

## The Expression of Matrix Metalloprotease 20 is Stimulated by Wild Type but not by 4 bp- or 2 bp- Deletion Mutant DLX3

Hyun Jung Park, Hyun-Mo Ryoo, Kyung Mi Woo, Gwan-Shik Kim, and Jeong-Hwa Baek\*

Department of Cell & Developmental Biology, School of Dentistry and Dental Research Institute, Seoul National University

(received March 7, 2009 ; revised March 11, 2009 ; accepted March 13, 2009)

Mutations in DLX3 are associated with both autosomal dominant hypoplastic hypomaturational amelogenesis imperfecta (ADHHAI) and tricho-dento-osseous (TDO) syndrome. ADHHAI is caused by a c.561\_562delCT (2bp-del DLX3) mutation whereas TDO syndrome is associated with a c.571\_574delGGGG (4bp-del DLX3) mutation. However, although the causal relationships between DLX3 and an enamel phenotype have been established, the pathophysiological role of DLX3 mutations in enamel development has not yet been clarified. In our current study, we prepared expression vectors for wild type and deletion mutant DLX3 products (4bp-del DLX3, 2bp-del DLX3) and examined the effects of their overexpression on the expression of the enamel matrix proteins and proteases. Wild type DLX3 enhanced the expression of matrix metalloprotease 20 (MMP20) mRNA and protein in murine ameloblast-like cells. However, neither a 4bp-del nor 2bp-del DLX3 increased MMP20 expression. Wild type DLX3, but not the above DLX3 mutants, also increased the activity of reporters containing 1.5 kb or 0.5 kb of the MMP20 promoter. An examination of protein stability showed that the half-life of wild type DLX3 protein was less than 12 h whilst that of both deletion mutants was longer than 24 h. Endogenous DLX3 was also found to be continuously expressed during ameloblast differentiation. Since inactivating mutations in the gene encoding MMP20 are associated with amelogenesis imperfecta, the inability of 4bp-del or 2bp-del DLX3 to induce MMP20 expression suggests a possible involvement of such mutations in the

enamel phenotype associated with TDO syndrome or ADHHAI.

**Key Words :** DLX3, 4bp-del DLX3, 2bp-del DLX3, Matrix metalloprotease 20, Amelogenesis imperfecta, Tricho-dento-osseous syndrome

### 서론

법낭질 형성과정은 분비기, 이행기, 성숙기로 이루어지며, 분비기 동안 상아질과 법낭질 경계부분에서부터 리본 형태의 carbonated hydroxyapatite 결정이 침착되기 시작하여 법낭질 전체 두께의 길이 성장이 이루어진다. 이 시기에 법낭모세포(ameloblast)는 다량의 세포외기질 단백질을 분비하며 이중 85-90% 정도는 amelogenin으로 구성되어 있고 기타 enamelin, ameloblastin 등의 단백질이 소량 포함된다. 또한 법낭모세포는 이 시기에 matrix metalloprotease 20(enamelysin, MMP20)를 분비하는데, 이 효소는 특이적으로 치아조직에서 발현되고, amelogenin의 가공, 분해를 담당하는 것으로 알려져 있다(Ryu et al., 1999). Amelogenin 분자들이 모여 nanosphere를 형성하고 이것이 더 모여 잘 조직화된 supramolecular structure로 조립되며 이렇게 조직화된 구조를 따라 apatite의 길이 성장이 이루어지게 된다(Fincham et al., 1994; Du et al., 2005; Margolis et al., 2006). 이 때 amelogenin 분자의 조립이 제대로 진행되기 위해서는 MMP20에 의해 amelogenin이 적당한 위치에서 잘려지는 것이 필수적이다(Ryu et al., 1999; Hunter et al., 1999; Fincham et al., 1999). 법낭질 생성이 이행기 및 성숙기로 진행됨에 따라 법낭모세포에 의한 단백질 분비는 감소하고 대신 이미 분비된 세포외기질의 재흡수가 진행되며, 이 때

\*Corresponding author: Jeong-Hwa Baek, Department of Cell and Developmental Biology, School of Dentistry, Seoul National University, 28 Yeongun-dong, Jongno-gu, Seoul 110-749, Korea. Tel.: +82-2-740-8688, Fax.: +82-2-741-3193, E-mail: baekjh@snu.ac.kr

세포외기질의 재흡수가 진행되기 위해서는 법낭모세포에서 분비된 serine proteinase인 kallikrein 4(KLK4)에 의해 기질 단백질이 분해되는 것이 선행되어야 한다. 이렇게 단백질이 없어진 공간에 apatite 침착이 진행되어 법낭질 결정의 두께와 폭이 증가하고 법낭질의 경도가 증가된다. 이러한 과정이 완성되면 법낭모세포도 소실되고, 법낭질 전체 무게의 1% 미만의 단백질만이 남게 되어 우리 신체에서 석회화정도가 가장 높은 조직이 된다(Bartlett et al., 2006).

