

관절 연골세포에서 integrin
신호전달계에 의한 TGF- β 1
신호전달계의 영향분석

연세대학교 대학원

의과학과

박민성

관절 연골세포에서 integrin
신호전달계에 의한 TGF- β 1
신호전달계의 영향분석

지도교수 이진우

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2006 년 월 일

연세대학교 대학원

의과학과

박민성

박민성의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 이 진 우 인

심사위원 _____ 이 수 곧 인

심사위원 _____ 김 건 홍 인

연세대학교 대학원

2006 년 12 월 일

감사의 글

부족함이 많은 저에게 많은 가르침을 주시고 지도하여 주신 이진우 교수님 그리고 본 연구를 자문하여 주신 이수곤 교수님, 김건홍 교수님께 진심으로 감사드립니다. 항상 변함없이 저를 무조건 꽉꽉 도와주시는 존경하는 아버지, 어머니, 형님과 형수님께, 그리고 수연이에게 깊은 감사를 드립니다. 아울러 석사과정을 마치기까지 여러 가지로 많은 도움을 주신 윤희누나, 연락이형, 호선누나, 인혜에게 감사하는 마음을 전합니다. 또 초등학생시절부터 지금까지 저를 아껴주시고 지도하여 주신 한영희 선생님께 감사드리며, 제가 힘들어할 때마다 도와준 소중한 친구들에게 고마운 마음을 전합니다.

주위의 많은 분들의 도움으로 2년여의 석사과정을 마치게 되었습니다. 앞으로 더욱 열심히 공부하여 발전된 모습을 보여드리겠습니다. 감사합니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 연구 재료	8
2. 연구 방법	8
가. 관절 연골세포의 분리 및 배양	8
나. 연골세포의 배양	9
다. 제 2형 교원질의 코팅	9
라. 실험군의 분류	10
마. 단백질 추출	10
바. Western blot 분석	11
III. 결과	12
1. 제 2형 교원질에 부착된 연골세포 형태	12
2. 제 2형 교원질에 의한 SMAD 2 및 SMAD 3 의 인산화분석	12
3. 제 2형 교원질 및 TGF- β 1에 의한 SMAD 2 및 SMAD 3의 인산화 분석	13
4. FAK (Y397)와 FAK (Y925)의 인산화 분석 	15
5. MAP kinases의 인산화 분석	15
IV. 고찰	19
V. 결론	23
참고문헌	24

영문요약 28

그림 차례

그림 1. TGF- β 신호전달 모식도	5
그림 2. 인테그린과 세포외 기질의 결합	6
그림 3. 각 자극에 대한 세포형태의 관찰	12
그림 4. 제 2형 교원질 자극에 의한 SMAD 2와 3의 활성	13
그림 5. 각 군 별 SMAD 2 인산화	14
그림 6. 각 군 별 SMAD 3 인산화	15
그림 7. 각 군 별 FAK (Y397) 인산화	16
그림 8. 각 군 별 FAK (Y925) 인산화	17
그림 9. 각 군 별 ERK 1/2 인산화	18
그림 10. 각 군 별 p38 인산화	18
그림 11. TGF- β 1 신호전달계와 인테그린 신호전달계 의 신호 교차반응 기전	22

관절 연골세포에서 integrin 신호전달계에 의한 TGF- β 1 신호전달계의 영향분석

관절 연골세포의 증식 및 생존을 위해서 인테그린과 제 2형 교원질과 같은 세포외 기질간의 상호작용이 필수적으로 요구된다. 그러나 아직까지 제 2형 교원질과 특이적인 인테그린 신호전달경로의 상호작용의 기능에 대해 알려진 바가 거의 없다. TGF- β 1은 연골세포의 특성을 유지하고 증식 및 세포외기질 합성을 촉진한다고 알려져 있다. 최근에는 연골세포에서 TGF- β 1 신호전달경로는 다른 성장인자의 신호전달경로와 신호교차반응을 일으키는 것으로 밝혀지고 있다. 따라서 관절 연골세포에 제 2형 교원질 및 TGF- β 1의 자극을 각각 또는 동시에 가한 후, 이로 인한 세포내 신호전달 단백질의 활성화 변화를 분석함으로써, 인테그린 신호전달경로와 TGF- β 1 신호전달경로의 신호교차반응의 기전을 밝히고자 하였다.

외부자극에 의한 인테그린과 TGF- β 1의 하위 신호전달경로를 분석하기 위해 제 2형 교원질을 세포 배양 용기에 코팅하였고, TGF- β 1은 세포 배양액에 첨가하는 방법으로 가했으며, 각 자극 또는 두 가지 자극을 함께 처리한 조건에서 연골세포를 배양하였다. 세포내 총 단백질을 추출하여 western blot기법을 이용하여 신호전달 단백질의 활성 변화를 분석한 결과, 제 2형 교원질 자극을 가한 군에서의 세포부착이 제 2형 교원질 자극을 가하지 않은 군에 비해 빨리 이루어졌으며, 제 2형 교원질 자극을 가한 군에서 SMAD 2와 SMAD 3의 발현이 관찰되었다. 특히 두 자극을 동시에 가한 군에서는 SMAD 2와 SMAD 3의 활성화에 대한 시너지효과를 관찰하였다. TGF- β 1 처리군

에서 FAK의 타이로신 925번째 부위의 인산화가 확인 되었고, 동시 자극군에서 시너지효과를 확인하였다. FAK의 하위 신호전달경로인 extracellular signal-regulated protein kinase 1/2 (ERK 1/2)와 p38의 활성화에는 유의한 변화가 없었다. 따라서 관절 연골세포에서 두 경로 사이의 신호교차반응이 존재하며 이에, SMAD 2 와 SMAD 3 및 FAK (Y925) 가 관여할 것으로 사료된다.

핵심되는 말 : 관절연골세포, 신호교차반응, 제2형교원질, TGF- β 1

관절 연골세포에서 integrin 신호전달계에 의한 TGF- β 1 신호전달계의 영향분석

<지도교수 이진우>

연세대학교 대학원 의과학과

박민성

I. 서론

관절연골은 매우 풍부한 세포외 기질로 구성된 조직이며, 연골 세포와 세포외 기질간의 결합은 세포 고유의 생물학적 기전 유지에 필수적이다. 세포와 세포외 기질과의 결합은 세포 표면의 인테그린에 의해 이루어지며, 이는 세포내 신호전달체계를 통해 외부 신호를 핵 내로 전달하는 역할을 한다. 제 2형 교원질은 연골의 가장 큰 비중을 차지하는 단백질이다. 정상적인 연골의 재생을 위해서는 제 2형 교원질의 생성이 이루어져야 하며, 여러 가지 관절연골 질환에서 변성된 세포외 기질은 세포와 세포외 기질간의 비정상적인 결합을 유도하게 된다. 지금까지 연골세포의 대사 조절에서 미세 환경 즉 세포 주위의 기질이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀져 있으며, 이는 연골세포의

세포외 기질로서 제 2형 교원질의 중요성을 의미한다.

