

# cDNA array를 이용한 파골세포 분화 관련 유전자의 탐색

조영준 · 이장희\* · 이창섭 · 이상호

조선대학교 치과대학 소아치과학교실 · 미생물학교실\* · 구강생물학 연구소

### 국문초록

RAW 264.7과 이것이 분화된 파골세포양 세포에서 파골세포 분화관련유전자의 전체적인 유전자 발현을 조사하기 위해 cDNA array 방법을 사용하였다. 1176 cDNA spot grid가 있는 Mouse Atlas cDNA array 결과를 확인하기 위하여 역전사 효소 증합반응 검사를 시행하였다. cDNA array 결과 6개의 유전자가 2.5% 이상 발현이 증가하였으며(PKC beta II, POMC, PTEN 등), 16개의 유전자가 2.5%이상 발현이 감소하였다(Osteopontin, Cyclin D1, Cathepsin C, PTMA 등). PKC beta II 유전자의 역전사-효소 증합 반응 검사 결과 이 유전자를 확인할 수 있었다. 파골세포 분화 결과 RAW 264.7 세포주에 비해 파골세포양 세포에서 PKC beta II 유전자의 발현이 많았다. 파골세포 분화 관련 유전자는 RAW 264.7 세포주와 이것이 분화된 파골세포양 세포와 차이를 보였고, 이 유전자의 발현증가와 RAW 264.7 세포주의 파골세포 분화와 연관을 보였다.

**주요어** : 파골세포 분화관련 유전자, cDNA array

## I. 서 론

골 조직은 교원질, 당단백과 같은 세포외 기질과 조골세포, 파골세포, 골세포 등 여러종류의 세포들로 구성되어 있는 매우 복잡하고 활동적인 조직으로서, 기계적인 지지, 장기보호, 조절에 필요한 미세 환경 제공, 미네랄 저장 장소 제공 등 생체 항상성 유지를 위한 기본적인 역할을 하고 있으며, 지속적인 골 개조가 일어나는 활동적인 조직으로 파골세포에 의한 골 흡수와 조골세포의 골 형성 과정이 균형있게 순서적으로 진행된다<sup>1)</sup>.

파골세포는 단핵세포-탐식세포 계통의 조혈전구세포 (hematopoietic precursor)에서 분화되며 골 기질을 흡수시킨다. 파골세포는 골 내막에 위치하며, 골 조직에 존재하는 유일한 다핵세포이고 흡수가 일어나는 골면에 근접하여 주름 변연이 나타난다<sup>1)</sup>. 또한 파골세포는 tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)와 풍부한 calcitonin(CT) 수용체를 가지는 특성이 있으며 산 생성이 활발하고 흡수와(Howship's lacuna)를 형성한다. 파골세포는 골수 내의 조혈 단핵세포로부터 유래하고, 이 단핵전구세포는 혈액 내로 순환되며 골 내막층에서 전구세포들이 증식하고 서로 융합하여 다핵세포를 형성하며, 골을 흡수한다고 알려져 있다<sup>2)</sup>.

골 기질의 성분을 주로 합성하는 조골세포는 미분화 간엽세포에서 유래된 전조골세포가 골 표면에 도달하여, 성숙한 조골세포로 분화되고, 10~20%가 골세포로 되어 석회화 조직에 묻

힌다고 알려져 왔다. 활발한 대사작용으로 석회화 과정에 중요한 역할을 하는 조골세포는 골 표면에 근접한 세포질 내에 파립형질내세망(rough endoplasmic reticulum, RER)이 발달해 있고, 세포막에 염기성 인산분해 효소를 갖고 있다<sup>3)</sup>.

