

## 히스톤 탈아세틸화 효소 억제제 trichostatin A가 C2C12 myoblast 세포 분화와 세포주기 조절인자의 발현에 미치는 영향

이 원 준\*

이화여자대학교 건강과학대학

Received June 7, 2007 / Accepted June 27, 2007

**Effects of Histone Deacetylase Inhibitor, Trichostatin A, on the Differentiation of C2C12 Myoblasts and the Expression of Cell Cycle Regulators.** Won Jun Lee\*. *College of Health Science, Ewha Womans University* – The purpose of this study was to determine the modulating effects of histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, on the differentiation of mouse C2C12 myoblasts. We demonstrated that trichostatin A induced morphological changes of C2C12 myoblasts into smooth muscles and significantly increased the gene expression of smooth muscle markers including smooth muscle  $\alpha$ -actin and transgelin. These results were due to the change in the expression level of cell cycle regulators in trichostatin A-treated C2C12 cells. Real-time PCR data revealed that cyclin dependent kinase inhibitor, p21, mRNA expression was significantly increased in trichostatin A-treated C2C12 cells. However, trichostatin A rapidly decreased cyclin D1 mRNA expression necessary for cell cycle progression in 24hr after treatment. In conclusion, the strong inhibitory effects of trichostatin A on histone deacetylation induced transdifferentiation of C2C12 myoblasts into smooth muscle cells and these results are partly due to the changes in the expression of cell cycle regulators such as p21 and cyclin D1.

**Key words** – Histone deacetylase, smooth muscle, differentiation, cell cycle regulators, trichostatin A

### 서 론

후천적 기작(epigenetic mechanism)이란 DNA의 염기 서열 변화 없이 유전자의 발현을 조절하는 생물학적 기능을 일컫는 용어이다. 히스톤(histone) 단백질은 DNA와 함께 뉴클레오솜(nucleosome)을 구성하는 요소이며, 히스톤 단백질의 구조는 여러 가지 posttranslational modification이 일어난다[26]. 이러한 히스톤 단백질의 변형 중 히스톤 아세틸화(acetylation)와 메틸화(methylation)는 DNA 메틸화와 함께 특정 유전자의 발현을 조절하는 중요한 후천적 기작이다. 이러한 뉴클레오솜 구조의 변화를 통해 유전자의 발현을 조절하는 히스톤 변형은 히스톤 꼬리의 아미노산인 라이신 잔기(lysine residue)에서 일어난다. 일반적으로 특정 유전자 발현이 활성화된 경우에는 히스톤 꼬리에 히스톤 아세틸화 효소(histone acetyltransferase, HAT)에 의해 아세틸화가 일어나 있는 반면, 히스톤 탈아세틸화 효소(histone deacetylase, HDAC)에 의해 탈아세틸화가 일어난 경우에는 특정 유전자 발현이 비활성화, 즉 유전자 발현이 억제된 경우이다[9,23]. 세포주기의 S phase동안 HAT는 아세틸 그룹을 히스톤 단백질의 라이신에 전이시키는 반응을 일으킴으로써 히스톤 단백질과 DNA와의 상호 친화력(affinity)을 감소시키는 역할을 하게 된다. 따라서 히스톤 단백질의 아세틸화는 염색질

(chromatin)의 구조를 매우 조밀하고 단단한 구조인 heterochromatin에서 느슨한 형태의 euchromatin의 형태로 변화시키는데, 이러한 형태의 DNA는 전사인자(transcription factors)의 접근을 용이하게 함으로써 결국 유전자의 발현을 활성화시킨다[5]. 이와는 상반된 반응인 히스톤 탈아세틸화가 HDAC 효소에 의해 일어나기도 한다. 탈아세틸화된 히스톤 단백질은 양전위를 노출하게 되고 이는 곧 음전위를 가지고 있는 DNA와의 친화력을 높이게 되어 매우 조밀한 구조의 heterochromatin을 형성함으로써 전사인자가 유전자 발현을 위해 promoter 지역으로 접근하는 것을 차단하여 특정 유전자의 발현을 억제하게 된다. 유전자의 지속적인 발현을 위해서는 이러한 후천적 기작이 유전자 발현의 활성화시키는 방향으로 충족되어야 한다.

본 연구에서 사용한 trichostatin A는 HDAC 억제제로서 여러 가지 암세포의 증식을 억제하는 것으로 보고되었다[17]. 세포 증식(proliferation)은 진핵 세포의 세포주기(eukaryotic cell cycle)에 의해 조절되며, 이는 4단계로 이루어져 있다(G1, S, G2, M). 진핵세포가 DNA와 전사인자간의 상호작용을 가능하게 하기 위해서는 염색질 재편성(chromatin remodeling)이 필수적이다[12]. 앞서 언급하였듯이 trichostatin A는 뉴클레오솜 히스톤 단백질의 탈아세틸화를 억제함으로써 염색질의 구조를 재편성한다. 이러한 DNA의 구조적 재편성은 여러 가지 암세포내의 cyclin dependent kinase(cdk) 억제제 유전자의 발현을 증가시키고, 이는 결국 retinoblastoma(Rb) 단백질의 인산화(phosphorylation) 상태를 저하시킴으로써 암세