관절연골의 정상적인 표현형 유지 및 대사와 재생을 위해서 여러 가지의 사이토카인과 세포외 기질, 그리고 생 역학적 자극 등이 필수적으로 요구된다. 특히, transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) 과 같은 사이토카인과 제 2형 교원질 등이 관절연골의 대사조절에 가장 중요하다고 보고되어 왔다. TGF- β 1은 연골세포의 기질 형성을 촉진하는 가장 강력한 성장인자로 알려져 있다. TGF- β 1의 신호교차반응은 서로 복잡하게 연결되어 있고, 세포골격의 재편성과 자극, 억제 를 포함하는 조절 기작들에 의한 다양한 신호전달경로의 활성화를 유발한다. 수년전까지 신호전달경로는 수용체를 활성화시키는 분자에 의해 유전자의 전사를 조절하는 일차원적인 경로로만 생각되어져 왔 으나, 최근에 각각의 단계에서 작용하는 신호조절인자들에서 일어나 는 상호작용이 복잡하게 영향을 주며, 서로 다른 신호전달경로가 복잡하게 얽혀있는 신호교차반응 (signal cross-talk)이 일어난다고 밝혀 졌다¹. 세포외부에 존재하는 TGF- β ligand는 type II 수용체에 결합 되고, 이 수용체는 type I 수용체를 유입해서 이중4량체 복합체를 만 들게 된다² (그림 1). Type II 수용체에 의해 활성화된 type I 수용체 COOH기 말단에서 SMAD 단백질들에 신호를 전달하고, 인산화 된 SMAD 2 및 SMAD 3 단백질은 SMAD 4와의 결합을 유도해 핵 안 으로 이동하여 전사 개시 복합체로서 작용한다². Franck 등³은 연골세포에 TGF- β 를 가하여 배양한 결과 세포외 기질생성이 증가되었다고 보고하였다. 또한 Qiao 등⁴이 연골세포에서 TGF- β 1에 의한 제 2형 교원질의 합성이 증가되며, 이는 transforming growth factor-beta-activated kinase (TAK)-1 에 의해 조절된다고 보고한 바 있다. 인테그린 (integrin)은 연골세포와 세포외 기질간의 부착을 조절하는 이형 이량체 막투과 수용체의 한 종류로써, 연골세포의 교원질 수용체에 인테그린 α 2 β 1이량체 (dimer)가 포함된다고 알려져 있으며⁵, 관절 연골의 골격 기능과 세포외 기질과의 상호작용을 통해 연골세포의 증

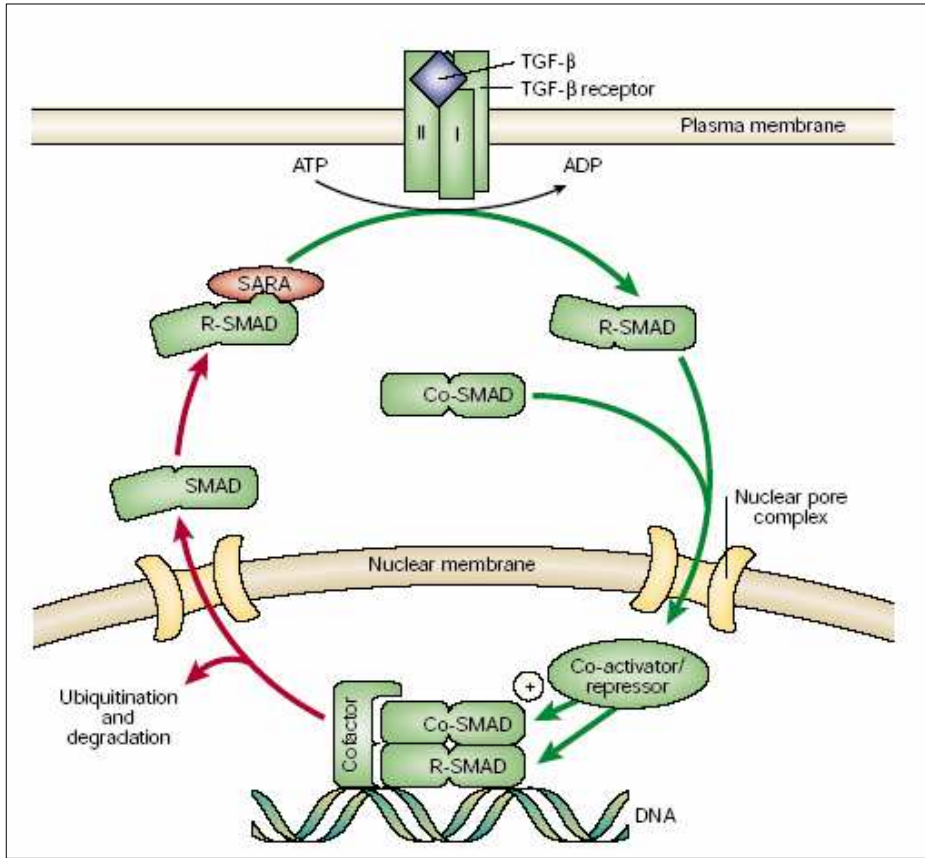


그림 1. TGF-β 신호전달 모식도.

식, 분화와 사멸 등과 관련된 외부 신호를 전달해 주는 역할을 한다. 연골세포들은 그들의 분자적 성질과 물리적 특징들을 결정하는 세포외 기질을 끊임없이 생산하고 재구성하며, 이에 대해 세포와 세포외 기질 사이의 부착은 세포에 크게 영향을 미친다⁶. 또한 세포막에 걸쳐 있고, plaque 단백질과 결합하는 세포질 부위를 가지며 focal adhesion과 연관된 단백질들은 인테그린을 통해 받는 세포증식, 분화, 사멸을 조절하는 신호 정보를 전달한다고 한다⁷. 즉, 세포외 기질과 세포사이에서 기능적이고 양쪽의 정보를 전달해 주는 것으로 알려져 있다.

분자적 수준에서 이들 부착에 의한 신호는 인테그린 수용체의 결합,

actin cytoskeleton의 조직화, focal adhesion을 유도하는 효소들의 집합에 의해 이루어 진다^{7,8}. 세포외 기질과 세포의 부착으로 인해 세포 내부에서는 actin cytoskeleton과 부착이 일어난다. 최초 focal complexes와 같은 작은 점으로 시작하여 oval focal adhesion으로 진행되고 더 나아가서 beaded fibrillar adhesions까지 발전한다. 시작단계는 focal complexes라 하며, 다양한 신호들을 개시할 수 있는 인테그린 분자들이 paxillin, vinculin, talin, focal adhesion kinases (FAK), 그리고 인산화된 tyrosine kinase 단백질과 결합한다 (그림 2).

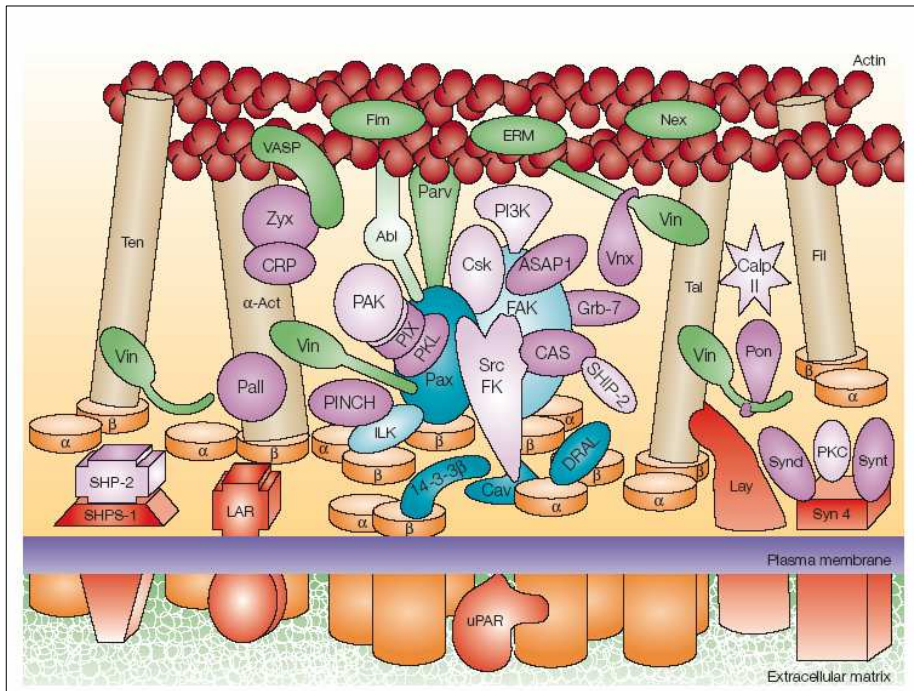


그림 2. 인테그린과 세포외 기질의 결합.

