffer(50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 8.0)의 초기 배양액 부피 대비 25~50배로 농축, 현탁 후, 최종 농도가 1 mg/ml이 되도록 lysozyme을 처리한 후 원심분리하여 상층액을 회수하였다.

Fast protein liquid chromatography(FPLC)를 이용한 정제과정은 Ni-NTA column에 10 ml의 샘플을 주입하고, binding buffer로 0.5 ml/min, 3 CV동안 His-Tag 단백질을 resin에 결합시켰다. Washing buffer로 0.5 ml/min, 3 CV동안 흘러 non-specific binding protein을 씻어냈다. Washing buffer와 elution buffer로 gradient를 주어 imidazole 농도를 서서히 증가시키면서 His-Tag 단백질을 분리해 내었다. 회수된 정제 단백질의 분리는 50 mM NaH₂PO₄(pH 8.0) buffer를 이용하여 4°C에서 24시간 dialysis 하였다. Dialysis 후, 정제 단백질 확인하여 많은 양을 차지하는 작은 size의 band는 size cut-off filtration을 통해 추가제거를 하였다.

2. Protein Microarray

ProtoArrayTM (Invitrogen Life technologies, California, USA) kit를 사용하여

protein microarray를 시행하였다.

1) Blocking

정제된 단백질($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) $120 \mu\text{l}$ 를 vortexing 없이 잘 섞어준 후 protein microarray 포함한 mailer를 4°C 에 15분간 유지하였다. Chamber 안에 microarray를 위로 향하게 장착 후 25 ml blocking buffer를 벽면을 따라 넣어 cold room에서 1시간 배양하였다. Mailer 제거 후 wipe 위에서 array의 끝을 서서히 쳐서 완충액만 건조하였다.

2) Probing과 washing

Protein($50 \mu\text{g}/\text{ml}$) $120 \mu\text{l}$ 를 array membrane에 전체적으로 골고루 뿌린 후 hybrislip cover slip를 array membrane area를 덮었다. 50 ml 튜브에 array가 위를 향하도록 하고 넣어 뚜껑을 닫고 tapping 한 후 어떠한 충격 없이 4°C 에 1시간 30분간 두었다. 50 ml 튜브에서 array를 꺼내 얼음위에서 배양된 chamber안에 사선 방향으로 넣은 후 25 ml probing buffer를 넣어 array를 서서히 흔들어 hybrislip 제거한 후 chamber rail에 array를 장착한다. 25 ml probing buffer를 chamber 벽면에 넣어 얼음위에서 1분간 배양한 후 천천히 3회 따라내기를 하였다.

3) Antibody 처리

Probing buffer와 Anti-His-Alexa Fluor 647 Antibody를 $0.3 \mu\text{g}$ 농도로 25 ml 를 chamber 벽면을 따라 넣어 암실 얼음위에서 30분간 배양하였다.

4) Washing과 drying

25 ml probing buffer를 chamber 벽면에 넣어 얼음위에서 1분간 배양한 후 천천히 3회 따라내기를 하였다. 멸균된 50 ml 튜브에 array를 두고 800 xg 로 원심분리시킨 다음 암실에서 1시간 동안 배양한 후 scan을 하였다.

3. APin의 과발현과 발현억제 *construct*의 제작 및 *transfection*

1) *Construct* 제작

APin 과발현 *construct*의 제작은 APin의 open reading frame(ORF)를 포함하는 cDNA를 진핵 세포 발현 vector인 pcDNA3의 EcoRI 절단 부위에 정상 단백 합성 방향으로 위치시킨 후 potent cytomegalovirus promoter (pCMV)를 부착시켜 *construct*를 제작하였다.

APin 발현억제 *construct*의 제작은 김 등²⁾의 방법으로 제작한 APin siRNA *construct*를 제작하여 실험에 이용하였다.

2) 법랑모세포주 배양 및 *transfection*

Dr. Sugiyama로부터 받은 법랑모세포주²⁵⁾를 5% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, USA)과 항생제 (Penicillin 100 U/ml, Streptomycin 100 μ g/ml, Gentamycin 50 μ g/ml 및 fungizone 2.5 μ g/ml)가 함유된 Modified Eagles Medium (MEM, Gibco BRL, Rockville, USA)에 epidermal growth factor(EGF, Sigma-Aldrich, St, Louis, Mo, USA)를 첨가하여 type 1 collagen이 처리된 배양 접시에서 하루 동안 배양하였다.

다음날 세포가 배양접시의 70~80%의 면적까지 증식한 것을 확인한 후 Lipofectamine reagent(Gibco BRL, Rockville, USA)와 plus reagent에 각각 CMV-APin 플라스미드와 U6-APin siRNA 플라스미드를 혼합한 다음 OPTI-MEM(Gibco BRL, Rockville, USA)을 넣고 배양기에서 37°C, 5% CO₂의 조건으로 5~7시간 배양하였다. 배양 후 5% FBS와 ascorbic acid 그리고 β -glycerophosphate가 포함된 MEM 배양액을 첨가 한 다음 배양기에서 하루 더 배양한 후 RNA를 추출하였다.

