



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](#)

이학석사 학위논문

동물 근육에서 단백체 분석을 이용한
근감소증 관련 인자 발굴

**Discovery of sarcopenia-related factors in animal
muscles using proteomic analysis**

울산대학교대학원

의과학과

김예원

동물 근육에서 단백질 분석을 이용한
근감소증 관련 인자 발굴

지도교수 고정민

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 2월

울산대학교 대학원

의과학과

김예원

김 예 원의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 고 정 민 (인)

심사위원 이 승 훈 (인)

심사위원 정 창 희 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2024년 2월

국문 요약

연구배경

근육량과 근력의 저하로 운동 능력이 감소하는 상태를 근감소증 (sarcopenia)이라고 한다. 근감소증의 원인은 노화, 호르몬 부족, 영양 부족, 활동 부족 등 다양하다. 전세계적으로 노령 인구가 증가하고 있음에 따라 노인성 근감소증 유병률은 크게 늘어날 것으로 예상되지만, 아직까지 공인된 근감소증 치료제는 없다.

연구목적

동물 근육 시료에서 단백질 분석 방법을 이용하여 골격 근육량 감소를 일으키는 인자들을 발굴하고 그 작용 및 기전을 확립하여, 신규 근감소증 치료 표적 인자를 제시하고자 한다.

연구방법 및 내용

- 운동시킨 마우스, 뒷다리를 매달아 운동 제한시킨 마우스, 젊은 마우스, 노화된 마우스에서 근육조직들을 적출하였다. 적출한 근육조직에서 단백질 분석 방법을 이용해서 발현이 변화하는 인자들을 조사하였다.
- C2C12 근육세포에서 complement C1q binding protein (C1qbp) 또는 tumor protein, translationally-controlled 1 (Tpt1)의 발현을 조절한 다음 근육세포 분화와 성장을 조사하였다.
- C1qbp 또는 Tpt1의 발현을 조절한 근육세포에서 분화 동안 분화 관련 유전자들의 발현을 real-time PCR과 western blot assays 방법을 이용하여 수행하였다.
- 마우스 근육조직에 Tpt1 shRNA를 주입한 다음 조직학적 분석을 통해 마우스 근육량을 관찰하였다.

연구결과

근육 손실을 유발한 마우스 (뒷다리 고정된 마우스와 노화 마우스)의 근육 시료에서 단백질 분석을 통해, 각각 운동시킨 마우스 및 젊은 마우스의 근육 시료와 비교하여, 공통적으로 단백질 발현이 증가하는 C1qbp와 Tpt1을 선별하였다. C2C12 세포 분화 시

C1qbp 발현은 감소하였으며 재조합 C1qbp 단백질 처리 시 근육세포 분화를 현저히 억제하였다. 반대로 Tpt1 발현은 근육세포 분화 동안 증가하였으며 Tpt1 결핍은 근육세포 분화를 촉진하였다. 그러나, 마우스 뒷다리 근육조직에 Tpt1 shRNA를 주입해 근육량을 관찰한 결과 대조군과의 의미 있는 차이는 관찰할 수 없었다.

결론

마우스 근육 시료에서 단백질 분석을 통해 근육세포 분화에 유의한 작용을 하는 C1qbp와 Tpt1 인자들을 발굴하였다. 향후 이 인자들의 생체 내 작용 검증이 필요하다.

목차

국문요약	i
목차	iii
그림 차례	iv
서론	1
연구재료 및 방법	4
결과	10
고찰	15
참고문헌	37
영문요약	49

List of Figures

Figure 1. A schematic diagram of a proteomic analysis.	19
Figure 2. Muscle loss due to hindlimb-unloading or aging.	21
Figure 3. Muscle proteome of mice with muscle loss.	23
Figure 4. C1qbp and Tpt1 expressions in skeletal muscles.	25
Figure 5. Expression levels of C1qbp and Tpt1 in mice with muscle loss and in muscle cells.	27
Figure 6. Suppression of myogenic differentiation upon rC1qbp treatment.	29
Figure 7. Enhancement of myogenic differentiation upon Tpt1 knockdown.	31
Figure 8. Upregulation of myogenic differentiation-related genes upon Tpt1 knockdown.	33
Figure 9. Muscle mass after Tpt1 knockdown in hindlimb-unloaded mice.	35

서론

근감소증 (sarcopenia)은 1989년 Rosenberg에 의해 ‘flesh’를 뜻하는 그리스어 sarx, ‘loss’를 뜻하는 그리스어 penia에서 유래되었다 [1, 2, 3]. 근육량의 감소에 국한한 초기 개념 [4, 6]은 현재 여러 국제 정의를 통해 골격근 기능, 특히 근력의 손실에 초점을 맞추도록 발전했으며 [4-6], 현재 근감소증의 의학적 정의는 골격근량과 기능의 점진적인 상실이다. 이것은 장애, 대사 장애, 삶의 질 저하, 사망과 같은 후유증과 부작용의 위험을 증가시키며 [7], 주로 노화 과정과 관련되어 있지만 젊은 성인에서도 발생할 수 있다 [7]. 좌식, 부동, 영양실조, 당뇨병, 비만 및 근육량 손실을 촉진할 수 있는 기타 급성 또는 만성 염증성 질환 등에 빈번하게 발생하여 부정적인 영향을 미치기도 한다 [7-9].