이를 통해 미세 환경에 대한 정보를 세포에 제공한다. Ronziere 등⁹은 쥐의 연골세포에서 인테그린 $\alpha 1\beta 1$ 과 골아세포의 특이적 표현형인 제 1형 교원질과의 결합을 유도한 결과, matrix metalloproteinase

(MMP)-13이 발현되어 제 2형 교원질이 파괴됨을 보고하였다. 또한 Lee 등¹⁰은 관절 연골세포에서 제 2형 교원질과 인테그린 $\alpha 2\beta 1$ 이 결합함으로써 세포 증식이 촉진되고 제 2형 교원질과 당단백의 생성이 증가됨을 보고한 바 있다. Wen-ning 등¹¹은 연골세포로부터 합성되는 세포외 기질의 성분이 제 2형 교원질과 세포와의 결합에 의해 조절된다고 발표하였다.

최근에는 연골세포에서 인테그린 신호전달과 TGF- $\beta 1$ 신호전달은 각각 epithelial growth factor (EGF)와 insulin-like growth factor (IGF)-1 등의 다른 성장인자의 신호전달경로와 신호교차반응을 일으키는 것으로 알려져 있다. Shakibaei 등¹²은 사람의 연골세포에서 인테그린 $\beta 1$ 신호전달경로와 IGF-1사이의 신호교차반응이 일어난다고 보고하였고, Watanabe 등¹³은 SMAD 2 및 3와 mitogen activated protein kinase (MAPK)사이의 전사인자 수준에서 일어나는 신호교차반응을 보고한 바 있다. 즉, 정상적인 연골세포에 TGF- $\beta 1$ 과 같은 성장인자 및 세포외 기질에 의한 연골세포의 제 2형 교원질 및 단백질 당 등이 증가하는 것으로 보고되어 왔으나, 각 자극에 의한 세포내 신호전달 기전에 대한 연구가 매우 미흡한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 연골세포에서 제 2형 교원질에 의한 SMAD 2와 SMAD 3의 활성화 및 TGF- $\beta 1$ 에 의한 FAK의 활성을 분석함으로써, 인테그린 신호 전달 경로와 TGF- $\beta 1$ 신호 전달 경로의 신호교차반응의 기전을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 재료

세포는 생 후 150일째 도살된 돼지의 뒷다리 슬관절 연골세포를 사용하였다. Dulbeccos Modified Eagles Medium-high glucose (DMEM-HG), 우태아혈청 (Fetal Bovine Serum; FBS), antibiotic-antimycotic 용액, trypsin-EDTA, phosphate buffered saline (PBS) 등은 Gibco BRL (Grand Island, NY, USA)사의 시약을 사용하였으며, 소의 제 2형 교원질 용액은 Chondrex (Redmond, WA, U.S.A.)사의 제품을 이용하였고, 사람의 재조합 TGF- β 1은 R&D Systems (Minneapolis, U.S.A.)사의 제품을 사용하였다. Type II collagenase와 hyaluronidase는 Worthington Biochemical (NJ, U.S.A.)사의 제품을 사용하였다. Western blot analysis 관련 시약 등은 Promega (Madison, WI, USA)사와 SIGMA (St. Louis, MO, USA) 사의 것을 사용하였다. ECL western blotting detection kit는 Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ, USA)사의 것을 사용하였다. SMAD 2, phospho-SMAD 2, phospho-SMAD 3의 항체는 Cell Signaling Technology (MA, U.S.A.) 사의 제품을 이용하였으며, SMAD 3의 항체는 Chemicon International (Temecula, CA, USA)사의 것을 사용하였고, FAK, phospho-FAK, ERK1/2, phospho-ERK1/2, p38, phospho-p38, GAPDH 등의 항체들은 Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)사의 것을 사용하였다.

2. 연구 방법

가. 관절연골세포의 분리 및 배양

돼지의 슬관절이 개방되지 않은 상태의 신선한 상태로 구입하여 클린벤치안에서 멸균된 칼과 핀셋을 이용해서 슬관절을 분리하고 연골을 걷어내어 채취한 후, 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 4°C의 dulbecco's modified eagle's medium-high glucose (DMEM-HG, GIBCO-BRL)가 담긴 50 ml tube로 옮겨서 세척한다. 세척된 연골조직을 멸균된 칼을 이용하여 최대한 잘게 자른 후, 연골의 무게를 측정한다. 연골조직을 효소용액 (DMEM-HG 9.3 ml/연골 1 g, collagenase II 10 mg/연골 1 g, hyaluronidase 6 mg/연골 1 g, 102 mM CaCl₂ 0.098 ml/연골 1 g)에 넣고 37°C에서 12시간동안 녹였다. 연골조직이 녹으면 13000 rpm으로 8분간 원심분리하고 10% DMEM-HG로 2번 세척한 후, 기본 배양액 (10% 우태아 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM-HG)에서 7일간 배양하였다.

나. 연골세포의 배양

분리된 연골세포는 기본 배양액 (10% 우태아 혈청과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM-HG)을 첨가하여 세포 배양 용기에서 배양하였다. 0.1% trypsin-EDTA (GIBCO-BRL)을 처리하여 1:2 비율로 계대 배양을 하였으며, 7일 동안 배양한 후 12시간동안 serum starvation을 실시하여 혈청에 의한 세포자극을 최대한 제거한 후, 실험에 사용하였고, 0.5% 우태아 혈청과 1X insulin-transferrin-selenium (ITS, GIBCO-BRL), 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM-HG에 배양하며 실험을 수행하였다.

다. 제 2형 교원질의 코팅

세포 배양 용기에 PBS (GIBCO-BRL)에 1 µg/ml의 농도로 희석한

제 2형 교원질 용액 (Chondrex)을 넣고 4°C에서 3일간 코팅하였다. 3일 후, 제 2형 교원질 용액을 제거하고 차가운 PBS로 한번 세척한 후 30분간 건조한 후 실험에 사용하였다.

라. 실험군의 분류

제 1군은 연골세포를 세포 배양 용기에서 배양한 군, 제 2군은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 제 2형 교원질이 코팅된 세포 배양 용기에서 배양한 군, 제 3군은 세포 배양 용기의 배양액에 10 ng/ml 의 TGF- β 1 (R&D Systems, Inc.)을 처리한 군, 제 4군은 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 제 2형 교원질이 코팅된 세포 배양 용기에 10 ng/ml 의 TGF- β 1을 처리하여 배양한 군으로 4가지 조건에 따라 분류하였다.

마. 단백질 추출

세포를 배양한 세포 배양 용기를 PBS로 2회 세척하였다. Passive lysis buffer (Promega), 500X protease inhibitor (Sigma), 100X phosphatase inhibitor I 와 II (Sigma)를 세포 배양 용기에 첨가하여 cell scraper를 이용하여 세포를 모은 후, sonication으로 단백질을 추출하였다. 단백질 추출 용액을 4°C에서 14,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 상층액만 취해서 -70°C에 보관하였다. 단백질 정량을 위해 각각의 균질액 4 μl 에 16 μl 의 증류수를 첨가하였고, 대조군으로 bovine serum albumin (BSA, 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) (Sigma) 0~6 μl 에 증류수 20~14 μl 를 첨가하였다. 정량하기 직전에 이 용액들과 protein-assay reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.) 980 μl 를 섞은 후, 200 μl 를 취하여 bradford 방법에 따라 흡광도 595nm에서 단백질 정량을 실시하였다.