법낭형성부전증(AI, amelogenesis imperfecta)은 치아 이외의 다른 전신적 임상증상이 없이 치아 법낭질에 결함이 나타나는 유전질환이다. 현재까지 AI의 원인으로 밝혀진 유전자 돌연변이는 amelogenin, enamel, ameloblastin 같은 법낭질 세포외기질 또는 이들 세포외기질 단백질을 분해하는 MMP20 또는 KLK4 단백분해효소를 인코딩하는 유전자에 다양한 형태로 나타나는 것으로 알려져 있다(Wright, 2006). 이들 유전자와 AI와의 연관성 때문에 이러한 기질단백질 또는 단백분해효소가 법낭질 발생과정 중 담당하는 생화학적 역할에 대해 어느 정도 연구가 진행되어 왔다. 그러나 상염색체 우성 AI의 일종인 autosomal dominant hypoplastic hypomaturational amelogenesis imperfecta(ADHHAI, OMIM 104510)에 관련된 유전자로 알려진 DLX3의 경우 AI 표현형을 유도하는 병태생리적 기전에 대해서는 아직 알려진 바가 없다. ADHHAI 환자는 법낭질 저형성과 저성숙 및 이상치 표현형을 나타내며, 이들 환자의 유전자에서 2개 염기가 결손(c.561\_562delCT)된 DLX3 돌연변이가 관찰되었다(Dong et al., 2005). 이러한 돌연변이로 인해 frameshift가 일어나 DNA에 결합하는 homeobox domain의 마지막 아미노산 2개가 바뀌고 조기 종료코돈이 생겨 88개 아미노산이 없어지며 대신 12개의 새로운 아미노산 서열이 생기게 된다. ADHHAI 환자 치아의 임상증상은 DLX3 변이와 관련된 또 다른 상염색체 우성 유전병인 tricho-dento-osseous 증후군(TDO 증후군, OMIM 190320)과 유사하다. TDO 증후군의 경우에는 치아 증상 외에도 곱슬거리는 머리카락과 머리뼈의 석회화정도가 높은 표현형이 동반되므로 AI로 분류되지 않는다(Price et al., 1998a, 1998b). TDO 증후군 환자에서는 homeobox domain 바로 뒷부분에서 4개의 염기가 결손(c.571\_574delGGGG)된 DLX3 돌연변이가 존재하는 것으로 밝혀졌다(Price et al., 1998b). 그 결과 frameshift가 일어나 67개 아미노산 서열이 변화되고 조기 종료코돈이 생겨 야생형에 비해 32개의 아미노산이 짧아진 DLX3 돌연변이체가 만들어지게 된다(Wright et al., 2008). 이 돌연변이체가 법낭질 저형성/저성숙을 유도하는 기전에 대해서도 아직 알려진 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 TDO 증후군의 원인인 4개의 염기가 결손된 DLX3(4bp-del DLX3) 돌연변이와 ADHHAI

의 원인인 2개의 염기가 결손된 DLX3(2bp-del DLX3) 돌연변이가 법낭질 표현형을 나타내는 기전을 알아보기 위해 사람 DLX3 야생형과 두 가지 돌연변이체의 발현 벡터를 제작하고 생쥐에서 확립된 법낭모세포주(ALC; Nakata et al., 2003)를 이용하여 AI과 관련된 것으로 보고된 세포외기질 단백질 및 단백분해효소의 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 그 결과 MMP20의 발현이 DLX3 야생형에 의해 증가된 반면 돌연변이체들에 의해서는 별다른 영향을 받지 못함을 확인하였다. MMP20는 amelogenin의 가공, 분해과정에 필수적인 효소로, MMP20의 효소 활성 부위 근처에 돌연변이가 있거나 amelogenin이 MMP20에 의해 잘려지는 부위 주변에 변이가 있는 경우 AI를 유발하는 것으로 알려져 있으므로(Wright, 2006), DLX3에 의한 MMP20 발현 조절은 ADHHAI 및 TDO 증후군에서 치아 표현형을 설명하는데 있어서 중요한 병태생리적 의미를 가질 수 있는 것으로 생각된다.

## 실험 재료 및 방법

### 세포 배양

ALC 세포의 배양을 위해 50 µg/ml rat tail type I collagen(BD biosciences; Bedford, MA, USA)을 이용하여 배양접시를 코팅하고, ALC 세포를 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco Invitrogen; Grand Island, NY, USA), antibiotics(100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, Gibco Invitrogen), 10 ng/ml recombinant human epidermal growth factor(Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)가 함유된 Minimal Essential Medium(MEM, Gibco Invitrogen)으로 이루어진 성장배지에서 계대 배양하여 유지하였다.

법낭모세포 분화를 유도하기 위해 ALC 세포를 분화배지에서 4주까지 배양하였으며, 사용된 분화배지는 10% FBS, 10 mM β-glycerophosphate(Sigma-Aldrich), 50 µg/ml ascorbic acid (Sigma-Aldrich), antibiotics를 함유한 Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM, Hyclone; Logan, UT, USA)이었다.

### DLX3 야생형 및 돌연변이체 발현벡터의 준비

사람 야생형 DLX3의 N 말단에 3xFlag tag이 붙어있는 발현 벡터를 구매하고(Genecopoeia; Germantown, MD, USA), 이를 이용하여 돌연변이체 발현벡터를 제작하였다. 4bp-del DLX3 돌연변이체 발현벡터는 polymerase chain reaction (PCR)-amplified site-directed mutagenesis cloning의 방법으로 제작하였고(Cha et al., 2007), 2bp-del DLX3 돌연변이체 발현벡터도 이와 동일한 방법으로 제작하였으며, 그 과정에 사용된 primer들의 염기서열은 다음과 같다.

DLX3-F:5'-atgagtggtccttcgatcgaagctcagc (including EcoRI restriction site)

DLX3-R:5'-tcagtacacagccccagggtggcg (including XhoI restriction site)

DLX3-mt-F:5'-ttccaagttcaagaact(*ct DEL*)acaagaacgggg-aggtgc

DLX3-mt-R:5'-gcacctccccgttctgt(*ag DEL*)agtttctgaactccaa

### MMP20 프로모터 클로닝 및 Luciferase 활성 분석

*Mus musculus*의 genome database(NCBI DQ190458)로부터 MMP20의 전사시작부위 상위 1.5 kb 이내의 염기서열을 조사한 결과 DLX3 결합 가능부위가 4곳이 있는 것으로 나타났기 때문에 -1416~104 bp 부위를 합성하여 염기서열을 확인하고 pGL3-luc 벡터에 클로닝을 시행하였다(pGL-MMP20(1.5)). 또한 DLX3 결합 가능부위 두 곳을 포함하는 -392~104 bp 부위만을 포함하는 리포터 벡터도 함께 제작하였다(pGL-MMP20(0.5)). 클로닝된 MMP20 프로모터가 DLX3에 의해 조절되는지 확인하기 위해 HEK293 세포를 이용하여 luciferase 활성을 분석하였다. 96-well plate에  $3 \times 10^3$  cells/well의 밀도로 세포를 분주한 후 100 ng 썬의 발현벡터와 reporter 벡터를 Lipofectamine 2000(Invitrogen)을 이용하여 transient transfection 한 후 24시간 후에 Bright-Glo Luciferase Assay System(Promega; Madison, WI, USA)을 이용하여 전사활성 분석을 시행하였다.