근감소증은 한 번 진단이 되면 회복이 어려워 적극적인 관리와 치료가 필요하지만 이에 비해 대응 개발이 늦어진 대표적인 질병이다. 특히, 치료제도 없는 상황에 오히려 노화에 따른 자연스러운 현상으로만 인식돼 최근에서야 질병코드를 부여받았다. 국제질병분류 (ICD-10) 등재를 위한 국제적 노력으로 미국질병통제예방센터 (CDC)는 2016년 근감소증의 질병코드를 처음으로 부여하였다 [2, 3]. M62.84가 2016년 10월 1일 자로 유효한 새로운 ICD-10-CM 코드이다 [2,3,10]. 이어 세계보건기구 (WHO) [3], 일본에 이어 한국에서는 2021년 1월 한국표준질병사인분류 (KCD) 8차 개정안에 처음으로 질병코드 (M62.5)를 부여하였다 [3].

진단 알고리즘과 진단 기준에 대한 국제적 합의와 공식 질병의 인정으로 전 세계가 근감소증이라는 질병의 중요성에 주목하게 되고 예방과 치료를 위한 다각적인 노력을 하고 있다. 하지만 현재까지 미국 식품의약국 (FDA)의 허가를 받아 시장에 출시된 치료제는 없는 상황이다 [3]. 따라서 근육 재생을 유도하는 근본적인 치료법이 아닌 근육 강화, 보행 훈련과 같은 물리 치료에 중점을 두거나 건강보조제, 식이요법 같은 대중적 요법에 의존하고 있다 [3, 6]. 그러므로 근감소증에 대한 치료제를 개발하는 것이 시급하다.

이전에 myostatin, activin, activin receptor, androgen receptor 등을 표적으로 글로벌 제약사들이 치료제 개발을 주도하였다 [11]. 하지만 사노피 (리제네론)는 myostatin 억제제 REGN-1033 (Trevogrumab)의 임상2상을 2015년에 마쳤으나 결과 자료를 발표하지 않았다. 노바티스는 activin receptor type-IIb에 높은 친화성을 가진 단일클론항체

BYM-338 (Bimagrumab)이 신체능력 지표에서 위약군과 유의미한 차이를 보이지 않아 비만 및 제2형 당뇨병 치료제 개발로 전환하였다. MSD는 선택적 androgen receptor 조절제인 MK-0773의 근력과 체지방 체중 개선을 입증하는 임상2상에서 위약군 대비 체지방 체중의 유의한 증가 외에 근육 기능의 개선은 입증하지 못하였다. 이들은 모두 2상 완료 시점에서 연구를 중단하였다 [11, 12]. 따라서 새로운 치료 표적 발굴이 절실하다.

단백체학 (Proteomics)은 전체 단백질 구성물의 포괄적인 목록을 작성하기 위한 기술 중심적 접근 방식이며, 건강과 질병에 있어서 단백질 변형을 높은 처리량으로 발견하기 위한 이상적인 분석 도구로써 [13, 14], 생화학, 세포생물학, 시스템 생물학 및 신약개발의 핵심 기술 중 하나이다 [17-20]. 대규모 단백질체학 연구는 이미 근육 형성, 근섬유 발달, 근육 변형 및 자연적인 근육 노화 동안의 전체적인 변화에 대한 수많은 정보를 제공해왔다 [23]. 그러나, 이를 이용하여 성공적으로 치료 표적을 발굴하여 신약 개발을 성공한 사례는 아직까지 관찰되지 않는다. 우리는 단백질체학 분석법을 적용하여 근육 손실 마우스와 노화 마우스에서 공통으로 발현이 높은 단백질을 빠르고 효율적으로 선별하고자 하였으며, 본 논문에서는 그 결과 중에서 complement C1q binding protein (C1qbp)와 tumor protein, translationally-controlled 1 (Tpt1) 단백질을 집중적으로 연구하였다 (Figure 1).

p32, 구형 C1q 수용체 (globular C1q receptor) 또는 히알루론산 결합 단백질 1 (hyaluronan binding protein 1)으로도 알려진 C1qbp는 주로 미토콘드리아 기질에서 발현되지만 [25, 93], 핵, 소포체, 골지체 및 세포막과 같은 다른 세포 내 구획에서도 발현이 보고되었다 [26-28]. C1qbp 결핍 마우스는 심각한 미토콘드리아 단백질 합성 장애를 나타낸다 [29]. C1qbp가 녹다운 된 인간 종양세포에서는 대사가 산화적 인산화에서 해당 작용으로 크게 전환되었고 in vivo에서 종양 형성이 하향 조절되었다 [30, 93].