\*Corresponding author

Tel : +82-2-3277-2563, Fax : +82-2-3277-2846

E-mail : jun@ewha.ac.kr

포들의 G1 phase arrest를 유발하게 되는 것이다. Cdk 억제제와 더불어 여러 다른 세포주기 조절인자(cell cycle regulators)들 또한 HDAC 억제제의 영향을 받아 암세포 증식을 억제한다고 보고되고 있다[1,21]. 하지만 HDAC 억제제인 trichostatin A가 암세포가 아닌 골격근 C2C12 myoblast 세포의 증식과 분화에 미치는 영향에 대한 연구는 부족한 실정이다.

근육의 형성과정은 세포내에서 근육특이 유전자들의 전사적 활성화에 의해 단핵의 myoblast에서 다핵의 myotube로의 형태적인 분화로 특정 지어진다[18]. 많은 선행연구들이 골격근 세포에 기초한 근육 형성과정을 밝히는데 있어서 분화가 진행되지 않은 C2C12 myoblast를 많이 이용하였다. 대부분의 연구들은 C2C12 myoblast 세포를 배양한 후 confluent한 상태가 되면 분화 배지로 세포를 배양하여 myotube로 분화를 유도하였으며, 이 과정에서 일어나는 근육 형성과정의 분자적 기작을 연구하였다[4,10,16,22]. 하지만 본 연구에서는 mouse 골격근 C2C12 myoblast 세포를 분화 배지로 유도하지 않은 상태에서 trichostatin A가 C2C12 세포에 미치는 영향에 초점을 두었다. 따라서 구체적인 본 연구의 목적은 강력한 HDAC 억제제인 trichostatin A가 C2C12 myoblast 세포의 증식과 분화에 어떠한 영향을 미치는지 세포주기 조절인자를 중심으로 살펴보는데 있다.

## 연구방법

### 시약 및 세포주

Fetal bovine serum, antibiotic, 세포배양 접시는 BioClone, Sigma, Falcon사로부터 각각 구입하였다. PCR primer는 Cosmo사로부터 제작하여 사용하였으며, trichostatin A는 Sigma-Aldrich사로부터 구입하여 사용하였다.

### 세포 배양 및 trichostatin A 처리

Mouse C2C12 myoblast 세포는 10% FBS, 100 U/ml의 페니실린 G, 100 µg/ml streptomycin sulfate를 함유하고 있는 Dulbecco's Modified Eagles' Medium(DMEM)을 이용하여 37°C(5% CO<sub>2</sub>)의 incubator에서 배양하였다. 세포는 6 wells plate에서 배양하였으며, 각각의 30 mm well에 2 ml당 2×10<sup>4</sup> 세포를 분주하고 24시간 후 여러 가지 농도(0, 8, 16, 31.3, 62.5, 125 nM)의 trichostatin A를 처리하여 3일 동안 배양하였다. Trichostatin A 처리 시간에 따른 세포 형태와 유전자 발현의 변화를 살펴보기 위하여 세포를 2 ml당 2×10<sup>4</sup> 세포를 분주하고 24시간 후 62.5 nM의 trichostatin A를 24, 48, 72시간 동안 처리한 후 대조군과 비교하였다. 모든 실험은 똑같은 조건의 세포 3 세트를 구성하여 실시하였다.

### Immunofluorescent staining

C2C12 myoblast 세포를 6 wells 배양 plate에 고정시키기

위하여 3.7% formaldehyde(pH 7-8)를 함유하고 있는 PBS 1 ml를 각각의 well에 10분간 처리하였다. 그 후 PBS 용액으로 고정된 세포를 헹군 후 0.2% trinton X-100과 10% goat serum을 포함하고 있는 PBS로 상온에서 15분간 처리하여 세포를 permeabilization했다. 다음은 C2C12 myoblast 세포에 mouse IgG monoclonal smooth muscle  $\alpha$ -actin primary 항체 (Sigma, St. Louis, MO)를 1:1000 비율로 희석시킨 600 µl의 PBS를 각각의 well에 상온에서 30분간 배양시켰다. 다음 세포는 PBS로 3번 씻어낸 후 1:250 비율로 희석된 Alexa488- conjugated goat anti-mouse IgG secondary 항체(Molecular Probes, Eugene, OR)로 상온에서 30분간 더 배양하였다. 마지막 단계로서 세포를 PBS로 3번 헹군 후 핵의 변화를 살펴보기 위하여 1.5 µg/ml의 4',6-diamidino-2-phenylindole(DAPI)를 이용하여 세포를 염색한 후 PBS로 3번 헹구었다. 세포 배양 plate상에서의 smooth muscle  $\alpha$ -actin protein 단백질의 발현 정도는 디지털 이미지 체계를 갖춘 Axiovert 200 epifluorescence 현미경 (Zeiss, Germany)을 이용하여 사진 촬영을 하여 관찰하였다.

