

RNA interference를 이용한 OD314 유전자의 발현 억제가 상아질모세포 전구세포에 미치는 영향

김흥중¹, 정문진¹, 손호현³, 박주철^{1,2}

조선대학교 치과대학 ¹구강조직학교실 · ²BK21, ³서울대학교 치과대학 치과보존학교실

간추림 : 상아질모세포는 신경능선세포에서 기원하며 상아질의 유기질을 형성하는데 상아질모세포의 분화과정이나 상아질의 형성과정과 관련한 분자생물학적 기전은 아직 명확히 밝혀져 있지 않다. OD314는 흰쥐의 치아발생과정과 세포배양실험에서 상아질 형성과정 특히 석회화결절이 형성되는 시기에 그 발현이 현저하며 상아질의 석회화과정에 중요한 기능을 암시한다. 본 연구에서는 OD314 유전자의 발현을 RNA interference를 이용하여 억제하여 상아질모세포내 다양한 유전자들의 단백질들을 평가함으로써 상아질의 형성과정에서 OD314의 기능을 알아보고자 하였다.

1. MDPC23 세포에 ascorbic acid와 β -glycerophosphate 첨가하여 석회화 결절 형성을 유도한 실험에서 배양 후 14일에 석회화 결절이 관찰되었다.
2. MDPC23 세포의 석회화 결절 형성과정에서 OD314, OC 및 DSPP mRNA는 배양초기부터 석회화 결절이 형성된 14일에도 동일한 발현을 보인 반면, ON mRNA는 석회화 결절이 형성되기 시작하는 7일부터 발현이 감소되었다.
3. MDPC23 세포의 배양과정에서 OD314 단백질은 17kDa 정도의 크기로 배양 시작부터 7일까지 동일한 발현을 보였으며 석회화 결절이 형성된 14일에는 더욱 강한 발현을 보였다.
4. MDPC23 세포에 OD314 siRNA를 transfection한 실험에서 OD314, OC, ON 및 DSPP의 mRNA의 발현이 감소하였고 OD314의 단백질 발현 또한 OD314 siRNA를 transfection한 세포에서 감소하였다.

이상의 결과를 종합하면 OD314가 상아질모세포의 주요 유전자들의 조절에 관여할 것으로 사료되나 이를 명확히 하기 위하여 앞으로 OD314에 대한 기능과 상아질모세포 관련인자들과의 상호연관성에 대한 향후 보완 연구가 필요할 것으로 사료된다.

찾아보기 낱말 : OD314, 상아질모세포, RNA interference, 석회화

서 론

치아의 상아질을 형성하는 상아질모세포는 신경능선세포에서 기원한다. 상아질모세포의 분화과정은 다양한 세포외기질, 신호전달물질, 성장인자 그리고

여러 수용체들이 관여하는 고도로 조직화된 과정으로 알려져 있다. 최근에 상아질모세포 분화조절인자와 사기질모세포에 의한 상아질 형성의 상피간엽상호작용에 관하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 그러나 아직 상아질모세포의 분화과정이나 상아질의 형성과정과 관련한 분자생물학적 기전에 대하여 명확히 밝혀져 있지 않다.

최근 Dey 등(2001)이 상아질모세포의 분화과정에 관여하는 유전자를 연구할 목적으로 suppression

*본 연구는 한국과학재단 목적기초연구(R01-2003-000-10141-0)지원으로 수행되었음.

교신저자: 박주철(조선대학교 치과대학 구강조직학교실)
전자우편: jcapark@chosun.ac.kr

subtractive hybridization 방법을 이용하여 치아유두 세포와 뼈모세포에 비하여 상아질모세포와 치수세포에서 선택적으로 발현되는 유전자인 OD314의 cDNA를 동정하고 Northern 분석을 통하여 OD314가 상아질모세포에서 주로 발현된다고 보고하였다. 또한 최근에 Kim (2003)은 OD314가 현재까지 기능이 알려져 있지 않는 새로운 단백질이며 주로 세포질에 분포한다고 하였고, mRNA in-situ hybridization과 면역조직화학적 염색에서 OD314 유전자가 상아질모세포에서 주로 발현된다고 하였다. 또한 사람의 치수세포의 배양실험에서 OD314는 치수세포가 상아질모세포로 분화하는 과정에서 분화과정의 초기에서 발현되어 그 발현이 유지되다가 석회화과정에서 더욱 증가한다고 하였다.

