



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학석사 학위논문

PHF2 의 파골세포 분화  
조절 기전에 관한 연구

Study on the role of PHF2  
in the regulation of  
osteoclastogenesis

2016 년 2 월

서울대학교 대학원  
의과학과 의과학전공  
김 선 영

A thesis of the Master's degree

Study on the role of PHF2  
in the regulation of  
osteoclastogenesis

PHF2 의 파골세포 분화  
조절 기전에 관한 연구

February 2016

The Department of Biomedical Sciences,

Seoul National University

College of Medicine

Seon-Young Kim

# PHF2의 파골세포 분화 조절 기전에 관한 연구

지도교수 전 양 속

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2015년 12월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학전공

김 선 영

김선영의 의학석사 학위论문을 인준함

2015년 12월

위원장 (인)

부위원장 (인)

위원 (인)

# Study on the role of PHF2 in the regulation of osteoclastogenesis

by

Seon-Young Kim

A thesis submitted to the Department of  
Biomedical Sciences in partial fulfillment of the  
requirements for the Degree of Master of Science  
in Medicine at Seoul National University College of  
Medicine

December 2015

Approved by Thesis Committee:

Professor \_\_\_\_\_ Chairman

Professor \_\_\_\_\_ Vice chairman

Professor \_\_\_\_\_

## 초 록

파골세포는 뼈를 분해시키는 다핵세포로 단핵구/대식세포 계열의 전구세포에서 분화된다. 파골세포의 과잉 증가와 활성화는 골밀도의 감소 및 골다공증의 원인이 된다. 파골세포의 분화를 조절하는 다양한 기전들 중, RANKL(Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ -B ligand)에 의하여 유도되는 전사인자인 NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)은 파골세포의 분화에 필수적인 것으로 알려져 있다. 한편, 최근 들어 흥미롭게 연구되는 분야로 히스톤 단백질의 메틸화나 아세틸화 같은 후성유전자 조절은 세포 분화에서 중요한 역할을 한다는 연구 결과가 연이어 보고되고 있다. 이에 본 연구에서는 Jumonji 계열의 히스톤 탈메틸화 효소인 PHF2(PHD finger protein 2)가 NFATc1 유전자에 후성유전자 조절을 통하여 파골세포의 분화를 조절한다는 가설을 바탕으로 연구를 수행하였다.

연구결과를 요약하면, (1) 파골세포 분화가 진행되는 동안 PHF2의

발현이 감소되는 것을 western blot으로 확인하였다. (2) RAW264.7 세포주와 1차 배양을 통해 얻은 골수 유래의 대식세포 (Bone marrow-derived macrophages : BMMs)에서 PHF2의 발현을 억제함으로써, RANKL 자극에 의한 파골세포의 분화가 촉진된다는 것을 관찰하였다. (3) PHF2의 발현이 억제된 세포에서 NFATc1의 전사활성이 증가된 것을 NFATc1의 하위 유전자 reporter를 이용하여 확인하였다. (4) PHF2는 NFATc1과 직접적으로 결합하며, NFATc1은 PHF2의 C-말단과 결합하는 것을 면역침강법으로 확인하였다.

위 결과들을 통해 PHF2가 파골세포의 분화를 억제하는 인자로 작용한다는 것을 알 수 있었으며, 그 조절기전의 일부로서 단백질-단백질 간의 직접적인 상호작용을 통하여 파골세포의 주요 전사인자인 NFATc1의 전사활성을 억제한다는 것을 제시할 수 있었다.

---

**주요어:** PHF2, NFATc1, RANKL

**학 번:** 2013 - 21767

## 목 차

초록.....	i
목차.....	iii
표 및 그림 목록 .....	iv
서론.....	1
실험재료 및 방법.....	3
결과.....	9
고찰.....	22
참고문헌 .....	26
영문 초록.....	30



## 표 및 그림 목록

그림 1 .....	14
그림 2 .....	15
그림 3 .....	17
그림 4 .....	18
그림 5 .....	19
그림 6 .....	20
그림 7 .....	21
표 1 .....	8

# 서론

과골세포는 단핵구/대식세포 계열의 전구세포가 융합하여 형성된 다핵세포로, 과골세포의 분화 신호는 조골세포에서 유래되어 두 세포 간의 조화는 뼈의 재구성에 중요한 역할을 하고 있다[1,2]. 조골세포와 기질세포에서 분비되는 M-CSF(Macrophage colony-stimulating factor)는 과골세포의 전구세포 생존에 필수적이며 RANKL(Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ -B ligand)은 과골세포의 분화 신호 중 하나로 RANK(Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ -B)를 통해 세포 안으로 유입되어 과골세포의 분화에서 'master switch' 역할을 하는 전사 인자인 NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1)을 유도한다[3,4]. NFATc1은 자가증폭이라는 독특한 방법으로 자기 자신의 프로모터에 결합하여 유전자를 발현하고, 동시에 하위 유전자의 발현을 증가시키기 때문에 과골세포 분화에 필수적인 전사인자로 알려져 있다 [5]. NFATc1의 조절은 번역후 변형[6,7], 마이크로 RNA[8], 후성유전자[9]에 의한 것이 알려져 있는데 후성유전자에 의한 NFATc1의 조절은 그 중요성에 비하여 거의 알려져 있지 않다. PHF2(PHD finger protein 2)는 Jumonji C family에 속하는 히스