### Total RNA 추출과 complementary DNA(cDNA) 합성

대조군과 trichostatin A로 처리된 세포를 RNeasy RNA extraction kit(Qiagen, Valencia, CA)을 이용하여 추출하였다. 그 다음 추출된 RNA를 ultrapure water에 용해시킨 후 ultraviolet(UV) 260 nm에서 농도를 측정하였다. cDNA는 0.5 µg의 total RNA와 first strand cDNA synthesis kit (Roche)을 이용하여 합성하였다. cDNA 합성조건은 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 95°C에서 5분순으로 진행되었고, final volume은 20 µl로 하였다.

### Real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR)

Transgelin, smooth muscle  $\alpha$ -actin, p21, cyclin D1 messenger RNA(mRNA) 발현을 측정하기 위하여, double-stranded DNA dye인 SYBR Green(Perkin Elmer, Boston, MA)을 이용하여 fluorescence real-time PCR을 실시하였다. PCR 조건은 총 4 단계로 구성되어 있으며, 1 단계는 50°C, 2분으로 1 cycle이며, 2 단계는 95°C, 10분이며, 3 단계는 총 30 cycles의 95°C, 15초와 60°C, 1분으로 구성되었다. 마지막 단계에서는 95°C에서 15초, 60°C에서 20초, 95°C, 15초로 구성되었다. 본 실험에서 사용한 primer sequences는 표 1에 나타난 바와 같다. SYBR Green 분석은 ABI PRISM 7700 system(PE Applied Biosystems)을 이용하였으며, 모든 샘플은 최소한 2회 이상 반복 측정하였으며, 각각의 target mRNA의 발현은 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA양으로 보정하였다.

### 자료분석

본 실험에서 얻은 자료는 SPSS(version 12.0) 통계 프로그램

Table 1. Primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primers	Reverse primers
Smooth muscle $\alpha$ -actin	CAGGCATGGATGGCATCAATCAC	ACTCTAGCTGTGAAGTCAGTGTGC
Transgelin	ACCAAGCCTTCTCTGCCTCAAC	GCCACACTGCACTACAATCCAC
p21	GCTGCTTGCACTCTGGTGT	TCTGCCCTTGGAGTGATAGA
Cyclin D1	TGAACTACCTGGACCGCTTC	CCACTTGAGCTTGTTCACCA
GAPDH	ATGACAATGAATACGGCTACAGCAA	GCAGCGAACTTTATTGATGGTATT

을 이용하여 처리하였다. 측정치는 평균±표준오차(Mean± SE)로 표시하였으며, 그룹간의 비교를 위하여 one-way ANOVA와 Tukey's post-hoc test를 실시하였으며, 통계적 유의수준은  $\alpha=0.05$ 로 설정하였다.

**결 과**

**Immunofluorescent staining**

Fig. 1은 대조군과 trichostatin A를 3일간 처리한 C2C12 myoblast 세포를 smooth muscle  $\alpha$ -actin(녹색)과 DAPI(푸른색) 항체로 이중 염색한 후 형광 현미경으로 찍은 사진이다. 본 연구에서는 HDAC 억제제인 trichostatin A 31.3 nM을 C2C12 myoblast 세포에 3일간 처리한 결과 형태학적으로 C2C12 myoblast 세포가 smooth muscle로 분화함을 보였다(Fig 1. c, d). 또한 이들 세포에서는 핵의 증가가 대조군 세포에 비해 많이 억제되었음을 보여주었다. 그 반면 대주군 세포에서는 smooth muscle  $\alpha$ -actin으로 염색된 세포를 전혀 찾

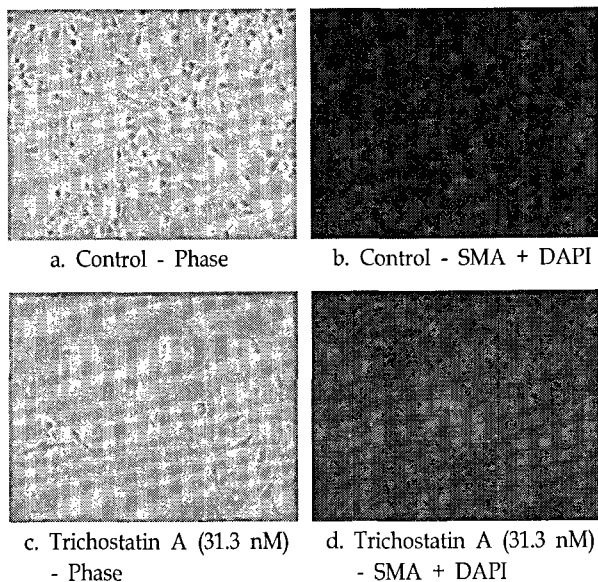


Fig. 1. Immunofluorescent staining images of differentiating C2C12 myoblasts after trichostatin A treatment. Smooth muscle  $\alpha$ -actin and DAPI immunofluorescence and corresponding phase contrast images. Smooth muscle  $\alpha$ -actin is stained fluorescent green and nuclei are fluorescent blue.