C1qbp는 또한 세포 외 기질로 분비될 수 있다 [27, 28, 101]. 분비된 C1qbp의 역할은 아직 밝혀지지 않았으나 염증 반응에 중요한 역할을 하는 것으로 추측되고 있다. 최근 연구에서는 돼지 생식기 및 호흡기 증후군 바이러스 감염이 Marc-145 세포에서 돼지 C1qbp 분비를 상향 조절하고 분비된 C1qbp가 IL1 β , IL6, IL8, TNF α 등 염증성 사이토카인의 생성을 촉진한다는 사실이 입증되었다 [31, 103]. 또한 내피세포에서 방출된 수용성 C1qbp는 브래디키닌 수용체 1 (bradykinin receptor 1) 발현을 상향 조절하여 브래디키닌 매개 혈관 투과성을 향상시켰다 [32]. C1qbp는 또한 전사인자 IIB, 히알루론산, 혈장 보완 성분 C1q,

lamin B 수용체, vitronectin, p53, 종양 억제제 ARF, kininogen, factor XII 등 여러 단백질과 상호 작용한다 [33-40].

면역 제어 종양 단백질 Tpt1은 TCTP, fortilin, p23 또는 histamine releasing factor (HRF)로 알려져 있다. 생물정보학 분석에 따르면, Tpt1은 인간 골격근에서 가장 많이 발현되는 비대 유전자로 밝혀졌다 [41]. Tpt1은 모든 진핵세포에서 발현되며 단백질 합성, 성장 및 세포 생존을 포함한 다양한 세포 과정을 제어하는 고도로 보존된 다기능 단백질이다 [42-44, 47]. 따라서 많은 연구에서는 잠재적인 치료 표적으로 여기고 있다 [45, 46]. Tpt1이 mTORC1 pathway를 활성화하고 AMPK pathway를 비활성화하여 자가 포식을 억제하기 때문에 항암치료 및 자가 포식 관련 질병에서 사용될 수 있을 것으로 보고되었다 [47]. 또한 포유동물의 면역 체계에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, Tpt1의 조절에 문제가 생기면 다양한 종양과 함께 후기 단계인 침윤과 전이에도 관련이 있는 것으로 밝혀졌다 [48]. 골격근의 Tpt1에 대해 보고된 한 연구에서는, Tpt1이 근섬유 변성/재생의 징후를 나타내는 상태인 저칼륨성 근병증 (hypokalemic myopathy) 마우스 모델에서 상향조절 되었다는 것을 보여주었다 [49, 105].

이전에 보고된 Tpt1의 분자 기능으로는 calcium-binding activity가 있다 [110]. 그러나 이후 non-canonical calcium-binding도 발견되었다 [51]. 또 다른 분자 기능에는 자가 상호작용 (self-interaction) [52]과 MCL1 단백질과의 상호작용 [53]이 포함된다. Tpt1은 종양 역전 (tumor reversion)에서 중요한 인자로 확인되었으며 [54], 종양 조직, 특히 상피 기원의 조직에서 고도로 발현된다 [42]. 이러한 Tpt1의 전사는 etoposid와 cisplatin과 같은 DNA 손상 물질에 의해 유도될 수 있다고 밝혀졌다 [55]. 또한 Tpt1은 세포사멸 조절에 중요한 역할을 한다. p53은 암세포의 세포사멸을 촉진하는데, Tpt1은 p53을 불안정하게 만들어 세포사멸을 방지하는 역할을 한다고 알려졌다 [91].

따라서 C1qbp와 Tpt1이 여러 세포 생리학적 측면에서 다양한 역할을 할 수 있다고 판단하였다. 본 연구에서는 두 인자의 발현을 조절하여 근육세포 분화에 미치는 영향을 실험하였다. 또한 두 인자 중에서 Tpt1을 마우스 체내에 직접 적용해 근감소증에 대한 적절한 치료 표적인지 검증하였다.

연구 재료 및 방법

연구 재료

세포 배양에 사용된 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)은 Welgene (경산시, 대한민국)에서 구입하였고, fetal bovine serum (FBS), Trypsin-EDTA, penicillin/streptomycin (P/S)은 Gibco (Waltham, MA, USA)에서, horse serum (HS)은 HyClone (Logan, UT)에서 구입하였다. 이 연구에서 사용된 C1qbp 항체는 Abcam (Abcam, Cambridge, UK)에서 구입하였고, Tpt1 항체는 Santacruz (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. β -actin, α -Tubulin, MyHC I, MyHC II 항체와 bovine serum albumin (BSA)는 Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse 또는 anti-rabbit IgG 항체는 Cell signaling (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Alexa Fluor 555 goat anti-mouse-IgG 항체는 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다.

