

파골세포 분화에 관여하는
G 단백질의 활성화

연세대학교 대학원
치 의 학 과
김 종 태

파골세포 분화에 관여하는
G 단백질의 활성화

지도 최 병 재 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2005년 6월 일

연세대학교 대학원

치 의 학 과

김 중 태

김종태의 박사 학위 논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2005년 6월 일

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 항상 격려와 세심한 관심을 베풀어 주신 최 병재 지도 교수님과 바쁘신 와중에도 많은 조언과 격려를 해 주신 손 홍규 교수님, 이 승일 교수님, 신 동민 교수님, 이 제호 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

아울러 본 논문과 실험과정에 많은 도움을 주신 구강생물학 교실 김민석 선생님께 감사드리며 항상 친절하게 웃는 낯으로 맞이해 준 구강생물학 교실원들과 소아치과학 교실원께도 감사드립니다. 논문 완성 동안 많은 이해와 시간을 양해 준 병원을 같이하는 친구들에게도 고마운 마음을 전합니다.

오늘의 제가 있기까지 항상 저를 믿고 사랑으로 키워주셨던 돌아가신 어머니께 감사드리며 영광을 돌립니다. 항상 헌신적이며 든든한 후원자이신 아버님과 많은 위로를 해 준 큰 누나, 작은 누나, 형 식구들에게 감사를 드리며 또한, 언제나 저를 믿고 격려해주신 장인, 장모님께도 감사드립니다.

항상 저에게 큰 힘이 되어 주는 사랑하는 아내 원은경과 사랑하는 딸 은수, 아들 윤수와 이 결실의 기쁨을 나누고 싶습니다.

2005년 6월

김 종 태

차 례

그림차례 ·	i
국문요약	
I. 서 론	1
II. 실험재료 및 방법	5
1. 실험재료	
2. 실험방법	
가. 세포배양	
나. 세포내 칼슘 농도 측정	6
다. 파골세포로의 분화유도 및 TRAP 염색	
라. 면역반응염색	
마. 면역형광염색	7
바. 통계학적 분석	8
III. 결 과	9
1. G 단백질 활성이 파골 세포 전구체의 세포내 칼슘 농도에 미치는 영향	
2. G 단백질 활성이 NFATc1의 활성도와 발현에 미치는 영향	
3. G 단백질 활성으로 인한 파골세포로의 분화	
4. G 단백질 활성으로 인한 MAPK 신호전달계의 활성화	2
IV. 고 찰	4
V. 결 론	
참고문헌	
영문요약	3

그림 차례

Fig 1. RANKL-induced Ca^{2+} oscillations in a time course in RAW264.7 cells.

Fig 2. Analysis of RANKL-induced Ca^{2+} oscillations frequency.

Fig 3. Generation of AlF_4^- -induced Ca^{2+} oscillations in RAW264.7 cells.

Fig 4. Analysis of AlF_4^- -induced Ca^{2+} oscillations frequency.

Fig 5. Expression and localization of NFATc1 by RANKL stimulation.

Fig 6. NFATc1 expression by RANKL stimulation.

Fig 7. Expression and localization of NFATc1 by AlF_4^- stimulation without RANKL.

Fig 8. Differentiation into osteoclast-like cells by RANKL stimulation in a time-dependent manner. 0

Fig 9. Differentiation into osteoclast-like cells by AlF_4^- stimulation.

Fig 10. Effects of AlF_4^- on MAPK pathways in RAW264.7 cells.

국 문 요 약

과골세포 분화에 관여하는 G 단백질의 활성화

분화된 과골세포는 뼈에서 칼슘을 재 흡수하여 혈장내의 칼슘농도를 유지시켜 뼈를 재구성 하게 된다. RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand), tumor necrosis factor α 등의 싸이토카인은 전구세포로부터 과골세포 분화를 유도한다. RANKL 신호는 전구세포내 TRAF6를 시작으로 NF κ B, c-fos, JNK, 그리고 ERK와 같은 다양한 신호전달기전을 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 최근 전구세포내에서 RANKL로 분화과정을 유발 시 세포내 칼슘 농도의 주기적 변화가 관찰되었으며, 칼슘 신호가 NFATc1 (nuclear factor of activated T cell)의 활성을 조절함으로써 최종적인 분화 단계에 관여함이 밝혀졌다. 칼슘신호전달은 세포의 증식, 분화, 유전자 전사, 신경전달물질의 분비, 기억과 학습, 그리고 근수축 등과 같은 다양한 생명현상에 관여하며, 과골세포 분화과정에서도 칼슘신호 역시 중요한 역할을 수행하고 있다. 그런데 과골세포 분화과정에서 칼슘 신호는 phospholipase C γ 의 활성화와 연계되어 있는 것으로 알려져 있는 반면, G-단백 연계 칼슘신호와의 상관성은 알려져 있지 않다. 이에 본 연구에서는 G-단백을 활성화시켰을 때 과골세포로의 분화를 유도할 수 있는지와 이에 따른 세포내 신호전달 기전을 알아보고자 하였다.

과골세포 전구세포주인 RAW264.7 세포에서 칼슘 dye인 fura2의 형광정도를 세포내 칼슘농도로 간주하여 측정하였으며, G-단백을 활성화하기 위하여 aluminium fluoride (AlF_4^-)를 사용하였다. NFATc1의 발현과 활성도를 NFATc1 항체를 이용하여 면역반응법과 면역형광염색법으로 확인하였고, RANKL에 의한 세포내 신호전달 매개체인 ERK와 JNK의 활성도를 시간대에 따라 확인하였다.

과골세포 전구체에 RANKL 자극 없이 AlF_4^- (100nM AlCl_3 , 5mM NaF)의 처리만으로 RANKL에 의한 분화과정에서 발견할 수 있는 칼슘 oscillations가 생성됨을 확인하였다. 또한 이렇게 칼슘 신호의 변화가 일어난 전구 세포들에서 tartrate

resistant acidic phosphatase 염색에 대해 양성 반응을 확인함으로써, 파골세포로의 분화가 이루어짐을 알 수 있었다. 또한 최종 분화단계에 관여하는 NFATc1의 발현 증가와 핵내의 이동을 확인하였다. 아울러 G 단백 신호 활성화와 칼슘신호 전달 외에 ERK와 JNK 신호 전달 체계를 활성화 할 수 있음을 확인하였다.

이상의 결과는 기존에 알려진 RANKL 신호전달 경로 외에 G 단백 신호전달 경로가 파골세포 분화과정에 관여하고 있을 가능성을 보여주고 있다고 판단된다.

핵심 되는 말 : 파골세포, RANKL, G alpha subunit, aluminum fluoride, Ca^{2+} oscillations, NFATc1

파골세포 분화에 관여하는 G 단백질의 활성화

<지도교수 최 병 재>

연세대학교 대학원 치의학과

김 종 태

I. 서 론

골조직은 골격을 구성하는 결체조직으로 교원섬유, proteoglycan과 같은 세포간 기질, 조골세포 (osteoblast), 파골세포 (osteoclast), 그리고 골세포 (osteocyte)로 구성되어있다. 골은 매우 활동적인 조직으로 이러한 세포들의 활성화에 의해 끊임없이 골개조가 일어난다. 골개조는 파골세포에 의한 골흡수와 조골세포에 의한 골형성의 균형이 유지되는 역동적 과정으로, 골개조에 의해 골은 지속적으로 새로워진다 (Manolagas, 2000). 실제 이 과정의 균형에 문제가 발생하면, 관절염, 치주염 등의 질환을 일으키고, 골다공증 및 골경화증과 같이 골 구조에도 영향을 미치게 된다 (Helfrich, 2003). 한편, 치아 맹출 과정에서는 치조골을 통한 맹출 경로 형성에 파골세포가 필요한데 파골세포의 형성과 기능이 감소된 다양한 형태의 골경화증의 경우 치아 맹출도 방해를 받는다.

파골세포는 단핵/대식세포계열의 조혈전구세포에서 기원하는 다핵의 거대세포로 골을 흡수하여 혈장 내 칼슘농도를 높이며, 조골세포는 간엽기원 (mesenchymal stem cell)의 골형성 세포로서 이후 자신의 분비물질에 매몰되어 점차적으로 골세포로 된다. 또한, 단핵/대식세포와 혈관내피세포 들도 조골세포와 직접 작용하거나, 사이토카인이나 성장인자와 같은 수용성 인자의 분비로 뼈의 재형성에 기여한다 (Teitelbaum 등, 1997).