톤 탈메틸화 효소로 처음 소개되었다[10]. 이후 H3K4me3에 결합하여 전사 억제 코드로 알려진 H3K9me2를 탈메틸화함으로써 전사 활성을 증가시키는 후성유전자로 기능이 보고되었으나[10,11], 최근에는 PHF2가 전사인자를 직접적으로 탈메틸화한다는 역할도 밝혀졌다[12]. 이렇게 PHF2는 탈메틸화 효소로서 작용하여 여러 세포의 분화에서 주요 전사인자들의 조절자 역할을 하는 것으로 알려졌다[12,13,14,15]. 특히, PHF2는 조골세포의 형성에서 중요한 전사인자로 알려진 Runx2(Runt-related transcription factor 2)의 공활성화인자로서의 기능이 확인되었다[12]. 이에 본 연구에서는 조골세포와의 긴밀한 상호작용을 통해 뼈의 재형성에 조력하는 PHF2가 파골세포에서는 생리학적으로 어떠한 기능을 가지고 있는지에 대한 의문을 가지고 연구에 착수하였다. 그 결과 PHF2가 파골세포의 분화에 관련되어 있으며 파골세포의 분화에서 가장 중요한 전사인자인 NFATc1의 전사활성을 억제함으로써 파골세포 분화를 저해한다는 것을 밝혔다. 이를 통해 PHF2가 조골세포의 형성을 촉진하고 파골세포의 형성을 억제하여 결과적으로는 골밀도를 증가시킬 수 있는 잠재적인 골다공증 치료제의 표적 단백질이 될 수 있다는 것을 확인하였다.

## 실험 재료 및 방법

### 시약 및 항체

Recombinant murine M-CSF는 Peprotech(Rocky Hill, NJ, USA)에서 구입하였고, RANKL은 서울대학교 김홍희 교수님으로부터 제공받았다. FBS(Fetal bovine serum)는 Gibco(Gaithersburg, MD, USA)에서 구입하였고, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium),  $\alpha$ -MEM(Minimum Essential Medium alpha), P/S(Penicillin/Streptomycin), HBSS(Hanks' Balanced Salt Solution)은 Hyclone(Logan, UT, USA)에서 구입하였다. Trap stain kit는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, enhanced chemiluminescence(ECL) solution은 Thermo(Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. PHF2와 Suv39H1 항체는 Cell signaling(Beverly, MA, USA), NFATc1과  $\beta$ -tubulin 항체는 Santa Cruz biotechnology(Santa Cruz, CA, USA), Flag 항체는 Sigma-Aldrich, HA 항체는 Roche(Basel, Switzerland)에서 구입하였다. 형질주입에 사용한 시약은 TransIT-2020으로 Mirus(Madison, WI, USA)에서 구매했다. Protein G sepharose와 streptavidin-affinity bead는 GE healthcare Bio-Sciences(Piscataway, NJ,

USA), HA-affinity bead는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. Trizol은 Invitrogen, cDNA 합성 시약과 RT-qPCR 시약은 Applied Biological Masterials Inc (Richmond, BC, Canada)에서 구입하였다.

### 세포 배양 및 파골세포 분화

RAW264.7 세포주는 10% (v/v) FBS와 1% (v/v) P/S을 넣은 DMEM 배양액으로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다. BMM은 8-14 주령 암컷 C57BL/6 쥐의 경골과 대퇴골에서 다음과 같은 방법으로 일차 배양을 통해 얻었다. 경골과 대퇴골 뼈의 양쪽 끝을 자른 후 주사기로 3% P/S가 들어 있는 HBSS를 흘려 넣어 전체 골수를 분리하고 40 µM nylon strainer로 걸러냈다. 걸러낸 골수는 적혈구를 제거한 후, α-MEM에 10% (v/v) FBS 와 1% (v/v) P/S을 넣은 배양액에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양한다. 12 시간 후에 배양접시에 부착되지 않은 세포를 원심분리하고 30 ng/ml의 M-CSF를 넣고 3 일간 배양하여 배양접시에 부착한 BMM을 scraper로 긁어내어 분리하였다. RAW264.7 세포주는 100 ng/ml의 RANKL을, BMM은 30 ng/ml M-CSF와 100 ng/ml의 RANKL을 24 시간 간격으로 3 일간 처리하여 파골세포로 분화시켰다.

## TRAP(Tartrate-resistant acid phosphatase) stain

TRAP을 염색하기 위하여 분화가 끝난 세포의 배지를 제거하고 PBS(Phosphate-buffered saline)로 세포를 헹궜다. 세포에 3.7% (v/v) 의 포르말데히드가 들어간 PBS를 넣고 5 분간 세포를 고정한 후에 0.1% Triton X-100이 들어간 PBS를 넣고 TRAP 염색 용액을 만들었다. TRAP 염색 용액은 1ml을 기준으로 만들 때, fast garnet GBC base 용액과 sodium nitrile 용액을 각각 20  $\mu$ l씩 넣고 섞은 후 900  $\mu$ l의 증류수를 추가하여 섞었다. 여기에 Naphthol AS-BI phosphoric acid solution 10  $\mu$ l, acetate solution 40  $\mu$ l과 tartrate solution 20  $\mu$ l을 순서대로 넣어서 만들었다. 0.1% Triton X-100을 제거하고 증류수로 세포를 헹궜난 후, TRAP 염색 용액을 넣고 37°C에서 10 분간 반응시켰다. 배양접시에 생성된 핵이 3 개 이상이고, TRAP 양성인 세포를 수를 산정하고 광학 현미경으로 사진을 찍었다.

## shRNA를 이용한 PHF2의 knock down

pLKO.1-puro를 제한효소 AgeI과 EcoRI으로 자르고 PHF2를 억제하는 염기서열을 넣어 shRNA (small hairpin RNA) vector를 제작했다. 렌티바이러스를 조립하는 vector인 pRSV-Rev, pMD2-

VSVG, pMDLg/pRRE와 함께 shRNA를 HEK293T 세포주에 형질 주입하여 렌티바이러스를 생산하였다. RAW264.7 세포주에 렌티바이러스를 8  $\mu\text{g/ml}$  polybrene과 섞어서 넣고 16 시간 동안 배양하여 세포를 감염시킨 후, 5  $\mu\text{g/ml}$  puromycin을 2-3 주 처리하여 PHF2를 지속적으로 억제하는 세포주를 만들었다. BMM은 세포를 렌티바이러스로 감염시키고 puromycin의 처리 없이 실험에 사용하였다. PHF2의 shRNA 염기서열은 표1에 명시하였다.