동물 실험

모든 실험동물 프로토콜은 서울아산병원 생명과학연구소 동물실험윤리위원회의 승인을 받았다. 동물실험계획서의 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee) 과제번호는 제 2016-12-035 호 (young/aged mouse), 제 2021-12-178 호 (exercised/hindlimb-unloaded mouse), 제 2023-12-037 호 (AAV6 injected mouse)이다. 실험용 마우스는 아산생명과학연구원에서 병원체가 없는 특정 조건에 적응하도록 하고 전용 사료와 물을 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다. 안락사 절차는 아산생명과학연구원 동물관리 및 이용위원회의 지침에 따라 수행되었다. 안락사 전에 모든 마우스를 Zoletil (50 mg/kg, i.p.)과 Xylazine (10 mg/kg, i.p.)으로 마취하고 비복근 (gastrocnemius), 가자미근 (soleus), 전경골근 (tibialis anterior), 장지신근 (extensor digitorum longus)을 채취하였다.

- 운동 마우스와 운동 제한 (뒷다리를 고정한) 마우스 비교 실험: 7 주령의 수컷 C57BL/6 마우스 (n = 4) (오리엔트바이오, 성남, 대한민국)를 10° 경사면에서 분당 15 m의 속도로 30 분씩 3 주간 러닝머신에서 운동하게 했다. 뒷다리를 고정한 그룹에서는 7 주령의 수컷

C57BL/6 마우스 (n = 4)를 대상으로 3 주 동안 뒷다리가 지면에 닿지 않은 상태로 꼬리를 고정하였다. 생후 10 주령에 마우스를 희생했다.

- **젊은 마우스와 노화 마우스:** 한국생명공학연구원 (대전, 대한민국)에서 19 개월령의 수컷 C57BL/6 마우스 (n = 7)를 구입하였다. 7 개월령의 수컷 C57BL/6 마우스 (n = 10)를 젊은 대조군으로 사용되었다.

- **아데노 바이러스 근육 내 주사 (AAV6 IM injection):** 한국과학기술연구원 (서울, 대한민국)에서 AAV6-U6-scr-CMV-mCherry (3.02×10^{12} GC/ml) 및 AAV6-U6-Tpt1 shRNA-CMV-mCherry (1.3×10^{12} GC/ml)를 구입하였다. 컨트롤 바이러스와 Tpt1 shRNA 바이러스를 각각 7 주령의 수컷 C57BL/6 마우스 (n = 4) (오리엔트바이오)를 대상으로 전경골근 (tibialis anterior muscle, TA muscle)에 총 2 회 근육 내 주사하였다. 마우스 반입 후 7 일에 1 차, 10 일에 2 차 주사를 하였고, 2 차 주사 후 뒷다리가 지면에 닿지 않도록 14 일간 꼬리를 고정하였다. 활동을 억제한 지 14 일에 마우스를 희생하였다.

비복근 (Gastrocnemius muscles)의 단백질 분석

제조업체의 지침에 따라 5% sodium dodecyl sulfate buffer 에 담긴 마우스 근육조직 샘플을 S220 Focused-ultrasonicator (Covaris, USA)를 사용하여 용해하였다. 용해물을 37°C 에서 12 시간 동안 trypsin/LysC : protein 혼합물 (1 : 25 비율)을 사용하여 S-trap-based tryptic digestion 을 실시하였다 (Promega, Madison, WI, USA). 건조된 펩타이드를 0.1% 포름산으로 재구성하고, NanoDrop One spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 205 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 펩타이드 농도를 결정하였다. 각 샘플의 펩타이드 (40 µg)를 건조하고 추후 사용할 때까지 -80°C 에서 보관하였다. 분해된 펩타이드는 Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific)와 결합된 Dionex UltiMate 3000 RSLCnano 시스템을 사용하여 두 번 측정하였다. 액체 크로마토그래피 그래디언트 및 데이터 의존적 수집-질량 분석 매개변수는 이전에 발표된 방법을 따랐다 [56, 57]. 또한, 수집된 질량 분석 스펙트럼은 SwissProt mouse proteome sequence database 에 대해 Sequest HT on Proteome Discoverer (버전 2.3, Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 검색하였다. 검색 매개변수는 cysteine carbamidomethylation 을 고정 변형으로, N-말단 아세틸화 및 메티오닌 산화를 두 개의 절단

오류가 있는 가변 변형으로 하여 기본값으로 설정하였다. 전구체 이온의 초기 질량 편차가 최대 10 ppm 이고 허용되는 단편 질량 편차가 20 ppm 으로 설정된 검색을 기반으로 펩타이드를 식별하였다. 단백질을 펩타이드에 적용할 때는 고유 펩타이드와 레이저 펩타이드를 모두 사용하였다. 각 단백질의 고유 펩타이드에 대한 피크 강도를 사용하여 라벨-프리 정량을 수행하였다.