일반적으로 세포는 세포 간 연락 (communication)을 통해 성장, 분화하는데 세포 외부의 신호는 신호전달체계라는 여러 과정을 통해 특이적인 세포 반응을 일으킨다. 조골세포를 포함한 간엽세포와의 세포 간 신호전달 (cell-cell signaling)은 파골전구세포로부터 다핵성 파골세포로의 분화를 일으킨다 (Khosla, 2001, Kobayashi 등, 2001). 파골세포 분화에 필수적인 신호전달 물질은 조골세포로부터 분비되는 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)과 M-CSF (macrophage colony stimulating factor)이다. M-CSF는 조골세포에 의해 분비되며 파골전구세포 및 파골세포의 생존 신호를 제공하고, RANKL은 골, 골수, 임파조직 등에 많이 발현되는 TNF 계열의 일종으로 파골세포 분화과정에서 파골전구세포의 RANK 수용체와 결합함으로써 분화를 지시하는 신호를 전달하게 된다 (Takayanagi 등, 2005). 파골전구세포에서 RANKL 신호는 전구세포내 TRAF6를 기점으로 NF- κ B, c-fos, JNK, ERK, 그리고 PI3K와 같은 다양한 신호전달기전을 활성화시키는 것으로 알려져 있다 (Boyle 등, 2003, Ha 등, 2003).

현재 전 세계적으로 파골세포의 분화와 관련되어 연구되어지고 있는 경향은 RANKL이 파골세포와 결합하여 TRAF6, JNK, 그리고 NF- κ B 까지 이어지는 신호전달 기전에 대한 연구에 집중되고 있다. 이는 RANKL이 전구세포와 결합된 후 주로 24시간 안에 이루어지는 기전이다. 그러나 여러 전사인자가 핵 내로 들어가 다양한 유전자 발현을 조절한 이후 즉, 분화 중기 (24시간) 이후에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 다만, 최근 분화 중기 이후 세포내 칼슘 농도의 주기적 변화 (칼슘 oscillation), 즉 칼슘신호가 관찰되었으며, 칼슘신호가 calcineurin (Ca^{2+} /calmodulin 의존성 탈인산화 효소)과 이하 신호전달계인 NFATc1 (nuclear factor of activated T cell)의 활성을 조절함으로써 최종적인 분화 단계에 관여함이 밝혀졌다 (Takayanagi 등, 2002, 2005, Koga 등, 2004). 그런데 파골세포 분화과정에서 NFATc1의 발현과 활성은 칼슘신호 전달 뿐만 아니라 TRAF6와 c-Fos 경로의 영향을 또한 받는다 (Takayanagi 등, 2005). 분화과정 중 NFATc1 유전자는 자가 증폭 과정을 통해 NFATc1 자체의 전사를 증가시키며, 이외 AP-1과 함께 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase), 칼시토닌 수용체, 그리고 cathepsin K 등의 파골세포 특이 유전자의 발현을 유도 한다 (Boyle 등, 2003). 현

재 칼슘신호는 파골세포 분화과정의 필수적인 신호전달체계로 인식되고 있는데, 특히 세포내 칼슘 치환제로 파골세포 전구체를 처리하면 분화과정이 억제됐다는 결과는 칼슘신호가 파골세포 분화과정에서 매우 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다 (Takayanagi 등, 2002).

NFAT 상위신호체계의 신호 전달 물질인 세포내 자유칼슘이온은 주로 호르몬이나 신경 전달 물질에 의해 증가되는데, 증가된 세포내 칼슘이온은 유전자 발현, 성장과 분화, 외분비액의 분비, 근육수축, 신경물질의 전달, 기억과 학습 등의 다양한 생체 내 반응을 조절한다 (Berridge 등, 2003). 세포내 칼슘이온 농도는 기저상태에서 세포외부에 비해 1/10,000정도의 낮은 수준으로 유지되다가 외부 신호가 전달되면 세포내 농도가 증가한 후 calmoduline 등 칼슘 결합 단백질과 결합하여 단백질인산화 효소와 단백질 탈인산화 효소의 활성도를 조절한다. 특히 파골세포 분화 과정에서 칼슘신호는 calcineurine과 NFATc1의 활성화에 중요한 역할을 한다 (Takayanagi 등, 2002, 2005, Koga 등, 2004). 이 때 칼슘신호는 칼슘 oscillation이라는 독특한 형태로 나타나는데, 이는 세포내 칼슘 농도의 증가와 감소가 반복되는 현상이다. 일반적으로 비흉분성세포에서 세포내 칼슘 농도의 증가는 세포내 칼슘의 저장소인 소포체 (endoplasmic reticulum, ER)에서의 칼슘 유리와 세포외부로부터 칼슘유입에 의하며, 세포내 칼슘의 감소는 칼슘완충 단백질과 소포체막 칼슘펌프 (sarco/endoplasmic Ca^{2+} ATPase, SERCA), 세포막 칼슘펌프 (plasma membrane Ca^{2+} ATPase, PMCA) 같은 칼슘 펌프에 의한다 (Kiselyov 등, 2003, Shin 등, 2003). 따라서 파골세포 분화과정에서 관찰된 칼슘 oscillation은 칼슘신호 단백질의 상호작용에 의해 나타난 결과이다.

그런데 대부분 세포에서의 칼슘 oscillation은 G-단백 연계 수용체 (G-protein coupled receptor, GPCR)의 활성화와 밀접한 관련을 맺고 있다 (Kiselyov 등, 2003). GPCR에 호르몬이나 신경전달물질과 같은 외부 신호가 결합하게 되면 유리·활성화형태 Gq subunit는 phospholipase C β (PLC β)를 자극하여 세포막에 존재하는 phosphatidyl-inositol-triphosphate (PIP2)를 가수분해하여 1, 4, 5-triinositol phosphate (IP $_3$)를 세포질내로 유리시킨다. 증가된 IP $_3$ 는 세포내 칼슘저장고로 알려진 소포체의 IP $_3$ 수용체 (IP $_3$ R)의 칼슘투과도를 변화시켜 세포질로의 칼슘유리

를 촉진시킨다. 더불어 ER로부터의 칼슘 유리는 세포막에 존재하는 Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channel의 전도도를 변화시켜 세포외부의 고농도의 칼슘을 세포내로 유입시키도록 한다 (Kiselyov 등, 2003). 이와 같이 세포내 증가된 칼슘이온은 칼슘펌프에 제거된다. 이러한 기전에 의해 세포내 칼슘 농도의 증가와 감소가 반복되면 칼슘 oscillation이 나타나는데, 이는 세포의 증식 및 분화, 분비 물질분비, 세포사멸, 신경전달 등 세포의 거의 모든 분야에서 중요한 신호전달 수단으로 여겨지고 있다.

파골세포 전구세포막에는 퓨린성 수용체, 칼시토닌 수용체, 당단백호르몬 수용체, 등의 여러 종류의 GPCRs이 존재하고 있다 (Gorn 등, 1995, Purdue 등, 2002, Marians 등, 2002). 그러나 아직까지 GPCRs의 활성화가 파골세포로의 분화를 유도할 수 있는 지에 대해서는 알려져 있지 않다. 다만 파골세포 분화과정에서 세포내 칼슘농도를 증가시킬 수 있는 phospholipase C γ 의 활성화가 RANKL과 연계되어 있는 것만이 알려져 있을 뿐이다 (Koga 등, 2004). 이에 본 연구에서는 AlF_4^- 로 G-단백을 활성화시켰을 때 파골세포로의 분화를 유도할 수 있는지와 이에 따른 칼슘신호를 포함한 세포내 신호전달 체계와 NFATc1의 활성화 및 발현, 파골세포로의 최종 분화 정도를 알아보려고 하였다.

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험 재료

RAW264.7 세포 (mouse, monocyte cell-line)는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Receptor Activator of NF- κ B Ligand (RANKL)은 KOMA Biotech. Inc. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 세포 배양에 필요한 DMEM 배지 및 FBS는 GIBCO/BRL (Grand Island, NY)에서 구입하였다. Tartrate-Resistant Acid Phosphatase (TRAP) staining kit와 aluminium fluoride (AlF_4^-)는 Sigma Chemical Co., Ltd (St. Louis, MO)에서 구입하였다. Anti-ERK, anti-phospho-ERK, anti-JNK, anti-phospho-JNK는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, anti-NFATc1, anti-NF κ B는 Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA)에서 구입하였다. Fura-2/AM과 Pluonic F-127은 Molecular probe (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다.