### Western blot

Lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% NP-40, protease cocktail)로 세포에서 단백질을 얻어 BCA 법으로 정량하고 단백질의 크기에 따라 8% 또는 10%의 SDS/polyacrylamide gel에서 전기영동한 다음 PVDF membrane에 transfer하였다. Membrane을 5% skim milk에서 1 시간 동안 blocking한 후, 1차 항체(5% skim milk에 1:500-3000 비율로 희석)를 넣고 4°C에서 16 시간 반응시켰다. Membrane을 HRP(Horseradish peroxidase)가 붙은 2차 항체(5% skim milk에 1:5000 비율로 희석)와 1 시간 반응시킨 후, ECL solution과 반응시켜 형광을 X-ray 필름에 감광하였다.

## qRT-PCR(Quantitative real-time polymerase chain reaction)

세포 내의 전체 RNA는 60 mm 배양접시에서 Trizol 시약으로 추출하였다. RNA를 1  $\mu$ g 정량하고 random primer, dNTP, reverse transcriptase, ribonuclease를 넣어 cDNA를 합성하였다. cDNA는 ABI StepOne Real-Time PCR 프로그램을 이용하여 증폭하였다. mRNA의 값의 보정은 18S RNA를 이용하여 Ct값으로 계산하였고, RT-qPCR에 사용한 TRAP primer는 forward의 염기서열이 5' - CAGCTCCCTAGAAGATGGATTCAT-3' , reverse의 염기서열이 5' -GTCAGGAGTGGGAGCCATA TG-3' 이다.

## Luciferase assay

RAW264.7 세포주에 NFATc1의 결합부위가 있는 TRAP의 리포터 유전자(전남대학교 김낙성 교수님께서 제공)와  $\beta$ -gal 유전자를 12시간 동안 형질주입 시킨 후 24시간 배양한다. 세포의 lysate와 luciferin을 반응시키고 Lumat LB9507 luminometer(Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany)로 형광을 측정하여 luciferase 활성을 확인하였다.  $\beta$ -gal의 활성은 흡광계로 405nm 파장에서 측정하였고 luciferase 활성을 보정하는데 사용하였다.



## 면역침강법

Lysis buffer를 사용하여 얻은 단백질 1 mg과 항체를 tube에 넣고 4°C에서 12 시간 반응시켰다. 이후 20 µl의 Protein G sepharose를 넣고 4°C에서 4시간 반응 시킨 후에 wash buffer(50 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1% NP-40)로 bead를 3번 씻어서 시료를 준비했다. Streptavidin과 HA-affinity bead를 이용한 pull-down에는 bead 15 µl와 lysate 1 mg이 사용되었으며 bead와 lysate는 4°C에서 4 시간 동안 반응시켰다.

## 표1. shRNA 염기서열

Target	염기서열 (5' → 3' )
Non-targeting control	CUAGCAAAAACGCUGAGUACUUCGAAAUGU CCUCGAGGACAUUUCGAAGUACUCAGCGCC
Mouse PHF2-I	CUAGCAAAAAGAGCUGAAGAUAGACGAGUU UCUCGAGAAACUCGUCUAUCUUCAGCUCCC
Mouse PHF2-II	CUAGCAAAAACGUGGCUAUUAAAGUGUUCU ACUCGAGUAGAACACUUUAAUAGCCACGCC

## 결 과

### 파골세포 분화에서 나타나는 PHF2의 발현량 변화

암컷 C57BL/6에서 일차 배양한 BMM과 파골세포 분화능이 있는 RAW264.7 세포주에 100 ng/ml RANKL을 24시간 간격으로 3일간 처리하여 파골세포로 분화시키고 이 과정에서 발생하는 PHF2의 변화를 살펴보았다. PHF2는 BMM에서 분화 초기에 증가하다가 감소하는 것을 확인할 수 있었고, RAW264.7 세포주에서는 분화 초기에서부터 발현이 지속적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 1A,B). 이 결과를 통해 파골세포 분화에 PHF2가 관여할 수 있다는 가능성을 확인하게 되었다.

### PHF2 억제 조건에서의 파골세포 분화

파골세포의 분화에서 PHF2의 역할을 확인하기 위하여 RAW264.7 세포주에 렌티바이러스로 shRNA를 감염시켜 지속적으로 PHF2가 억제되는 세포주를 만들었다. 이 세포를 100 ng/ml의 RANKL로 3일간 분화시킨 결과 PHF2의 발현을 억제한 세포주에서 파골세포 분화가 촉진되는 것을 확인할 수 있었다(그림 2A). 이 실험 결과를 검증하기 위하여 BMM에도 렌티바이러스로 shRNA를 감염시켜

PHF2의 발현을 억제한 후 파골세포로 분화시킨 결과 RAW264.7 세포주에서의 결과와 마찬가지로 PHF2의 발현이 억제된 세포에서 파골세포 분화가 촉진되는 것을 확인할 수 있었다(그림 2B). PHF2는 핵 단백질이기 때문에 RANKL 자극에 의한 신호전달에서 PHF2의 조절 받을 수 있는 단백질 후보로 전사인자인 NFATc1을 가정하고 PHF2 shRNA를 사용한 BMM의 분화에서 NFATc1의 발현을 확인해보았다. 놀랍게도 PHF2의 발현이 억제된 세포에서 NFATc1 단백질의 발현이 증가되어 있고(그림 2C), NFATc1의 하위 유전자인 TRAP의 mRNA 또한 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 2D).