세포배양 및 myotube 로의 분화

C2C12 세포는 American type culture collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였고, 10% FBS 와 1%의 penicillin/streptomycin (PS)을 포함한 DMEM 배지로 37°C (5% CO₂) 인큐베이터에서 배양하였다. Myotubes 로의 분화를 위해 2% HS 이 포함된 DMEM 배지로 4 일간 배양하였으며, 배지는 매일 교체하였다.

shRNA stable cell line 제작

Tpt1 발현 억제를 위해 Tpt1 mRNA 코딩 영역 (5'-GACTACATGAAATCACTCAAA-3')에 특이적인 shRNA 를 암호화하는 DNA 올리고뉴클레오티드를 어닐링하고, 렌티바이러스 발현 벡터 pLKO.1 (Addgene)에 결합시켰다. 렌티바이러스는 VSV-G, NL-BH 및 Tpt1 shRNA 를 암호화하는 플라스미드를 HEK293T 세포에 형질주입해 생성하였다. C2C12 세포를 이 바이러스에 감염시키고 24 시간 후 새로운 DMEM (10% FBS, 1% PS)으로 교체 후, 2 주간 2 µg/ml puromycin (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)으로 선별하였다.

C1qbp 과발현 벡터 제작

C1qbp 를 인코딩하는 cDNA 를 PCR 증폭하여 5'-FLAG 및 헤마글루티닌 (HA) 코딩 시퀀스를 포함하는 pIRES-neo (Clontech Laboratories, Inc., Mountain View, CA, USA)의 관독 프레임에 결합하였다. C2C12 세포를 Lipofectamine 2000 시약 (Invitrogen)을 사용하여 2 일 동안 C1qbp 발현 벡터로 감염시켰다.

세포생존능 (Cell viability) 측정

세포생존능은 시판 중인 CCK-8 assay Kit (Dojindo lab, Kumamoto, JAPAN)를 사용하였다. 우선 세포를 2×10^4 개씩 24-well plate 에 24 시간 배양 후에 50 μ l CCK-8 시약과 450 μ l 배양액을 섞어 분주하여 1 시간 동안 37°C (5% CO₂) 반응시켰다. 이후 Infinite M200 Pro (Tecan, San Jose, CA, USA)를 이용하여 450nm 에서 흡광도를 측정하였다.

면역 조직 화학 (immunohistochemistry) 및 면역 염색 (immunostaining)

표준 프로토콜에 따라 파라핀 섹션으로 면역 조직 화학 분석을 실시하였다. 섹션을 블로킹하고 anti-C1qbp (1 : 50), anti-Tpt1 (1 : 50), anti-Bax (1 : 50), 그리고 anti-Krt14 (1 : 50)으로 처리하여 4°C 에서 하루 배양하였다. 제조업체의 지침에 따라 Dako Envision+ System-horseradish peroxidase-labeled polymer secondary antibody system (Dako, Carpinteria, CA, USA)으로 배양하였다. 모든 섹션은 헤마톡실린으로 염색하였다. MyHC 면역 염색을 위해 세포를 4% PFA 로 15 분간 고정하고 PBS 에 0.5% Triton X-100 으로 10 분간 permeabilization 하였다. PBS 에 녹인 2% BSA 로 세포를 블로킹하고 anti-MyHC 항체 (1 : 1000)로 4°C 에서 하루 배양하였다. 다음날, 세포를 anti-mouse Alexa Fluor 555 항체 (1 : 1000)로 염색하고 DAPI 로 핵을 염색하였다. 이후 Zeiss LSM 710 공초점 현미경 (Carl Zeiss, Germany)을 사용해 이미지를 얻었다.

헤마톡실린-에오신 염색 (Hematoxylin & Eosin staining)

마우스 근육조직을 해부한 후 4% PFA 에 고정된 근육조직을 30% sucrose 로 침윤시켰다. 그 후 조직을 optimal cutting temperature compound 에 담가 액체질소로 동결하였다. CM1860 cryostat microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)을 사용하여 10 μ m 두께로 절편화 하였다. 슬라이드를 정제 증류수에 5 분간 넣은 후 Harris's alum hematoxylin 에 10 분간 담가 핵을 염색하였다. 이후 Acid alcohol 로 옮겨 헤마톡실린 색을 제거한 후 증류수에 담가 세척하였다. 0.5% ammonium water 에 3 회 빠르게 담갔다 빼어 헤마톡실린이 푸른색을 띠도록 하였다. 증류수로 세척한 후 70%, 80% 알코올에 각각 5 분간 두었다. 이후 에오신 용액으로 1 분 30 초간 세포질을 염색하였다. 70%부터 100%까지 농도별로 차례로 알코올에 담가 수분을 제거한 후 Xylene 에 20 분씩 세 차례 넣어주었다. Canada Balsam 마운팅 용액을 이용해 샘플을 고정하였다.

RNA 추출과 실시간 양적 중합 효소 연쇄 반응 (Quantitative real-time PCR)

시료 (세포, 마우스 조직)에 TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 처리하여 제조사의 매뉴얼에 따라 RNA 를 추출하였다. SuperScript III First-Strain synthesis system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 2 µg RNA 로부터 cDNA (complementary DNA)를 합성하였다. 이후 cDNA 는 SYBR Green (Roche, Mannheim, Germany)을 사용하여 근분화 관련 단백질들의 mRNA 발현을 확인하였다. SYBR Green 을 이용해 Quantitative real-time PCR 에서 사용한 primer 의 염기서열 정보는 Table 1 에 정리하였다.