본 연구는 상아질모세포 분화과정에서 OD314의 기능을 연구하기 위하여 siRNA (small interfering RNA)를 이용한 RNA interference 방법을 상아질모세포 전구세포(preodontoblast)에 적용하였다. 상아질모세포 전구세포로 구성된 MDPC23 세포(mouse dental papillae cell 23)에 OD314 siRNA construct를 transfection 한 후 RT-PCR 분석과 Western blot 분석을 통하여 상아질모세포내 주요 유전자들의 발현 변화를 분석하여 OD314 유전자의 기능을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. OD314 siRNA의 construct와 cell transfection

1) OD314 유전자의 siRNA construct 제작

siRNA converter program (<http://www.Ambion.com>)을 이용하여 OD314의 염기서열에서 siRNA를 위한 sense (5'-AAG TGC CTC AAG ATC AAA CTT CAA GAG AGT TTG ATC TTG AGG CAC TTT TTT TT-3')와 anti-sense (5'-AAT TAA AAA AAA GTG CCT CAA GAT CAA ACT CTC TTG AAG TTT GAT CTT GAG GCA CTT GGC C-3') oligomer를 제작 (Bioneer, Daejeon, Korea)하였다. 이

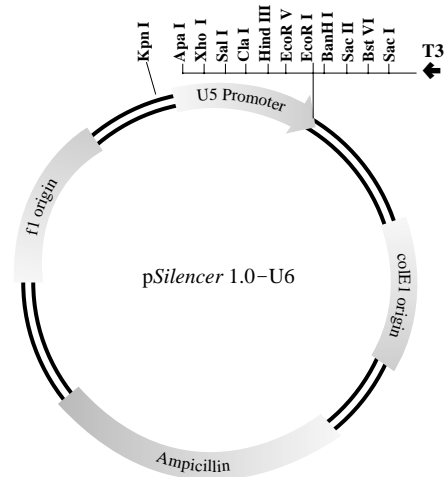


Fig. 1. Schematic representation of pSilencer 1.0-U6 vector.

를 annealing (Buffer; 100 mM K-acetate, 30 mM HEPES-KOH pH 7.4, 2 mM Mg-acetate)한 후 U6 vector (pSilencer 1.0-U6 vector, Ambion, Austin, TX, USA, Fig. 1)를 이용해 ligation하여 construct를 제작하였다. Construct의 염기서열을 분석 (Bioneer, Daejeon, Korea)하여 평가한 후 실험에 이용하였다.

2) Cell transfection

MDPC23 세포를 3.0×10^6 개씩 6 well plate (Nunc, Rochester, NY, USA)에 넣고 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Rockville, NY, USA)이 함유된 Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco BRL, Rockville, NY, USA)을 이용하여 하룻밤 동안 배양 시켰다. 다음날 세포를 lipofectamine plus reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 U6-OD314 siRNA 플라스미드를 2 μ g씩을 serum-free 배양액 OPTI-MEM (Gibco BRL, Rockville, NY, USA)이 함유된 배지에서 5시간 동안 transfection하였다. 배양 5시간 후 10% fetal bovine serum이 포함된 DMEM 배양액을 첨가 한 다음 incubator (37°C, 5% CO₂)에 48시간 더 배양하고 total RNA와 단백질을 추출하여 이를 RT-PCR과 western 분석에 이용하였다.

2. MDPC23 세포의 OD314 발현 분석

1) 세포 배양 및 석회화 결절의 확인

MDPC23 세포를 10% Fetal Bovine Serum과 항생제가 함유된 DMEM에 ascorbic acid (50 μ L/mL)와 β -glycerophosphate (10 mM)를 첨가한 배양액으로 배양하였다. 배양 0일, 4일, 7일 그리고 14일 후 세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 3회 세척한 후, 70% ethanol로 20분 동안 고정한 다음 0.1% NH_4OH 가 함유된 1% Alizalin Red-S (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)용액으로 5분간 염색하였다.

2) RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction)

MDPC23 세포를 PBS로 수세한 후 Trizol[®] reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 total RNA를 추출하였다. RT premix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 first strand cDNA를 합성하고 OD314, osteocalcin (OC), osteonectin (ON), Dentin sialoprophosphoprotein (DSPP) 및 control로 GAPDH 특이적 primer (Table 1)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였다. PCR은 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분 30초의 조건으로 30 사이클을 시행하였다. PCR 생성물을 1.5% Agarose gel에 전기영동하여 유전자 발현을 확인하였다. 분리된 유전자 단편들을 pGEM-

Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) Primer set

Protein	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Tm (°C)
OD314	S 422-446 ATGTCCTATGTGGTTCCTGTA AAA	593	55
	AS1015-986 ATGAGATCAGTGAAGAGGCTTTATACTT		
ON	S 1240-1255 ACATGGGTGGACACGG	405	52
	AS 1644-1627 CCAACAGCCTAATGTGAA		
OC	S 19-39 ATGAGAGCCCTCACACTCCTC	303	66
	AS 321-301 CTAGACCGGGCCGTAGAAGCG		
DSPP	S 784-802 AATGGGACTAAGGAAGCTG	814	54
	AS 1597-1580 AAGAAGCATCTCCTCGGC		
GAPDH	S 386-402 CCATGGAGAAGGCTGGG	195	55
	AS 580-561 CAAAGTTGTCATGGATGACC		

DSPP, Dentin sialoprophosphoprotein; OC, osteocalcin; ON, osteonectin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

Teasy Vector System (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 subcloning하고 이를 염기서열을 분석 (Bioneer, Daejeon, Korea)한 후, Blast search program (<http://ncbi.nlm.nih.gov/>)을 이용하여 OC, ON, DSPP 및 GAPDH 유전자로 보고 된 염기서열과 동일한지 확인하였다.

3) 항 OD314 항체의 제작

Kim(2003)에 의하여 OD314 단백질의 영역에서 주문 제작된 항체 CST15와 CPE14를 실험에 이용하였다.

4) Western blot 분석

MDPC23 세포를 PBS로 3회 수세한 후 RIPA buffer (0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 2% NP-40, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM PMSF, 50 mM Tris-HCl, pH 7.4)로 4°C에서 20분 동안 세포를 용해하여 단백질을 추출하였다. 단백질 정량 후 20 μ g의 단백질을 14% SDS PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 시행한 후 PVDF membrane (Pall corp, Eastern Hills, NY, USA)에 10V의 전압으로 40분 동안 transfer시켰다. Transfer된 PVDF membrane을 4°C에서 16시간 동안 5% non-fat dry milk/PBS-Tween 20으로 blocking한 뒤 PBS-Tween 20 용액으로 수세한 후 OD314에 대한 1차항체로 1시간 30분 동안 반응시킨 다음 PBS-Tween 20 용액으로 5분간 3회 수세하였다. Goat anti-rabbit IgG (Santa cruz Biotech, Santa cruz, CA, USA)를 1:20,000의 배율로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-Tween 20 용액으로 15분간 3회 수세하였다. Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Pierce, Rockford, IL, USA)로 2분간 반응시킨 후 암실에서 X-ray film (Fuji, Minamoto, Tokyo, Japan)으로 현상한 후 분석하였다.

3. OD314 siRNA construct를 transfection한 후 유전자들의 발현분석

정상 MDPC23 세포와 OD314 siRNA construct를 transfection한 MDPC23 세포에서 tRNA와 단백질을 추출하여 RT-PCR 분석과 Western 분석을 시행하였다.

결 과

1. 세포배양 및 석회화 결절의 형성

배양 초기의 MDPC23 세포는 다각형모양으로 섬유모세포와 유사한 형태를 보였다. 배양 7일경부터 세포증식이 관찰되었고 특히 배양 14일부터는 여러 층으로 된 결절을 형성하였다. 관찰되는 결절을 Alizarin-red S로 염색한 결과 대부분의 결절들은 석회화 결절로 확인되었다(Fig. 2).