### Semiquantitative reverse transcription(RT)-PCR

배양된 세포로부터 easy-blue RNA Extraction Reagent(iNtRON Biotechnology; Sungnam, Korea)를 이용하여 total RNA를 준비하고 AccuPower RT Premix (Bioneer; Daejeon, Korea)로 cDNA를 제작한 후 *i-star* Taq DNA polymerase (iNtRON Biotechnology)를 이용하여 PCR을 시행하였다. 얻어진 PCR 산물은 1.2% agarose gel에서 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다. PCR에 사용한 primer는 TaKaRa Korea에서 제작하여 사용하였으며 서열은 아래와 같다. Amelogenin과 ameloblastin의 경우 사용된 primer가 한 exon 내에 존재하므로, DNA로부터 PCR 산물이 만들어지는 것을 막기 위해 total RNA에 DNase I(Sigma-Aldrich)을 처리한 후 RT-PCR을 시행하였다. Amelogenin-forward(f) 5'-cagccgtatccttctctatgg-3', Amelogenin-reverse(r) 5'-cttctcccgttgggtcttg-3'; Ameloblastin-f 5'-ttctgtcttcccaatgac-3', Ameloblastin-r 5'-gggtcactttgttccaggt-3'; Dlx3-f 5'-atgagtggtccttcgatcgaagctcagc-3', Dlx3-r 5'-tcagtacacagccccagggtggcg-3'; MMP20-f 5'-ggccatagatgctgctgtgga-3', MMP20-r 5'-gagccagtaggagacaaagaggac-3', KLK4-f 5'-cccacctctccatccagcac-3', KLK4-r 5'-ggccttg-

tagtcagtcctatagc-3'; GAPDH-f 5'-tcaccatctccaggagcg-3', GAPDH-r 5'-ctgcttaccaccttctga-3'.

### Transient transfection

야생형 또는 돌연변이형 DLX3의 과발현이 법낭질 기질단백질 및 단백질분해효소 유전자의 발현에 미치는 효과를 알아보기 위해 ALC 세포에 이들 발현벡터의 transient transfection을 시행하였다. Collagen이 코팅된 배양접시에  $2 \times 10^5$  cells/60mm dish가 되도록 분주하고 성장배지에서 배양하여 세포가 70%정도 차면 Lipofectamine 2000을 이용하여 pcDNA3.1 또는 DLX3 발현벡터의 transient transfection을 시행하였다. 24시간 후 total RNA를 수집하여 RT-PCR을 수행하거나 48시간 후 단백질 시료를 준비하여 Western blot 분석을 시행하였다.

### Western blot 분석

배양된 세포를 PBS로 세척하고 Lysis buffer(10 mM Tris-Cl(pH7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA(pH8.0), 1% Triton X-100, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50 mM NaF, 0.2 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin, 1  $\mu\text{M}$  leupeptin, 1  $\mu\text{M}$  pepstatin)로 용해한 후 Bradford reagent(Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 30  $\mu\text{g}$  단백질을 5X Laemmli sample buffer에 섞은 후 10% gel을 이용하여 SDS-PAGE를 시행하고 PVDF 막에 옮긴 후 mouse anti-Flag M2-HRP(Sigma-Aldrich), goat anti-MMP20(Santa Cruz Biotechnology; Santa Cruz, CA, USA), goat anti-actin(Santa Cruz Biotechnology) 및 rabbit anti-goat HRP-conjugated IgG(Zymed; S. San Francisco, CA, USA)를 일차 및 이차 항체로 사용하고 ECL detection system(iNtRON)을 이용하여 Western 분석을 시행하였다.

### DLX3 단백질 안정성 비교

DLX3 야생형과 돌연변이형 간에 단백질의 안정성에 차이가 있는지 비교하기 위해 HEK 293 세포에 이들 발현 벡터를 transient transfection 하고 24시간 뒤 단백질 합성 저해제인 cycloheximide(CHX, 10  $\mu\text{g/ml}$ , Sigma-Aldrich)를 처리하여 0, 4, 8, 12, 24시간 후 단백질시료를 준비하여 Western 분석을 시행하였다. Densitometry를 시행하고 Actin과 비교하여 시간에 따른 DLX3의 양적 변화를 계수하였다.

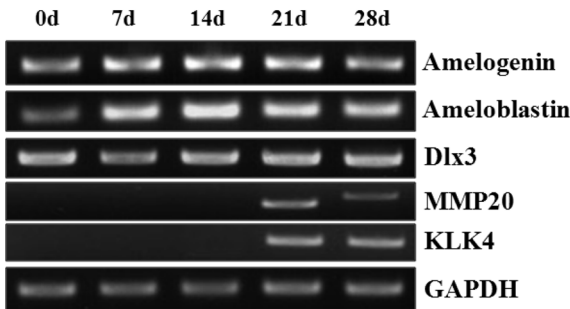
### 세포 증식 측정

야생형 또는 돌연변이형 DLX3의 과발현이 ALC 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 Cell Counting Kit-8(CCK-8; Dojindo Molecular Technologies, Gaithersburg, MA, USA)을 이용하여 실험하였다. ALC

세포( $5 \times 10^3$  cells/well)를 collagen이 코팅된 96 well plate에 분주하고 DLX3 발현벡터를 transient transfection 한 후 24시간이 지난 뒤부터 추가로 0, 24, 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나는 시점에 배양액에 CCK-8 시약을 배양액에 10:1 (v:v) 비율로 섞어 넣고 37°C에서 1시간 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 실험 결과