아 볼 수 없었으며, 세포가 3일간 매우 활발히 증식하였음을 DAPI 염색을 통해 알 수 있었다(Fig 1. a, b). 이러한 결과는 trichostatin A가 세포 증식과 분화에 관련된 중요한 유전자들의 발현을 조절한 것으로 사료된다.

**Smooth muscle marker 유전자의 발현 변화**

Smooth muscle  $\alpha$ -actin과 transgelin(smooth muscle 22 protein) 유전자는 smooth muscle에만 특징적으로 발현되는 유전자로서 smooth muscle의 지표로서 가장 널리 쓰이고 있다. 본 연구에서 real-time PCR을 이용하여 trichostatin A를 처리한 C2C12 myoblast 세포에서 이들 유전자의 mRNA 변화를 살펴보았다.

C2C12 myoblast 세포를 plate에 분주를 한 후 24 시간이 경과한 후 여러 농도의 trichostatin A(0, 8, 16, 31.3, 62.5, 125 nM)를 3일간 처리한 결과 smooth muscle  $\alpha$ -actin mRNA의 발현이 농도 의존적으로 증가하였으며, 본 연구에서 사용한 가장 높은 농도인 125 nM의 trichostatin A를 처리한 세포에서는 대조군에 비해 약 6배가량 유의하게 증가하였다(Fig. 2).

Fig. 3은 trichostatin A 처리 시간의 경과에 따른 smooth muscle  $\alpha$ -actin mRNA의 변화를 보여주는데, 62.5 nM의 trichostatin A 처리 후 24, 48시간 경과 후 smooth muscle  $\alpha$ -actin mRNA의 증가는 유의하지만 그 증가폭은 크지 않았

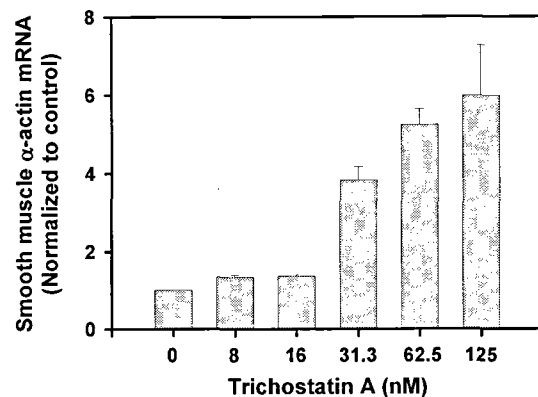


Fig. 2. Real-time PCR analysis of smooth muscle  $\alpha$ -actin after treatment with trichostatin A in C2C12 myoblasts. C2C12 cells were treated with 0, 8, 16, 31.3, 62.5, or 125 nM of trichostatin A for 3 day. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean±S.E. of 3 parallel replica experiments.

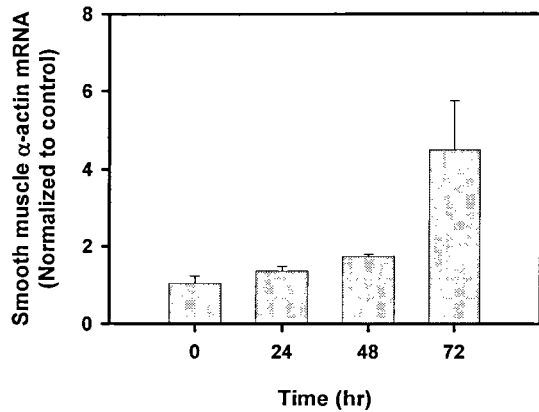


Fig. 3. Smooth muscle  $\alpha$ -actin mRNA expression after treatment with trichostatin A at different time points. C2C12 cells were treated with 62.5 nM of trichostatin A for 0, 24, 48, or 72 hr. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean $\pm$ S.E. of 3 parallel replica experiments.

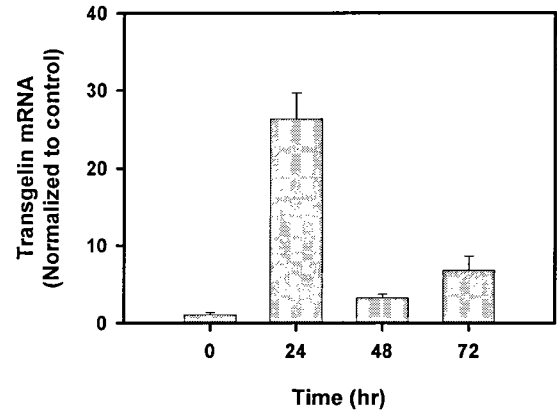


Fig. 5. Trangelin mRNA expression after treatment with trichostatin A at different time points. C2C12 cells were treated with 62.5 nM of trichostatin A for 0, 24, 48, or 72 hr. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean $\pm$ S.E. of 3 parallel replica experiments.

다. 하지만 72시간 경과 후 smooth muscle  $\alpha$ -actin mRNA의 발현은 대조군 세포에 비해 약 4배 이상 유의하게 증가하였다( $p < .05$ ).