파골세포가 골에 부착하여 산화 및 단백질 분해과정에 의해 골을 계속적으로 흡수하면 조골세포가 그부위에서 골기질을 구성하는 교원섬유 및 proteoglycan, osteonectin, osteopontin, sialoprotein 그리고 osteocalcin과 같은 단백질을 형성하여 골 석회화가 일어나는 것으로 알려져 있다. 포유류 세포막의 phospholipid에 있는 지방산인 arachidonic acid는 calcium-dependent phospholipase A2나 phosphatidyl inositol-specific phospholipase C에 의해서 생성된다<sup>4)</sup>.

이 두가지 세포는 여러 종류의 호르몬, 염증매개물질, 그리고 성장 인자에 의하여 영향을 받으며, 골모 세포와 파골세포 기능의 부조화는 골양이 증가된 "골항진증"과 골양이 감소된 "골다공증"과 같은 골격계의 이상을 야기시키고 이와 관련된 세포수준의 연구가 활발히 이루어지고 있다<sup>5,6)</sup>.

하지만 파골세포가 조혈전구세포에서 파골세포로 분화를 일으키는 정확한 signal이나 이때 작용하는 개개 유전자의 발현에 관한 연구는 충분히 이루어지지 못한 상황이다.

최근에는 DNA sequencing기술과 gene expression arrays 방법의 발달로 수많은 gene들의 parallel expression에 관한 연구가 이루어지고 있다. Gene expression array는 glass slide나 nylon filter와 같은 solid matrix상에서 고유의 com-

plementary DNA를 deposit시켜서 만든다<sup>7-9</sup>).

Array technique은 적용범위가 광범위해서 생리적, 병적 상태의 global gene expression의 변화 연구까지도 사용된다. 이 방법을 이용해서 이미 쥐의 연령증가에 따른 생리적 상태<sup>10</sup>, sleep cycle 동안 gene expression의 변화<sup>11</sup>, 섬유모세포의 serum stimulation<sup>12</sup>, irradiation-induced stress<sup>13</sup>, yeast sporulation<sup>14</sup>, yeast의 호기성 상태에서 혐기성으로 옮겼을 때의 diauxic shift<sup>6</sup> 등을 보고한 바 있으며, 염증질환<sup>15</sup>이나 신 생물등의 병적 상태에서의 유전자 발현 변화에 관한 연구들<sup>16-21</sup>도 활발히 이루어지고 있다.

이 연구에서는 골을 흡수시킨다고 알려진 파골세포와 이 세포의 기원인 대식세포의 유전자 발현현상을 규명하기 위하여 mouse macrophage 세포주(RAW264.7)와 이 세포에 ODF(osteoclast differentiation factor)를 처리하여 파골세포로 분화시킨 OCLs(osteoclast like cell)에서 total RNA를 분리하고 cDNA array technique을 이용하여 분화전과 분화후의 유전자발현의 변화를 규명하고자 하였다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 세포 배양 및 파골세포 분화

RAW264.7 세포주는 American type culture collection(Manassas, VA)에서 구입하였으며, 세포배양은 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 5% CO<sub>2</sub>와 37℃의 온도조건에서 배양하였다. RAW264.7 세포주를 이용한 파골세포 분화의 과정은 10% FBS가 포함된 α-MEM 배지에서 배양하였으며, 배양기간 중 recombinant human ODF를 50ng/ml의 농도로 처리하여 5일간 배양하였다. 분화된 파골세포는 TRAP 염색법을 이용하여 TRAP 양성인 세포들을 구별하였다.

### 2. RNA 준비

총 RNA의 준비에는 Trizol reagent(Life technologies, Inc.)를 이용하였다. RAW264.7 세포주와 파골세포양 세포를 6 well plate에 5일간 배양한 후 1ml의 Trizol reagent를 첨가하여 세포를 수확하였다. 원심분리용 튜브로 샘플을 옮기고 200μl의 클로로포름을 첨가하여 진탕한 후 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 새로운 원심분리용 튜브로 옮겨 500μl의 이소프로필 알코올을 첨가하여 혼합한 후 원심분리하여 총 RNA를 준비하였다.