4. RT-PCR

RT premix kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하고 APin, MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB, EF-hand calcium binding protein과 비교로 glyceradehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)의 특이적 primer를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다(Table 1). PCR은 95°C에서 30초, 55°C에서 30초, 72°C에서 30초의 조건으로 33사이클을 시행하였다. PCR 생성물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하여 유전자 발현을 확인하였다.

Table 1. Nucleotide sequences of the primers used for RT-PCR

<i>Proteins</i>		<i>Primer sequence(5'-3')</i>	<i>size(bp)</i>
APin	S	ccagcaggctagtcctatgtcctatgtgg	608
	AS	cgcgctcgacatgagatcagtg	
MEF2	S	aatgtcactgcctggcaaca	378
	AS	tcatcccgggtctcccgtctcata	
Aurora kinase A	S	gttgaagattgcagacttcgggtg	427
	AS	ccgtgggttcaggattccctaagat	
BMPR-IB	S	ggggttggtgtcactggtaggatta	476
	AS	acctgacagatcagatgcttctc	
EF-hand calcium binding protein	S	gaaggagacagccaatcagatcca	499
	AS	cgtagatgacgaaggtaggcat	
GAPDH	S	accacagtccatgccatcac	452
	AS	tccaccacctgttgetgt	

Ⅲ. 결 과

1. *APin* 재조합 단백질의 합성

정제된 *APin* 단백질은 약 1 mg/ml의 농도로 얻어졌고, SDS-PAGE 분석과 6X-His tag antibody를 사용하여 western을 시행하여 확인되었다.

2. *Protein Microarray*

본 연구에서는 글라스위에 nitrocellulose가 coating되어있는 NC slide칩을 사용하였다. 칩상의 모든 단백질은 gateway system으로 full length clone을 만들고 insect cell을 이용하여 발현을 시켰다. 생산되는 모든 단백질은 glutathione s-transferase(GST) tag을 가지고 있기 때문에 GST column을 이용하여 분리하여 pin spot 방식으로 spotting하였다.

APin 단백질을 probe로 이용하여 protoarray 실험을 한 결과이다(Fig. 1). *APin* 과 결합하는 단백질 중에서 Z-score 값이 3이상이 되는 74개의 단백질을 친화성이 강한 순서로 나열하였다(Fig. 2). 그 중에서 *APin*의 기능과 관련이 있을 것으로 생각되는 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein을 분석하였다(Table 2).



Fig. 1. Detection of the APin protein using Protein microarray.