2. MDPC23 세포에서 OD314의 발현 분석

1) RT-PCR 분석

MDPC23 세포의 석회화 결절 형성과정에서 OD314와 OC 그리고 DSPP mRNA는 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일과 석회화 결절이 형성된 14일에도 동일한 발현 양상이 유지되었다. 그러나 ON mRNA는 배양 시작 후 4일까지 발현이 유지되다가 석회화 결절이 형성되기 시작하는 7일부터는 발현이 다소 감소하였다(Fig. 3).

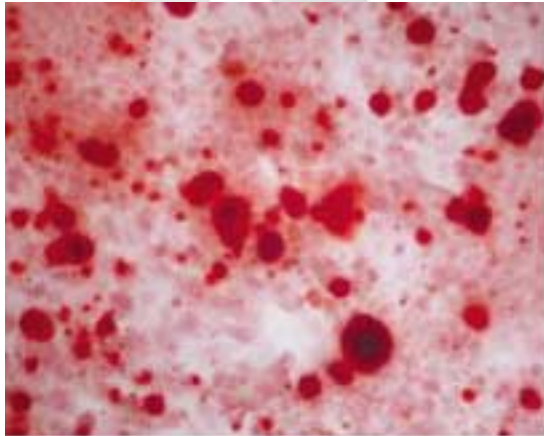


Fig. 2. Mineralized nodule formation in MDPC23 cells after 14 days of culture. Cells were induced for mineralization in the presence of ascorbic acid and β -glycerophosphate as described under "Materials and Methods". The nodules were detected by Alizarin red-S staining.

2) Western blot 분석

MDPC23 세포의 석회화 결절 형성과정에서 OD314 단백질은 17 kDa의 크기로 배양 시작부터 발현되기 시작하여 배양 4일, 7일까지 유지되었으며 석회화 결절이 형성되는 14일에는 발현이 더욱 증대된 소견을 보였다(Fig. 4).

3. OD314 siRNA를 transfection한 후 유전자의 발현분석

1) RT-PCR 분석

OD314 siRNA를 transfection한 MDPC23 세포에서 transfection하지 않은 MDPC23 세포보다 OD314 mRNA의 발현이 감소하였으며, OC, ON 그리고 DSPP mRNA의 발현까지 현저하게 감소하였다(Fig. 5).

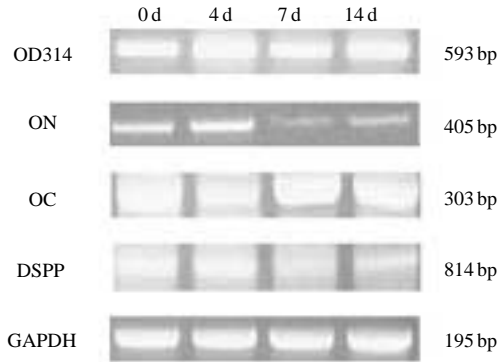


Fig. 3. Expression of OD314, DSPP ON, and OC transcripts in the culture of MDPC23 cells. Total RNAs were extracted from cultured cells after 0, 4, 7 and 14 days of culture. GAPDH used as a control (DSPP, dentin sialophosphoprotein; ON, osteonectin; OC, osteocalcin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

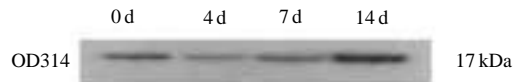


Fig. 4. Expression of OD314 protein during mineralization of MDPC23 cells. Proteins were extracted from cultured MDPC23 cells after 0, 4, 7 and 14 days and analyzed by Western blot with anti-OD314 antibody. OD314 was expressed as a 17 kDa protein in cultured cells.

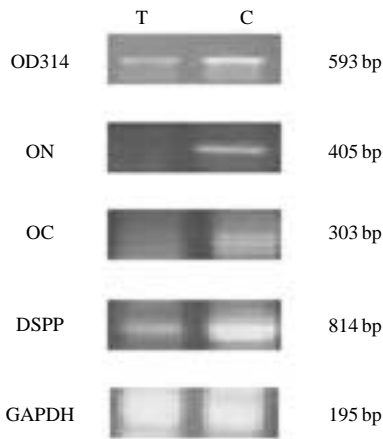


Fig. 5. Altered mRNA expression in the OD314 siRNA-transfected MDPC23 cells (T, transfected MDPC23 cells; C, MDPC23 cells; DSPP, dentin sialophosphoprotein; ON, osteonectin; OC, osteocalcin; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase).