먼저 법랑모세포의 분화과정 중 Dlx3가 발현되는 시기를 확인하고자 ALC 세포의 분화를 유도하고 7, 14, 21, 28일 배양한 후 total RNA를 준비하고 RT-PCR을 시행하였다(Fig. 1). Amelogenin, ameloblastin은 분화배지로 교체하면 발현이 약간 증가하여 계속 발현이 지속되었고, MMP20와 KLK4는 21, 28일 시료에서 발현되었으며 MMP20는 28일째 발현이 약간 감소하는 양상을 보였다. 이러한 유전자 발현 양상은 이 세포를 사용한 기존의 논문(Park et al., 2007)과 비교할 때 분화가 1주 이상 지연되어 진행되는 것으로 판단되었다. 그러나 법랑모세포

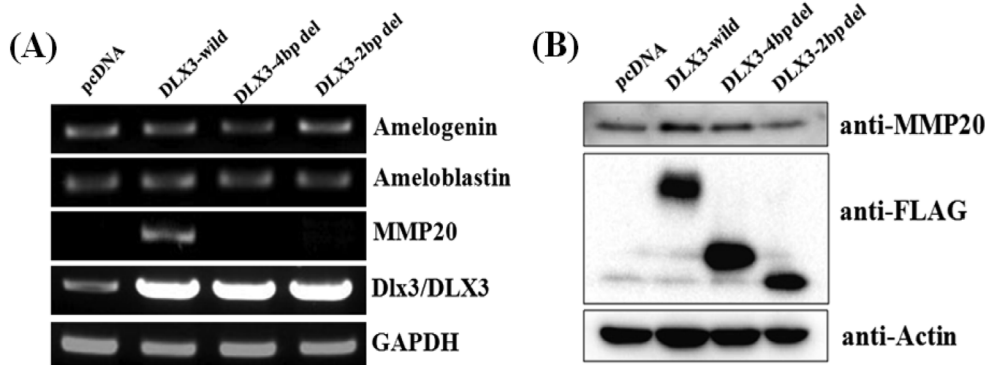


**Fig. 1.** Gene expression pattern during ameloblast differentiation of ALC cells. Ameloblast differentiation was induced by culturing ALC cells in DMEM supplemented with 10% FBS, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphate and 50  $\mu$ g/ml ascorbic acid. Total RNAs were prepared at the days indicated and RT-PCR was performed.

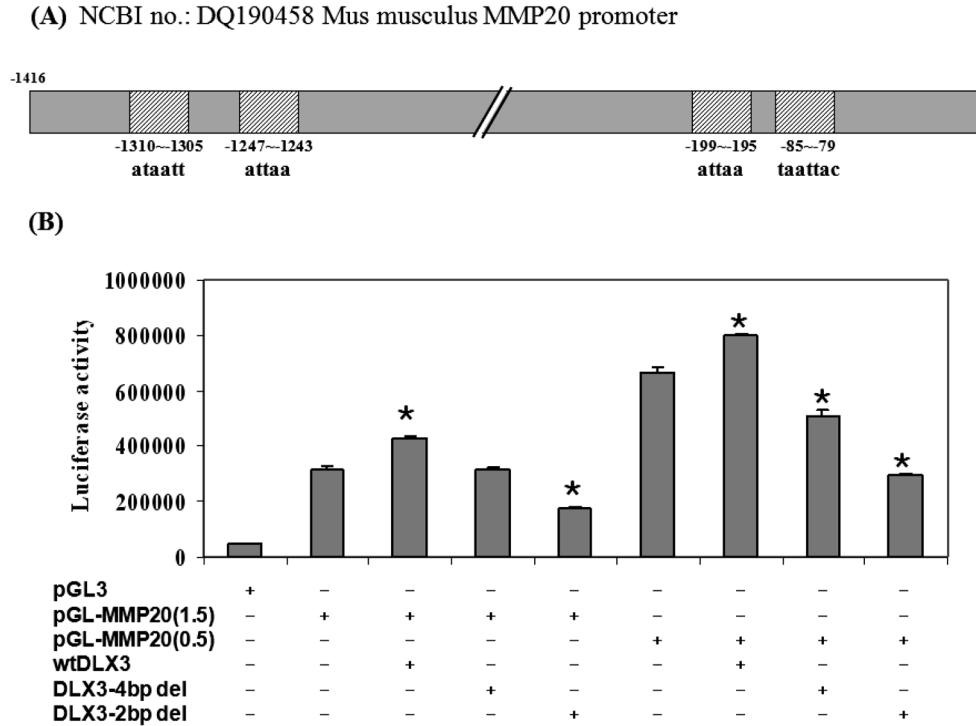
분화 후기에 발현되어 법랑질 성숙에 관여하는 KLK4의 발현이 관찰되었기 때문에 본 연구에 사용한 세포 배양 시스템에서 법랑모 세포 분화가 진행되고 있음은 확인할 수 있었다. Dlx3는 7일째 발현이 약간 감소한 것처럼 보였지만 그 외에는 분화기간 중 거의 일정하게 발현되었다.

생쥐 법랑모세포에서 Dlx3가 발현됨을 확인하였기 때문에, AI와 연관된 것으로 보고된 유전자들의 발현에 야생형 또는 돌연변이형 DLX3가 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다. 이를 위해 ALC 세포에 DLX3 발현 벡터를 transient transfection하고 성장배지에서 24시간 배양한 후 amelogenin, ameloblastin, MMP20, KLK4의 발현에 미치는 영향을 확인하였다. KLK4의 경우 PCR cycle 수를 증가시켜도 명확한 PCR 산물을 얻기 어려웠으며, 이는 법랑모세포 분화 후기에 발현되는 유전자의 특성과 관련된 것으로 생각되었다(Park et al., 2007; Lu et al., 2008). DLX3 야생형 과발현이 amelogenin이나 ameloblastin의 mRNA 발현에 큰 변화를 유도하지 않은 반면 MMP20 mRNA의 발현은 뚜렷하게 증가시켰다(Fig. 2A). DLX3 야생형 과발현에 의한 MMP20 발현 증가는 단백질 수준에서도 확인되었다(Fig. 2B). 그러나 야생형 DLX3와는 달리 돌연변이형 DLX3는 MMP20 발현을 증가시키지 않았다(Fig. 2). RT-PCR 결과에서는 야생형 DLX3를 과발현시킨 경우에만 MMP20 mRNA가 관찰된 반면 Western blot 분석에서는 ALC 세포에서 기본적으로 MMP20 단백질 밴드가 약하기는 하지만 어느 정도 관찰되었다(Fig. 2). 그 이유가 확실치는 않으나, ALC 세포에서 소량의 MMP20 mRNA가 발현되고 있으나 본 실험의 RT-PCR 조건에서 잘 확인이 되지 않아 이러한 결과가 나타난 것으로 추측된다.