### 3. cDNA array 검색

Clontech(Palo Alto, CA)에서 1176cDNA spot grid가 있는 Mouse Atlas cDNA expression arrays를 구입하였으며, cDNA 프로브 합성에는 총 RNA 5μg, 10 x dNTP 및 a-<sup>32</sup>P

dATP, 역전사 효소를 사용하여 제조사의 주어진 방법으로 합성하였다.

프로브 합성 후 정제 컬럼을 이용하여 프로브를 정제하여 사용하였다.

### 4. 역전사-효소중합반응(RT-PCR)

각각의 총 RNA(10μg) 샘플을 DNase I (Roche)으로 처리하고 oligo(dT) 12-18 primer와 Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.)를 이용하여 single-stranded cDNA를 역전사하였다. 역전사-효소중합반응의 initial denaturing은 gene-specific primer를 이용해서 Gene Amp PCR system 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA)에서 95℃로 5분간, 그 후 95℃에서 30초간 35회 cycle 한 후, 72℃에서 1분간 시행하였다. 표준화를 위해 GAPDH를 이용하였다.

Primers는 다음과 같다. : PKCbeta II -F, 5' AAAGTC-GAACGCAAGGAGATT-3', PKCbeta II -R, 5' -TTAGC-TCTTGAATTCAGGTTTAAAAATTC-3' ; for GAPDH-F, 5' -CAAGGCTGTGGCAAGGTCA-3', GAPDH-R, 5' -AGGTGGAAGAGTGGGAGTTGCTG-3'

## III. 실험성적

### 1. 실험실에서 파골세포분화

50ng/ml의 ODF를 RAW264.7 cell의 배양액에 첨가하여 5일간 배양하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 파골세포의 특징을 가진 다핵 세포들로 분화됨을 관찰할 수가 있었으며, 이 세포들을 TRAP 염색하였을 때 TRAP 양성인 세포들임을 확인할 수 있었다.

### 2. 파골세포 분화시 다양한 유전자의 발현

RAW264.7 세포들의 파골세포양 세포로 분화가 확인됨에 따라 분화 전· 후에 발현되는 유전자들을 분석하기 위해 cDNA array를 이용하였다. cDNA array의 프로브 합성에 사용할 총 RNA는 RAW264.7 세포주(분화 전)와 ODF(50ng/ml)를 처리하여 5일간 배양(분화 후)한 세포로부터 Trizol 용액을 이용하여 얻었다. 이들 총 RNA를 주형으로 동위원소 표지된 α-<sup>32</sup>P dATP와 역전사 효소를 이용하여 cDNA 프로브를 합성하였다. 이들 프로브를 이용하여 cDNA array 실험을 수행하여 Fig. 2의 결과를 얻을 수 있었다. Array상의 전체 1176개의 유전자 중 약 36%에 해당하는 유전자들이 이들 세포에서 발현되고 있음을 확인할 수 있었으며, 이중 2.5배 이상의 발현에 차이를 보이는 유전자들을 Table 1에 표시하였다.

분화 전 단계의 세포인 RAW264.7 세포주에서 2.5배 이상

**Table 1.** List of induced and downregulated genes during osteoclastogenesis of RAW 264.7 cell line (Atlas Mouse cDNA 1.2 Array)

Gene name	Expression level	Gene location
	RAW264.7	
Octamer-binding transcription factor 8(OCT8, OTF8); POU domain class 3 transcription factor 3(POU3F3); brain - specific homeobox/POU domain protein 1(BRN1)	2.5% ↑	A06i
T-box protein 2(TBX2)	2.5% ↑	A07h
Groucho gene-related protein(GRG); amino enhancer of split protein(AES)	2.5% ↑	A13m
Pro-opiomelanocortin-alpha(POMC)	10% ↑	D11f
Protein kinase C beta II type(PKC-beta 2;PKCB)	10% ↑	E11i
Phosphatase & Tensin homolog(PTEN) ; mutated in multiple advanced cancers protein 1(MMAC1)	2.5% ↑	F14m