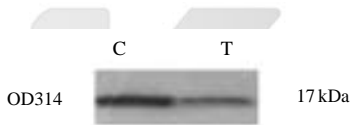


Fig. 6. Altered protein expression in the OD314 siRNA-transfected MDPC23 cells analyzed by Western blot with anti-OD314 antibody (T, transfected MDPC23 cells; C, MDPC23 cells).

2) Western 분석

OD314의 단백질 발현 또한 OD314 siRNA를 transfection한 MDPC23 세포에서 transfection하지 않은 MDPC23 세포에서 보다 감소하였다(Fig. 6).

고찰

상아질 형성과정은 상아질모세포에 의하여 유기 기질이 먼저 생성되고, 이차적으로 기질을 수산화인회석 결정으로 석회화하는 순서로 이루어진다. 상아질은 대부분이 무기질로 구성되어 있으며 유기질은 주로 제I형 아교질과 비아교성 단백질로 구성되어 있는데, 비아교성 단백질에는 decorin, biglycan, osteo-

nectin (ON), osteocalcin (OC), osteopontin (OPN), bone sialoprotein (BSP), dentin matrix protein 1 (DM-P1), dentin matrix protein 2 (DMP2) 그리고 dentin sialophosphoprotein (DSPP) 등이 알려져 있다(Gorter 등 1987, Berdal 등 1991, Butler 등 1992, Davideau 등 1996, Hirst 등 1997, About 등 2000, Shiba 등 2002, Sui 등 2002, Kim 2003). OC는 뼈세포의 기질에서 대부분을 차지하는 비아교질성 단백질 중 하나이다(Price 등 1976). ON은 뼈기질에서 광범위하게 발현되는 비아교질성 단백질로써 사람의 상아질모세포와 꽃상아질에서 관찰되고 있다(Fujisawa와 Kuboki 1989, Mundlos 등 1992, Reichert 등 1992, Yan과 Sage 1999). 이와 달리 DSPP는 상아질에서만 특이하게 발현되는 유전자로 알려져 있는데, 독특하게도 하나의 유전자에서 dentin phosphoprotein (DP)과 dentin sialoprotein (DSP)이 합성되어 따로 따로 분리된다(Veis와 Perry 1967, Gorter de Vries 등 1987, George 등 1993, Butler와 Ritchie 1995, D'Souza 등 1997, Butler 1998, Qin 등 2001). 이러한 세포외기질들은 상아질모세포의 분화와 상아질의 형성과정에서 이차적으로 생성되거나 석회화 과정에 관여하는 것들(Qin 등 2002, 2003)로 간주할 수 있기 때문에 상아질모세포의 분화와 상아질 형성을 초기에 조절하는 다른 인자에 관한 연구가 필요하다.

상아질모세포의 특성을 연구하기 위해서는 상아질모세포를 실험관에서 배양하는 방법이 필수적인데, 현재까지 알려진 방법으로는 주로 3가지가 이용되고 있다. 첫째는 치수를 배양하는 것이고 둘째는 직접 상아질모세포를 현미경상에서 분리하여 배양하는 방법, 그리고 마지막으로 치아유두세포를 배양하는 방법이 있다. 첫 번째 방법은 치수내 다양한 세포가 존재하여 다량의 상아질모세포가 배양될 수 있는가의 문제점이 있다. 두 번째 방법은 순수한 상아질모세포만을 배양할 수 있으나 숫자가 적고 분열 배양기간이 짧다는 문제점이 있다. 마지막 방법은 치아유두세포에서 상아질모세포로 분화하는 방법으로 다양한 세포들을 상아질모세포로만 분화하도록 하는데 어려움이 있다.