### **PHF2의 발현에 따른 NFATc1의 전사활성 조절**

PHF2의 억제에 따라 NFATc1의 발현이 증가하고 이를 통해 분화가 촉진되는 것을 위의 실험으로 확인하였다. 이 결과를 통해 PHF2가 NFATc1의 억제자로 파골세포 분화에 관여할 것이라는 가정을 세우고, PHF2가 NFATc1의 전사활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NFATc1의 결합부위가 있는 TRAP 리포터 유전자를 이용한 luciferase assay를 수행하였다. RAW264.7 세포주에 DNA 형질 주입이나 RANKL을 통하여 NFATc1의 발현을 유도하

고 활성을 측정된 결과, PHF2가 억제된 세포에서 NFATc1의 전사 활성이 더 높게 측정되었다(그림 3A,B). 반대로 PHF2를 일시적으로 과발현시킨 RAW264.7 세포주에서 NFATc1의 활성을 측정된 결과, 형질 주입된 PHF2의 양이 증가함에 따라 NFATc1의 전사 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 3B). 이 결과를 통해 PHF2가 NFATc1의 전사활성 억제자로서 작용한다는 가설을 확인할 수 있었다.

### **PHF2와 NFATc1의 결합**

위의 실험을 통해 NFATc1의 전사활성에서 중요한 조절자로서 PHF2의 역할을 확인하였으므로 면역침강법을 통해 두 단백질이 서로 결합하는 지를 확인해 보기로 하였다. 우선 HEK293T 세포주에 PHF2와 NFATc1을 일시적으로 과발현시킨 후 각각의 tag에 대한 결합력을 가진 bead를 이용하여 pull down assay를 수행한 결과 PHF2와 NFATc1이 결합하고 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 4A). 이 결과를 검증하기 위하여 RAW264.7 세포주에 RANKL을 24 시간 처리하여 NFATc1의 발현을 유도한 후, PHF2 항체를 이용한 면역침강법을 수행하였다. 앞의 결과와 동일하게 두 단백질이 결합하고 있는 것을 확인할 수 있었다(그림 4B).

## PHF2의 C-말단과 NFATc1의 결합

앞의 실험을 통하여 PHF2와 NFATc1이 직접적으로 결합하는 것을 확인하였다. 그리고 PHF2의 어떤 기능적 도메인이 NFATc1에 결합하는지를 알아보기 위하여 PHF2를 4 개의 부분으로 나누고 각각을 NFATc1과 함께 HEK293T 세포주에 형질주입하였다. PHF2 도메인의 tag과 결합하는 streptavidin-affinity bead로 pull down assay를 수행한 결과 PHF2의 C-말단과 NFATc1이 결합하는 것을 확인할 수 있었다(그림5A). 기존의 보고에 따르면 PHF2의 C-말단은 전사인자와 결합하여 전사활성의 억제 마커인 H3K9me2을 탈메틸화함으로써 전사활성을 증가시킨다는 논문이 보고되어 있었다[13]. 그러나 앞의 결과에서 확인한 것과 같이 PHF2는 과골세포 분화의 억제자로 작용하였기 때문에 기존에 알려지지 새로운 방식을 통하여 과골세포 분화 조절에 관여할 수 있다는 가설을 세워야 했다.

## 과골세포의 분화에서 PHF2와 Suv39H1의 역할

PHF2는 기존에 탈메틸화 효소로서 주로 전사활성을 증가시키는 기능으로 보고되어 왔지만 본 연구를 통해 억제자로서 작용할 수 있다는 가능성에 대하여 확인하였다. 그리고 최근에 PHF2가 히스톤

메틸전달 효소인 Suv39H1과 결합하여 리보솜 RNA의 전사를 억제하는 역할이 보고되었다(그림 6A) [17]. 이에 따라 파골세포 분화에서 Suv39H1의 발현을 확인해 본 결과 PHF2와 같은 양상으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다(그림 7A). 또한 HEK293T 세포주에 PHF2와 Suv39H1을 과발현한 pull down assay에서 두 단백질이 결합하는 것을 확인할 수 있었다(그림 7B). 이를 통해 PHF2가 파골세포 분화에서 Suv39H1의 H3K9me2/3의 메틸화에 관여하는 억제자로 작용할 수 있는 가능성을 보게 되었다.

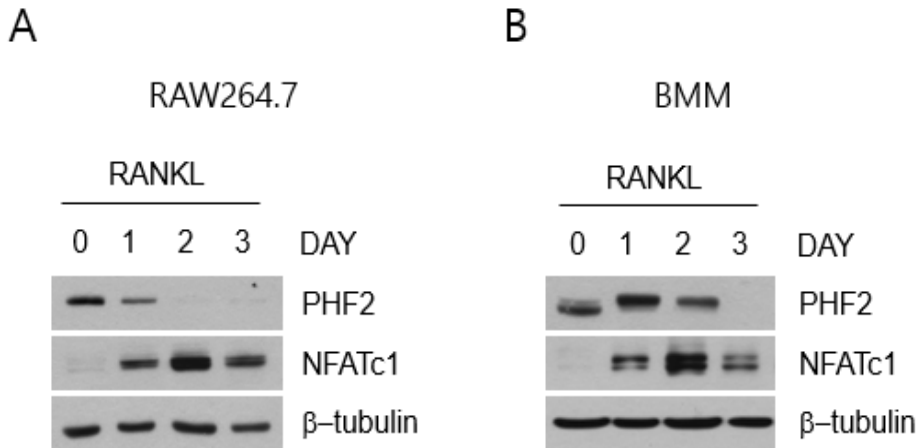


그림 1. 파골세포 분화에서 나타나는 PHF2의 발현량 변화  
 RAW264.7 세포주에 100 ng/ml의 RANKL을 처리하고, BMM에는 30 ng/ml의 M-CSF와 100 ng/ml의 RANKL을 각각 24 시간 마다 처리하여 3 일간 파골세포의 분화를 유도함. (A) BMM의 파골세포 분화에서 나타난 PHF2의 발현량을 확인함. (B) RAW264.7 세포주의 파골세포 분화에서 나타난 PHF2의 발현량을 확인함.