Gene name	Expression level	Gene location
	OCLs	
TCRA enhancer-binding factor-interacting protein 1(TEBFP1);ALY	2.5% ↑	A10h
Early growth response protein 3(EGR3)	2.5% ↑	B01c
Early growth response protein 1(EGR1) ; Kruppel box 24protein(KROX24)	2.5% ↑	B02m
Epidermal growth factor receptor kinase substrate	2.5% ↑	B03a
Signal transducer and activator of transcription 6(STAT6)	2.5% ↑	B09f
Cylin D1(CCND1; CYL1)	2.5% ↑	B10g
Prothymosin alpha(PTMA)	2.5% ↑	B12f
Osteopontin(OP); bone sialoprotein 1; minopontin; early T-lymphocyte activation 1 protein(ETA1); secreted phosphoprotein 1(SPP1); calcium oxalate crystal growth inhibitor protein	10% ↑	B13b
CD14 monocyte differentiation antigen; LPS receptor(LPSR); myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein	10% ↑	C01i
Prothymosin beta 4(TMSB4; PTMB4)	2.5% ↑	D12d
Insulin-like growth factor IA (IGF1A); somatomedin	2.5% ↑	D14e
Small inducible cytokine subfamily A member 4(SCYA4); macrophage inflammatory protein 1 beta (MIP1-beta; MIP1B)	2.5% ↑	D14j
Disabled homolog 2(Drosophila)	2.5% ↑	F02c
Cathepsin C(CTSC) ; CTSJ; dipeptidyl peptidase I (DPPI); dipeptidyl transferase	2.5% ↑	F04a
Laminin gamma 1 subunit(LAMC1) ; laminin gamma 1 subunit(LAMC1); laminin B2 subunit	2.5% ↑	F08f
DNA topoisomerase II alpha(TOP2A)	2.5% ↑	F10b

의 발현을 보이는 유전자는 osteopontin, LPS receptor, PTMA 등을 포함하여 16개의 유전자들이 해당됨을 확인할 수 있었다. 또한 파골세포로 분화된 후에 그 발현이 증가하는 유전자들은 POMC, PKC beta II, TBX II 등 6개의 유전자들을 확인할 수 있었다.

### 3. RT-PCR에 의한 array의 확인

cDNA Array를 이용하여 얻은 결과를 확인하기 위하여 PKC beta II 유전자의 발현양상을 RT-PCR를 이용하여 확인하였다. PKC beta II 유전자의 전체염기서열을 이용하여 forward primer와 reverse primer(PKCbetaII-F, 5' -

AAACTCGAACGCAAGGAGATT-3' 와 PKCbetaII-R, 5' -TTAGCTCTTGAATTCAGGTTTTAAAAATTC-3')를 주문 합성하였으며, Control 유전자인 GAPDH의 primers (GAPDH-F, 5' -CAAGGCTGTGGGCAAGGTCA -3', GAPDH-R, 5' -AGGTGGAAGAGTGGGAGT TGCTG-3') 들도 주문 합성하였다.

앞서 준비한 것과 동일한 조건에서 각각의 total RNA를 준비하여 cDNA를 합성한 후 각각의 primer조합을 이용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 3 에서와 같이 분화 후의 샘플에서 PKC beta II 유전자의 예상 크기와 같은 밴드의 PCR 산물이 나타남을 확인할 수 있었으며, 이 PCR 산물의 염기서열을 분석한 결과 PKC beta II 유전자임을 확인할 수 있었다.

#### IV. 총괄 및 고안

골 조직은 태생 후에도 계속적인 골흡수와 형성으로 이어지는 개조가 반복되는 동적인 조직이며 이러한 골조직의 성장과 개조는 조골세포, 파골세포 및 그 전구세포의 증식, 분화 및 활성에 영향을 미치는 여러 가지 인자에 의하여 조절되고 있다.