야생형 DLX3가 ALC 세포에서 MMP20의 전사를 직접 조절하는지 확인하기 위해 기존에 보고된 Dlx3 결합 염기서열을 이용하여(Feledy et al., 1999) 생쥐의 MMP20 전사 시작부위 상위 1.5 kb에 해당하는 DNA 염기서열을 대상으로 TAAT 모티프를 조사한 결과 Dlx 결합 가



**Fig. 2.** MMP20 expression was induced by wild type DLX3 but not by mutant DLX3. ALC cells were transiently transfected with DLX3 expression vector or with pcDNA3.1 and incubated for 24 (A) or 48 (B) hours. Then cells were lysed for total RNA extraction and RT-PCR (A) or for protein preparation and Western blot analysis (B).



**Fig. 3.** Wild type DLX3 enhanced MMP20 promoter activity while mutant DLX3 suppressed. (A) Illustration of putative DLX3 binding elements in mouse MMP20 promoter. (B) ALC cells were transiently transfected with DLX3 expression vectors and luciferase reporter vectors containing 1.5 kb or 0.5 kb MMP20 promoter. After 24 hour incubation, luciferase activity was measured. Data represent mean + S.D. (N=4). \*significantly different from the cells containing MMP20 reporter only ( $p < 0.01$ ).

능성이 있는 부위가 4곳이 있는 것으로 분석되었다(Fig. 3A). 이러한 결과를 바탕으로 생쥐 MMP20 프로모터 (1.5 kb 또는 0.5 kb)를 luciferase 벡터에 클로닝하고 DLX3 과발현시킨 후 프로모터 활성을 관찰하였다. ALC 세포는 transfection 효율이 낮아 충분한 리포터 활성을 관찰하기 어려웠기 때문에 HEK293 세포를 이용하여 실험을 진행하였다. pGL3-basic 벡터만 넣은 경우 luciferase 활성이 낮았지만 MMP20 프로모터가 포함된 pGL-MMP20 벡터만 넣은 경우 luciferase 활성이 상당히 높게 나타났으며, 1.5 kb 보다 0.5 kb 프로모터에서 기본 활성이 더욱 높게 나타났다(Fig. 3B). 이러한 현상은 사람 MMP20 프로모터를 넣은 리포터의 활성이 SV40 프로모터를 넣은 리포터 활성과 거의 유사하게 나온 기존의 보고(Zhang et al., 2007)와 비슷한 것으로 생각된다. 여기에 야생형 DLX3를 추가적으로 과발현한 경우 pGL-MMP20(1.5)와 pGL-MMP20(0.5) 모두에서 통계적으로 유의한 luciferase 활성의 증가가 관찰되었다(Fig. 3B). 그러나 DLX3 돌연변이형의 경우 리포터 활성의 증가가 나타나지 않았으며, 오히려 MMP-20 프로모터 활성을 억제하는 것으로 나타났고 이러한 억제 효과는 2-bp del DLX3에서 더욱 뚜렷하게 나타났다.

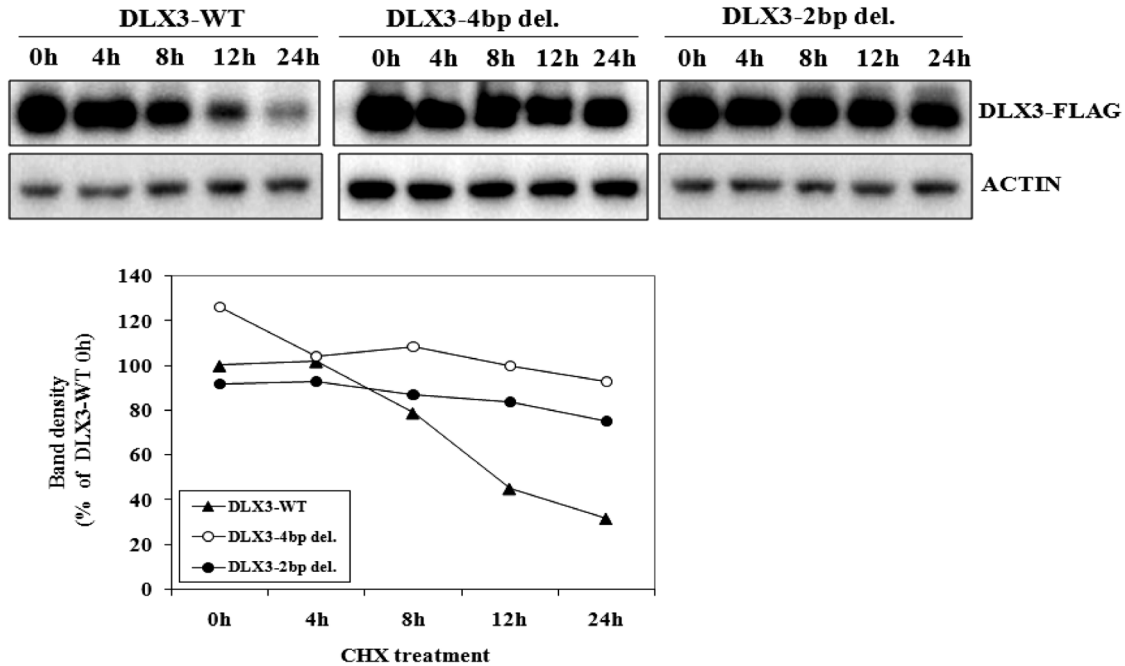
기존의 보고에서 4bp-del DLX3는 야생형에 비해 단백질 분해속도가 느림을 확인하였기 때문에(Cha et al.,