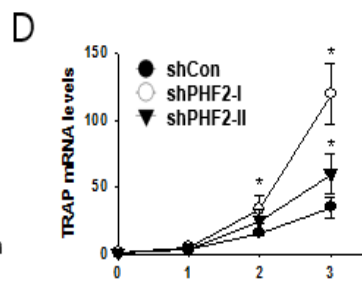
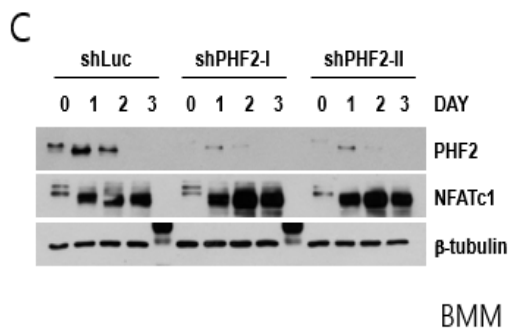
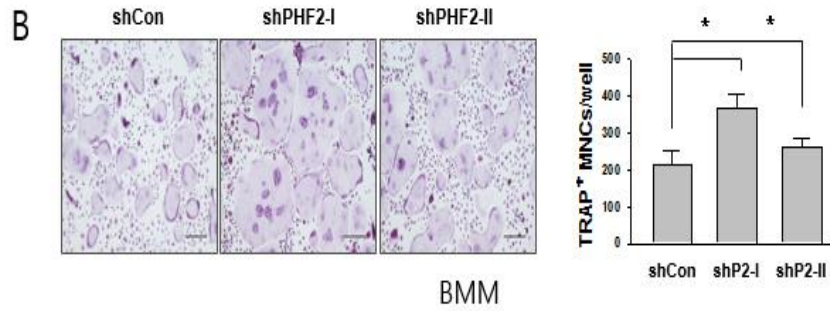
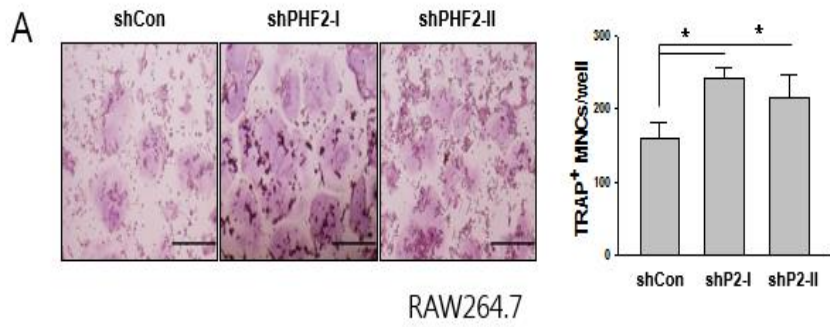




그림 2. PHF2 shRNA를 사용한 파골세포의 분화 RAW264.7 세포주와 BMM의 PHF2를 shRNA로 억제시킨 후 RANKL 자극을 주어 3일간 분화를 유도함. (A) PHF2를 억제하는 RAW264.7 세포주를 48-well 배양접시에서 분화시켜 TRAP을 염색한 사진과 3개 이상의 핵을 가진 파골세포 개수를 산정하여 표시함. (B) PHF2가 억제된 BMM을 48-well 배양접시에서 분화시켜 TRAP을 염색한 사진과 3개 이상의 핵을 가진 파골세포의 개수를 산정하여 표시함. (C) shRNA를 사용한 BMM에서 분화 기간에 RANKL에 의하여 유도된 NFATc1의 발현량을 western blot으로 나타냄. (D) shRNA를 사용한 BMM의 파골세포 분화에서 발현된 TRAP의 mRNA를 qRT-PCR로 확인함.

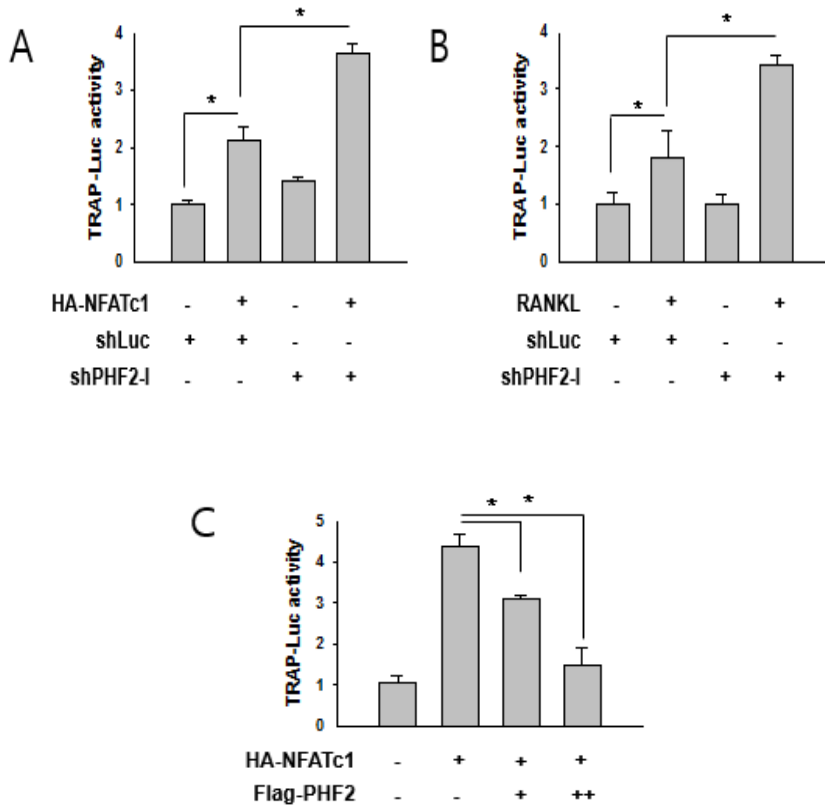


그림 3. PHF2 억제 조건에서 NFATc1의 전사 활성 측정  
 RAW264.7세포주에 TRAP 리포터 유전자와  $\beta$ -galactosidase를 일시적으로 형질주입하여 NFATc1의 전사활성을 측정함. (A) RAW264.7 세포주에 pcDNA와 HA-NFATc1을 형질주입하여 TRAP 리포터 유전자의 luciferase 활성을 측정함. (B) PHF2가 억제된 RAW264.7 세포주에 RANKL을 처리하여 NFATc1을 유도한 후 TRAP 리포터 유전자의 luciferase 활성을 측정함. (C) RAW264.7 세포주에 Flag-PHF2와 HA-NFATc1을 형질주입하여 TRAP 유전자의 luciferase 활성을 측정함.