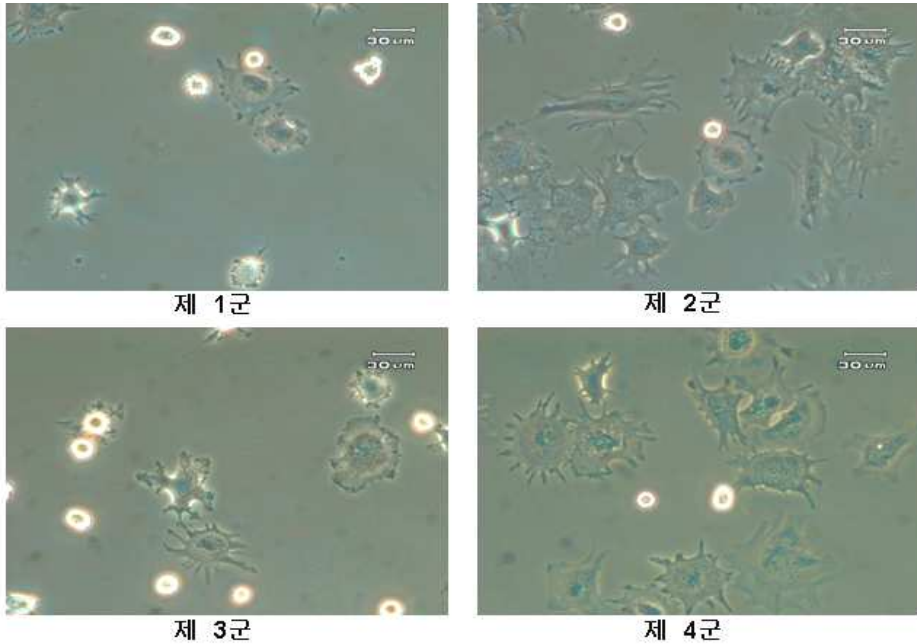
바. Western blot 분석

세포 추출액은 sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma)가 포함된 10%의 polyacrylamide gel (polyacrylamide:bisacrylamide=29:1)을 사용하여 gel을 전기영동 버퍼 (25mM Tris, 250mM Glycine, 0.1% SDS)에 담그고 120 volt에서 전기영동을 실시하였다. 전기영동이 끝나면 western blotter (Bio-Rad)로 2 시간 동안 50 volt의 전류를 흘려 단백질을 gel로부터 PVDF membrane (Amersham Pharmacia)으로 옮겼다. 5%의 무지방 우유를 함유한 1X TBST (100 mM Tris (pH7.5), 1.5 M NaCl, 0.5% tween-20) 용액으로 1 시간 동안 blocking 한 후, 1X TBST로 10 분 간격으로 3 회간 실온에서 세척하였다. 세척한 membrane은 일차 항체를 함유한 1% 무지방 우유를 포함한 용액 (1:3500)에서 2 시간 동안 천천히 흔들면서 부착시켰다. 일차 항체 반응 후, membrane을 10 분 간격으로 1X TBST를 이용하여 3 회간 세척하였다. 세척한 membrane을 이차 항체가 함유한 TBST (1% 무지방 우유 함유)로 실온에서 1 시간 동안 반응시킨 후, 10 분 간격으로 1X TBST를 이용하여 3 회간 세척하였다. ECL western blotting detection kit (Amersham Pharmacia)를 사용하여 발광을 유도한 후, ECL hyper film (Amersham Pharmacia)를 사용하여 현상하였다. Western blotting에 사용된 일차 항체는 phospho-SMAD 2, SMAD 2, phospho-SMAD 3, SMAD 3, phospho-FAK, FAK, phospho-ERK1/2, ERK1/2, phospho-p38, p38, GAPDH이었다. Western blot analysis를 통해 얻은 결과는 TINA pixel analyzer version 2.10 (Raytest Isotopenme gerate GmbH, Straubenhardt, Germany)를 이용하여 정량화하였고, 각 단백질의 발현정도는 GAPDH로 표준화하였다.

III. 결과

1. 제 2형 교원질에 부착된 연골세포 형태

세포부착 1시간째 세포형태를 현미경상으로 관찰한 결과, 제 2형 교원질에서 배양된 군 (제 2군 및 제 4군)이 코팅되지 않은 군 (제 1군 및 제 3군)에 비해 보다 빠른 부착 능력과 넓게 퍼진 세포형태를 관찰하였으며, 이러한 연골세포부착은 성장인자보다 세포외 기질 즉, 제 2형 교원질에 의해 영향을 받는 것으로 확인되었다 (그림 3).

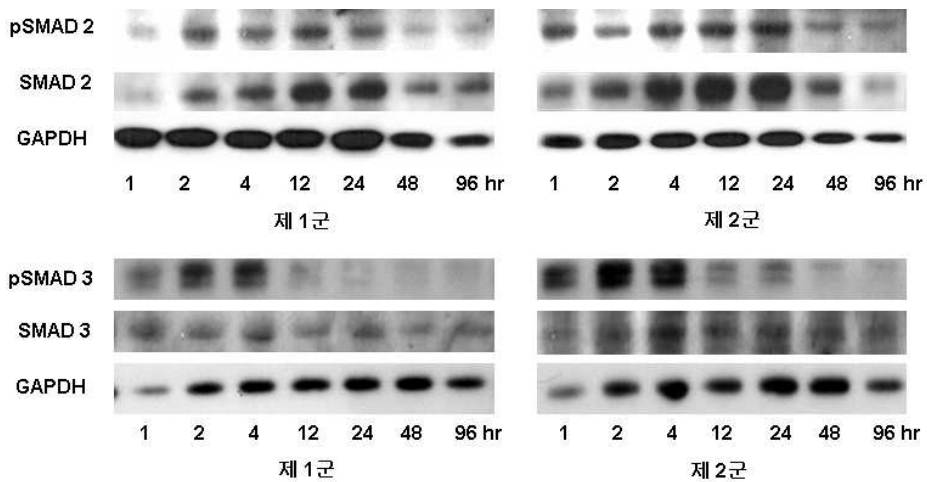


제1군: 세포배양용기, 제2군: 제2형 교원질, 제3군: TGF- β 1, 제4군: 동시 처리

그림 3. 각 자극에 대한 세포형태의 관찰. 제 2형 교원질 (1 μ g/ml, 제 2군) 과 TGF- β 1 (10 ng/ml, 제 3군) 그리고 동시자극 (제 4군)을 가한 후 1시간째 연골세포의 현미경으로 관찰하였다 (X200).

2. 제 2형 교원질에 의한 SMAD 2 및 SMAD 3의 인산화 분석

SMAD 2의 인산화가 부착 후 24시간까지 꾸준히 증가하였으나, 48시간 이후에 감소되었다. 특히, 대조군에 비해 제 2형 교원질에서 배양된 세포 (제 2군)에서 세포부착 후 1시간 이후에 빠르게 증가하였다. SMAD 3의 인산화는 제 2군에서 1시간부터 4시간까지 확연히 증가하였으며, 12시간 이후 급격하게 감소하였다. 따라서 SMAD 2와 달리 SMAD 3은 부착 초기에 관여하는 것으로 보이며, 제 2형 교원질에 의해 TGF- β 1 신호전달물질인 SMAD 2 및 SMAD 3이 활성화됨을 확인하였다 (그림 4).



제1군: 세포배양용기, 제2군: 제2형 교원질

그림 4. 제 2형 교원질 자극에 의한 SMAD 2와 3의 활성화. 대조군 (제 1군) 과 제 2형 교원질 (제 2군)에 의한 관절 연골세포에서의 TGF- β 1 신호전달 단백질인 SMAD 2와 SMAD 3의 인산화를 확인하기 위해 연골세포를 시간별 (1, 2, 4, 12, 24, 48, 및 96시간)로 채취하여 western blot analysis로 관찰하였다.

3. 제 2형 교원질 및 TGF- β 1에 의한 SMAD 2 및 SMAD 3의 인산화 분석

TGF- β 1과 제 2형 교원질의 두 자극에 의해 각각 SMAD 2 활성이 시간이 지남에 따라 감소하였으나, 두 자극을 동시에 가한 군 (제 4군)에서 48시간부터 96시간까지 지속되는 것으로 나타났다 (그림 5). SMAD 2와 유사하게, 제 2군과 제 3군에서 SMAD 3 활성이 시간이 지남에 따라 감소하였으나, 제 4군에서 48시간부터 96시간까지 지속되는 활성을 확인하였다 (그림 6). 따라서 제 2형 교원질과 TGF- β 1을 동시에 처리하였을 경우, 신호전달경로에 SMAD 2와 SMAD 3이 관여하는 것으로 보인다.