Database ID	Ultimate ORF ID	Array ID	Block	Row	Column	Signal Used	CV	Z-Score
hfl_001633a	hfl000015	B46R10C03	46	10	03	1206	0.06567	18.05225
hfl_154272b	hfl026513	B36R06C03	36	06	03	1020	0.02634	15.07769
hfl_012988c	hfl12372	B20R11C07	20	11	07	975.5	0.07466	15.16603
hfl_012989d	hfl113412	B03R14C05	03	14	05	902	0.01411	13.99660
hfl_009257e	hfl112312	B24R10C05	24	10	05	827.5	0.05042	12.79918
hfl_009275f	hfl110720	B09R10C19	09	10	19	801	0.05650	12.37539
hfl_000444g	hfl110012	B10R10C13	10	10	13	793.5	0.01337	12.25545
hfl_001170h	hfl02009	B28R06C09	28	06	09	773	0.13172	11.92760
CTL2108		B36R13C05	36	13	05	698.5	0.05163	10.73618
hfl_000518i	hfl00922	B42R14C09	42	14	09	650.5	0.00537	10.09649
CTL2121		B36R13C11	36	13	11	625.5	0.07122	9.56675
hfl_010047j	hfl00042	B20R09C07	20	09	07	625	0.11007	9.56075
hfl_010079k	hfl10240	B36R02C17	36	02	17	538.5	0.16151	8.17742
hfl_000450l	hfl020209	B11R06C15	11	06	15	522.5	0.13939	7.92155
hfl_000501m	hfl00432	B18R06C03	18	06	03	486	0.06402	7.33793
hfl_000465n	hfl113274	B29R10C17	29	10	17	478.5	0.01626	7.21789
hfl_000529o	hfl02090	B42R06C11	42	06	11	458	0.05558	6.89005
hfl_000677p	hfl020188	B24R07C19	24	07	19	448	0.04104	6.73012
hfl_000520q	hfl014104	B23R04C03	23	04	03	432	0.01637	6.47425
hfl_001602r	hfl020009	B17R10C17	17	10	17	423	0.03009	6.30332
hfl_000295s	hfl020060	B34R07C07	34	07	07	414	0.17763	6.18639
hfl_000975t		B28R13C01	28	13	01	412	0.05492	6.19440
hfl_000300u		B12R13C13	12	13	13	402.5	0.03689	6.00248
hfl_000199v	hfl00967	B09R03C17	09	03	17	402	0.13368	5.99448
hfl_000308w		B02R13C15	02	13	15	400	0.03889	5.96250
hfl_000604x	hfl110204	B47R12C11	47	12	11	390.5	0.13943	5.81057
hfl_000845y	hfl013526	B47R03C13	47	03	13	386.5	0.03476	5.74660
hfl_000207z	hfl020058	B48R14C07	48	14	07	374.5	0.01699	5.55469
hfl_000128aa	hfl011159	B48R05C01	48	05	01	364.5	0.09506	5.39477
hfl_010275ab	hfl11920	B36R09C15	36	09	15	358.5	0.09270	5.29882
hfl_000502ac	hfl012818	B45R03C17	45	03	17	356	0.09137	5.25884
hfl_000410ad		B18R13C01	18	13	01	354.5	0.07380	5.23485
hfl_144570ae	hfl112012	B39R03C19	39	03	19	352.5	0.17853	5.20286
hfl_000470af	hfl020179	B47R12C05	47	12	05	337	0.42804	4.95498
hfl_000565ag	hfl110114	B33R04C09	33	04	09	333.5	0.01908	4.89901
hfl_000897ah	hfl020603	B26R10C13	26	10	13	318.5	0.02886	4.65913
hfl_000270ai	hfl000000	B22R12C03	22	12	03	318	0.07560	4.65113
hfl_010440aj		B41R05C13	41	05	13	312	0.03626	4.55518
hfl_000170ak	hfl010109	B09R11C03	09	11	03	311.5	0.03405	4.54716
hfl_000052al	hfl020231	B37R04C15	37	04	15	290.5	0.00730	4.21134
hfl_000525am	hfl110019	B20R09C15	20	09	15	290.5	0.02678	4.21134
hfl_000030an	hfl003463	B03R12C01	03	12	01	289.5	0.01710	4.19635
hfl_000240ao	hfl011701	B42R10C15	42	10	15	282	0.13039	4.07541
hfl_000005ap	hfl000607	B02R11C11	02	11	11	280	0.04041	4.04343
hfl_010252aq	hfl000038	B24R14C11	24	14	11	276	0.00512	3.97946
hfl_000484ar		B12R13C05	12	13	05	273	0.06216	3.93148
hfl_010293as	hfl00000	B15R06C15	15	06	15	269	0.02103	3.86751
hfl_000407at	hfl113202	B08R04C01	08	04	01	268.5	0.01843	3.85951
hfl_000209au	hfl110002	B20R10C19	20	10	19	264.5	0.02406	3.79555
hfl_000244av	hfl110709	B07R03C09	07	03	09	255	0.08319	3.64362
hfl_000295aw		B20R13C09	20	13	09	253.5	0.01953	3.61963
hfl_010002ax	hfl020007	B16R10C11	16	10	11	253	0.02795	3.61163
hfl_010007ay	hfl000708	B09R08C19	09	08	19	252.5	0.04761	3.60364
hfl_001200az		B25R05C13	25	05	13	251	0.12959	3.57965
hfl_000929ba	hfl010084	B14R10C19	14	10	19	246.5	0.06024	3.50769
hfl_000002bb	hfl020753	B09R06C13	09	06	13	244	0.06376	3.46770
hfl_000200bc	hfl000010	B21R11C09	21	11	09	241.5	0.03806	3.42772
hfl_000003bd	hfl110001	B08R12C01	08	12	01	241	0.07629	3.41973
hfl_130009be	hfl000032	B47R12C03	47	12	03	240.5	0.01470	3.41173
hfl_000240bf		B26R13C13	26	13	13	238	0.27334	3.37175
hfl_010250bg	hfl01000	B20R07C09	20	07	09	237	0.05370	3.35676
hfl_010001bh	hfl110252	B40R09C17	40	09	17	236.5	0.14052	3.34776
hfl_000005bi	hfl020700	B35R14C03	35	14	03	231	0.33672	3.25981
hfl_000000bj	hfl00013	B29R12C17	29	12	17	231	0.04898	3.25981
hfl_000100bk	hfl110000	B26R03C11	26	03	11	230	0.06149	3.24301
hfl_000400bl	hfl110002	B13R05C13	13	05	13	229.5	0.12016	3.23682
hfl_000070bm	hfl020007	B08R11C03	08	11	03	225	0.11314	3.16385
hfl_000407bn		B34R13C13	34	13	13	223.5	0.18034	3.13986
hfl_000100bo	hfl000629	B47R11C09	47	11	09	221.5	0.09258	3.10788
hfl_100000bp	hfl020002	B43R11C15	43	11	15	220.5	0.02245	3.09189
hfl_000200bq	hfl020002	B20R03C11	20	03	11	219.5	0.07409	3.07889
hfl_000100br	hfl110000	B14R10C07	14	10	07	218.5	0.02265	3.05990
CTL2116		B42R13C11	42	13	11	216.5	0.02286	3.02792
hfl_000100bs	hfl020002	B37R11C13	37	11	13	216	0.16368	3.01992

Fig. 2. Relative affinity ranking with the APin protein.