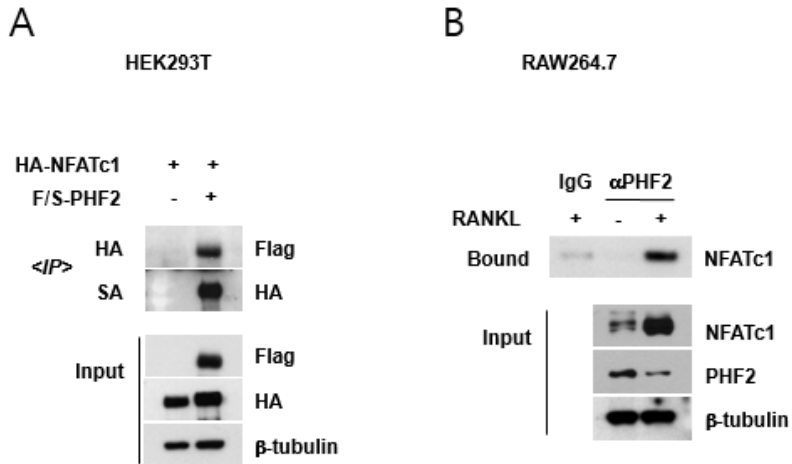


그림 4. PHF2과 NFATc1의 interaction (A) HEK293T 세포주에 Flag/SBP-PHF2과 HA-NFATc1을 형질주입으로 과발현하여 streptavidin 또는 HA affinity bead로 각각 pull down을 수행함. (B) RAW264.7 세포주에 24 시간 동안 RANKL을 처리하고 PHF2 항체를 이용하여 면역침강법을 수행함.

A

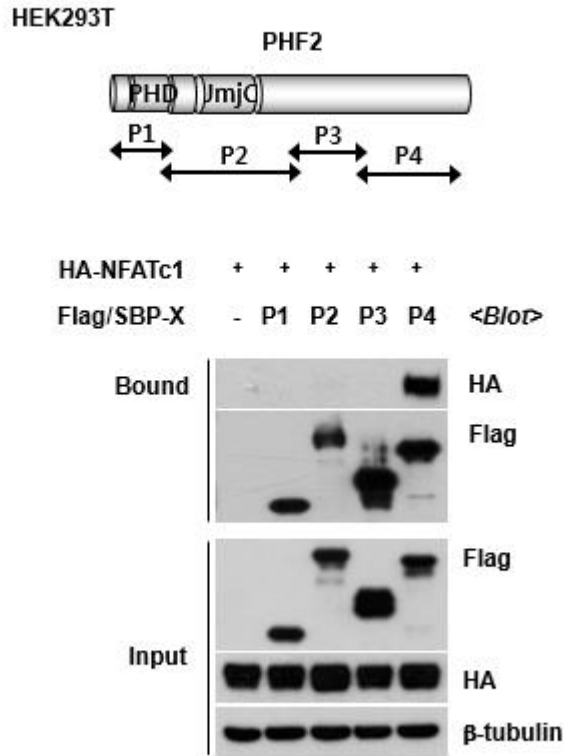
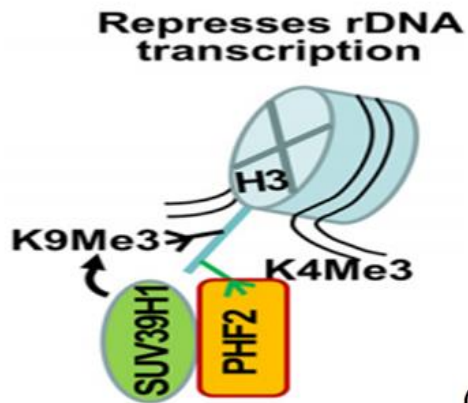


그림 5. NFATc1과 결합하는 PHF2의 도메인 (A) HEK293T 세포주에 Flag/SBP tag이 달린 4개의 PHF2의 도메인과 HA-NFATc1을 각각 형질주입하고 streptavidin-affinity bead를 이용하여 pull-down assay를 수행함.



*Guang Shi et al., 2014*

그림 6. 리보솜 RNA 전사활성을 억제하는 PHF2와 Suv39H1 PHF2가 H3K4me3에 결합하고 Suv39H1을 유인하여 H3K9을 메틸화함. 히스톤 억제 코드로 알려진 H3K9me3는 Suv39H1에 의하여 리보솜 RNA의 전사활성을 억제시킨다고 보고됨.