TNF-related ligand에 의해 활성화된 생화학적 경로는 세포의 apoptosis, 분화, 증식, 그리고 생존과 같은 다양한 생물학적 반응이 조화되어 있다. Caspase는 apoptosis를 유도하는 생화학적 현상을 유도하며, 반면에 NF- $\kappa$ B는 세포죽음을 억제하는 것으로 알려져 있다. 또한 NF- $\kappa$ B는 싸이토카인과 adhesion molecule과 같은 다양한 유전자를 조절하여 면역매개 염증반응을 유지하며 조절하는데 매우 중요한 역할을 수행한다<sup>22)</sup>.

TNF superfamily의 해당 수용기인 TNFR1, TNFR2, CD30, CD40, DR3/TRAMP/Apo-3 그리고 TRAIL receptor는 자극 받거나 과 발현되면, JNK를 활성화시키는 신호전달물질인 TRAF2 (TNF receptor associated factor 2)를 세포질로 위치시킨다. 파골세포의 분화와 관련되어 많은 연구자들이 조혈전구세포(hematopoietic precursor cell)를 이용하여 여러 가지 물질이나 co-culture system을 이용하여 이러한 세포가 파골세포로 분화시키는 시스템을 확립하였으나, 어떤 신호전달경로를 사용하며 어떤 수용기와 라이겐드가 관여하는지는 알 수 없었으나 최근에 TNF superfamily에 속하는 OPGL과 같은 물질이 이러한 역할을 수행한다는 것이 보고되었다<sup>23)</sup>.

파골세포의 분화과정에는 많은 유전자의 발현이 증가 또는 감소할 것이다. 그동안 subtraction hybridization, differential display PCR 등과 같은 방법으로 파골세포 분화에 따라 발현의 변화가 있는 유전자가 보고되어져 왔으나 소수의 유전자만을 규명할 수 있었다. 이러한 한계를 극복할 수 있는 방법으로 다수의 유전자 분석을 동시에 할 수 있는 cDNA array 검색법이 최근 개발되어 암발생기전 연구 등 다양한 분야에서 사용되고 있다.

이 연구에서는 cDNA array 검색법이 파골세포의 분화 연구에 사용될 수 있는지를 검증하고자 하였다. RAW 264.7 세포주를 이용하여 파골세포로 분화하는 조건을 확립한 후, 파골세포로의 분화 전·후 유전자 발현양상을 cDNA array를 이용하여 규명하였다.

RAW 264.7 세포주는 ODF (50ng/ml)를 처리한 배양에서 파골세포로 분화됨을 multi-nucleate cell과 TRAP 염색을 통하여 확인할 수 있었다. cDNA array를 통해 얻은 결과 중 분화 후 감소한 유전자 Osteopontin, Cyclin D1, Cathepsin C 등은 분화과정에서 감소한다고 기존에 알려진 유전자들이다<sup>24,25)</sup>. 분화 후 발현이 증가한 유전자중 PTEN은 tumor suppressor protein이며 TNF에 의해 유도되는 nuclear factor  $\kappa$ B 활성을 저해시킨다고 알려져 있다<sup>26)</sup>. PKC beta 유전자는 isoform I, II가 있으며, rat osteoclast에서 세포형태를 유지

하는데 중요한 유전자로 알려져 있다<sup>27)</sup>. 또한 T 임파구의 motility와 관련되어 있으며<sup>28)</sup>, integrin과 함께 cell fusion에 중요한 역할을 할 것으로 추정된다<sup>29)</sup>. POMC는 macrophage nitric oxide synthase의 autocrine modulation 작용과 관련되어 중요한 유전자로 알려져 있다<sup>30)</sup>. 따라서 이들 결과의 체계적인 분석을 통하여 이들 유전자의 효소적 특성이나 조절에 대한 연구 및 파골세포의 분화기작등의 연구 등에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