여러 농도의 trichostatin A(0, 8, 16, 31.3, 62.5, 125 nM)를 3일간 처리한 결과 또 하나의 주요 smooth muscle marker인 trangelin mRNA의 발현이 농도 의존적으로 증가하여 최대 13배 이상 증가치를 보였다(Fig. 4).

처리 시간에 따른 trangelin mRNA 발현 변화를 보기 위해 C2C12 myoblast 세포에 62.5 nM의 trichostatin A를 24, 48, 72시간동안 각각 처리한 결과, 24시간 경과 후 trangelin mRNA의 발현이 25배 이상 급격히 증가하였으며, 48시간 이후부터는 대조군에 비해 여전히 증가된 발현을 보였지만 24

시간에 비해 많이 감소하였다(Fig. 5).

#### 세포주기 조절 유전자 p21과 cyclin D1 발현 변화

본 연구에서는 HDAC 억제제인 trichostatin A가 C2C12 myoblast 세포의 분화를 촉진시켰는데, 이러한 결과는 세포 주기 조절인자 유전자의 변화에 의해 세포의 증식이 억제되는 동시에 분화가 촉진되었음을 시사한다. 이를 검증하기 위하여 trichostatin A가 C2C12 myoblast 세포의 세포주기 조절인자인 p21과 cyclin D1 유전자의 발현 변화를 알아보았다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 p21 mRNA의 발현은 시간이 경과할수록 농도가 높아질수록 대체적으로 증가하는 경향을 보였다. 72시간 trichostatin A를 처리하였을 때 p21 mRNA

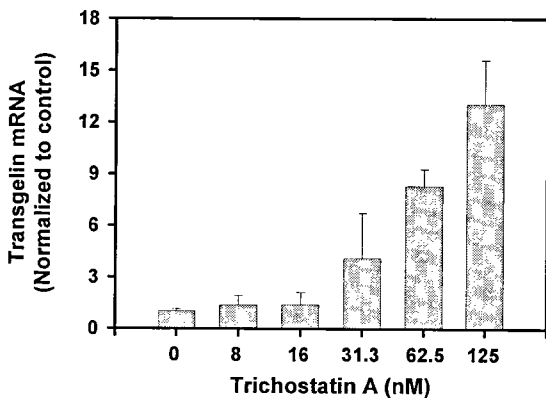


Fig. 4. Real-time PCR analysis of trangelin after treatment with trichostatin A in C2C12 myoblasts. C2C12 cells were treated with 0, 8, 16, 31.3, 62.5, or 125 nM of trichostatin A for 3 day. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean $\pm$ S.E. of 3 parallel replica experiments.

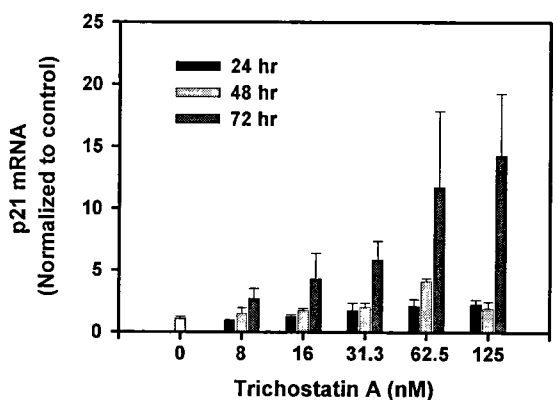


Fig. 6. Real-time PCR analysis of p21 after treatment with trichostatin A in C2C12 myoblasts. C2C12 cells were treated with 0, 8, 16, 31.3, 62.5, or 125 nM of trichostatin A for 1, 2, or 3 day. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean $\pm$ S.E. of 3 parallel replica experiments.

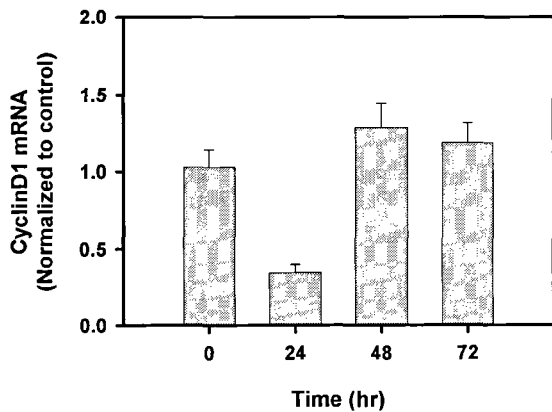


Fig. 7. Cyclin mRNA expression after treatment with trichostatin A at different time points. C2C12 cells were treated with 62.5 nM of trichostatin A for 0, 24, 48, or 72 hr. Data are normalized to control, and each graph bar represents the mean±S.E. of 3 parallel replica experiments.

는 해당 농도에서 가장 높은 증가치를 나타내었으며 본 연구에서 사용한 가장 높은 농도의 trichostatin A(125 nM)를 72 시간동안 처리하였을 때 p21 mRNA는 약 15배 이상 유의하게 증가함을 보였다(p<.05).