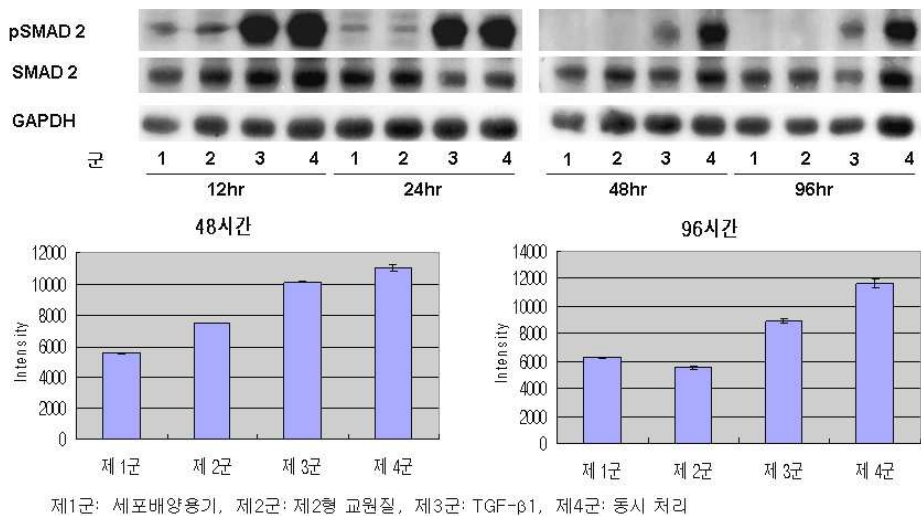
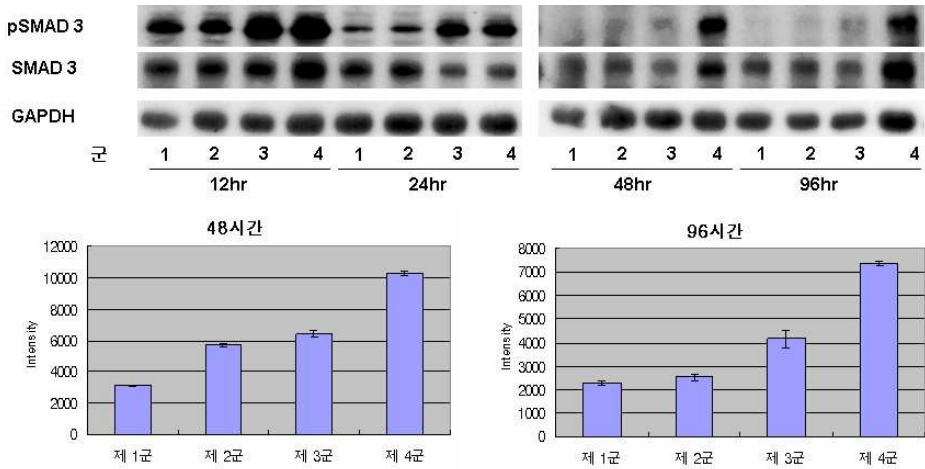


그림 5. 각 군 별 SMAD 2 인산화. 제 2형 교원질 (제 2군)과 TGF- β 1 (제 3군) 그리고 동시 자극 (제 4군)에 의한 관절 연골세포에서의 TGF- β 1 신호전달 단백질 SMAD 2의 인산화를 시간별 (12, 24, 48, 및 96시간)로 western blot analysis를 통해 관찰하였다.



제1군: 세포배양용기, 제2군: 제2형 교원질, 제3군: TGF- β 1, 제4군: 동시 처리

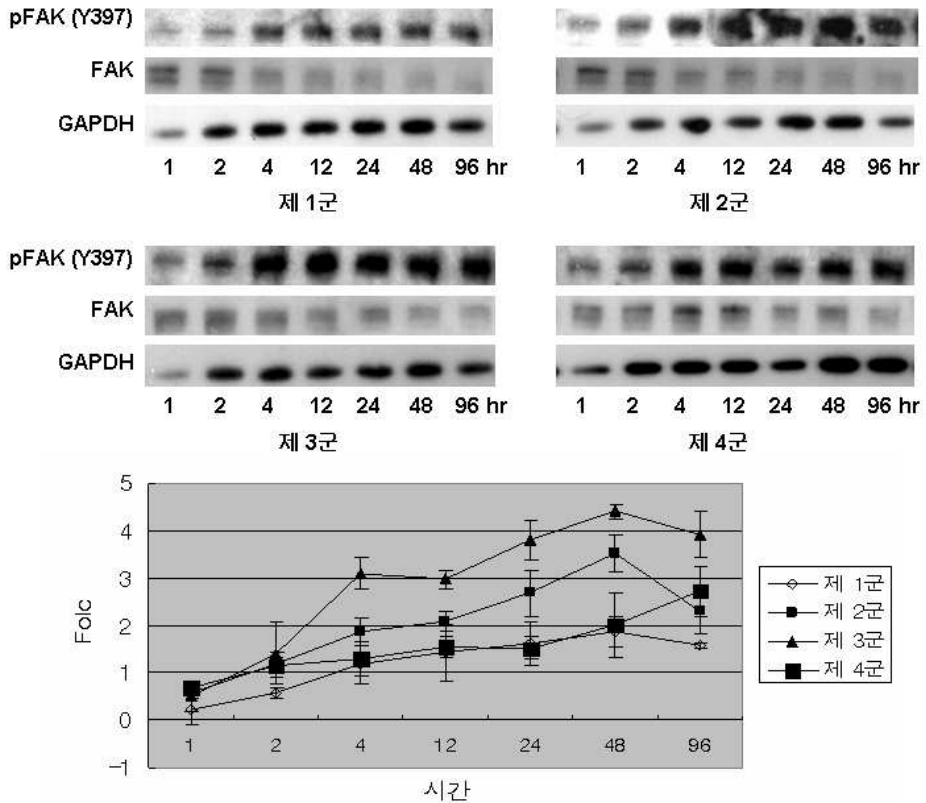
그림 6. 각 군 별 SMAD 3 인산화. TGF- β 1 신호전달 물질인 SMAD 3의 인산화를 시간별 (12, 24, 48, 및 96시간)로 western blot analysis를 통해 관찰하였다.

4. FAK (Y397)와 FAK (Y925)의 인산화 분석

인테그린의 하위 신호전달단백인 FAK의 인산화 부위 타이로신 397번 (Y397)을 확인한 결과, 모든 군에서 시간이 지남에 따라 FAK 인산화가 증가하였고, 두 자극을 모두 가했을 때에 패턴의 변화를 보이지 않았다. (그림 7). FAK의 인산화 부위인 타이로신 925번 (Y925)을 확인한 결과, 대조군에 비해 제 2형 교원질과 TGF- β 1을 가한 군 그리고 두 자극을 모두 가한 군에서 FAK (Y925)의 활성이 증가되었으며, 또한 두 자극을 모두 가했을 때 활성이 96시간까지 지속되는 것을 확인하였다 (그림 8). 따라서 TGF- β 1과 제 2형 교원질에 의해 FAK의 타이로신 397번이 아닌 타이로신 925번 인산화에 시너지 효과를 보였다.