#### V. 결 론

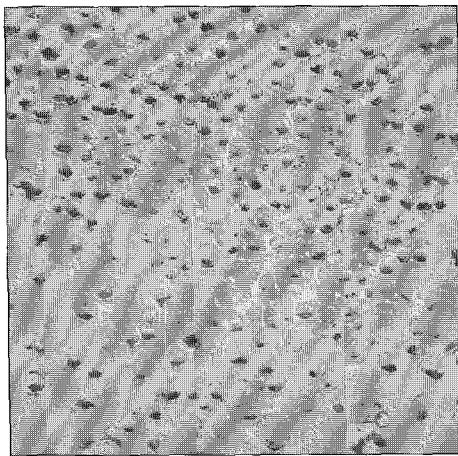
RAW 264.7 세포주의 파골세포 분화 모델에서 분화에 따른 유전자 발현의 변화 양상을 1176개의 cDNA array를 이용하여 분석한 결과 다수의 증가 또는 감소하는 유전자가 밝혀졌으며 이 중 기존의 연구결과를 뒷받침하는 것들이 있으므로 cDNA array가 파골세포와 관련한 유전자 발현 연구에 유용한 수단이 될 수 있다.

#### 참고문헌

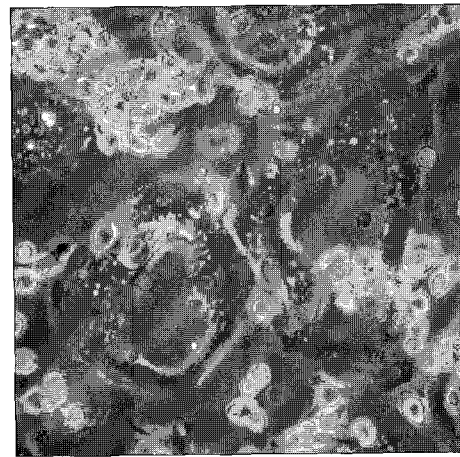
1. Meghji S : Bone remodelling. Br Dent J 172:235-242, 1992.
2. Ralph P, Nakoinz I : Antibody-dependent killing of erythrocyte and tumor targets by macrophage-related cell lines : Enhancement by PPD and LPS. J Immunol 119:950-954, 1997.
3. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, et al. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by ssteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. Endocrinology 122:1373-1382, 1988.
4. Kuehi FA Jr, Egan RW : Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. Science 210:978-984, 1980.
5. Rodan GA, Martin TJ : Role of osteoblasts in hormonal control of bone resorption. Calcif Tissue Int 33:349-351, 1981.
6. Udagawa N, Takahashi N, Akatsu T, et al. : The bone marrow derived stromal cells line MC3T3/PA6 and ST2 support osteoclast-like cell differentiation in cultures with mouse spleen cells. Endocrinology 125:1805-1813, 1989.
7. Chalilfour LE, Fahmy R, Holder EL, et al. : A method for analysis of gene expression patterns. Anal Biochem 216:299-304, 1994.
8. DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO : Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. Science 278:680-686, 1997.