Table 2. Four high expression proteins are related to the functional characteristics, such as tumorigenesis, organ development and mineralization

<i>Order</i>	<i>Z-Score</i>	<i>Proteins</i>	<i>Function</i>
14	7.92155	MEF2	- coregulator for myogenic cell proliferation - tumor proliferation and tumorigenesis.
29	5.39477	Aurora kinase A	- overexpression and amplification of human tumor
51	3.57965	BMPR-IB	- organ development
13	8.17742	EF-hand calcium binding protein	- regulate cellular activity and mineralization

3. APin의 과발현과 발현억제

pCMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 APin의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, U6-APin siRNA construct를 transfection하여 APin 발현을 억제시킨 경우에는 APin는 관찰 되지 않았다(Fig. 3).

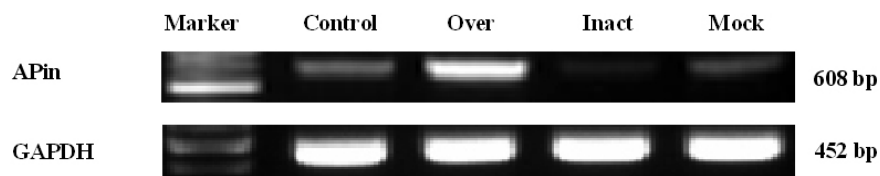


Fig. 3. RT-PCR amplification of the APin in ameloblast cell line after over-expression with CMV-APin plasmid and inactivation with U6-APin siRNA.

4. APin의 과발현과 발현억제에 따른 상호작용하는 유전자의 변화

상호작용하는 단백질 중에서 종양생성과 증식에 관계가 있는 MEF2와 Aurora kinase A는 CMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 MEF2와 Aurora kinase A 둘 모두에서 발현이 현저히 감소하였다. U6-APin siRNA construct를 transfection하여 APin의 발현억제를 유도한 경우에는 둘 모두 변화가 없었다.

여러 기관의 발생과 관련이 있는 BMPR-IB와 석회화 과정에 연관된 EF-hand calcium binding protein은 APin의 과발현을 유도한 경우에는 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein 모두에서 발현이 많이 증가되었으나, APin을 발현억제 시킨 경우에는 BMPR-IB는 변화가 없었고, EF-hand calcium binding protein은 현저히 감소하여 관찰이 어려웠다(Fig. 4와 5).

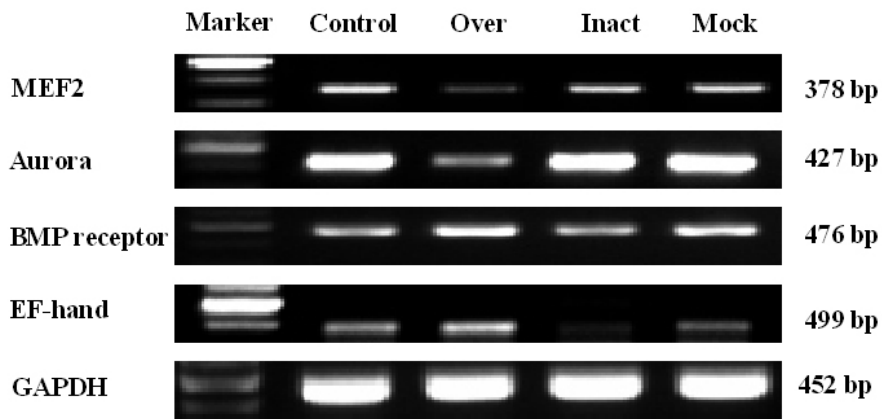


Fig. 4. RT-PCR amplification of MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB and EF-hand calcium binding protein ameloblast cell line after over-expression with CMV-APin protein plasmid and inactivation with U6-APin protein siRNA.