2007), 2bp-del DLX3도 유사한 효과를 보이는지 알아보 고자 CHX 처리에 의해 신생단백질 합성을 저해한 상태에서 시간 경과에 따른 DLX3 단백질량 변화를 관찰하였다. DLX3 야생형의 경우 12시간 이전에 단백질량이 50% 이하로 감소된 반면, 두 가지 돌연변이형 모두 단백질 분해속도가 늦어 24시간까지 50% 이상을 유지하고 있는 것으로 나타났다(Fig. 4).

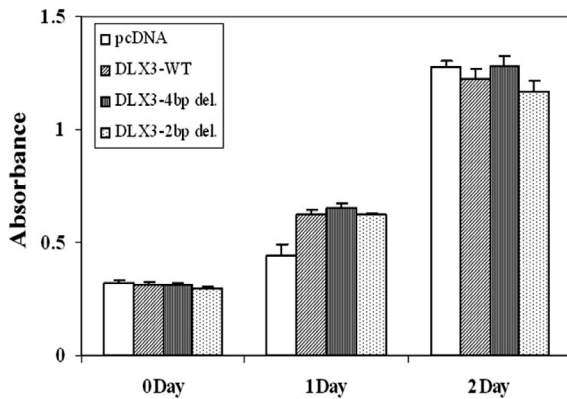
마지막으로 돌연변이형 DLX3 단백질의 세포내 축적으로 인해 세포 독성을 나타낼 가능성이 있는지 확인하기 위해 ALC 세포에 이들을 과발현시키고 세포성장을 관찰하였다. 그 결과 야생형과 돌연변이형 DLX3 모두 ALC 세포의 성장에는 통계적으로 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다(Fig. 5).

## 고 찰

본 논문에서는 범양질 저형성/저성숙과 관련된 것으로 알려진 2 bp-del 또는 4bp-del DLX3 돌연변이가 범양 모세포의 유전자 발현에 미치는 영향을 관찰하였으며, 그 결과 야생형 DLX3가 MMP20 전사를 촉진시킬 수 있는 반면 돌연변이형 DLX3는 이러한 효과를 나타내지 못함을 확인하였다.



**Fig. 4.** Both mutants of DLX3 show longer half-life than wild type DLX3. ALC cells were transiently transfected with DLX3 expression plasmids and incubated for 24 hours. Then cells were further incubated in the presence of 10  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) for the times indicated and DLX3 protein level was determined by Western blot analysis (*upper panel*). Densitometric analysis was performed and DLX3 band density was normalized by actin band density (*lower panel*). Data were expressed as the percent band density over wild type DLX3 band density at 0 h.



**Fig. 5.** DLX3 over-expression did not affect cellular proliferation. ALC cell were transiently transfected with DLX3 expression vector or with pcDNA3.1 and incubated for 24 h. Then cells were further cultured for the days indicated. CCK-8 reagents were used for measuring the proliferation activity. Results are expressed as the mean + S.D. (N=5).

최근의 보고에 따르면 amelogenin 프로모터에 Dlx 결합부위가 존재하며, 이 염기서열 조각을 리포터 벡터에 클로닝하고 Dlx2 과발현 벡터와 같이 세포에 transfection 하면 리포터 활성이 증가된다고 하였다(Lézot et al., 2008). 그러나 생체 내에서 법낭질 형성과정 중 Dlx2와 amelogenin의 발현 시기를 서로 비교해보면 오히려 Dlx2가 발현되지 않는 법낭모세포에서 amelogenin 전사체가

발견되는 것으로 나타나 실제로 Dlx2가 amelogenin 전사를 촉진할 가능성이 낮을 것을 시사하였다. 모든 Dlx가 유사한 homeobox 도메인을 가지고 있으므로 amelogenin의 전사 조절과정에 Dlx2외에 다른 Dlx 전사 인자가 관여할 가능성이 있을 것으로 생각되었다. 따라서 먼저 법낭모세포 분화과정 중 Dlx3의 발현시기를 먼저 확인하였다. 기존의 보고에 의하면 사람 또는 생쥐 치아 발생과정 중 법낭모세포에서 지속적으로 Dlx3/DLX3 mRNA 및 단백질이 관찰되는 것으로 알려져 있으며(Ghoul-Mazgar et al., 2005; Lérot et al., 2008), 이러한 보고와 유사하게 ALC 세포의 분화과정 중 Dlx3가 계속 발현됨이 확인되었다. 따라서 법낭모세포에서 계속 발현되는 Dlx3가 법낭모세포 분화과정 중 발현되는 여러 유전자의 전사를 조절할 가능성이 있을 것으로 생각되었다. 이를 확인하고자 ALC 세포에 야생형 또는 돌연변이형 DLX3를 과발현하고 사람의 법낭질 저형성 또는 저성숙 표현형과 연관된 것으로 보고된 유전자들의 발현을 관찰하였다. 예상과 달리 프로모터에 Dlx 결합부위가 있다고 알려진 amelogenin은 DLX3 과발현에 의해 큰 영향을 받지 않았다. 그러나 amelogenin 단백질의 분해 효소인 MMP20의 발현이 야생형 DLX3에 의해 촉진되었으며, 야생형 DLX3에 의한 MMP20 프로모터 활성 증가가 같이 관찰되었기 때문에 MMP20 mRNA 전사 수준에서 DLX3의 조절을 받을 것으로 생각되었다.