본 실험에서는 Hank 등(1998)이 CD-1 태생 흰쥐의 큰어금니에서 얻은 치아유두에서 만들어낸 상아

질모세포양의 세포주를 사용하였으며 이 세포주를 Sun 등(1998)이 RT-PCR, Northern 분석 등을 통하여 상아질모세포의 특성을 갖는 것을 확인하였다. 배양 과정은 About 등(2000)의 석회화 결절 형성을 유도한 실험 방법을 참고하였으며 본 연구에서도 ascorbic acid와 β -glycerophosphate의 첨가 후 배양 14일에 Alizarin-red S 염색으로 nodule이 석회화 결절을 확인하였다(Fig. 2).

MDPC23 세포로부터 석회화 결절의 형성을 유도한 후 OD314, DSPP, OC, ON mRNA의 발현을 분석한 RT-PCR 분석에서 OD314와 DSPP 그리고 OC mRNA는 배양 0일, 4일, 7일과 석회화 결절이 형성된 14일에도 동일한발현 양상이 유지되었으나, ON mRNA는 배양 시작 후 4일까지 발현이 유지되다가 석회화 결절이 형성되기 시작하는 7일이 되면서 발현이 다소 감소하는 소견을 보였다(Fig. 3). 이 결과는 OC는 석회화된 상아질에서 주로 발현되는 반면에 ON은 상아질모세포 초기 분화과정이나 상아질이 석회화되기 전 단계인 전상아질에서 발현된다는 Papagerakis 등(2002)의 연구 결과와 일치한다. 특히, 상아질모세포의 특이적 유전자로 알려진 DSPP가 배양 과정에서 전반적으로 발현된 것으로 보아 MDPC23 세포가 상아질모세포의 특성을 나타내고 있음을 확인할 수 있으며, OD314는 상아질모세포에서 발현된다고 생각할 수 있다. 석회화 결절의 형성을 유도한 배양과정의 Western 분석에서 OD314 단백질은 배양 0일부터 발현되기 시작하여 4일, 7일 까지 유지되다가 석회화 결절이 형성되는 14일에는 발현이 더욱 증대하였다(Fig. 5). 이 결과에서 OD314 단백질이 상아질모세포의 석회화 과정에 깊은 관련성을 가지고 있는 단백질이라는 것을 유추할 수 있다. 그러나 OD314 단백질의 발현 양상은 mRNA의 발현과 다른 양상을 보이는데 이는 RT-PCR 분석과 단백질 분석의 감응도의 차이라고 생각할 수 있다.

RNAi (RNA interference)는 특정 유전자의 발현을 억제하여 그 기능을 연구하는 방법으로, siRNA (small interfering RNA)를 이용하여 서열 특이적으로 mRNA의 분해를 유도함으로써 단백질 합성을 차단하고 그 결과 유전자의 발현을 간접작용을 하는 기법이다(Elbashir 등 2001, Brummelkamp 등 2002,

Paddison 등 2002, Sui 등 2002).

본 연구에서는 OD314 siRNA를 transfection하기 위하여 OD314 siRNA를 U6 vector로 subcloning하였으며 이 vector는 U6 promotor에 의해 조절되며, 이는 RNA Polymerase III promotor로부터 정해진 거리에서 합성을 시작하고, 4~5uridine을 만나면 합성을 끝내게 된다(Miyagishi와 Taira 2002). OD314 siRNA를 MDPC23 세포에 transfection한 후 transfection을 한 MDPC23 세포와 transfection하지 않은 MDPC23 세포를 대조군으로 사용하여 비교한 RT-PCR 분석에서 transfection한 MDPC23 세포에서 대조군에 비해 OD314의 mRNA와 더불어 OC, ON, DSPP의 mRNA의 발현이 감소하였다(Fig. 5). 또한, transfection한 MDPC23 세포와 대조군을 비교한 Western 분석에서 OD314 단백질은 대조군에 비해 transfection한 MDPC23 세포에서 감소하는 양상을 보였다(Fig. 6). 이 결과는 OD314가 다른 상아질모세포 관련인자의 발현을 조절하는 작용을 한다고 유추할 수 있으며 또한 상아질모세포에 특이적이라고 알려진 DSPP가 감소되는 것으로 보아 OD314가 DSPP의 발현에 영향을 준다는 것을 알 수 있다.