2. 실험 방법

가. 세포 배양

RAW264.7 세포는 5% CO₂와 95% air가 지속적으로 제공되어지는 37°C incubator에서 10% FBS와 1% antibiotics를 포함하고 있는 DMEM 배지로 배양하였다. 유지되는 세포의 배지는 3일에 한 번씩 교체하였으며, 세포 계대 배양 시에는 EDTA-Trypsin (0.25%)을 사용하였다.

나. 세포 내 칼슘 농도의 측정

실험 3일 전 35 mm 배양 접시에 유리로 된 cover-slip (22 x 22)을 올려 놓은 뒤, 배양 접시 당 5×10^4 개의 세포를 분주 하였다. 다음 날 RANKL 및 AlF_4^- 와 같은 약물을 처리 한 뒤, 그로부터 24, 48, 72, 144시간 이후에 배지 제거 후 PSS (physiological salt solution, 140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl_2 , 1mM CaCl_2 , 10mM HEPES, 10mM glucose, pH7.4, 310mOsm)에 Fura-2/AM을 5mM의 농도로 실온에서 40분간 세포 내에 축적하였다. 340nm와 380nm의 두 파장으로 세포 내 Fura-2/AM을 활성화 시켰으며, 510nm의 파장으로 칼슘을 측정하였다. 두 파장으로부터 활성화 된 값은 각 각의 파장값에서 다음과 같은 계산을 거친 이 후 적용되었다.

$$\text{(Ratio} = F_{340}/F_{380})$$

세포로부터 나오는 형광은 현미경에 부착되어져 있는 CCD (Photon Technology International Inc, Lawrenceville, NJ)카메라로 측정하였으며 2초 당 한 장씩 30 분간 측정되었다 (Shin 등 , 2003).

다. 파골세포로의 분화 유도 및 TRAP 염색

RAW264.7 세포를 48 well plate에 well당 1×10^4 의 수로 분주 한 뒤 하루가 지난 이후 RANKL과 aluminium fluoride를 처리 하였다. 이후의 세포 배양은 위 실험 방법에 표기 된 것과 동일한 방법으로 실행되었다. 24시간, 48시간, 72시간, 6일이 지난 뒤, 파골세포로의 분화를 확인하기 위하여 TRAP 염색을 실시하였다. TRAP (파골세포의 표지 단백질) 염색은 Leukocyte Acid Phosphate Assay Kit (Sigma Chemical Co., Ltd St. Louis, MO)에서 구입하여 사용하였다.

라. 면역반응염색

RAW264.7 세포를 60mm 둥근 배양접시에 분주 한 뒤 다음날 RANKL (50ng

/ml)을 처리하고 원하는 시간동안 배양하였다. Lysis buffer (20 mM Tris, pH7.4, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 8.0, 0.1% Triton-X100, 0.01 mg/ml aprotinin, 0.005 mg/ml leupeptin, 0.4 mM PMSF, and 4 mM NaVO₄)를 이용하여 RAW264.7 세포로부터 전체 단백질을 원심분리를 통해 추출하였다. Well 당 50 - 100mg의 동량 단백질을 전기영동법을 사용하여 8% SDS-page gel에서 크기별로 분리 하였다. 그렇게 분리 된 단백질들을 nitrocellulose membrane에 전기적으로 이동시킨 다음 6% skim milk를 사용하여 blocking과정을 거친 후, NFATc1 (1:1000), total-ERK (1:1000), phospho-ERK (1:1000), total-JNK (1:1000), phospho-JNK (1:1000), 그리고 NF-kb p65 (1:1000)의 항체를 이용하여 blotting하였으며, 이후 HRP-conjugated 이차 항체를 실온에서 한 시간 동안 반응시킨 뒤, chemiluminescence (ECL, Amersham Pharmacia Biotech)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다 (Shin 등, 2003).

마. 면역형광 염색

RAW264.7 세포를 poly-L-lysine 코팅 되어있는 얇은 유리판 (22 x 22)위에 분주 한 뒤 다음날 RANKL (50ng /ml)과 aluminium fluoride를 처리하고 원하는 시간동안 배양하였다. 4% PFA (paraformaldehyde)를 20분간 처리하여 세포를 고정시킨 이후 0.2% Triton X-100을 5분간 처리하였다. 이후 5% goat serum이 들어있는 blocking solution (0.1% gelatin, 1% BSA, 0.01% Na azide)을 30분간 처리하고 mouse anti-NFATc1을 세포에 처리하여 세포 내부의 NFATc1을 표지 하였다. 이어서 Alexa 488-labeled anti-mouse IgG antibody (Molecular Probe), 이차 항체를 붙여 그 형광을 관측함으로써 세포 내 NFATc1의 localization을 확인하였다 (Shin 등, 2003).

바. 통계학적 분석

Student T-test를 실시하여 통계학적으로 분석하였으며, $P < 0.05$ 일 때 유의성있는 차이로 간주 하였다.

III. 결 과

1. G-단백 활성이 파골 세포 전구체의 세포내 칼슘 농도에 미치는 영향

파골전구 세포에서 RANKL은 분화를 결정짓는 가장 중요한 인자이다 (Katagiri 등, 2002). RANKL은 일련의 신호 전달과정을 통하여 PLC- γ 를 활성화 시키고, 이에 따라 세포 질 내 칼슘 농도를 변화 시키며 calcineurine을 활성화시키고, 그리고 결과적으로 NFATc1이라는 전사 인자를 활성화시켜 파골세포 분화의 후기 과정을 결정짓는 것으로 알려져 있다 (Takayanagi 등, 2002, 2005, Koga 등, 2004). 이 과정에서 칼슘 반응은 RANKL 처리 시 전구세포 내부에서 oscillation의 형태로써 나타나는데, oscillation 빈도의 정도에 따라 세포질 내 칼슘 의존적인 단백질들의 활성-불활성의 정도가 결정지어지게 된다. 본 실험에서 AlF_4^- 처리 시 세포 내 칼슘 반응을 비교하기 위하여 RANKL 유도성 칼슘 oscillation을 먼저 알아보고자 하였다 (Fig. 1, 2). RAW264.7 세포에 RANKL을 50ng/ml의 농도로 처리한 뒤 24시간, 48시간, 72시간, 6일에서 나타나는 칼슘 반응을 측정하였는데, 세포 내 칼슘 농도의 변화는 파골전구세포에 축적된 Fura-2 형광 염료의 340nm와 380nm에서의 강도 비율로 표시하였다 (ratio, 340/380).

Fig 1. 대조군에서 전구 세포에 RANKL을 처리하지 않은 경우와 RANKL을 처리 한 뒤 짧은 시간동안은 세포 내 칼슘 농도의 변화가 관찰되지 않았다. RANKL 처리 후 24시간 이후부터 전구 세포 내부에서 칼슘 농도의 증가와 감소가 반복하는 칼슘 oscillation이 관측되었으며 RANKL 처리 후 72시간까지 관측되어졌다. 6 일째 실험 군에서는 세포 내 칼슘 oscillation은 관측되어지지 않았다. RANKL 처리 후 24시간부터 6일 사이의 세포 내 칼슘 oscillation 빈도는 Fig. 2에서와 같이 RANKL을 처리하지 않은 대조군에서 2 ± 1.09 회/30분 ($n \geq 10$), 24시간에서 14.1 ± 2.17 회/30분, 48시간에서 19.4 ± 1.74 회/30분 ($n \geq 10$), 72시간에서 11.2 ± 1.33 회

/30분 ($n \geq 10$), 그리고 6일째 1.1 ± 0.44 2 ± 1.09 회/30분 ($n=9$) 이었다. 이상의 결과에서 RANKL 처리 후 48시간이 지났을 때에 칼슘 oscillation이 가장 활발히 일어나는 것을 확인하였기 때문에 이후 RANKL 처리 실험부터는 대부분 48시간 때에 실행하였다.