Trichostatin A 처리시간에 따른 cyclin D1 mRNA의 발현 변화는 Fig. 7에 나타난 바와 같다. 62.5 nM의 trichostatin A를 C2C12 myoblast 세포에 처리한 후 24시간이 경과하자 cyclin D1 mRNA가 50%이상 감소하였으며, 48시간 이후에는 급격히 감소되었던 cyclin D1 mRNA가 대조군 수준으로 회복되었으며, 72시간 경과 후에도 큰 변화가 없이 대조군 수준으로 발현이 유지되었다.

### 고 찰

히스톤이란 DNA와 복합적으로 뉴클레오솜을 구성하는 기본 단백질로서 이러한 뉴클레오솜이라는 작은 구성단위가 반복되어 모든 인간의 유전자가 포함된 염색질(chromatin)을 구성하게 된다[25]. 히스톤 변형, 즉 히스톤 아세틸화는 DNA 메틸화와 함께 DNA의 염기서열에는 변화가 일어나지 않은 상태에서 유전자의 발현을 조절하는 가장 핵심적인 후천적 기작이다[8]. 일반적으로 유전자내의 히스톤 단백질은 아세틸화가 일어나 있는 상태 또는, 탈아세틸화 상태로 존재하게 되는데, 이는 HAT와 HDAC 효소에 의해 각각 그 반응이 일어난다. 이러한 히스톤 단백질의 아세틸화 또는 탈아세틸화에 의한 염색질의 재구성은 특정 유전자의 전사(transcription)를 조절하는데 있어 매우 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다[9,23]. 히스톤 아세틸화는 일반적으로 유전자 발현이 활성화된 경우에 일어나며, HDAC 효소에 의한 탈아세틸화는 유전자의 발현을 억제시킨다[12,14]. 본 연구에서는

이러한 특정 유전자의 발현을 조절하는 기능이 있는 히스톤 구조의 재편성을 HDAC 효소 억제제인 trichostatin A를 이용하여 C2C12 myoblast 세포에 유도하였을 때 일어나는 유전자의 발현과 세포의 변화를 살펴보았다.

본 연구의 결과는 HDAC 억제제인 trichostatin A가 C2C12 myoblast 세포를 smooth muscle로 분화시켰다. trichostatin A를 C2C12 myoblast 세포에 처리한 후 형태학적으로 세포의 증식이 trichostatin A의 농도가 높아질수록 더욱 억제되는 것을 현미경상에서 뚜렷이 볼 수 있었으며, 또한 세포가 분화될 때의 특징인 길어짐(elongation)과 주위의 다른 세포들과의 융합(fusion) 현상이 일어났으며, smooth muscle의 전형적인 형태로 분화되었다. 또한 본 연구에서는 유전자의 직접적인 발현을 통해 smooth muscle로의 분화를 검증하기 위해 smooth muscle의 지표로 널리 쓰이는 smooth muscle α-actin과 transgelin mRNA의 변화를 살펴보았다. Trichostatin A는 농도 의존적(concentration-dependent)으로 smooth muscle α-actin과 transgelin mRNA의 발현을 최대 약 6배, 13배 정도 각각 증가시켰다. 형태학적인 변화는 물론 immunofluorescent staining과 smooth muscle marker 유전자 발현의 증가는 C2C12 myoblast 세포를 인위적으로 serum을 포함하지 않은 분화 배지로 배양하지 않은 상태에서 히스톤 단백질의 탈아세틸화를 억제시키자 smooth muscle로 분화함을 명백히 보여준다.

Trichostatin A에 의한 smooth muscle로의 분화는 히스톤 단백질의 아세틸화의 상태는 세포주기 조절기전에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다. 즉, trichostatin A가 C2C12 세포의 조절기전에 관여하는 중요한 유전자의 발현을 조절하여 세포의 증식을 억제함과 동시에 분화를 유도하는 기전이 활성화된 것으로 판단된다. 이를 검증하기 위하여 본 연구에서는 trichostatin A를 C2C12 세포에 처리한 후 세포주기 조절유전자인 p21과 cyclin D1 mRNA의 변화를 살펴보았다. Cyclin은 세포주기 기전에 있어서 필수적인 구성요소로서 각각의 cyclin은 cyclin dependent kinase(cdk) 단백질에 결합하여 활성화를 시킨다[24]. 세포주기의 G1 phase를 정상적으로 통과하기 위해서는 D-type와 E-type와 같은 두 가지 종류의 cyclin이 필요하며, 특히 D-type cyclin은 결정적인 세포주기 진행에 있어서 결정적인 역할을 한다[11]. Cyclin과 cdk 결합체는 G1 phase에서 형성되어 retinoblastoma (Rb) 단백질의 인산화(phosphorylation)를 유도한다[7]. Cdk4와 6은 D-type cyclin과 결합하여 세포분열을 촉진하는 자극 또는 환경이 주어지면 활성화되어 세포주기의 진입과 G1 progression을 유도한다. 좀 더 구체적으로 언급하자면 D-type cyclin은 cdk4와 6을 활성화하는 반면, cyclin E는 cdk2를 활성화시킨다. 활성화된 cdk4/6-cyclin D1은 G1 phase 초기에 Rb 단백질을 인산화 시키며, 이는 cyclin E를 증가시키고, cyclin E는 cdk2와 결합하여 Rb 단백질의 인산화를 더욱