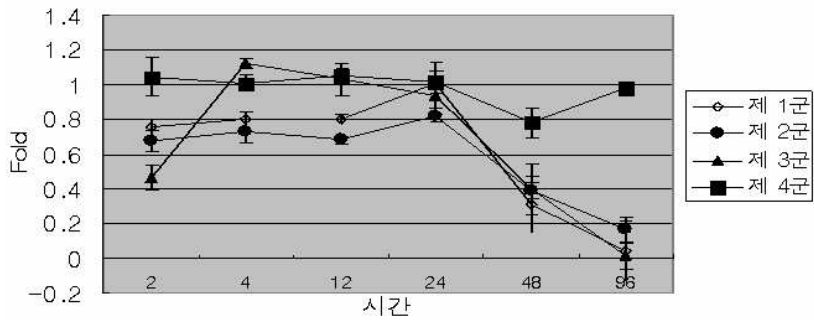
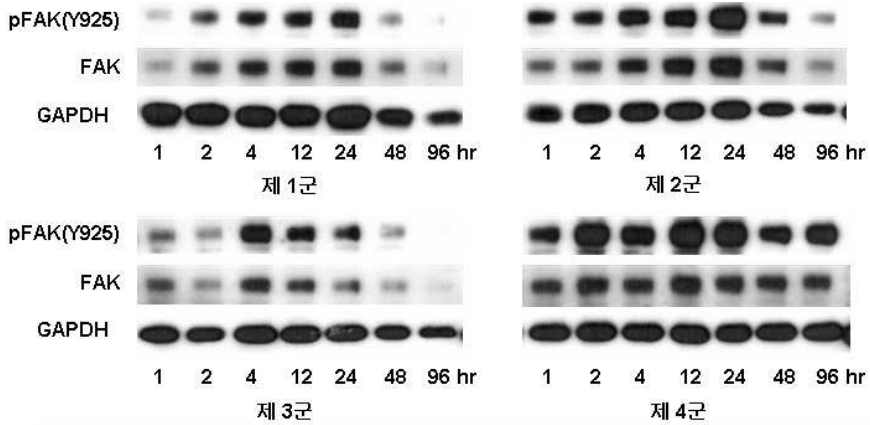
5. MAP kinases의 인산화 분석

MAPK 신호전달단백인 ERK1/2의 인산화를 확인한 결과, 각 군 간에서 인산화 양상의 유의한 차이를 볼 수 없었으며 두 자극을 모두 가한 군에서 또한 증가되지 않았다 (그림 9). p38의 인산화를 확인한 결과, 각 군의 차이가 없었으며, 두 자극을 동시 처리한 군에서의 변화 양상을 확인할 수 없었다 (그림 10).



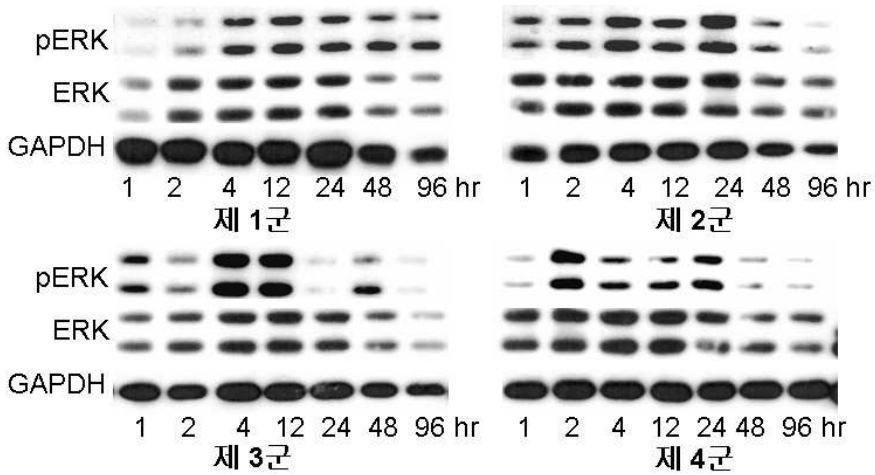
제1군: 세포배양용기, 제2군: 제2형 교원질, 제3군: TGF- β 1, 제4군: 동시 처리

그림 7. 각 군 별 FAK (Y397) 인산화. 제 2형 교원질 (제 2군) 과 TGF- β 1 (제 3군) 그리고 동시자극 (제 4군)에 의한 관절 연골세포에서의 인테그린 신호전달 단백질 FAK (Y397)의 인산화를 시간별 (1, 2, 4, 12, 24, 48, 및 96 시간)로 western blot analysis를 통해 관찰하였다.



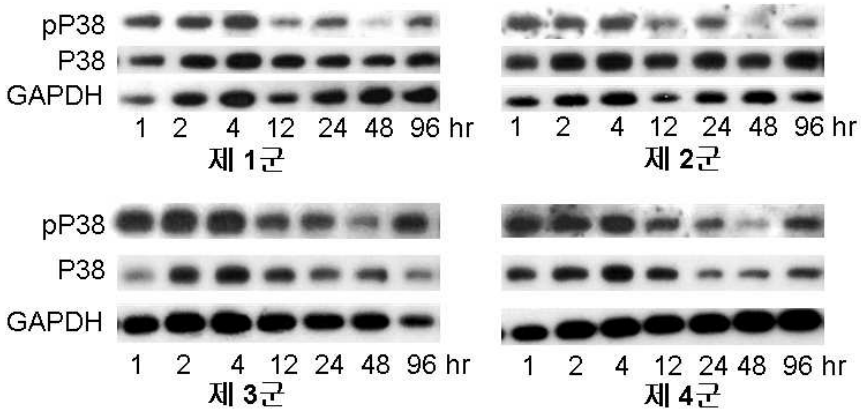
제1군: 세포배양용기, 제2군: 제2형 교원질, 제3군: TGF- β 1, 제4군: 동시 처리

그림 8. 각 군 별 FAK (Y925) 인산화. 제 2형 교원질 (제 2군) 과 TGF- β 1 (제 3군) 그리고 동시자극 (제 4군)에 의한 관절 연골세포에서의 인테그린 신호전달 단백질인 FAK (Y925)의 인산화를 시간별 (1, 2, 4, 12, 24, 48, 및 96 시간)로 western blot analysis를 통해 관찰하였다.



제1군: 세포배양용기, 제2군: 제2형 교원질, 제3군: TGF- β 1, 제4군: 동시 처리

그림 9. 각 군 별 ERK 1/2 인산화. 제 2형 교원질 (제 2군) 과 TGF- β 1 (제 3군) 그리고 동시자극 (제 4군)에 의한 관절 연골세포에서의 MAPK 신호 전달 단백질인 ERK 1/2의 인산화를 시간별 (1, 2, 4, 12, 24, 48, 및 96시간)로 western blot analysis를 통해 관찰하였다.



제1군: 세포배양용기, 제2군: 제2형 교원질, 제3군: TGF- β 1, 제4군: 동시 처리

그림 10. 각 군 별 p38 인산화. 제 2형 교원질 (제 2군) 과 TGF- β 1 (제 3군) 그리고 동시자극 (제 4군)에 의한 관절 연골세포에서의 MAPK 신호 전달 단백질인 p38의 인산화를 시간별 (1, 2, 4, 12, 24, 48, 및 96시간)로 western blot analysis를 통해 관찰하였다.

IV. 고찰

골관절염 (Osteoarthritis, OA)은 주로 체중이 부하되는 관절에서 발생되어 통증유발, 활동의 제약, 체형변형 등이 일어나는 가장 일반적인 관절 질환이다. 골관절염이 발생한 연골은 연골기능이 크게 손상된 상태로, 연골기질에 수분과 단백다당의 함유량이 증가되어 수화, 비후되어 연골기질의 파열이 일어나고, matrix metalloproteinases (MMPs)가 분비되어 proteoglycan을 분해시켜 균열이 발생 (fibrillation)하여 연골조직이 파괴된다¹. 또한 연골세포의 탈분화 (dedifferentiation)는 세포의 특성을 잃어버리는 현상으로써 연골세포의 탈분화가 진행될 때, 제 2형 교원질의 유전자 발현이 억제되고, 제 1형 교원질의 유전자는 증가된다. 세포내 기본적인 생물학적 기능은 세포 내에서 발현되는 유전자에 의해서 조절된다. 이러한 유전자 발현의 조절은 다양한 신호의 복잡한 전달 과정이 관여함으로써 이루어지게 된다. 따라서 연골세포의 기능적인 연구를 위해서는 연골세포의 특정 신호전달과정의 이해가 필수적이다. 인테그린은 연골세포의 부착을 매개하는 대표적인 세포부착 단백질의 일종이다^{14,15}. 인테그린은 세포외부로부터 연골세포에게 성장, 사멸, 분화, 이동 등의 관련된 신호를 전달해주는 매개체의 역할을 한다^{16,17}.

현재 TGF- β 1에 의한 연골세포의 제 2형 교원질의 발현이 증가한다는 보고와^{3,4}, 발현된 제 2형 교원질 및 세포외 기질 성분들이 연골 유지에 주요 역할을 한다는 연구가 많이 알려져 있다^{6,7,10,11}. 또한 연골세포에서 두 종류이상의 성장인자를 처리할 경우, 신호교차반응이 이루어지며, 이로 인해 연골세포의 대사가 활성화 된다는 연구가 보고되고 있다^{12,13}.