본 연구 결과를 종합해 보면 OD314의 유전적 발현을 억제함에 따라 상아질에 존재하는 유전자의 발현이 감소되는 결과를 얻은 바, OD314가 상아질모세포 분화과정과 상아질 형성과정에서 중요한 역할을 할 것으로 사료된다. 앞으로도 OD314 유전자의 과발현 실험과 함께 knockout mouse 제작과정을 통하여 OD314 유전자의 기능에 대한 향후 보완 연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

- About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA : Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 258 : 33-41, 2000.
- Berdal A, Gorter de Vries I, Hotton D, Cuisinier-Gleizes P, Mathieu H : The cellular and extracellular distribution of osteocalcin and dentin phosphoprotein in teeth of vitamin D-deficient rats. *J Biol Buccale* 19 : 45-53, 1991.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R : A system for stable

- expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296 : 550–553, 2002.
- Butler WT : Dentin matrix protein. *Eur J Oral Sci* 106 : 204–210, 1998.
- Butler WT, Bhowm M, Brunn JC, D'Souza RN, Farach-Carson MC, Happonen RP, Schrohenloher RE, Seyer JM, Sommerman MJ, Foster RA : Isolation, characterization and immunolocalization of a 53–KDal dentin sialoprotein (DSP). *Matrix* 12 : 343–351, 1992.
- Butler WT, Ritchie H : The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 39 : 169–179, 1995.
- Davideau JL, Papagerakis P, Hotton D, Lezot F, Berdal A : In situ investigation of vitamin D receptor, alkaline phosphatase, and osteocalcin gene expression in oro-facial mineralized tissues. *Endocrinology*. 137 : 3577–3585, 1996.
- Dey R, Son HH, Cho MI : Isolation and partial sequencing of potentially odontolast-specific/enriched rat cDNA clones obtained by suppression subtractive hybridization. *Arch Oral Biol* 46 : 249–260, 2001.
- D'Souza RN, Cavender A, Sunavala G, Alvarez J, Ohshima T, Kulkarni AB, MacDougall M : Gene expression patterns of murine dentin matrix protein I (Dmp1) and dentin sialophosphoprotein (DSPP) suggest distinct developmental functions in vivo. *J Bone Miner Res* 12 : 2040–2049, 1997.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T : Duplexes of 21–nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494–498, 2001.
- Fujisawa R, Kuboki Y : Changes in levels of osteonectin in bovine dentine during tooth development. *Arch Oral Biol* 34 : 89–92, 1989.
- George A, Sabsay B, Simonian PA, Veis A : Characterization of a novel dentin matrix acidic phosphoprotein. *J Biol Chem* 268 : 12624–12630, 1993.
- Gorter de Vries I, Quartier E, Boute P, Wisse E, Coomans D : Immunocytochemical localization of osteocalcin in developing rat teeth. *J Dent Res* 66 : 784–790, 1987.
- Hanks CT, Sun ZL, Fang DN, Edwards CA, Wataha JC, Ritchie HH, Butler WT : Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae. *Connective Tissue Res* 37 : 233–249, 1998.
- Hirst KL, Simmons D, Feng J, Aplin H, Dixon MJ, MacDougall M : Elucidation of sequence and the genomic organization of the human dentin acidic phosphoprotein1 (DMP-1) gene: exclusion of the locus from a causative Role in the pathogenesis of dentinogenesis imperfecta type II. *Genomics* 42 : 38–45, 1997.
- Kim DH : Functional characterization of odontoblast-specific gene, OD314. Dental collage chosun university doctor degree, 2003.
- Miyagishi M, Taira K : U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnology* 19 : 497–500, 2002.
- Mundlos S, Schwahn B, Reichert T, Zabel B : Distribution of osteonectin mRNA and protein during human embryonic and fetal development. *J Histochem Cytochem*. 40 : 283–291, 1992.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS : Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 16 : 948–958, 2002.
- Papagerakis P, Berdal A, Mesbah M, Peuchmaur M, Malaval L, Nydegger J, Simmer J, MacDougall M : Investigation of osteocalcin, osteonectin, and dentin sialophosphoprotein in developing human teeth. *Bone* 30 : 377–385, 2002.
- Price PA, Otsuka AA, Poser JW, Kristaponis J, Raman N : Characterization of a gamma-carboxyglutamic acid-containing protein from bone. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 1447–1451, 1976.
- Qin C, Cook RG, Orkiszewski RS, Butler WT : Identification and characterization of the carboxyl-terminal region of rat dentin sialoprotein. *J Biol Chem* 276 : 904–909, 2001.
- Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Tsujigawa H, Nagatsuka H, Nagai N, Butler WT : The expression of dentin sialophosphoprotein gene in bone. *J Dent Res* 81 : 392–394, 2002.
- Qin C, Brunn JC, Cadena E, Ridall A, Butler WT : Dentin sialoprotein in bone and dentin sialophosphoprotein gene expressed by osteoblasts. *Connect Tissue Res* 44 : 179–183, 2003.
- Reichert T, Storkel S, Becker K, Fisher LW : The role of osteonectin in human tooth development: an immunohistological study. *Calcif Tissue Int* 50 : 468–472, 1992.
- Shiba H, Uchida Y, Kamihagi K, Sakata M, Fujita T, Nakamura S, Takemoto T, Kato Y, Kurihara H : Transforming growth factor- β 1 and basic fibroblast growth factor modulate osteocalcin and osteonectin/SPARC syntheses in