생쥐와 사람 MMP20 프로모터 염기서열을 분석한 결과, 생쥐의 경우 전사시작 부위 상위 1.5 kb 안에 TAAT 모티프가 4곳이 있었으며, 사람의 경우 2 kb 이내에 6군데가 있는 것으로 분석되었다. 이러한 분석결과와 유사하게, MMP20 리포터 활성 분석 실험에서 야생형 DLX3를 과발현한 경우 pGL-MMP20(1.5)와 pGL-MMP20(0.5) 모두에서 통계적으로 유의한 luciferase 활성의 증가가 관찰되었다. 그러나 DLX3 돌연변이형의 경우 과발현에 의해 리포터 활성의 증가가 나타나지 않았으며, 오히려 MMP20 프로모터 활성을 억제하는 것으로 나타났고 이러한 억제 효과는 2-bp del DLX3에서 더욱 뚜렷하게 나타났다. 이러한 결과는 야생형 DLX3에 의한 MMP20 프로모터 전사활성 증가가 특이적인 현상이며, 야생형 DLX3의 C 말단 부위가 MMP20 전사 조절에 꼭 필요함을 시사하는 결과로 생각된다.

DLX3는 homeobox 도메인의 N 말단쪽과 C 말단쪽에 transactivation 도메인이 존재하며 이 두 가지가 다 있어야 전사활성이 잘 나타나는 것으로 알려져 있다(Feledy et al., 1999). 4bp-del 또는 2bp-del DLX3는 frameshift로 인해 homeobox 도메인 뒷부분에 존재하는 기존의 아미노산 서열이 없어지고, 길이는 짧아졌지만 새로운 아미노산 서열을 가진 C 말단이 형성된다. 따라서 이들 돌연변이형의 C 말단은 야생형 DLX3 C 말단과 같은 전사활성을 잘 나타내지 못할 것으로 생각되며, 본 연구에서 돌연변이형 DLX3가 MMP20 프로모터 활성을 증가시키지 못하는 결과는 이와 연관된 현상으로 생각된다. 한편 ADHHAI 및 TDO 증후군은 모두 상염색체 우성으로 나타나며, Dlx3<sup>+/+</sup> heterozygote 생쥐의 경우 별다른 표현형이 없으므로(Morasso et al., 1999), 4bp-del 또는 2bp-del DLX3에 의한 법낭질 표현형은 야생형 DLX3 단백질의 부족에 의해 나타났다가보다는 돌연변이형 DLX3가 야생형 DLX3에 대해 dominant-negative로 작용한 결과로 여겨지고 있다(Duverger et al., 2008). 4bp-del DLX3 돌연변이형의 경우 homeobox 도메인 직후에 아미노산 서열이 바뀌므로 DNA 결합능에 별 차이가 없다고 보고된 바 있으나(Cha et al., 2007; Choi et al., 2008), 최근 보고에 따르면 4bp-del DLX3가 DNA에 결합하지 못하고, 또한 야생형 DLX3 단백질에 결합하여 야생형 DLX3에 의한 전사활성을 dominant-negative하게 억제하는 것으로 나타났다(Duverger et al., 2008). 2bp-del DLX3의 경우 homeobox 도메인의 마지막 아미노산 2개가 바뀌므로 DNA 결합능의 차이가 있을 가능성이 있으며 이에 대한 추가적 연구가 필요하다. 또한 2bp-del DLX3는 본 연구에서 MMP20 프로모터의 기본 활성을 현저히 감소시키는 것으로 나타나, 새로이 형성된 C 말단을 가진 2bp-del DLX3가 다른 단백질과의 상호작용에 영향을 미쳐 MMP20 프로모터의 기본활성을 저해할 가능성이 있음을 시사하였다. 실제 Dlx는 Lef-1이나 Ets2

같은 다른 전사인자와 결합하여 상협적으로 타겟 유전자의 발현을 조절하는 것으로 보고된 바 있으므로 이와 관련된 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다(Diamond et al., 2006; Ezashi et al., 2008).

기존의 보고에서 DLX3 단백질의 아미노산서열에 대한 분석 결과 homeobox 도메인 후방의 C 말단부에 PEST 도메인이 있으며, PEST 도메인은 26S proteasome을 통한 단백질분해에 대한 표지 역할을 하므로(Rogers et al., 1986; Rechsteiner and Rogers, 1996) proteasome 저해제인 MG132를 처리하면 야생형 DLX3 단백질양이 증가됨을 보여 DLX3가 proteasome 경로를 통해 단백질분해가 일어날 가능성이 있음을 제시한 바 있다(Cha et al., 2007). 따라서 4bp-del DLX3와 2bp-del DLX3 단백질이 야생형과 비교하여 단백질 안정성에 차이가 있는지 확인한 결과 두 가지 돌연변이형 모두 단백질 분해속도가 야생형보다 현저히 느린 것으로 나타났다. 이러한 결과는 돌연변이형 DLX3가 야생형에 비해 세포 내에서 더 많이 축적될 수 있고 그를 통해 dominant-negative로서의 작용을 효율적으로 잘 할 가능성이 있음을 시사한다.

MMP20는 법낭질 석회화 과정의 주요 조절인자 중 하나로, MMP20의 효소 활성 부위 근처에 돌연변이가 있거나 amelogenin이 MMP20에 의해 잘려지는 부위 주변에 변이가 있는 경우 AI를 유발하는 것으로 알려져 있다(Wright, 2006). 생체 내에서 DLX3가 MMP20의 발현 조절에 관여하고, 4bp-del DLX3 또는 2bp-del DLX3가 이러한 작용을 나타내지 못할 뿐 아니라 다른 전사인자와의 단백질 상호작용을 통해 MMP20 발현을 저해한다면 TDO 및 ADHHAI 증후군에서 치아 표현형을 설명하는데 있어서 중요한 병태생리적 의미를 가질 수 있는 것으로 생각된다. 다만 ALC 세포의 분화과정에서 Dlx3 mRNA는 지속적으로 발현됨에 반해 MMP20 전사체는 분화가 좀 더 진행된 후 발현되는 양상을 고려해보면, 법낭모세포 분화과정 중 MMP20가 발현되기 위해서는 Dlx3의 전사활성을 증가시키는 다른 보조인자 또는 다른 전사인자의 추가적 작용이 필요할 것으로 생각되며 향후 이에 대한 추가적 연구가 이루어질 필요가 있다.