Table 1. Primer sequences

Primers	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
<i>Clqbp</i>	ACA GCA TCC CTC CAA CAT TT	GGG AGT TGA TGT CAG TTC TGG
<i>Tpt1</i>	GACTACATGAAATCACTCAAA	TTTGAGTGATTTCATGTAGTC
<i>Myh2</i>	AGGCGGCTGAGGAGCACGTA	GCGGCACAAGCAGCGTTGG
<i>Myh4</i>	CAATCAGGAACCTTCGGAACAC	GTCCTGGCCTCTGAGAGCAT
<i>Myh7</i>	TGCCAAGGGCCTGAATGA	GCTCCACCTAAAGGGCTGTT
<i>Mef2C</i>	GCAGGCAAAGATTGTGTGCT	CGCCTGTGTTACCTGC ACTT
<i>Myogenin</i>	GCCATCCAGTACATTGAGCG	GCTGTGGGAGTTGCATTAC
<i>18s</i>	CTCAACACGGGAAACCTCAC	CGCTCCACCAACTAAGAACG

웨스턴 블롯 (Western blot Analysis)

C2C12 세포는 단백분해효소 저해제 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA)가 포함된 RIPA buffer (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY, USA)로 용해되었다. 이후 원심분리 (13,000 rpm, 4°C)를 통해 상층액 (total cell lysates)을 수집하였다. 단백질 양은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 얻은 total cell lysates 는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 단백질의 크기에 따라 분리한 후, Nitrocellulose Membrane (NC) membrane (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA)으로 옮겼다. Membrane 은 5% Skim milk-TBST (20

mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20, pH7.5)로 1 시간 동안 blocking 한 뒤, 상온에서 TBST 로 10 분간 3 회 씻어내었다. 각각 항체들을 5% Skim milk 로 희석한 후 4°C에서 overnight incubation 하였다. 항체의 호스트에 따라 anti-rabbit 또는 anti-mouse HRP-conjugated 항체로 membrane 을 1 시간 동안 반응시키고, TBST 로 10 분간 3 회 씻어내었다. 이후 ECL (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) 용액을 넣어 반응시킨 다음 X-ray 필름으로 현상하여 단백질 발현을 확인하였다.

통계 분석

모든 실험은 독립적으로 세 반복 이상을 수행하였다. 모든 연구 결과는 평균과 표준오차로 표시하였고, 두 그룹 간의 비교는 student's t-test 를 사용하였다. 다중 그룹 간의 비교는 Kruskal-Wallis test 를 사용하였으며 사후검증은 Duun's test 를 사용하였다. 통계 분석 프로그램은 GraphPad Prism 8.0 software 를 사용하였고 $P < 0.05$ 인 경우를 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결과

근육 손실 마우스에서 단백질 분석 결과 C1qbp 와 Tpt1 단백질 발현이 상향 조절되었다.

이 연구에서는 근육 손실을 유발한 두 마우스 모델 (뒷다리를 고정시킨 마우스와 노화 마우스)을 만들었으며 (Figure 2A, B), 이후 마우스를 희생하여 4 종류의 하지근육인 비복근 (gastrocnemius), 가자미근 (soleus), 전경골근 (tibialis anterior), 장지신근 (extensor digitorum longus)을 실험에 사용하였다.

먼저, 3 주간 운동시킨 마우스와 뒷다리를 고정시킨 마우스 그룹에서 유의미한 체중의 차이는 없었다 (Figure 2C). 그러나 체중 대비 상대적 근육량을 계산하였을 때 4 가지 근육에서 감소하였다 (Figure 2D). 비복근의 경우, 운동 마우스와 뒷다리 고정 마우스의 상대적 근육량은 각각 $0.6589 \pm 0.0177\%$, $0.5199 \pm 0.0163\%$ 로, 뒷다리를 고정시킨 마우스에서 21.1% 감소하였다. 가자미근의 경우, 각각 $0.0368 \pm 0.0025\%$, $0.0217 \pm 0.002\%$ 로 40.9% 감소하였다. 전경골근의 경우, 각각 $0.1947 \pm 0.009\%$, $0.1704 \pm 0.0098\%$ 로 12.5% 감소하였다. 장지신근의 경우, 각각 $0.0433 \pm 0.0013\%$, $0.0348 \pm 0.002\%$ 로 19.5% 감소하였다. 반면, 19 개월의 노화 마우스에서는 체중이 $34.86 \pm 0.995\text{g}$, 7 개월의 젊은 마우스에서는 $30.053 \pm 0.75\text{g}$ 으로 체중이 16% 증가하였다 (Figure 2E). 또한 상대적 근육량은 유의하게 감소하였다 (Figure 2F). 비복근의 경우, 젊은 마우스와 노화 마우스의 상대적 근육량은 각각 $0.6228 \pm 0.0127\%$, $0.5084 \pm 0.0059\%$ 로 18.4% 감소하였다. 가자미근의 경우, 각각 $0.0371 \pm 0.0012\%$, $0.0278 \pm 0.0009\%$ 로 25% 감소하였다. 전경골근의 경우, 각각 $0.1901 \pm 0.0046\%$, $0.1616 \pm 0.0028\%$ 로 15% 감소하였다. 장지신근의 경우, 각각 $0.0435 \pm 0.0013\%$, $0.036 \pm 0.001\%$ 로 17.2% 감소하였다.