증가시킨다[13,15]. 이러한 Rb 단백질의 과인산화(hyperphosphorylation)는 전사인자인 E2F-1을 활성화시키고 DNA 복제와 유사분열에 필수적인 여러 유전자를 발현시키는 역할을 한다[7]. 따라서 이러한 선행연구를 바탕으로 cyclin D1은 세포가 증식 또는 분열할 수 있도록 하는데 있어서 매우 중요한 역할을 담당함을 알 수 있다. 본 연구에서 cyclin D1 mRNA의 발현은 62.5 nM의 trichostatin A를 C2C12 myoblast 세포에 처리한 후 24시간이 경과하자 급격히 감소하여 대조군의 30% 정도에 미치지 않았다. 하지만 이렇게 감소된 cyclin D1 mRNA의 발현은 48시간이 지난후 대조군과 차이가 나지 않았다. 이러한 결과는 trichostatin A는 세포 증식을 하는데 있어서 필수적인 cyclin D1의 유전자 발현을 매우 빠른 속도로 조절함을 시사한다. 이렇게 감소된 cyclin D1 mRNA는 결국 cyclin D1 단백질의 발현을 감소시킨다. 이는 세포 분열단계로의 진행에 있어서 필수적인 Rb 단백질의 인산화를 위한 전단계인 cyclin D1과 cdk4/6의 결합을 현저히 감소시킬 것이다. 결국 C2C12 myoblast 세포는 이러한 기전에 의해 증식단계로 진행하지 못하고, 분화단계로의 활성화가 진행된 것으로 사료된다.

본 연구에서 고찰한 또 다른 세포주기 조절 유전자인 p21은 앞에서 언급하였듯이 세포가 분열과 증식단계로 진행하는데 있어서 필수적인 cdk를 억제하는 유전자이다. p21은 cyclin-cdk 복합체에 결합하여 모든 세포 주기 단계의 전이에 있어서 필수적인 kinase의 활성화를 저해시킨다[3,20]. p21의 발현은 p53에 의해 활성화되며, 이러한 p21 유전자 발현의 증가는 결국 G1 phase에서 S phase로 세포주기가 진행되지 못하게 한다[2,19]. 따라서 p21 유전자의 발현 증가는 다양한 모든 형태의 세포의 분화단계에서 나타난다[6]. 앞서 결과에서 살펴보았듯이 trichostatin A로 처리한 C2C12 세포에서 cdk 억제제인 p21이 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 시간적으로 보았을 때 72시간 동안의 trichostatin A의 처리는 p21 mRNA의 발현을 최대 15배 정도까지 유의하게 증가시켰다. 이러한 p21 mRNA의 증가는 C2C12 myoblast 세포가 세포주기의 G1 phase에서 S phase로 진행하는 것을 억제시키며, cyclin D1 유전자의 발현변화와 함께 smooth muscle로의 분화를 활성화하는데 있어서 중요한 역할을 하였다고 사료된다.

## 요 약

본 연구는 분화 전단계인 C2C12 myoblast 세포에 중요한 후천적 기작의 하나인 DNA 히스톤 단백질의 아세틸화를 조절하였을 때 일어나는 변화를 살펴본 결과, 히스톤 탈아세틸화 효소를 trichostatin A로서 억제시키자 C2C12 myoblast 세포가 smooth muscle로 분화하였다. 이는 immunofluorescent staining을 통해 smooth muscle  $\alpha$ -actin의 발현 증가를 trish-

ostatin A로 처리한 세포에서 관찰하였으며, DAPI 염색을 통해 대조군 세포와 비교하여 세포의 증식이 많이 억제됨을 관찰하였다. 또한 real-time PCR 결과는 smooth muscle  $\alpha$ -actin과 transgelin mRNA의 발현이 trichostatin A 처리군 세포에서 현저히 증가함을 보여주었다. 이러한 결과를 바탕으로 히스톤 단백질의 탈아세틸화 억제제는 C2C12 myoblast 세포의 분화에 매우 중요한 역할을 하며, 또한 C2C12 myoblast 세포를 골격근인 다핵의 myotube로 분화시키지 않고, smooth muscle로 분화시킴을 알 수 있었다. 이것은 분명히 HDAC 억제제인 trichostatin A가 DNA 히스톤 단백질의 HDAC 효소에 의한 탈아세틸화를 강력히 억제하고, 이러한 HDAC 효소의 억제는 세포주기에 있어서 증식과 분화를 조절하는 유전자들의 발현을 조절하였음을 시사한다. 이를 검증하기 위해 세포주기 조절인자인 p21과 cyclin D1 mRNA의 발현을 조사한 결과 세포를 증식단계로 진행하는데 있어서 필수적인 cdk 억제제인 p21 mRNA의 발현이 trichostatin A로 처리한 세포에서 현저히 증가함을 보였으며, 세포 증식을 유도하는 cyclin D1 mRNA의 발현은 trichostatin A를 처리한 후 24시간 후 유의하게 감소함을 보였는데 이는 trichostatin A가 세포증식을 억제하는 초기단계에서 cyclin D1 유전자의 발현을 조절함을 보여준다. 향후 연구에서는 또 하나의 중요한 후천적 기작인 DNA 메틸화와 히스톤 아세틸화가 유전자 발현을 조절하는데 있어서 상호작용에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단 신진교수연구비에 의해 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Dashwood, R. H., M. C. Myzak and E. Ho. 2006. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis* **27**, 344-349.
2. El-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein. 1993. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817-825.
3. Elledge, S. J. 1996. Cell cycle checkpoints: preventing and identity crisis. *Science* **274**, 1664-1672.
4. Fanzani, A., F. Colombo, R. Giuliani, A. Preti and S. Marchesini. 2006. Insulin-like growth factor 1 signaling regulates cytosolic sialidase Neu 2 expression during myoblast differentiation and hypertrophy. *FEBS Journal* **273**, 3709-3721.
5. Grunstein, M. 1997. Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
6. Halevy, O., B. G. Novitch, D. B. Spicer, S. X. Skapek, J.