---

## 감사의 글

이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2007-000-E00070)

---

## 참고문헌

Bartlett JD, Skobe Z, Lee DH, Wright JT, Li Y, Kulkarni AB,

- Gibson CW. A developmental comparison of matrix metalloproteinase-20 and amelogenin null mouse enamel. *Eur J Oral Sci.* 2006;114 Suppl 1:18-23.
- Cha JH, Ryoo HM, Woo KM, Kim GS, Baek JH. Dlx3 plays a role as a positive regulator of osteoclast differentiation. *Int J Oral Biol.* 2007;32:85-91.
- Choi SJ, Song IS, Ryu OH, Choi SW, Hart PS, Wu WW, Shen RF, Hart TC. A 4 bp deletion mutation in DLX3 enhances osteoblastic differentiation and bone formation in vitro. *Bone.* 2008;42:162-71.
- Diamond E, Amen M, Hu Q, Espinoza HM, Amendt BA. Functional interactions between Dlx2 and lymphoid enhancer factor regulate Msx2. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:5951-65.
- Dong J, Amor D, Aldred MJ, Gu T, Escamilla M, MacDougall M. DLX3 mutation associated with autosomal dominant amelogenesis imperfecta with taurodontism. *Am J Med Genet A.* 2005;133A:138-41.
- Du C, Falini G, Fermani S, Abbott C, Moradian-Oldak J. Supramolecular assembly of amelogenin nanospheres into birefringent microribbons. *Science.* 2005;307:1450-4.
- Duverger O, Lee D, Hassan MQ, Chen SX, Jaisser F, Lian JB, Morasso MI. Molecular consequences of a frameshifted DLX3 mutant leading to Tricho-Dento-Osseous syndrome. *J Biol Chem.* 2008;283:20198-208.
- Ezashi T, Das P, Gupta R, Walker A, Roberts RM. The role of homeobox protein distal-less 3 and its interaction with ETS2 in regulating bovine interferon-tau gene expression - synergistic transcriptional activation with ETS2. *Biol Reprod.* 2008;79:115-24.
- Feledy JA, Morasso MI, Jang SI, Sargent TD. Transcriptional activation by the homeodomain protein distal-less 3. *Nucleic Acids Res.* 1999;27:764-70.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP, Sarte P, Lau EC, Diekwisch T, Slavkin HC. Self-assembly of a recombinant amelogenin protein generates supramolecular structures. *J Struct Biol.* 1994;112:103-9.
- Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol.* 1999;126:270-99.
- Ghoul-Mazgar S, Hotton D, Lézet F, Blin-Wakkach C, Asselin A, Sautier JM, Berdal A. Expression pattern of Dlx3 during cell differentiation in mineralized tissues. *Bone.* 2005;37:799-809.
- Hunter GK, Curtis HA, Grynopas MD, Simmer JP, Fincham AG. Effects of recombinant amelogenin on hydroxyapatite formation in vitro. *Calcif Tissue Int.* 1999;65:226-31.
- Lézet F, Thomas B, Greene SR, Hotton D, Yuan ZA, Castaneda B, Bolaños A, Depew M, Sharpe P, Gibson CW, Berdal A. Physiological implications of DLX homeoproteins in enamel formation. *J Cell Physiol.* 2008;216:688-97.
- Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem.* 2008;389:695-700.
- Margolis HC, Beniash E, Fowler CE. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation. *J Dent Res.* 2006;85:775-93.
- Morasso MI, Grinberg A, Robinson G, Sargent TD, Mahon KA. Placental failure in mice lacking the homeobox gene Dlx3. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:162-7.
- Nakata A, Kameda T, Nagai H, Ikegami K, Duan Y, Terada K, Sugiyama T. Establishment and characterization of a spontaneously immortalized mouse ameloblast-lineage cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308:834-9.
- Park JC, Park JT, Son HH, Kim HJ, Jeong MJ, Lee CS, Dey R, Cho MI. The amyloid protein APin is highly expressed during enamel mineralization and maturation in rat incisors. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:153-60.
- Price JA, Bowden DW, Wright JT, Pettenati MJ, Hart TC. Identification of a mutation in DLX3 associated with trichodonto-osseous (TDO) syndrome. *Hum Mol Genet.* 1998a;7:563-9.
- Price JA, Wright JT, Kula K, Bowden DW, Hart TC. A common DLX3 gene mutation is responsible for trichodonto-osseous syndrome in Virginia and North Carolina families. *J Med Genet.* 1998b;35:825-8.
- Rechsteiner M, Rogers SW. PEST sequences and regulation by proteolysis. *Trends Biochem Sci.* 1996;21:267-71.
- Rogers S, Wells R, Rechsteiner M. Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science.* 1986;234:364-8.
- Ryu OH, Fincham AG, Hu CC, Zhang C, Qian Q, Bartlett JD, Simmer JP. Characterization of recombinant pig enamelysin activity and cleavage of recombinant pig and mouse amelogenins. *J Dent Res.* 1999;78:743-50.
- Wright JT. The molecular etiologies and associated phenotypes of amelogenesis imperfecta. *Am J Med Genet A.* 2006;140:2547-55.
- Wright JT, Hong SP, Simmons D, Daly B, Uebelhart D, Luder HU. DLX3 c.561\_562delCT mutation causes attenuated phenotype of tricho-dento-osseous syndrome. *Am J Med Genet A.* 2008;146:343-9.
- Zhang Y, Li W, Chi HS, Chen J, Denbesten PK. JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 in vitro. *Matrix Biol.* 2007;26:633-41.