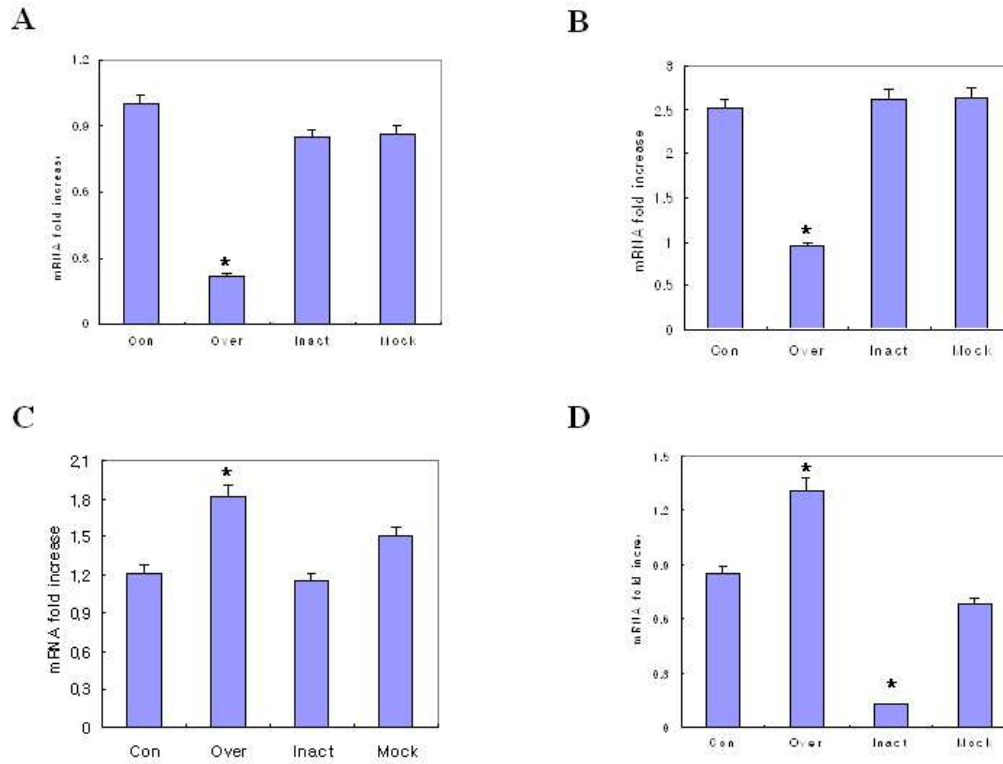


Fig. 5. The amplification for the APin reactions in control, over-expression, inactivation and mock groups. The relative amounts of MEF2 (A), Aurora kinase A (B), BMP R-IB (C) and EF-hand calcium binding (D) mRNA, after normalization with the amounts of the GAPDH mRNA. The results were represented as means \pm SD of three independent transfections. Control, normal ALC; Over, APin over-expression; inact, APin inactivation; Mock, ALC expressing empty vector.

IV. 고찰

치아의 발생은 상피기원의 법랑모세포와 중간엽기원의 상아모세포에 의해서 상호 조절된다²⁰⁾. 최근 들어 치아형성에 관여하는 이들 세포들의 분화유도인자와 독특한 세포-특이적 유전자들에 대한 관심이 높아지고 있으나, 법랑모세포의 분화과정이나 법랑질의 형성과정의 분자생물학적 기전에 대하여 명확히 밝혀져 있지 않다^{7,19,32)}.

상피기원인 법랑모세포는 법랑질형성 각 시기의 주요활성이 반영된 표현형의 변화를 점진적으로 보이는 독특한 생활주기를 갖는다. 법랑질 형성은 기능적으로 분비전기(presecretory stage), 분비기(secretory stage), 성숙기(maturation stage)의 세 시기로 일반적으로 구별된다^{14,24)}. 분비전기에는 내치아상피가 법랑모세포로 분화하여 단백질 합성기구를 발달시켜 유기바탕질 분비를 준비한다. 분비기 법랑모세포는 Tome's 돌기를 특징으로 하며 왕성한 합성 및 분비활동을 반영한다. 성숙기의 법랑모세포에는 주름세포끝(ruffle ended)과 평탄세포끝(smooth ended)이 주기적으로 교대로 나타나면서 무기질 침착에 필요한 이온을 조성하고 운반한다^{22,26,27,28,31)}.

최근에 박 등⁴⁾은 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314가 치아 발생과정에서 상아모세포 뿐 아니라 법랑모세포에도 발현된다고 하여 OD314의 법랑질형성에서의 역할을 시사하였다. Solomon 등²⁹⁾에 의해 OD314가 APin 단백질의 염기서열과 거의 유사함이 밝혀졌으며, Moffatt 등²¹⁾은 APin이 성숙기 법랑모세포에서 뿐 아니라 치아기에서도 발현된다고 하였다.

본 연구에 사용한 법랑모세포 세포주는 Nakata 등²⁵⁾이 C57BL/6J mouse의 하악 대구치에서 얻은 세포주로, 분화를 유도를 위한 일정한 조건에서 이 세포를 배양하면 세포들이 법랑모세포의 특성을 보이는 것을 RT-PCR 분석을 통하여 확인한 세포주이다. 본 실험에서 법랑모세포 세포주에 U6-APin siRNA construct와 CMV-APin construct를 이용하여 APin의 과발현과 발현억제를 유도하였다. APin

의 과발현을 유도하였을 때 APin의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, APin의 발현을 억제 시킨 경우에는 APin mRNA의 발현이 관찰되지 않았다. 이는 범람모세포 세포주에 대하여 APin의 과발현과 발현 억제가 정상적으로 이루어졌음을 나타낸다.