따라서 본 연구는 관절에서 분리한 연골세포에 연골의 주요 구성 성분인 제 2형 교원질과 대표적인 연골성장인자인 TGF- β 1의 자극을 가하였을 때 또는 두 가지 자극을 동시에 가했을 때 변화되는 세포내

신호전달 단백질의 활성을 살펴보았다.

TGF- β 1의 신호전달경로 특이단백인 SMAD 2와 SMAD 3이 제 2형 교원질 자극이 가해진 군에서 빠르게 활성화되었음이 확인되었다. 즉, 코팅된 제 2형 교원질의 자극으로 인한 인테그린 신호전달경로가 SMAD 2와 SMAD 3의 신호전달경로와 상호작용을 한다는 것을 의미한다. SMAD 2와 SMAD 3이 제 2형 교원질과 TGF- β 1에 의해 활성화되었으나 자극을 가한 후 48시간이 지나자 활성이 감소되었다. 하지만 두 가지 자극이 모두 가해졌을 때에 활성이 96시간까지 지속되었고, 약 4배 증가된 것으로 보아, 두 자극에 의한 시너지 효과가 있는 것으로 나타났다. 이 결과는 제 2형 교원질로부터 매개된 인테그린 하위 신호전달계와 TGF- β 1 하위 SMAD 2와 SMAD 3의 신호전달 경로에서 신호교차반응이 일어난다는 것을 보여준다. 이 결과는 Michaela 등¹⁸이 보고한 사람의 슬관절에서 얻은 연골세포를 alginate bead모형을 이용하여 TGF- β 1 과 제 2형 교원질 또는 두 가지 자극을 모두 처리하였을 때 SMAD 2 또는 SMAD 3의 인산화가 증가하며, TGF- β 1과 제 2형 교원질자극 사이의 신호교차반응이 일어난다는 연구 결과와 유사하게 나타났다.

인테그린의 세포내에 부착하는 focal adhesion kinase (FAK)는 인테그린의 신호전달과정의 중심적인 역할을 한다고 할 수 있다. 하지만 연골세포에서 세포 특성의 유지에 가장 크게 영향을 주는 것으로 알려져 있는 TGF- β 1의 신호전달과정과 관련하여 인테그린과 FAK에 의해 전개되는 세포내 신호전달과정의 자세한 기전에 대해서 밝힌 연구는 매우 미흡한 실정이다^{19,20}. 본 연구 결과에서, FAK autophosphorylation 부위인 타이로신 397번째 잔기의 인산화는 시간이 지남에 따라 증가되는 것으로 나타났으나, 모든 군에서 차이가 없었으며, 시너지 효과 또한 확인할 수 없었다. 한편, FAK의 타이로신 925번째 아미노산 잔기의 인산화가 제 2형 교원질에 의해서 빠르게 증가 되었으며, TGF- β 1에 의해서도 활성을 보였다. 특히 두 자극을 동시에 가한

군에서 빠르게 활성화 되어 96시간까지 강하게 증가된 활성이 지속되는 것으로 확인되었다. 즉, TGF- β 1과 인테그린 신호를 전달하는 FAK의 타이로신 925번 부위가 신호교차반응에 관여한다고 사료된다. Qi 등^{23,24}은 3차원 배양된 관절 연골세포에서 TGF- β 1과 제 2형 교원질의 공동 작용에 의해 DNA의 합성과 aggrecan의 mRNA발현이 촉진된다고 보고한 바 있다. 따라서 본 연구에서 관찰된 TGF- β 1과 제 2형 교원질에 의한 FAK (Y925) 활성화 및 SMAD 2 및 3의 활성화의 시너지 효과가 연골세포의 표현형을 유지 및 세포증식을 증가시키는 데에 중요한 역할을 할 수 있음을 보여 준다.

세포와 세포외 기질의 상호작용에 의해 인테그린으로 전달된 세포외 기질의 자극은 인테그린 β 1의 cytoplasmic domain에 결합된 FAK와 Src, paxillin, talin, p130^{CAS}, cavaolin등의 cofactor들에 의해 신호전달이 이루어지고 증식, 분화, 사멸 등의 세포대사가 조절된다. FAK의 활성화는 FAK와 Src의 상호작용에 의해 타이로신 397, 타이로신 576, 타이로신 577, 타이로신 861 그리고 타이로신 925번 잔기 등의 인산화로 인해 일어난다고 알려져 있다. 특히 FAK의 타이로신 925 잔기의 인산화가 일어나게 되면 FAK로 전달된 신호는 MAP kinase의 활성화에 영향을 준다고 알려져 있다^{19,20,21,22}. MAP kinase의 활성화 기전은 Src, p130^{CAS}, Crk 등이 관여하는 FAK 활성화에 의존적인 경로와 Shc, Fyn, caveolin-1 등이 관여하는 FAK 활성화에 대해 비 의존적인 경로의 두 가지 경로를 통해 MAP kinase가 활성화 되는 두 가지 경로로 나눌 수 있다^{25,26,27}. 최근에 발표된 연구에 따르면, IGF와 fibroblast growth factor (FGF) 등의 여러 가지 사이토카인에 의해 MAP kinase가 활성화 되고 연골세포의 대사가 조절된다고 한다^{28,29}. 한편, Starkman 등³⁰은 IGF에 의한 연골세포에서의 단백질 합성이 MAP kinase 활성화에 비 의존적으로 증가된다고 보고 하였다. 본 연구에서는 MAP kinase의 일종인 p38과 ERK1/2가 TGF- β 1 또는 제2형 교원질에 의해 의미있게 활성화 되거나 두 자극에 의한 시너지 효과

를 보이지 않았다. MAP kinase의 활성화에는 수많은 단백질이 관여하며, 세포 증식, 분화 및 사멸 등을 조절하는 신호 전달경로 또한 매우 복잡하게 구성되어 있다. 따라서 본 연구에서 p38과 ERK의 활성화 이전에 FAK에 비 의존적인 세포내 신호전달경로가 관여할 것으로 추측된다.

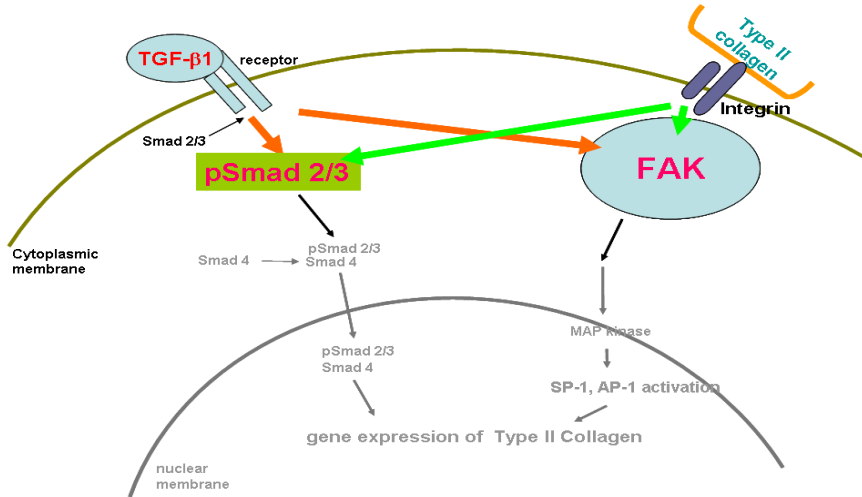


그림 11. TGF-β1 신호전달계와 인테그린 신호전달계의 신호교차반응 기전.

따라서, 본 연구에서 TGF-β1에 의한 신호와 제2형 교원질 자극에 의한 인테그린 신호가 FAK (Y925)와 SMAD 2 및 SMAD 3의 활성화에 시너지 효과가 있음을 밝혔으며, 이 단백질들이 두 자극에 대한 신호교차반응에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다 (그림 11). 본 연구 결과가 관절 연골세포의 대사조절기전을 이해하는 데에 도움이 될 것으로 기대된다.