다음은 RANKL과 같은 분화 유도 인자 없이 G-단백의 활성화만으로 세포 내 칼슘 농도가 변하는지, 또한 그 변화가 RANKL로부터 발생하는 칼슘 oscillation과 유사한지를 비교하였다. G-단백을 활성화하기 위해 AlF_4^- 로 RAW264.7 세포를 처리하였는데, AlF_4^- 는 세포 내로 들어가 불활성 상태의 GDP-Ga subunit에 결합하며 GDP-Ga subunit은 GTP와의 결합 없이도 활성화 되는 특성을 갖고 있다 (Sternweis와 Gilman, 1982, Wittinghofer, 1997). 전구 세포를 AlF_4^- 만으로 처리한 후 RANKL 유도성 칼슘 oscillation이 가장 활발한 48시간 때에 세포 내 칼슘 농도의 변화를 측정하였다. 전구 세포에 AlF_4^- 처리 즉시는 칼슘 oscillation이 관측되지 않았으며, Fig. 3에서와 같이 48시간대에 RANKL 유도성 칼슘 oscillation과 유사한 칼슘 oscillation이 발생하였다. 48시간대에 AlF_4^- 에 의한 칼슘 oscillation은 20.5 ± 2.17 회/30분 ($n=5$)으로서 Fig. 2의 RANKL에 의한 칼슘 oscillation의 실험결과와 통계학적으로 유의성이 없음을 확인하였다.

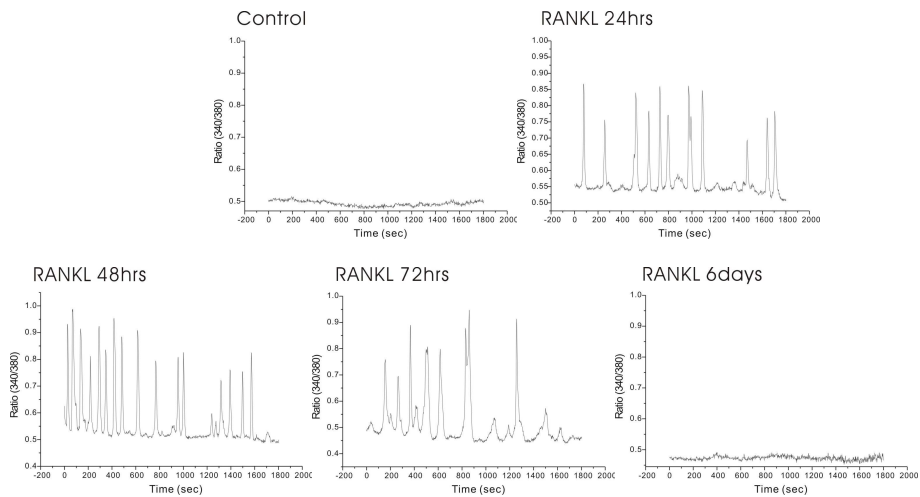


Fig 1. RANKL-induced Ca^{2+} oscillations in a time course in RAW264.7 cells

Fura 2 ratio (340/380) was measured as an intracellular Ca^{2+} concentration after 24hours RANKL stimulation (50ng/ml). RANKL-induced Ca^{2+} oscillations were observed in RAW264.7 cells from about 24hours to 72hours, and at 6 days, Ca^{2+} oscillations did not occurred. The tracing was the representative of 9 to 10 independent experiments.

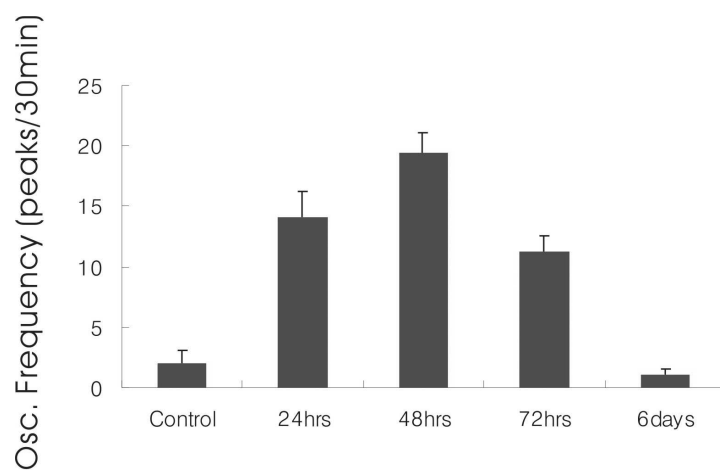


Fig 2. Analysis of RANKL-induced Ca^{2+} oscillations frequency

The frequency of RANKL-induced Ca^{2+} oscillations was analyzed in RAW264.7 cells. At 48hours, RANKL-induced Ca^{2+} oscillations showed a maximal frequency. Analysis was performed with 9 to 10 independent experiments.

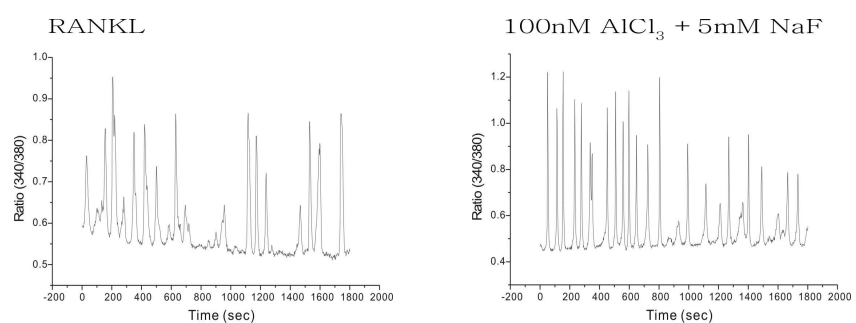


Fig 3. Generation of AlF_4^- -induced Ca^{2+} oscillations in RAW264.7 cells

After 48hours with RANKL and AlF_4^- stimulation (100nM AlCl_3 and 5mM NaF), Ca^{2+} oscillations were observed in RAW264.7 cells. The tracing was the representative of 5 independent experiments.

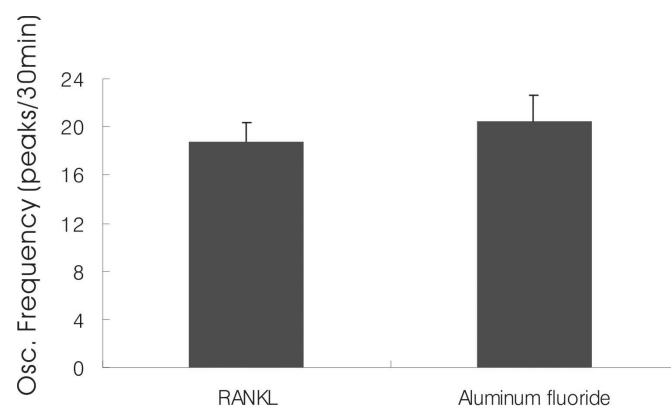


Fig 4. Analysis of AlF_4^- -induced Ca^{2+} oscillations frequency

At 48hours, the frequency of AlF_4^- -induced Ca^{2+} oscillations were analyzed compared to RANKL-induced Ca^{2+} oscillations in RAW264.7 cells. Analysis was performed with 5 independent experiments.

2. G 단백질 활성이 NFATc1의 활성도와 발현에 미치는 영향

NFATc1은 전사 인자로서 RANKL에 의한 분화 과정 중에서 분화 후기를 결정짓는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Takayanagi 등, 2002, 2005, Koga 등, 2004). 이 때 NFATc1이 활성화되어 핵내로 이동되며 자체의 전사 활동에 의해 NFATc1 단백질의 발현량이 증가된다 (Takayanagi 등, 2002). 따라서 Fig. 3에서 관찰된 G-단백 활성화에 의한 칼슘신호가 NFATc1의 핵내로의 이동과 발현 양을 변화시키는 지를 측정해 보는 것이 필요하다.

NFATc1의 활성도 및 세포 내 발현 양을 측정하기 위하여 면역반응법과 면역형광 염색법을 실시하였다. 먼저 NFATc1 항체를 이용하여 세포 내 NFATc1 단백질의 위치를 표지하여 세포질 내의 존재 양과 핵 내에 존재 양을 확인하였다. 핵의 위치는 DAPI 염색을 통하여 확인하였다. Fig. 5의 대조군에서 RANKL을 처리하지 않았을 경우나 처리 후 약 1시간이내에서는 파골전구 세포 질 내에 NFATc1 단백질의 양이 미미하였고 핵 내부에는 거의 없는 것을 알 수 있었다. 그러나 RANKL 처리 후 24시간 이후부터 핵을 포함하여 전체적으로 NFATc1의 발현이 증가하였으며, 이는 RANKL 처리 후 72시간까지 지속적으로 유지되었다 (Fig. 5, n=4). 이는 Fig. 6의 NFATc1의 면역반응법을 통해서도 알 수 있었는데 대조군에 비해 NFATc1의 발현양이 24시간부터 72시간까지 현저히 증가함을 알 수 있었다 (Fig. 6, n=3). AlF_4^- 처리 시 NFATc1 항체를 이용하여 세포 내 NFATc1 단백질을 표지한 결과, 처리 후 48시간 이후부터 NFATc1의 발현양이 증가하며, 핵 내부에서도 NFATc1의 존재가 확인되었다 (Fig. 7, n=4).