이 실험에서는 지금까지 보고된^{4,6,21,29)} APin 단백질의 상호작용을 연구하고자 protein microarray를 시행하였다. 단백질은 그 특성상 또다른 단백질과 상호작용을 통해 그 기능을 수행하는데 단백질칩은 단백질 상호작용을 분석하는데 가장 적합한 방법 중의 하나이다. 단백질칩은 수천개의 단백질을 작은 칩상에 고정해 동시다발적으로 단백질의 결합을 분석하는 자동화 기기시스템으로 센서칩과 단백질결합 분석장치로 구성되어 있다. 센서칩은 수백개의 단백질이 작은 표면에 일정한 배열로 결합된 것으로 대부분 슬라이드글라스 크기의 유리나 플라스틱이 이용된다. 본 연구에서는 글라스위에 nitrocellulose가 coating되어있는 NC slide칩을 사용하였다. 칩상의 모든 단백질은 gateway system으로 full length clone을 만들고 insect cell을 이용하여 발현을 시켰다. 생산되는 모든 단백질은 GST tag를 가지고 있기 때문에 GST column을 이용하여 분리하여 pin spot 방식으로 spotting하였다.

본 실험에서 APin 단백질을 probe로 이용하여 protoarray 실험을 한 결과, APin과 결합을 하는 단백질 중에서 Z-score 값이 3이상이 되는 74개의 단백질 중에서 친화성이 강하면서 그들의 역할에 관심이 있는 4개의 단백질들(MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein)을 분석하였다.

MEF2는 근육-특이 유전자(muscle-specific genes)의 발현을 조절하는 MADS-box transcription factor를 포함한다¹⁵⁾. MEF2는 생쥐 배아의 carcinoma P19 세포의 분화 과정 중에 발현이 증가¹⁵⁾되고, 발육중인 근육세포에서도 그 발현이 증가³³⁾하기 때문에 근육세포의 증식과 종양의 증식의 조절자로 작용하는 것으로 여겨진다.

Aurora kinase는 세포분열의 핵심조절인자로 확인된 serine/threonine kinase을 나타내며 Aurora-A, Aurora-B와 Aurora-C kinase의 3종류로 분류된다¹⁶⁾. 인간의 다양한 암세포에서 그의 발현이 증가되어 암세포와 관련된 많은 세포의 표현형에

관여한다¹⁶⁾. Carvajal 등⁹⁾과 Brown 등⁸⁾은 transfection 실험에서 Aurora kinase의 과발현이 악성(malignancy)과 관련이 있기 때문에 이들 kinase의 억제를 통한 암 치료에 적용을 암시하였다.

본 실험에서는 종양세포의 증식과 관련이 있는 MEF2와 Aurora kinase A는 CMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 둘 모두에서 발현이 현저히 감소하였다. U6-APin siRNA construct를 transfection하여 APin의 발현억제를 유도한 경우에는 둘 모두 변화가 없었다. APin 과발현이 MEF2와 Aurora kinase A의 발현을 억제하는 것으로 보아 APin은 범랑모세포의 증식과정에서 MEF2와 Aurora kinase A의 역할을 대신하는 것으로 생각된다.

BMP는 치아발생이나 모낭(hair follicle)의 발생과 같은 상피-간엽상호작용에 의한 발생과정에서 세포의 분화와 증식을 조절한다⁵⁾. 발생동안에 BMP들은 세포사멸, 증식과 분화를 유도하는데 이들의 각각 다른 효과는 두 종류의 BMP receptors에 의해 조절된다. BMPR-IB와 -II는 상아모세포에서 확인이 됨에 반하여 BMPR-IA와 -II는 범랑모세포에서 확인되었다²³⁾.

EF-hand calcium binding protein parvalbumin은 지금까지 근육과 신경세포에서 광범위하게 연구되어 왔으나 최근에 immunogold cytochemistry법에 의해 세포내 발현을 확인함으로써 치아발생 과정동안의 광화(mineralization)에 그의 역할이 제기되었다¹⁰⁾. 분화중인 범랑모세포에서 parvalbumin은 Tome's 돌기의 형성초기에는 세포의 근위부에 발현되다가 돌기 형성이 완료되면 세포 전체에 고루 퍼진다¹⁰⁾. 주름끝과 평탄끝 범랑모세포에서 parvalbumin의 발현은 다양하게 나타나며, 분화중인 상아모세포에는 범랑모세포에서보다 더 약하게 발현된다. 또한 범랑질의 광화에 있어 중요한 역할을 하는 tuftelin은 EF-hand calcium-binding domain을 갖는다¹¹⁾.