4 종류의 근육 중 하나인 비복근의 단면적을 비교하였을 때 뒷다리 고정 마우스와 노화 마우스를 각각 운동 시킨 마우스와 젊은 마우스와 비교하여 근육 단면적이 낮았다 (Figure 2G-J). 이를 바탕으로 근육 손실이 유발된 두 마우스 모델에서 근육 위축이 발생하였음을 확인하였다.

뒷다리가 고정된 마우스와 노화 마우스 각각을 운동시킨 마우스와 젊은 마우스의 근육조직들과 단백질 분석을 통해 비교 분석하였다 (Figure 1). 마우스의 하지 근육에는 비복근, 가자미근, 전경골근, 장지신근이 있다. 이 중 비복근은 type I, type IIa, type IIb 를

모두 가진 혼합 유형의 근육으로 알려져 있다 [58]. 우리는 본 연구에서 근육 유형을 구분하지 않았으나, 모든 근육 유형을 함유한 비복근에서 충분한 단백질을 확보하고자 질량 분석법 기반 단백질 분석 시 비복근 조직을 채취하여 사용하였다. 그 결과, 근육 손실 마우스 모델에서 각각 단백질 82 개와 177 개의 발현이 현저하게 상향 조절되었다 (Figure 3A-C). 이 중 공통적으로 55 개의 단백질이 뒷다리 고정 마우스와 노화 마우스 모두에서 상향 조절되었다 (Figure 3C). 이 단백질들의 gene ontology analysis 에 따르면 유기 화합물의 산화를 통한 에너지 생산, 전구체 대사물질 및 에너지 생성, 산화-환원 과정 등이 biological process 에서 상위 에 랭크된 카테고리들이었다 (Figure 3D). 정리하면 다양한 물질의 대사 과정, 세포 분화 등 여러 생물학적 과정의 범주에 존재하는 것으로 나타났다. 본 연구에서는 골격근의 성장과 발달을 제어하고 유지하는 데 중요하고, 근육세포 분화에 관여하는 단백질에 초점을 맞추었다. 세포 분화 카테고리에 해당하는 17 개 단백질들 중 뒷다리 고정 마우스와 노화 마우스의 비복근 조직들에서 공통으로 상위 에 속한 네 가지 단백질들은 *Tpt1*, *Bax*, *KRT14*, *C1qbp* 이었다 (Figure 3E-F).

실시간 양적 중합 효소 연쇄 반응 (qRT-PCR)을 사용하여 마우스의 여러 조직에서 *Tpt1*, *Bax*, *KRT14*, *C1qbp* 의 mRNA 발현 수준을 측정하였다. *C1qbp* 는 신장조직에서 가장 발현이 높았고, 그 다음이 근육조직이었다 (Figure 4A). *Tpt1* 은 근육조직에서 발현이 가장 높았고, 그 다음이 신장조직이었다 (Figure 4A). 그러나 *Bax* 와 *KRT14* 는 근육조직에서의 발현이 다른 조직들보다 낮았다. 이는 비복근 조직을 면역 조직 화학 염색 (IHC staining)하여 추가로 확인하였다 (Figure 4B).

C2C12 근육세포 분화 동안 *C1qbp* 발현은 감소하였고, *Tpt1* 발현은 반대로 증가하였다.

단백체 분석 결과를 생체 내에서 검증하기 위해 운동시킨 마우스와 뒷다리를 고정한 마우스의 근육조직에서 *C1qbp* 와 *Tpt1* 단백질 발현을 Western blot 실험을 통해 비교하였다. 단백질 분석 결과와 일관되게, 뒷다리를 고정한 마우스의 근육조직에서 *C1qbp* 와 *Tpt1* 단백질 발현 수준이 유의하게 높았다 (Figures 5A-B).

다음으로 C2C12 근육세포 분화 과정에서 *C1qbp* 와 *Tpt1* 의 발현이 변하는 양상을 real-time PCR 과 western blot 실험을 이용하여 조사하였다. 먼저 골격근 섬유는 광범위하게 느린 연속 (type I)과 빠른 연속 (type II)으로 분류된다 [59]. 빠른 연속은 다시

type II a, II x, II b 의 하위 유형으로 나누어진다 [59]. 이들은 에너지 생산에 있어서도 차이를 보인다. Type I 및 type II a 섬유는 주로 산화 대사에, type II x 및 type II b 섬유는 주로 해당 대사에 의존한다 [59]. Mef2C 는 *mef-2* 계열 구성원과 달리 골격근, 비장, 뇌 근모세포의 후기 분화 단계에서 상향조절 되는 것으로 알려져 있다 [60]. 우리는 이 실험에서 type I , type II a, type II b 의 대표적인 myosin 으로 각각 *myh7*, *myh2*, *myh4* 와 후기 분화 마커 *mef2C* 를 근육세포 분화 마커로 사용하였다.