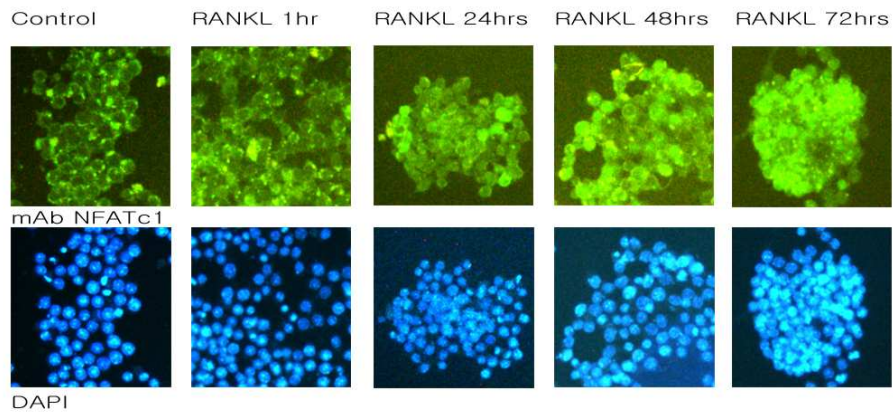


Fig 5. Expression and localization of NFATc1 by RANKL stimulation

Expression and localization of NFATc1 by RANKL stimulation in RAW264.7 cells were observed in a time-dependent manner. NFATc1 was labeled by mAb against NFATc1 following by FITC and nucleus was labelled by DAPI. The immuno-labelling was the representative of 4 independent experiments.

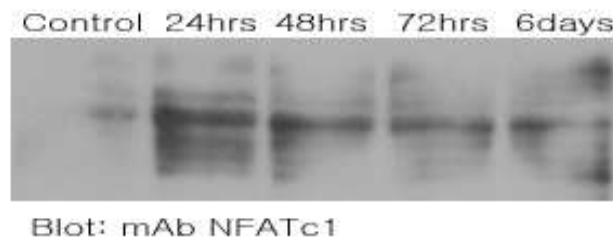


Fig 6. NFATc1 expression by RANKL stimulation

Expression level of NFATc1 was investigated by RANKL stimulation on RAW264.7 cells. Up-regulation of NFATc1 was observed after 24hours when Ca^{2+} oscillations occurred . The immuno-blotting was the representative of 3 independent experiments.

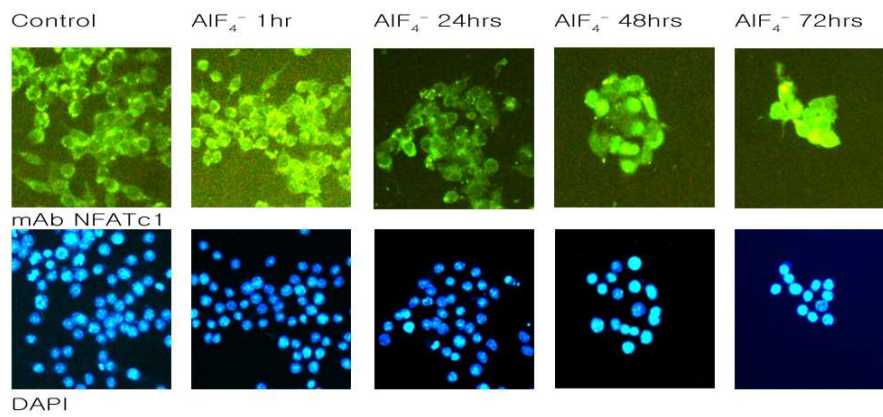


Fig 7. Expression and localization of NFATc1 by AIF₄⁻ stimulation without RANKL

Expression and localization of NFATc1 in RAW264.7 cells were observed by AIF₄⁻ stimulation without RANKL. After 24hours AIF₄⁻ stimulation, NFATc1 was mainly localized in nucleus. The immuno-labelling was the representative of 4 independent experiments.

3. G 단백질 활성화로 인한 파골세포로의 분화

전구세포에서 파골세포로 분화가 이루어질 때, cathepsin K, TRAP (tartrate resistant acidic phosphatase) 등과 같은 몇 종류의 단백질이 파골세포 내부에서 특이적으로 발현되어진다 (Byole 등, 2003). 그 중 TRAP 단백질은 파골세포로의 분화의 유무를 확인하는 기준으로 사용되는데, TRAP 단백질은 단일 파골세포 때부터 발현되어지며, 분화 말기에 다핵 파골세포에서도 발현되어진다. 이에 AlF_4^- 과 RANKL 처리 시 나타나는 TRAP 양성의 세포를 관찰하였다. RANKL 처리 후 24시간부터 TRAP 염색에 양성 반응을 보이는 단일 세포들이 관찰되었으며 6일이 경과하게 되면 Fig. 8에서처럼 양성 반응을 보이는 다핵세포들이 관찰되었다 (n=4). AlF_4^- 를 처리하고 48시간 때에 TRAP 염색을 실시한 결과 RANKL에서와 유사한 TRAP 양성의 단일 세포들이 관측되었다 (Fig. 9, n=4).

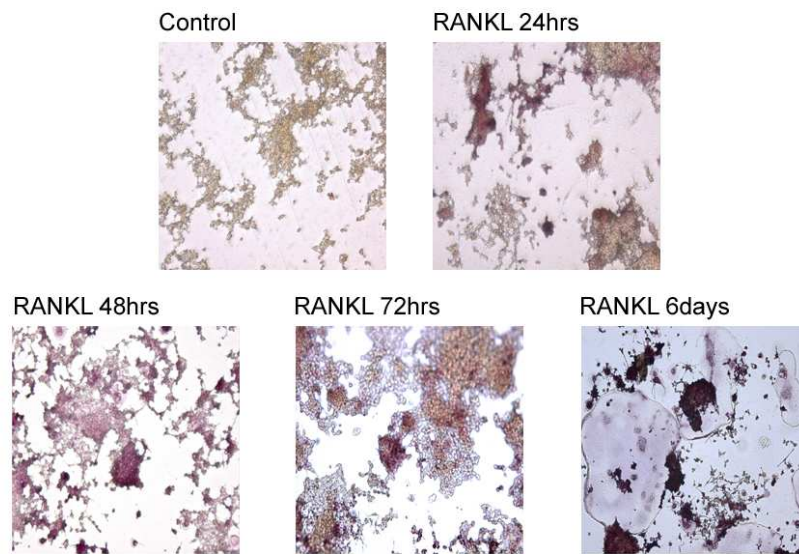


Fig 8. Differentiation into osteoclast-like cells by RANKL stimulation in a time-dependent manner

After 24hours RANKL stimulation, TRAP assay was performed. Note that TRAP positive single cells were observed until six days after RANKL treatment and at 6 days differentiated cells showed darker and formed larger multi-nucleated cells. The TRAP-positive cells were the representative of 4 independent experiments.

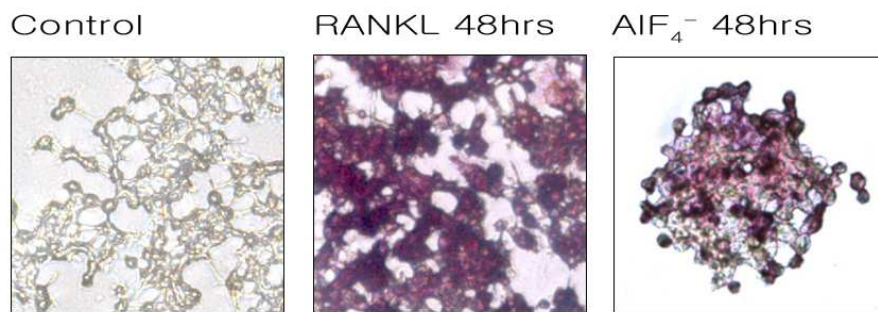


Fig 9. Differentiation into osteoclast-like cells by AlF_4^- stimulation

After 48hours AlF_4^- stimulation, TRAP positive cells which were almost same with RANKL stimulated cells were observed. The TRAP-positive cells were the representative of 4 independent experiments.