치아발생과 같은 기관의 발생과 석회화(mineralization)와 관련이 있는 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein은 APin의 과발현을 유도한 경우에는 모두에서 발현이 많이 증가되었으나, APin을 발현억제 시킨 경우에는

BMPR-IB는 변화가 없었고, EF-hand calcium binding protein은 현저히 감소하였다. 본 연구에서 APin 과발현시 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein의 발현이 많이 증가한다는 것은 APin은 BMPR-IB와 EF-hand calcium-binding protein의 역할을 촉진시켜 치아형성 말기에 법랑질과 상아질의 광화에 관여한다는 것을 암시한다.

본 연구 결과로 보아 APin 단백질은 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB, EF-hand calcium binding protein과 상호작용하여 법랑모세포의 분화와 석회화 과정 중에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, 이들 상호간의 신호전달 경로 등에 대한 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결 론

단백질칩을 이용한 protein microarray는 단백질의 상호작용 연구에 중요하게 사용되는 핵심기술이다. 상아모세포-특이 인자로 보고된 OD314가 최근에 APin 단백질의 염기서열과 거의 유사함이 밝혀졌으며, 법랑모세포에도 발현되어 APin의 법랑질 형성에서의 역할을 시사하였다. 이 연구에서는 protein microarray를 이용하여 법랑모세포 분화과정 중에 APin의 역할을 탐색하고자 하였다.

APin protein microarray를 시행하여 그의 기능에 관심이 있는 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein을 분석하였다. 법랑모세포주에 APin 과발현과 발현억제를 유도하기 위해서 U6-APin siRNA construct와 CMV-APin construct로 transfection하였다. Transfection 후에 protein microarray에 의해서 선택된 4개의 유전자 발현을 RT-PCR로 평가하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. CMV-APin construct를 transfection하여 APin의 과발현을 유도한 경우에는 APin의 발현이 뚜렷이 증대되었으나, U6-APin siRNA construct를 transfection하여 APin을 발현을 억제시킨 경우에는 APin는 관찰 되지 않았다.

2. APin의 과발현을 유도한 경우에는 MEF2와 Aurora kinase A 둘 모두에서 발현이 현저히 감소한 반면에, APin의 발현억제를 유도한 경우에는 둘 모두 변화가 없었다.

3. APin의 과발현을 유도한 경우에는 BMPR-IB와 EF-hand calcium binding protein 모두에서 발현이 크게 증가한 반면, APin을 발현억제 시킨 경우에는 BMPR-IB는 변화가 없었고, EF-hand calcium binding protein은 현저히 감소하였다.

위의 결과들로 보아 APin 단백질은 MEF2, Aurora kinase A, BMPR-IB, EF-hand calcium binding protein의 상호작용하여 법랑모세포의 분화와 석회화 과정 중에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. 김두현, 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철. 상아모세포 관련 유전자, OD314의 발현과 기능 연구. 대한치과보존학회지 29:399-408, 2004.
2. 김지용. APin 재조합단백질의 합성과 적용. 조선대학교 대학원 석사학위논문, 2006.
3. 김홍중, 정문진, 손호현, 박주철. RNA interference를 이용한 OD314 유전자의 발현억제가 상아모세포 전구세포에 미치는 영향. 대한체질인류학회지 17: 121-129, 2004.
4. 박주철, 김익환, 김홍중, 정문진, 오현주, 정제오, 손호현. 흰쥐 상아질모세포 분화과정에서 OD314의 역할. 대한체질인류학회지 18:187-196, 2005.
5. Andl T, Ahn K, Kairo A, Chu EY, Wine-Lee L, Reddy ST, Croft NJ, Cebra-Thomas JA, Metzger D, Chambon P, Lyons KM, Mishina Y, Seykora JT, Crenshaw EB 3rd, Millar SE. Epithelial Bmpr1a regulates differentiation and proliferation in postnatal hair follicles and is essential for tooth development. *Development* 131:2257-2268, 2004.
6. Aung PP, Oue N, Mitani Y, Bosserhoff AK, Yasui W. Systematic search for gastric cancer-specific genes based on SAGE data: melanoma inhibitory activity and matrix metalloproteinase-10 are novel prognostic factors in patients with gastric cancer. *Oncogene* 25:2546-2557, 2006.

7. Bei M, Stowell S, Maas R. Msx2 controls ameloblast terminal differentiation. *Dev Dyn* 231:758-765, 2004.
8. Brown JR, Koretke KK, Birkeland ML, Sanseau P, Patrick DR. Evolutionary relationships of Aurora kinases: implications for model organism studies and the development of anti-cancer drugs. *BMC Evol Biol* 4:39-45, 2004.
9. Carvajal RD, Tse A, Schwartz GK. Aurora kinases: new targets for cancer therapy. *Clin Cancer Res* 12:6869-6875, 2006.
10. Davideau JL, Celio MR, Hotton D, Berdal A. Developmental pattern and subcellular localization of parvalbumin in the rat tooth germ. *Arch Oral Biol* 38:707-715, 1993.
11. Deutsch D, Dafni L, Palmon A, Hekmati M, Young MF, Fisher LW. Tuftelin: enamel mineralization and amelogenesis imperfecta. *Ciba Found Symp.* 205:135-147, 1997.
12. Dey R, Son HH, Cho MI. Isolation and partial sequencing of potentially odontoblast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization. *Arch Oral Biol* 46:249-260, 2001.
13. D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M. Gene expression patterns of murine dentin matrix protein 1 (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner R* 12:2040-2049, 1997.