9. Schena M, Shalon D, Davis RW, et al. : Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270:467-470, 1995.
10. Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, et al. : Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285:1390-1393, 1999.
11. Cirelli C, Tononi G : Difference in brain gene expression between sleep and waking as revealed by mRNA differential display and cDNA microarray technology. *J Res Suppl* 1:44-52, 1999.
12. Iyer VR, Eisen MB, Ross DT, et al. : The transcriptional program in the response of human fibroblasts to serum. *Science* 283:83-87, 1999.
13. Amundson SA, Bittner M, Chen Y, et al. : Fluorescent cDNA microarray hybridization reveals complexity and heterogeneity of cellular genotoxic stress responses. *Oncogene* 18:3666-3672, 1999.
14. Chu S, DeRisi J, Eisen M, et al. : The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* 282:699-705, 1998.
15. Heller RA, Schena M, Chai A, et al. : Discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:2150-2155, 1997.
16. Backert S, Gelos M, Kobalz U, et al. : Differential gene expression in colon carcinoma cells and tissues detected with a cDNA array. *Int J Cancer* 82:868-874, 1999.
17. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. : Molecular classification of cancer : class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286:531-537, 1999.
18. Khan J, Simon R, Bittner M, et al. : Gene expression profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays. *Cancer Res* 58:5009-5013, 1998.
19. Moch H, Schraml P, Buvendorf L, et al. : High-throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma. *Am J Pathol* 154:981-986, 1999.
20. Shim C, Zhang W, Rhee CH, et al. : Profiling of differentially expressed genes in human primary cervical cancer by complementary DNA expression array. *Clin Cancer Res* 4:3045-3050, 1998.
21. Wang K, Gan L, Jeffery E, et al. : Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray. *Gene* 229:101-108, 1999.
22. Wiley SR, Schoolley K, Smolak PJ, et al. : Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-682, 1995.
23. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. : A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 89:309-319, 1997.
24. Petre CE, Wetherill YB, Danielsen M, et al. : Cyclin D1 : mechanism and consequence of androgen receptor co-repressor activity. *J Biol Chem* 19:1-39, 2001.
25. Teral K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, et al. : Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 14:839-849, 1999.
26. Gustin JA, Maehama T, Dixon JE, et al. : The PTEN tumor suppressor protein inhibits tumor necrosis factor-induced nuclear factor  $\kappa$ B activity. *J Biol Chem* 276:27740-27744, 2001.
26. Volkov Y, McGrath S, Eidhin DN, et al. : Crucial importance of PKC- $\beta$ (1) in LFA-1-mediated locomotion of activated T cells. *Nat Immunol* 2:508-514, 2001.
27. Holloway WR, Collier FM, Herbst RE, et al. : Complex shape changes in isolated rat osteoclasts: Involvement of protein kinase C in the response to calcitonin. *Calcif Tissue Int* 61:306-312, 1997.
29. Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME : Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C(PKC) and link PKC to specific  $\beta$ 1 integrins. *J Biol Chem* 276:25005-25013, 2001.
30. Star RA, Rajora NR, Huang J, et al. : Evidence of autocrine modulation of macrophage nitric oxide synthase by  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:8016-8020, 1995.