4. G 단백질 활성화로 인한 MAPK 신호전달계의 활성화

AlF_4^- 의 자극으로 인한 세포 내 칼슘 oscillation의 발생과 NFATc1의 활성화가 24시간 이후에 발생하였다는 Fig. 3-4와 Fig. 7의 결과는 칼슘신호 외의 다른 신호가 관여되어 있을 가능성이 있다. 따라서 기존에 알려진 RANKL 처리에 의해 활성화 되는 신호전달 중 MAPK의 신호전달 경로를 살펴보았다. ERK와 JNK는 MAPK 신호전달 경로 중 대표적 단백질로서 두 단백질은 인산화 됨으로 인해 활성을 갖는 특성이 있다 (Gohda 등, 2005). RANKL과 AlF_4^- 를 세포에 처리한 후, 시간 별로 세포 내 총 단백질을 추출, 분리한 후 total-ERK, phospho-ERK, total-JNK, 그리고 phospho-JNK 등의 각 항체를 반응 시켜 양적인 변화를 확인하였다. Fig. 10에서 RANKL 처리 시에는 phospho-ERK와 phospho-JNK가 처리 후 1시간대에서 가장 활성화가 많이 이루어진 반면, AlF_4^- 를 처리한 세포에서는 phospho-ERK의 경우 처리 후 2시간 이후부터 지속적으로 활성화가 이루어져 최종 분화단계인 6일 때까지 활성화 되었다. 또한 phospho-JNK는 RANKL 처리시 보다 조금 늦은 2시간대에서 큰 활성을 나타내었다.

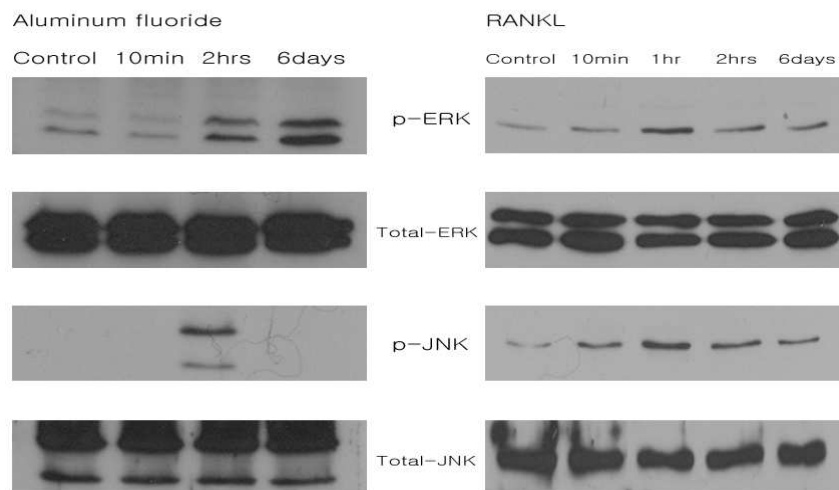


Fig 10. Effects of AlF_4^- on MAPK pathways in RAW264.7 cells

After treatment with RANKL and AlF_4^- on RAW264.7 cells, ERK and JNK were immunoblotted with specific Abs against ERK, p-ERK, JNK and p-JNK in a time-dependent manner.

IV. 고찰

파골세포는 전구 세포가 뼈 조직 근처로 이동함으로써 그 분화 과정이 시작된다. 뼈 조직에 존재하는 조골세포로부터 발현되어지는 RANKL은 파골세포 전구체 세포막에 존재하는 특이적 수용체인 RANK와 결합함으로써 파골세포로의 분화를 촉진하는 신호를 세포 내부로 전달하게 된다 (Takayanagi 등, 2002, 2005). 전구세포로 분화를 촉진하는 신호 물질은 RANKL, TNF α superfamily, 그리고 IL 등과 같은 사이토카인 등이다 (Takayanagi 등, 2002). 현재까지 전구 세포가 파골세포로 분화하는데 있어 사이토카인에 의한 세포내부로 전달되는 신호전달에 대해 연구가 집중되어 왔다. 그런데 최근 칼슘신호가 RANKL 신호전달에서만 유발되며, 이는 calcineurin과 NFATc1의 활성화에 필수적임이 입증되어 칼슘신호 전달의 중요성이 보고되었다 (Takayanagi 등, 2002, 2005, Koga 등, 2004). RANKL에 의한 칼슘신호는 칼슘 oscillation이라는 독특한 형태를 보이는데, 칼슘 oscillation은 주로 GPCR 의존성 칼슘신호단백들의 상호작용에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다 (Kiselyov 등, 2003). 그러나 파골전구세포에서 G 단백질의 활성화가 파골세포분화 신호 전달 체계에서 어떤 영향을 미치는 지에 대해서는 연구된 바 없다. 이에 본 연구에서는 파골세포의 전구세포 내에 존재하는 G 단백질 이하 신호전달 경로를 활성화시킴으로써 칼슘 oscillation과 NFATc1의 활성화, 그리고 파골세포로의 분화를 확인하고자 하였다.

RANKL은 전구세포의 세포막에 존재하는 RANK 수용체에 결합하여 분화관련 신호를 전달하고 24시간 이후부터 세포 내 칼슘 oscillation 반응을 일으켰다 (Fig. 1, 2). 칼슘 oscillation은 RANKL 자극 이후 24시간 이후부터 발생되어 72시간 까지 유지되는 것이 확인되었으며, 이는 파골세포로의 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 NFATc1의 발현 증가 시간과 거의 일치함을 알 수 있었다 (Fig. 5, 6). 칼슘 oscillation의 발생과 NFATc1의 활성화 증가에 대한 관계는 Takayanagi 등에 의해서 파골세포로의 분화과정에서 매우 중요한 역할을 한다고 보고되어진 바 있었는데, 본 실험결과에서도 기존의 보고 내용과 일치함을 확인할

수 있었다 (Fig. 8, Takayanagi 등, 2002).

AIF_4^- 는 세포 내부에서 Ga subunit에 결합하고 활성화 된 상태의 구조로 변환시키는 역할을 한다 (Sternweis와 Gilman, 1982). AIF_4^- 를 세포에 처리하게 되면, 세포 외부로부터의 GPCR의 활성화 없이도 G protein의 활성화에 의한 신호전달을 가능하게 할 수 있다. G protein의 활성화는 주로 세포 내부의 cAMP나 칼슘과 같은 이차 전령체의 증가를 유발하게 되고 하부 신호전달 체계를 활성화, 또는 억제하는 역할을 수행한다 (Wittinghofer, 1997). G 단백질 활성화제인 AIF_4^- 는 Fig. 3에서와 같이 RANKL 처리 후 48시간대에 나타난 칼슘 oscillation과 유사한 빈도로 관측되었다. 칼슘 반응의 한 표현인 oscillation은 칼슘의 농도가 높아질 때의 증가 크기도 중요한 의미를 가지며, 또한 칼슘이 증가하고 감소하는 횟수, 즉 빈도 역시 세포 내 신호 전달에 매우 중요한 역할을 하고 있다 (Kiselyov 등, 2003). RANKL 자극에 의해서 발생하는 칼슘 oscillation의 빈도와 AIF_4^- 에 의해서 발생하는 칼슘 oscillation의 빈도가 유사하다는 Fig. 4의 실험결과는 분화를 유도하는 세포 내 신호전달 중 NFATc1이 활성화될 가능성을 예측할 수 있다. 이에 AIF_4^- 를 전구세포에 처리하여 관측되어지는 칼슘 oscillation이 파골세포로의 분화에 필요한 신호를 전달한다는 것을 확인하기 위해서 세포 내 NFATc1의 활성을 알아보려고 하였다. NFATc1은 전사인자로서 결합되어있는 인산기가 calcineurin과 같은 탈인산화 효소에 의해서 제거됨으로써 핵 내부로 이동할 수 있게 되며, 핵 내부로 이동한 NFATc1은 자체적으로 NFATc1을 전사하게 되므로 세포 내 NFATc1의 위치를 확인하거나 세포 내 NFATc1의 발현 양을 측정함으로써 NFATc1의 활성을 간접적으로 측정해 볼 수 있다 (Takayanagi 등, 2002). AIF_4^- 를 전구세포에 처리하고 24, 48, 72, 96시간이 지난 뒤에 NFATc1의 항체를 이용하여 활성을 측정하여 본 결과, Fig. 7에서와 같이 칼슘 oscillation이 관측되었던 48시간 이후부터 NFATc1의 활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이것은 AIF_4^- 에 의해서 칼슘 oscillation이 발생되어지며 이로 인하여 분화과정에서 매우 중요한 역할을 담당하고 있는 NFATc1의 활성이 증가되어 지는 것으로 알 수 있었다.