V. 결론

관절 연골세포에 일어나는 인테그린 신호전달경로와 TGF- β 1 신호전달경로의 신호교차반응의 기전을 확인하고자 세포에 대해 제 2형 교원질과 TGF- β 1의 자극을 가한 후 western blotting을 시행하였다.

본 실험에서 단층 배양된 관절 연골세포에서는 SMAD 2와 SMAD 3이 TGF- β 1 뿐 아니라 제 2형 교원질에 의해서도 활성화되었으며, 이와 유사하게 FAK 타이로신 925부위에서 TGF- β 1에 의해 활성화됨을 확인하였다. 또한 SMAD 2와 SMAD 3 그리고 FAK (Y925)에서 두 자극에 의한 시너지 효과가 확인되었다. 따라서 연골세포의 대사에 중요한 역할을 하는 성장인자와 세포외 기질에 의한 두 신호전달경로의 신호교차반응에 SMAD 2와 SMAD 3, 그리고 FAK (Y925)가 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

참고 문헌

1. Dumont JE, Pecasse F, Maenhaut C. Crosstalk and specificity in signalling. Are we crosstalking ourselves into general confusion? *Cell Signal* 2001;13:457-463.
2. Shi Y, Massague J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 2003;113:685-700.
3. Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta signaling through the Smad pathway: role in extracellular matrix gene expression and regulation. *J Invest Dermatol* 2002;118:211-5.
4. Qiao B, Padilla SR, Benya PD. Transforming growth factor (TGF)-beta-activated kinase 1 mimics and mediates TGF-beta-induced stimulation of type II collagen synthesis in chondrocytes independent of Col2a1 transcription and Smad3 signaling. *J Biol Chem* 2005;280:17562-71.
5. Loeser RF. Integrins and cell signaling in chondrocytes. *Biorheology* 2002;39:119-124.
6. Hynes RO. Integrins: Bidirectional, Allosteric Signaling Machines. *Cell* 2002;110:673-687.
7. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix-cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:793-805.
8. Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:274-286.
9. Ronziere MC, Aubert-Foucher E, Gouttenoire J, Bernaud J, Herbage D, Mallein-Gerin F. Integrin alpha1beta1 mediates collagen induction of MMP-13 expression in MC615 chondrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 2005;1746:55-64.
10. Lee JW, Qi WN, Scully SP. The involvement of beta1 integrin

- in the modulation by collagen of chondrocyte-response to transforming growth factor- β 1. *J Orthop Res* 2002;20:66-75.
11. Qi WN, Scully SP. Type II collagen modulates the composition of extracellular matrix synthesized by articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2003;21:282-9.
 12. Shakibaei M, John T, De Souza P, Rahmanzadeh R, Merker HJ. Signal transduction by β 1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J* 1999;342:615-23.
 13. Watanabe H, de Caestecker MP, Yamada Y. Transcriptional cross-talk between Smad, ERK1/2, and p38 mitogen-activated protein kinase pathways regulates transforming growth factor- β -induced aggrecan gene expression in chondrogenic ATDC5 cells. *J Biol Chem* 2001;276:14466-73.
 14. Albelda SM, Buck CA. Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J* 1990;4:2868-80.
 15. Salter DM, Hughes DE, Simpson R, Gardner DL. Integrin expression by human articular chondrocytes. *Br J Rheumatol* 1992;31:231-4.
 16. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285:1028-32.
 17. Hynes RO. Related Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell* 1992;69:11-25.
 18. Schneiderbauer MM, Dutton CM, Scully SP. Signaling "cross-talk" between TGF- β 1 and ECM signals in chondrocytic cells. *Cell Signal* 2004;16:1133-1140.
 19. Guan JL. Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol* 1997;16:195-200.
 20. Li W, Duzgun A, Sumpio BE, Basson MD. Integrin and FAK-mediated MAPK activation is required for cyclic strain mitogenic effects in Caco-2 cells. *Am J Physiol Gastrointest*

Liver Physiol 2001;280:G75-87.

21. Schoenwaelder SM, Burridge K. Bidirectional signaling between the cytoskeleton and integrins. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:274-86
22. Mitra SK, Mikolon D, Molina JE, Hsia DA, Hanson DA, Chi A, Lim ST, Bernard-Trifilo JA, Ilic D, Stupack DG, Cheresch DA, Schlaepfer DD. Intrinsic FAK activity and Y925 phosphorylation facilitate an angiogenic switch in tumors. *Oncogene* 2006; 28:25:5969-84.
23. Qi WN, Scully SP. Extracellular collagen modulates the regulation of chondrocytes by transforming growth factor-beta 1. *J Orthop Res* 1997;;15:483-90.
24. Qi WN, Scully SP. Effect of type II collagen in chondrocyte response to TGF-beta 1 regulation. *Exp Cell Res* 1998; 25:241:142-50.
25. Lee JW, Juliano R. Mitogenic signal transduction by integrin- and growth factor receptor-mediated pathways. *Mol Cells* 2004;17:188-202.
26. Schlaepfer DD, Jones KC, Hunter T. Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol Cell Biol* 1998;18:2571-85.
27. Wary KK, Mariotti A, Zurzolo C, Giancotti FG. A requirement for caveolin-1 and associated kinase Fyn in integrin signaling and anchorage-dependent cell growth. *Cell* 1998;94:625-34.
28. Shakibaei M, Seifarth C, John T, Rahmzadeh M, Mobasheri A. Igf-I extends the chondrogenic potential of human articular chondrocytes in vitro: Molecular association between Sox9 and Erk1/2. *Biochem Pharmacol* 2006;72:1382-95
29. Raucci A, Laplantine E, Mansukhani A, Basilico C. Activation

of the ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase pathways mediates fibroblast growth factor-induced growth arrest of chondrocytes. *J Biol Chem* 2004;279:1747-56.

30. Starkman BG, Cravero JD, Delcarlo M, Loeser RF. IGF-I stimulation of proteoglycan synthesis by chondrocytes requires activation of the PI 3-kinase pathway but not ERK MAPK. *Biochem J* 2005;389:723-9.

Abstract

The effect of TGF- β signaling pathway by integrin signaling pathway in articular chondrocytes

Min Sung Park

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

(Directed by Professor **Jin Woo Lee**)

It is established that articular chondrocytes require integrin mediated interactions with extracellular matrix (ECM), such as type II collagen, a major matrix component of articular cartilage, to proliferate and survive. However, the functional interaction between type II collagen and specific integrin signaling pathway has not been identified. Transforming growth factor-beta 1 (TGF)- β 1 seems to play a crucial role in maintaining chondrogenic properties, proliferation and stimulates ECM synthesis in chondrocytes. Recently, signal cross-talking between TGF- β 1 and other growth factors in chondrocytes was reported. Therefore, in this study, the signal cross-talk between integrin signaling cascade and TGF- β 1 signaling cascade in articular chondrocytes was identified, through the analysis the altered activation of intracellular signal transmitting proteins after the treatment of type II collagen and TGF- β 1 each or both stimuli into cells.

To analyze integrin or TGF- β 1 mediated signaling pathways from extracellular stimuli, type II collagen was coated on the cell culture plate and TGF- β 1 was injected into cell culture media. Chondrocy-

tes were cultured in the conditioned media with each or both stimuli. As a result of altered activation of signaling proteins with western blotting technique of whole cell lysates, more rapid attachment of cells was observed in the type II collagen coated group than non-treated group. The phosphorylated smad 2 and 3 were expressed in the type II collagen coated group and synergistically up-regulated expression in the co-treated group. The phosphorylated FAK (Y925) was activated by TGF- β 1 treatment and synergistically up-regulated by both stimuli. But any meaningfully changed phosphorylation of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 1/2 and p38, as known downstream molecules of FAK cascade, was not observed. This result means that SMAD 2, SMAD 3 and Y925 phosphorylation site of FAK are involved in this signal cross-talking in articular chondrocytes.

Key Words : Articular chondrocyte, Signal cross-talk, Type II collagen, TGF- β 1