사진부도 ①

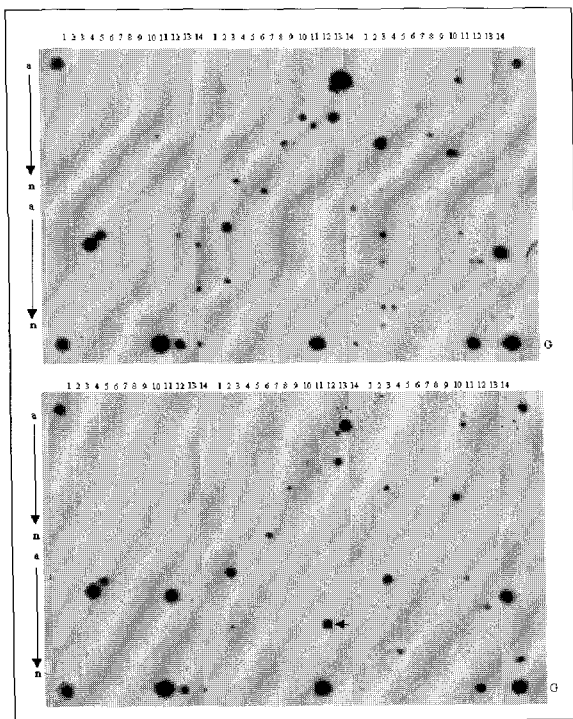


RAW 264.7

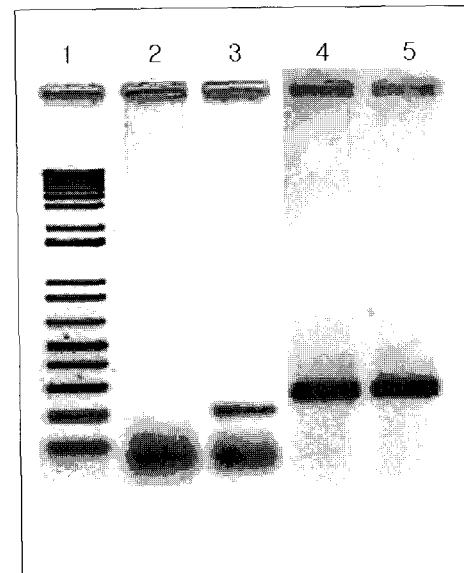


Osteoclast like cells

**Fig. 1.** Osteoclastogenesis of RAW264.7 cell line. RAW264.7 cells were cultured in 48-well plates with ODF(50ng/ml) added at day 0 and during a medium change on day 3. Osteoclast formation was assessed by counting multinucleated, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive cells present on day 5.



**Fig. 2.** Atlas mouse cDNA array. The probes were prepared from RAW264.7 cell line(left) or osteoclast like progenitor cell(right) treated with ODF(50ng/ml)for 5 days. Capital letters designate sextants. small letters indicate row positions and numbers refer to columns. Section G is the bottom row containing the housekeeping and negative controls. Arrow point to PKC beta- II and POMC. For cDNA identification, consult Clontech's Atlas array web page(<http://www.atlas.clontech.com>).



**Fig. 3.** RT-PCR analysis of PKC beta II at RAW 264.7 cell and OCLs. Each sample of total RNA (10 ug) was treated with DNase I (Roche) and reversely transcribed to single-stranded cDNAs using oligo(dT)12-18 primer with Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.). RT-PCR was carried out for 5 min at 95°C for initial denaturing, followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1min, in the Gene Amp PCR System 2400 (Applied Biosystems, Foster City, CA), using the gene-specific primers as those chosen from database. GAPDH was used for normalization.

- Lane 1. DNA size marker
- Lane 2. RAW 264.7
- Lane 3. PKC II in differentiated osteoclast-like cell
- Lane 4. GAPDH in RAW 264.7
- Lane 5. GAPDH in Differentiated osteoclast-like cell

**Abstract**

**IDENTIFICATION OF GENES INVOLVED IN OSTEOCLAST  
DIFFERENTIATION BY CDNA ARRAY ANALYSES**

Young-Jun Cho, Chang-Seop Lee, Zang-Hee Lee\*, Sang-Ho Lee.

*Department of Pediatric Dentistry, Microbiology\*, College of Dentistry, Chosun University*

To examine the global gene expression of osteoclastogenesis-related genes in RAW 264.7 and its differentiated OCLs through the use of Atlas Mouse cDNA Array 2.1 membranes printed with 1176 well-characterized mouse genes involved in biology. Both samples were screened in parallel using cDNA expression arrays. The array results were additionally validated using RT-PCR. The results of cDNA arrays showed that 6 genes were up-regulated >2.5-fold (PKC beta II, POMC, PTEN, etc) and 16 genes were down-regulated >2.5-fold (Osteopontin, Cyclin D1, Cathepsin C, PTMA, etc) in both samples at the mRNA level. RT-PCR analysis of PKC beta II of these differentially expressed genes gave result consistent with cDNA array findings. The result of osteoclastogenesis showed that the PKC beta II gene was overexpressed in OCLs compared with RAW264.7 cell line. Osteoclastogenesis-related genes are differentially expressed in RAW264.7 cell line and its differentiated OCLs. its gene overexpression correlates with osteoclast differentiation in RAW264.7 cell line.

**Key words** : Genes involved in osteoclast differentiation, cDNA array