위와 같은 실험 결과들은 파골세포의 전구체가 RANKL의 자극 없이 AIF_4^- 의 작용만으로 파골세포로 분화가 가능하다는 것을 짐작케 한다. Fig. 8에서 RANKL을

전구세포에 처리하게 되면 전구세포들은 분화되어가는 과정에서 TRAP이라는 단백질을 특이적으로 발현하며, 이와 같은 단백질의 발현을 표지 삼아 파골세포로의 분화를 결정짓는다 (Igarashi 등, 2002). 따라서 AIF_4^- 만을 처리한 세포를 배양한 뒤 TRAP 염색에 양성을 나타내는 파골세포로 분화가 되었는가를 확인하였다. Fig. 9에서 알 수 있듯이, AIF_4^- 를 처리한 샘플에서 칼슘 oscillation이 나타나는 48 시간대에 TRAP 염색에 양성의 반응을 나타내는 단일 세포들을 확인 할 수 있었다. 파골세포는 TRAP 염색에 양성의 반응을 나타내는 세포들이 fusion이 일어남으로 인해 거대 다핵 세포를 형성하게 되고 그 세포가 실질적인 칼슘의 재흡수 역할을 하게 된다. TRAP 염색에 양성을 보이는 단일 핵 세포를 확인함으로써 AIF_4^- 의 자극으로 인하여 어느 정도 파골세포로의 분화가 일어나고 있음을 확인할 수 있었다.

그런데 AIF_4^- 에 의한 G 단백 활성화와 이외 AIF_4^- 가 다른 신호전달기전에 작용하여 파골세포로의 분화와 연관되어 있을 가능성이 있을 수 있다. G 단백질에 AIF_4^- 가 결합하게 되면 G subunit 중 $\text{G}\beta\gamma$ 는 분해되어 독립적인 신호전달 경로를 활성화할 수 있는데, $\text{G}\beta\gamma$ 는 궁극적으로 MAPK 신호전달 경로를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다 (Gutkind, 1998). 또한 AIF_4^- 는 세포내에서 작은 G 단백질인 Ras GTP의 GTPase 활성을 감소시켜 Ras 단백질과 그 이하 신호전달 경로인 MAPK 신호전달 경로를 활성화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다 (Wittinghofer, 1997). 파골세포 분화과정에서 RANKL 신호전달 네트워크는 ERK, JNK 등의 MAPK 신호전달 경로의 활성화됨이 보고되었으며 (Ha 등, 2004), 이는 NFATc1의 활성화와 발현량 증가에 필수적인 것으로 여겨지고 있다. 따라서 AIF_4^- 에 의해 MAPK 신호전달 경로가 활성화되는 지를 확인하였다. Fig. 10에서 RANKL은 phospho-ERK와 phospho-JNK의 발현을 처리 후 약 1시간대에서 증가시켰는데, AIF_4^- 는 약 2시간대에서 증가시킴을 확인할 수 있었다. 그러나 RANKL은 6일째 phospho-ERK와 phospho-JNK의 발현량에 변화를 주지 못하였으나, AIF_4^- 는 phospho-ERK의 발현량을 증가하였다. 이는 AIF_4^- 에 의한 MAPK 신호전달 활성화가 RANKL에 의한 것과 정확히 일치하지는 않는 것을 의미한다. 그럼에도 불구하고 이와 같은 실험 결과는 발생 시간을 비교하여 볼 때, AIF_4^- 의 자극이 세포 내 칼슘의 증가를 직접

적으로 유도한다는 것 보다 MAPK와 같은 신호전달 경로를 활성화시킴으로 인하여 간접적인 세포 내 칼슘 증가를 일으키는 것으로 해석 되어질 수 있다.

AlF_4^- 는 알루미늄과 불소로 구성되어진다. AlF_4^- 는 다양한 세포에서 G 단백질 활성화를 통해 세포내 칼슘농도와 IP_3 농도를 증가시키는 것으로 보고되었으며, 이와 연관된 AlF_4^- 를 이용한 여러 실험결과들이 보고되어 왔다 (Blackmore 등, 1988, Zhou 등, 1990, Deckmyn 등, 1991, Moonga 등, 1993). 생태계는 물과 영양분, 음식물 등에 알루미늄을 함유하고 있으며, 불소는 불소화 음용수, 의약품, 치과용품, 그리고 비료 등을 통해 인체 내로 공급되어 질 수 있다 (Jones와 Bennett, 1985). 특히 불소는 충치예방을 위해 50년 이상 사용되어 왔다 (Harrersley, 1999). AlF_4^- 는 인간에서 골 관절염, 정신장애, 언어장애, 발작과 같은 증상을 초래할 수 있는 것으로 알려져 있다 (McLure, 1933, Altman 등, 1999, Harrersley 등, 1999, Spittle 등, 2000, Lu 등, 2000). 특히 불소는 갑상선호르몬 항진호르몬의 역할을 유사 수행할 수 있는데 G 단백을 활성화시켜 인체 내 악영향을 미칠 수 있으며 (Schlud, 2000), 만성적 AlF_4^- 에의 노출은 알츠하이머씨 병에도 영향을 주어 β -amyloid의 생성을 증가시키기도 한다 (Struneckaa, 1999). 이와 같이 AlF_4^- 는 동물과 사람세포에서 신호전달기전의 활성화를 통해 항상성, 대사, 성장, 분화 등의 변화를 초래할 수 있다. 본 연구에서도 AlF_4^- 는 G 단백질의 활성화를 통해 칼슘신호전달과 이외 MAPK 신호전달 경로를 활성화시켜 파골세포 분화에서 결정적 인자인 NFATc1의 활성도와 발현량을 증가시켰다. 이는 AlF_4^- 가 골 항상성에 변화를 초래할 수 있다는 분자적 수준의 확인으로써, 향후 AlF_4^- 에 의한 골조직의 변화, 특히 G 단백질 활성화에 의한 파골세포 분화과정은 지속적으로 연구되어야 할 것으로 판단된다.

V. 결 론

파골세포 전구세포주인 RAW264.7 세포에서 AlF_4^- 에 의해 G-단백을 활성화시켰을 때, 파골세포로의 분화를 유도할 수 있는지와 이에 따른 세포내 신호전달 기전을 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 파골세포 전구체에 RANKL 자극 없이 AlF_4^- (100nM AlCl_3 , 5mM NaF)의 처리만으로 RANKL에 의한 분화과정에서 발견할 수 있는 칼슘 oscillation이 생성됨을 확인하였다.
2. 칼슘 신호의 변화가 일어난 전구 세포들에서 tartrate resistant acidic phosphatase 염색에 대해 양성 반응을 확인함으로써, 파골세포로의 분화가 이루어짐을 알 수 있었다.
3. 최종 분화단계에 관여하는 NFATc1의 발현 증가와 핵 내의 이동을 확인하였다.
4. G 단백질 신호 활성화와 칼슘신호 전달 외에 ERK와 JNK 신호 전달 체계를 활성화 할 수 있음을 확인하였다.

이상의 결과는 기존에 알려진 RANKL 신호전달 경로 외에 G 단백질 신호전달 경로가 파골세포 분화과정에 관여하고 있을 가능성을 보여주고 있다고 판단된다.