14. Garant PR. Oral cells and tissues. 2nd ed., Quintessence publishing Co., Inc., Chicago, IL, p25-52, 2003.
15. Hidaka K, Morisaki T, Byun SH, Hashido K, Toyama K, Mukai T. The MEF2B homologue differentially expressed in mouse embryonal carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 213:555-560, 1995.
16. Katayama H, Brinkley WR, Sen S. The Aurora kinases: role in cell transformation and tumorigenesis. *Cancer Metastasis Rev* 22:451-464, 2003.
17. Kawahashi Y, Doi N, Takashima H, Tsuda C, Oishi Y, Oyama R, Yonezawa M, Miyamoto-Sato E, Yanagawa H. In vitro protein microarrays for detecting protein-protein interactions: application of a new method for fluorescence labeling of proteins. *Proteomics* 3:1236-1243, 2003.
18. Letarte M, Voulgaraki D, Hatherley D, Foster-Cuevas M, Saunders NJ, Barclay AN. Analysis of leukocyte membrane protein interactions using protein microarrays. *BMC Biochem.* 6:1-12, 2005.
19. Millar SE, Koyama E, Reddy ST, Andl T, Gaddapara T, Piddington R, Gibson CW. Over- and ectopic expression of Wnt3 causes progressive loss of ameloblasts in postnatal mouse incisor teeth. *Connect Tissue Res* 44:124-129, 2003.
20. Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non-dental

mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. Arch oral Biol 32:123-127, 1987.

21. Moffatt P, Smith CE, Sooknanan R, St-Arnaud R, Nanci A. Identification of secreted and membrane proteins in the rat incisor enamel organ using a signal-trap screening approach. Eur J Oral Sci 114(Suppl):139-146, 2006.

22. Moffatt P, Smith CE, St-Arnaud R, St-Arnaud R, Nanci A. Cloning of rat amelotin and localization of the protein to the basal lamina of maturation stage ameloblasts and junctional epithelium. Biochem J 399:37-46, 2006.

23. Nadiri A, Kuchler-Bopp S, Perrin-Schmitt F, Lesot H. Expression patterns of BMPRs in the developing mouse molar. Cell Tissue Res 324:33-40, 2006.

24. Nancy A. Ten Cate's oral histology: development, structure, and function. 6th ed., Mosby, Inc., St. Louis, MI, p192-239, 2003.

25. Nakata A, Kameda T, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, Sugiyama T. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. Biochem Biophys Res Commun 308:834-839, 2003.

26. Reith EJ, Boyde A. Autoradiographic evidence of cyclical entry of calcium into maturing enamel of the rat incisor tooth. Arch Oral Biol. 26:983-987, 1981.

27. Salama AH, Zaki AE, Eisenmann DR. Cytochemical localization of Ca²⁺-Mg²⁺ adenosine triphosphatase in rat incisor ameloblasts during enamel

secretion and maturation. *J Histochem Cytochem* 35:471-482, 1987.

28. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:128-161, 1998.

29. Solomon A, Murphy CL, Weaver K, Sletten K, Westermark G, Westermark P. Calcifying epithelial odontogenic (Pindborg) tumor-associated amyloid consists of a novel human protein. *J Lab Clin Med* 142:348-355, 2003.

30. Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y. A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:5515-5520, 2002.

31. Takano Y, Crenshaw MA, Reith EJ. Correlation of ⁴⁵Ca incorporation with maturation ameloblast morphology in the rat incisor. *Calcif Tissue Int* 34:211-213, 1982.

32. Wang XP, Suomalainen M, Jorgez CJ, Matzuk MM, Werner S, Thesleff I. Follistatin regulates enamel patterning in mouse incisors by asymmetrically inhibiting BMP signaling and ameloblast differentiation. *Dev Cell* 7:719-730, 2004.

33. Yu YT, Breitbart RE, Smoot LB, Lee Y, Mahdavi V, Nadal-Ginard B. Human myocyte-specific enhancer factor 2 comprises a group of tissue-restricted MADS box transcription factors. *Genes Dev* 6:1783-1798, 1992.

저작물 이용 허락서

학 과	치의공학과	학 번	20057595	과 정	박사
성 명	한글 : 박 선 화 영문: Park, Sun-Hwa				
주 소	광주광역시 동구 산수2동 두암타운 108-803				
연락처	E-MAIL:				
논문제목	한글: Protein microarray를 이용한 APin 단백질의 상호작용 영문: APin protein interactions using protein microarray				

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(O) 반대()

2006년 12월 일

저작자: 박 선 화 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하