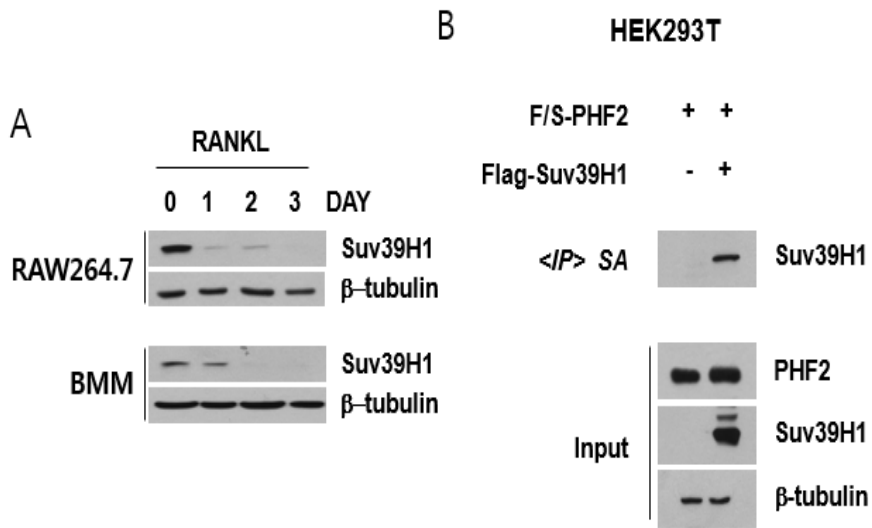


그림 7. 파골세포 분화에서 Suv39H1의 역할 (A) RAW264.7 세포주와 BMM을 3 일간 파골세포로 분화시키는 동안 Suv39H1의 변화를 western blot으로 확인함. (B) HEK293T 세포주에 Flag/SBP-PHF2와 Flag-Suv39H1을 과발현하여 pull down assay를 수행함.

## 고찰

본 연구를 통해 최근 연구 분야에서 심도 있게 다뤄지고 있는 후성유전조절자가 지방세포, 연골세포, 조골세포의 분화뿐만이 아니라 파골세포의 분화에도 영향을 미칠 수 있다는 사실을 확인하였다. 후성유전조절자에 대한 연구는 그 범위가 단순히 세포의 분화뿐만이 아니라 암까지 넓혀지고 있으며, 고정된 유전자 정보를 변화시킬 수 있다는 점에서 그 중요성이 인식되어 최근 연구가 활발하게 이루어지고 있는 분야이다. 그러나 파골세포의 분화에서 유독 후성유전조절자에 대한 연구는 그 중요성과는 반대로 발견된 바가 많지 않다. 후성유전조절자가 분화의 조절에 관여한 다는 것이 밝혀졌더라도 조절기전이 후성유전학적 접근이 아닌 다른 방법으로 이루어져 있거나 미제로 남은 채로 보고되는 것이 대부분이다. 그렇기 때문에 본 연구에서 목표로 하는 파골세포 분화에서 후성유전조절자인 PHF2의 조절 기전을 규명해 내는 것은 새로운 발견이 될 것으로 예상했다.

본 실험을 통해 히스톤 탈메틸화 효소로 알려진 PHF2가 전사인자인 NFATc1의 전사활성을 억제하여 파골세포 분화를 억제하는 것을 확인할 수 있었다. NFATc1에 대한 PHF2의 전사활성 억제

효과는 리포터 유전자를 이용한 luciferase assay를 통하여 밝혀냈지만 아쉽게도 후성유전자 조절 기전에 대한 해답을 얻기 위한 실험이라고 하기에는 역부족인 부분이 있었다. 또한 기본적으로 파골세포의 뼈를 흡수하는 기능에 대한 연구가 부족하였다. 따라서 보다 다양한 후성유전학적 접근법을 이용한 검증과 파골세포의 근본적인 기능에 대한 효과를 관찰하는 것이 문제를 해결하는데 도움이 될 것으로 사료되었다. 또한 실험의 정확한 검증을 위하여 PHF2의 과발현이 파골세포의 분화에 어떤 영향을 줄 수 있는지에 대한 연구도 필요할 것이다.

PHF2는 기존에 알려진 바와 같이 H3K9me2에 대한 탈메틸화 효소로서 작용하기 때문에 전사활성을 증가시키는 것으로 알려져 있어 본 연구에서 제시하는 억제자로서의 역할과는 상반된 기능을 보여주었다. 따라서 파골세포에 분화에 있어서 PHF2의 기능이 이전에 알려져 있는 것과는 다른 조절 기전으로 전사인자의 전사활성을 조절하는 방법에 대하여 연구할 필요가 있었다. 최근 PHF2가 히스톤 메틸전달 효소인 Suv39H1을 유인하여 H3K4me3에 결합하고, Suv39H1이 H3K9을 메틸화함으로써 리보솜 RNA의 전사를 억제한다는 내용의 논문이 발표되었다. 이 논문에 따르면 PHF2는 후성유전자 조절을 통해 직접적으로 전사인자의 전사활성을 조절하지



는 않지만 PHF2가 닳처럼 Suv39H1을 히스톤으로 유인함으로써 실질적으로는 Suv39H1이 히스톤의 메틸화를 수행하여 전사활성을 억제할 수 있도록 하게 한다는 것이다. 이러한 조절 기전으로 전사활성이 억제된다는 사실이 파골세포의 분화에 적용될 경우 본 연구에서 발견한 PHF2의 파골세포 분화 억제효과를 설명할 수 있을 것이라는 가설을 세웠다. 실제로 RAW264.7 세포주와 BMM의 파골세포 분화에서 Suv39H1의 발현을 확인한 결과 시간이 지날수록 PHF2와 마찬가지로 Suv39H1의 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 두 단백질이 함께 전사활성을 조절하는데 기여할 수 있을 것이라는 가능성을 확인하게 되었다. 대부분의 PHF2에 대한 연구는 탈메틸화를 통한 전사활성 증가로 보고되어 있기 때문에 PHF2가 Suv39H1과 함께 NFATc1의 중개자로 전사활성 억제에 관여한다는 것이 증명될 경우 최근 밝혀진 PHF2의 새로운 기능이 한번 더 증명 받게 되는 것이다. 또한 파골세포 분야에서 거의 알려져 있지 않은 후성유전학 연구에 새로운 발견이 될 것으로 사료된다.