참 고 문 헌

Altman P, Cunningham J, Marsh F, Dhanesha U, Ballard M, and Thompson J: Disturbance of cerebral function in people exposed to drinking water contaminated with aluminium sulphate: retrospective study of the Camelford water incident. *Br Med J* 319: 807-819, 1999

Blackmore PF, Lynch CJ, Uhing RJ, Fitzgerald T, Bocckinno SB, and Exton JH: Role of guanine nucleotide regulatory protein and inositol phosphates in the hormone induced mobilization of hepatocyte calcium. *Adv Exp Med Biol* 232: 169-182, 1988

Berridge MJ, Martin D, Bootman H, and Roderick L: Calcium Signaling: Dynamics, homeostasis and remodeling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 517-529, 2003

Boyle WJ, Simonet WS, and Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423: 337-42, 2003

Deckmyn H: Signal transduction in blood platelets. *Verh K Acad Geneest Kd Belg* 53: 589-604, 1991

Gohda J, Akiyama T, Koga T, Takayanagi H, Takana S, and Inoue J: RANK-mediated amplification of TRAF6 signaling leads to NFATc1 induction during osteoclastogenesis. *EMBO J* 24: 790-799, 2005

Gorn AH, Rudolph SM, Flannery MR, Morton CC, Weremowicz S, Wang TZ,

Krane SM, and Goldring SR: Expression of two human skeletal calcitonin receptor isoforms cloned from a giant cell tumor of bone. The first intracellular domain modulates ligand binding and signal transduction, *J Clin Invest* 95: 2680 - 91, 1995

Gutkind JS: The pathways connecting G protein-coupled receptors to the nucleus through divergent mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem*. 273: 1839-42, 1998

Ha H, Kwak HB, Lee SK, Na DS, Rudd CE, Lee ZH, and Kim HH: Membrane rafts play a crucial role in receptor activator of nuclear factor kappaB signaling and osteoclast function. *J Biol Chem* 278: 18573-80, 2003

Ha H, Kwak HB, Lee SW, Jin HM, Kim HM, Kim HH, and Lee ZH: Reactive oxygen species mediate RANK signaling in osteoclasts. *Exp Cell Res* 301: 119-27, 2004

Hattersley JG: Fluoridation defining moment. *J Orthomol Med* 14: 1-20, 1999

Helfrich MH: Osteoclast diseases. *Microsc Res Tech* 61: 514-32, 2003

Igarashi Y, Lee MY, and Matsuzaki S: Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 781: 345-58, 2002

Jones KC and Bennett BG: Exposure commitment assessments of environmental pollutants. *Monitoring and Assessment Res Centr* 4: 1-35, 1985

Karsenty G, and Wagner E.F: Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* 2: 389-406, 2002

Katagiri T, and Takahashi N: Regulatory mechanism of osteoblast and osteoclast differentiation. *Oral Diseases* 8: 147-159, 2002

Khosla S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* 142: 5050-5, 2001

Kiselyov K, Shin DM, and Muallem S: Signalling specificity in GPCR-dependent Ca²⁺ signaling. *Cellular Signaling* 15: 243-253, 2003

Kobayashi N, Kadono Y, Naito A, Matsumoto K, Yamamoto T, Tanaka S, and Inoue J: Segregation of TRAF6-mediated signaling pathways clarifies its role in osteoclastogenesis. *EMBO J.* 20: 1271-1280, 2001

Koga T, Inui M, Inoue K, Kim S, Suematsu A, Kobayashi E, Iwata T, Ohnishi H, Matozaki T, Kodama T, Taniguchi T, and Takayanagi H: Costimulatory signals mediated by the ITAM motif cooperate with RANKL for bone homeostasis. *Nature* 428: 758-63, 2004

Lu Y, Sun ZR, Wu LN, Wang X, Lu W, and Liu SS: Effect of high fluoride water on intelligence in children. *Fluoride* 33: 74-78, 2000

Manolagas SC: Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr. Rev.* 21: 115-137, 2000

Marians RC, Ng L, Blair HC, Unger P, Graves PN and Davies TF: Defining thyrotropin-dependent and -independent steps of thyroid hormone synthesis by using thyrotropin receptor-null mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 15776 - 81, 2002

Matsuo K, Owens JM, Tonko M, Elliott C, Chambers TJ, and Wagner EF: fos 1 is a transcriptional target of c-fos during osteoclast differentiation. *Nat. Genet.* 24: 184-187, 2000

Mclure FJ: A review of fluorine and its physiological effects. *Physiol Rev* 13: 277-300, 1933

Moonga BS, Pazianas M, Alam AS, Shankar VS, Huang CL, and Zaidi M: Stimulation of a Gs-like protein in the osteoclast inhibits bone resorption but enhances tartrate-resistant acid phosphatase secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 190: 496-501, 1993

Purdue BW, Tilakaratne N, and Sexton PM: Molecular pharmacology of the calcitonin receptor. *Receptors Channels* 8: 243 - 55, 2002

Schuld A: Symptoms hypo/F. *PFPC Bull* 18: 1-18, 2000

Shin DM, Dehoff M, Luo X, Kang SH, Tu J, Nayak SK, Ross EM, Worley P F, and Muallem S: Homer 2 tunes G protein-coupled receptors stimulus intensity by regulating RGS proteins and PLC β GAP activities. *J Cell Biol* 162: 293-303, 2003

Spittle B: Fluoride and intelligence. *Fluoride* 33: 49-52, 2000

Sternweis PC and Gilman AG: Aluminium: a requirement for activation of the regulatory component of adenylate cyclase by fluoride. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 4888-4891, 1982

Struneeckaa: Aluminium plus fluoride: a new deadly duo in Alzheimer's disease. *The News (A Hoechst Marion Roussel Report of International Medical Opinion)* 1: 10-11, 1999

Takayanagi H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, and Taniguchi T: Induction and Activation of the Transcription Factor NFATc1 (NFAT2) Integrate RANKL Signaling in Terminal Differentiation of Osteoclasts. *Developmental Cell* 3: 889-901, 2002

Takayanagi H: Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 83: 170-179, 2005

Teitelbaum SL, Tondravi MM, and Ross FP: Osteoclasts, macrophages and the molecular mechanism of bone resorption. *J Leuk Biol* 61: 381-8, 1997

Teitelbaum SL: Bone resorption by osteoclasts. *Science* 289: 1504-1508, 2000

Wittinghofer A: Signaling characteristics: aluminum fluoride for molecule of the year. *Curr Biol* 7: R682-R690, 1997

Zhou J, Sims C, Chang CH, Bertin L, Hopfer U, and Douglas J: Proximal tubular epithelial cells possess a novel 42-kDa guanine nucleotide-binding regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 7532-5,

1990

.

Abstract

Involvement of G protein Activation in Osteoclastogenesis

Jong Tae Kim, D.D.S., M.S.D.

*Department of Dental Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor **Byung Jai Choi**, D.D.S., Ph.D.)

To obtain consistency of Ca^{2+} level in blood plasma, differentiated osteoclast reabsorbs Ca^{2+} from bone and remodels bone structure. RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand), tumor necrosis factor α and other cytokines induce osteoclastogenesis from pre-osteoclast. RANKL signal is known as an activator of TRAF6 in preosteoclast, which leads to activate NF κ B, c-fos, JNK, ERK and other mechanism of signal transductions. In a recent study, intracellular concentration of Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) oscillations are observed during the osteoclastogenesis from pre-osteoclasts by RANKL, and NFATc1 (nuclear factor of activated T cell) activation, affected by calcium signaling, is proven as an important factor at the final stage of osteoclastogenesis. The Ca^{2+} signaling is involved in proliferation, differentiation, gene transcription, secretion of neurotransmitter, memory, learning, muscular contraction, and most of all osteoclastogenesis. During the osteoclastogenesis, even though phospholipase C γ is well known activator of Ca^{2+} signaling, G protein-mediated Ca^{2+} signaling is not that well known. This research shows when G protein was activated

whether osteoclastogenesis occurred.

In RAW264.7, a pre-osteoclast cell line, we measured intensity of fluorescent regarding as a concentration of Ca^{2+} , and use aluminum fluoride (AlF_4^-) to activate G protein. We conformed both expression and activity of NFATc1 by western blot and immunofluorescence using NFATc1 antibody, and observed activation of ERK and JNK in which are mediations of signaling in cell.

Without stimulation of RANKL, Ca^{2+} oscillations occurred in pre-osteoclasts by AlF_4^- , and we conformed osteoclastogenesis by staining of tartrate resistantacidic phosphatase of these precursors. We observed NFATc1 movement in nucleus and increase of expression of NFATc1, an activator of the final osteoclastogenesis. It is proven that NFATc1 activates G protein signaling, calcium signaling, ERK and JNK signaling.

In addition to previous study, RANKL signal pathway, in this research G protein signaling also affects osteoclastogenesis.

Key Words : Osteoclast, RANKL, G alpha subunit, aluminum fluoride, Ca^{2+} oscillations, NFATc1