- vitamin-D-activated pulp cells. *J Dent Res* 80 : 1653-1659, 2001.
- Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y, Forrester WC, Shi Y : A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 99 : 5515-5520, 2002.
- Sun ZL, Fang DN, Wu XY, Ritchie HH, Begue-Kirn C, Wataha JC, Hanks CT, Butler WT : Expression of dentin sialoprotein (DSP) and other molecular determinants by new cell line from dental papillae, MDPC23. *Connective Tissue Res* 37 : 251-261, 1998.
- Veis A, Perry A : The phosphoprotein of the dentin matrix. *Biochemistry* 6 : 2409-2416, 1967.
- Yan Q, Sage EH : SPARC, a matrix cellular glycoprotein with important biological functions. *J Histochem Cytochem* 47 : 1495-1506, 1999.

K C I

Abstract

Inactivation of the OD314 Gene by RNA Interference in Preodontoblast Cell Lines

Heung-Joong Kim¹, Moon-Jin Jeong¹, Ho-Hyun Son³, Joo-Cheol Park^{1,2}

¹*Department of Oral Histology and* ²*BK21, School of Dentistry, Chosun University*

³*Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Seoul National University*

Tooth development depends on reciprocal interactions between oral epithelium and ectomesenchyme. The ectomesenchyme-derived odontoblasts secrete several collagenous and non-collagenous proteins to form a unique extracellular matrix. OD314 was obtained by subtractive hybridization between odontoblasts and osteoblast/pulp cells, and differentially or predominantly expressed in odontoblasts of rat incisors compared to osteoblasts and pulp cells. However, little is known about the function of OD314 in odontoblast differentiation. In this study, to better understand the function of OD314, we inactivated the OD314 gene in mouse MDPC23 cells using U6 promoter-driven siRNA method. After the characterization of mineralized nodule formation and molecular expression of MDPC23 cell, Inactivation effects of the OD314 were evaluated by RT-PCR and western blot.

1. Mineralized nodule formation was observed after 14 days of culture in MDPC23 cells.
2. The OD314, OC and DSPP mRNA were highly expressed throughout the cultures, while the expression of ON decreased as the MDPC23 cells differentiated.
3. The OD314 protein was weakly expressed at 7 days of culture, but increased gradually as MDPC23 cells reached mineralization stage.
4. The inactivation of OD314 by RNA interference downregulated the expressions of OD314, DSPP, OC, and ON mRNA and OD314 protein in MDPC23 cells.

These results suggest that OD314 may play a important role in mineralization process of odontoblast and also regulate odontoblast-related genes such as OC, ON, and DSPP.

Key words : OD314, Odontoblast, SiRNA, Mineralization, Regulation