기존의 연구에서 잘 알려진 바와 같이 파골세포와 조골세포는 아주 밀접한 관계를 가지고 있다. 파골세포의 생존과 분화에 필수적인 M-CSF와 RANKL은 조골세포에서 유래하고, 조골세포의 분화에

필수적인 BMP-2(Bone morphogenetic protein 2)는 뼈에 저장된 형태로 존재하다가 파골세포의 뼈 흡수 과정을 통해 분비됨으로써 조골세포의 분화에 기여한다. 그렇기 때문에 두 세포의 균형은 뼈의 재구성에 있어서 중요한 역할을 하는데 PHF2는 조골세포 분화 촉진을 통해 뼈의 형성을 돕는 역할로 밝혀졌고 파골세포의 분화 억제제를 통해 뼈의 흡수를 방해하는 것으로 확인했다. 그렇기 때문에 생리학적 접근으로 보았을 때, PHF2는 뼈의 재구성에서 골밀도를 증가시킬 수 있는 표적 단백질로 연구될 수 있다. 나아가 PHF2를 활성화 시키는 약물에 대한 개발이 이루어진다면 골다공증과 같은 골밀도 감소에 의한 질병의 근본적인 해결책이자 예방책으로서 주요한 연구 주제가 될 수 있을 것으로 생각된다.

## 참 고 문 헌

1. DA Corral, M Amling, M Priemel, et al. Dissociation between bone resorption and bone formation in osteopenic transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(23), 13835–13840, 1998.
2. DL Lacey, E Timms, HL Tan, et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*, 95(2), 165–176. 1998.
3. WC Dougall, M Glaccum, K Charrier, et al. RANK is essential for osteoclast and lymph node development. *Genes Dev*, 13, 2412–2424, 1999.
4. H Takayanagi, S Kim, T Koga, et al. Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling in terminal differentiation of osteoclasts. *Dev Cell*, 3(6), 889–901, 2002.
5. M Asagiri, K Sato, T Usami, et al. Autoamplification of NFATc1 expression determines its essential role in

- bone homeostasis. *J Exp Med*, 202, 1261–1269, 2005.
6. JH Kim, K Kim, HM Jin, et al. Negative feedback control of osteoclast formation through ubiquitin-mediated down-regulation of NFATc1. *J Biol Chem*, 285(8), 5224–5231, 2010.
  7. Kim JH<sup>1</sup>, Kim K, Youn BU, et al. RANKL induces NFATc1 acetylation and stability via histone acetyltransferases during osteoclast differentiation. *Biochem J*, 436(2), 253–62, 2011.
  8. Y Lee, HJ Kim, CK Park, et al. MicroRNA-124 regulates osteoclast differentiation. *Bone*, 56(2), 383–389, 2013.
  9. T Yasui, J Hirose, S Tsutsumi, et al. Epigenetic regulation of osteoclast differentiation: possible involvement of Jmjd3 in the histone demethylation of Nfatc1. *J Bone Miner Res*, 26(11), 2665–2671, 2011.
  10. K Hasenpusch-Theil, BP Chadwick, T Theil, et al. PHF2 a novel PHD finger gene located on human Chromosome 9q22. *Mamm Genome*, 10, 294–298, 1999.

11. Wen H<sup>1</sup>, Li J, Song T, et al. Recognition of histone H3K4 trimethylation by the plant homeodomain of PHF2 modulates histone demethylation. *J Biol Chem*, 285, 9322–9326, 2010.
12. HJ Kim, JW Park, KH Lee, et al. Plant homeodomain finger protein 2 promotes bone formation by demethylating and activating Runx2 for osteoblast differentiation. *Cell Res*, 24(10), 1231–1249, 2014.
13. Y Okuno, F Ohtake, K Igarashi, et al. Epigenetic regulation of adipogenesis by PHF2 histone demethylase. *Diabetes*, 62(5), 1426–1434, 2013.
14. K Hata, R Takashima, K Amano, et al. Arid5b facilitates chondrogenesis by recruiting the histone demethylase Phf2 to Sox9–regulated genes. *Nat Commun*, 4, 2850–2060, 2013.
15. KH Lee, UI Ju, JY Song, et al. The histone demethylase PHF2 promotes fat cell differentiation as an epigenetic activator of both C/EBP $\alpha$  and C/EBP $\delta$ . *Mol Cells*, 37(10), 734–741, 2014.

16. KH Lee, JW Park, HS Sung, et al. PHF2 histone demethylase acts as a tumor suppressor in association with p53 in cancer. *Oncogene*, 34(22),2897–2909, 2014.
17. G Shi, M Wu, L Fang, et al. PHD finger protein 2 (PHF2) represses ribosomal RNA gene transcription by antagonizing PHF finger protein 8 (PHF8) and recruiting methyltransferase SUV39H1. *J Biol Chem*, 289(43), 29691–29700, 2014.

# Abstract

Osteoclasts are bone-resorbing multinucleated cells that differentiate from monocyte/macrophage-lineage precursors. Bone destruction and osteoporosis are attributed to excessively activated osteoclasts. Osteoclast differentiation is governed by diverse regulatory processes including NFATc1 (Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1) activation in response to RANKL (Receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ -B ligand). The mechanism of epigenetic regulation of NFATc1 in osteoclastogenesis not investigated yet. Here I test a hypothesis that a jumonji histone demethylase, PHF2 (PHD finger protein 2), might epigenetically regulate NFATc1 during osteoclast differentiation.

Western blot analysis showed decrease of PHF2 expression during osteoclastogenesis of RAW264.7 cell line. The knock

down expression of PHF2 in RAW264.7 and bone marrow macrophages (BMMs) facilitated the osteoclastogenesis through RANKL. Luciferase reporter assay showed that the suppression of PHF2 also increased the transcriptional activity of NFATc1. Immunoprecipitation assay showed that PHF2 directly binds to the c-terminal of NFATc1.

From above results, I suggest that PHF2 plays a suppressive role in osteoclastogenesis. As for part of the signaling mechanisms of the inhibition of transcriptional activity, direct protein-protein interaction between PHF2 and NFATc1 was suggested.

---

**Keywords:** PHF2, NFATc1, RANKL

**Student number:** 2013-21767