- Rhee and G. J. Hannon. 1995. Correlation of terminal cell cycle arrest of skeletal muscle with induction of p21 by MyoD. *Science* **267**, 1018-1021.
7. Ishida, S., E. Huang, H. Zuzan, R. Spang, G. Leone, M. West and J. R. Nevins. 2001. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 4684-4699.
  8. Jones, P. A. and S. B. Baylin. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Review of Genetics* **3**, 415-428.
  9. Kornberg, R. D. and Y. Lorch. 1999. Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryotic chromosome. *Cell* **98**, 285-294.
  10. Langen R. C., A. M. Schols, M. C. Kelder, J. L. Van Der Velden, E. F. Wouters and Y. M. Janssen-Heininger. 2002. Tumor necrosis factor-alpha inhibits myogenesis through redox dependent and -independent pathways. *American Journal of Physiology* **283**, C714-C721.
  11. Latella, L., A. Sacco, D. Pajalunga, M. Tiainen, D. Macera, M. D'Alangelo, A. Felici, A. Sacchi and M. Crescenzi. 2001. Reconstitution of cyclin D1-associated kinase activity drives terminally differentiated cells into the cell cycle. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 5631-5643.
  12. Li, B., M. Carey and J. L. Workman. 2007. The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**, 707-719.
  13. Lundberg, A. S. and R. A. Weinberg. 1998. Functional inactivation of the retinoblastoma protein requires sequential modification by at least two distinct cyclin-cdk complexes. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 753-761.
  14. Mizzen, C. A. and C. D. Allis. 1998. Linking histone acetylation to transcriptional regulation. *Cellular and Molecular Life Sciences* **54**, 6-20.
  15. Morgan, D. O. 1997. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 261-291.
  16. Park, I. H., E. Erbay, P. Nuzzi and J. Chen. 2005. Skeletal myocyte hypertrophy requires mTOR kinase and S6K1. *Experimental Cell Research* **309**, 211-219.
  17. Papeleu, P., T. Vanhaecke, G. Elaut, M. Vinken, T. Henkens, S. Snyckers and V. Rogiers. 2005. Differential effects of histone deacetylase inhibitors in tumor and normal cells-what is the toxicological relevance? *Critical Reviews in Toxicology* **35**, 363-378.
  18. Sabourin, L. A. and M. A. Rudnicki. 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clinical Genetics* **57**, 16-25.
  19. Sherr, C. J. 1994. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell* **79**, 551-555.
  20. Sherr, C. J. and J. M. Roberts. 1995. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes & Development* **9**, 1149-1163.
  21. Sowa, Y., T. Orita, S. Hiranabe-Minamikawa, K. Nakano, T. Mizuno, H. Nomura and T. Sakai. 1999. Histone deacetylase inhibitor activates the p21/WAF1/Cip1 gene promoter through the Sp1 sites. *Annals of the New York Academy of Sciences* **886**, 195-199.
  22. Spangenburg, E. E., D. K. Bowles and F. W. Booth. 2004. Insulin-like growth factor-induced transcriptional activity of the skeletal alpha-actin gene is regulated by signaling mechanisms linked to voltage-gated calcium channels during myoblast differentiation. *Endocrinology* **145**, 2054-2063.
  23. Struhl, K. 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & Development* **12**, 599-606.
  24. Ullmannova, V., P. Stockbauer, M. Hradcova, J. Soucek and C. Haskovec. 2003. Relationship between cyclin D1 and p21(Waf1/Cip1) during differentiation of human myeloid leukemia cell lines. *Leukemia Research* **27**, 1115-1123.
  25. Workman, J. L. 2006. Nucleosome displacement in transcription. *Genes & Development* **20**, 2009-2017.
  26. Wolffe, A. P. and J. J. Hayes. 1999. Chromatin disruption and modification. *Nucleic Acids Research* **27**, 711-720.