C2C12 세포 분화 동안 근육 분화 마커들의 mRNA 및 단백질 발현이 상향 조절되어 세포가 잘 분화되었음을 확인하였다 (Figure 5C-D). 이러한 발현 패턴과는 대조적으로, C1qbp 의 mRNA (Figure 5C) 및 단백질 (Figure 5D) 발현 수준은 하향 조절되었다. 반대로, Tpt1 은 근육 분화 마커들과 동일하게 mRNA (Figure 5C) 및 단백질 (Figure 5D) 발현 수준이 상향 조절되었다. C1qbp 는 근육세포의 발현 초기에, Tpt1 은 발현 후기에 주로 작용할 것임을 시사하는 소견이다.

rC1qbp 단백질은 C2C12 근육세포 분화를 감소시킨다.

C1qbp 의 mRNA 와 단백질 발현 수준이 감소하였으므로 과발현 (Figure 6A)시켜 근육세포 분화에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, C1qbp 의 과발현은 C2C12 세포에서 근육 분화에 영향을 끼치지 못하였다 (Figure 6B).

C1qbp 는 세포 밖으로 분비된다는 보고가 있다 [26-28, 101]. C2C12 세포의 근육 분화 동안 배양액 (CM)을 수집하여 C1qbp 단백질 발현을 western blot 으로 확인하였다. 그 결과, 분화 유도 후 1 일째에 CM 에서 C1qbp 의 발현이 가장 많이 증가하였으며 이후 점점 감소하는 양상을 보였다 (Figure 6C). 따라서, C1qbp 가 C2C12 근육세포에서 자가 분비 방식으로 세포 분화에 작용할 수 있다는 가설을 세웠다. 이를 실험하기 위해 C2C12 세포에 재조합 C1qbp (rC1qbp) 단백질을 처리하였다. 그 결과, rC1qbp 단백질은 근육세포 분화를 용량 의존적으로 억제했지만 (Figure 6D), 근육세포 개수에는 영향을 미치지 않았다 (Figure 6E). 마찬가지로, rC1qbp 단백질은 근육 분화 마커의 발현을 유의하게 하향 조절하였다 (Figure 6F-G). 이 결과들은 rC1qbp 단백질이 근육 분화를 억제할 수 있음을 시사한다.

C2C12 세포에서 Tpt1 결핍은 근육세포 분화를 촉진한다.

C2C12 근육세포 분화 시 Tpt1 의 mRNA 및 단백질 발현이 증가하기 때문에, C2C12 세포에 Tpt1 shRNA 로 Tpt1 결핍 세포를 만들어서 mRNA 및 단백질 발현 감소를 확인하였다 (Figure 7A). C2C12 세포를 4 일간 배양하여 세포생존능을 비교하였을 때, 3 일째에 Tpt1 shRNA 처리한 세포에서 세포 개수가 약간 감소하였다 (Figure 7B). 다음으로 Tpt1 결핍이 근육세포 분화에 미치는 영향을 조사하였다. Tpt1 shRNA 처리한 세포에서 myotube area 가 2 일과 3 일째에 대조군에 비해서 증가함을 보였다 (Figure 7C). 하지만 4 일째에는 myotube area 의 차이가 없어졌다. Tpt1 의 myoblast fusion 역할을 좀 더 자세히 알아보기 위해서, Tpt1 이 결핍된 C2C12 세포를 4 일간 근육세포로 분화시킨 다음 myotube formation 을 분석하였다 (Figures 7D-F). 흥미롭게도, Tpt1 shRNA 처리한 세포에서 분화된 myotube 당 핵 개수가 대조군에 비해 유의미한 증가를 확인하였다 (Figures 7E). 또한 myotube 당 myotube 면적 분포를 정량적으로 분석한 결과, Tpt1 결핍 세포에서 면적이 작은 myotube 의 수는 감소하고 반대로 큰 면적의 myotube 는 증가하였다 (Figure 7F). 이는 Tpt1 결핍이 myotube formation 을 증가시켜 더 많은 핵을 가진 myotube 를 만들어 냄을 의미한다.

근육 분화 마커로 Tpt1 결핍 세포에서의 발현을 확인하였다. 앞서 C2C12 근육세포 분화 확인을 위해 사용한 분화 마커 myh2, myh4, myh7, mef2C 와 함께 초기 단계 분화 마커로 알려진 myogenin [63]도 사용하였다. 위의 근육세포 분화 결과와 일치하게, Tpt1 결핍 세포에서 분화 동안 근육 분화 관련 유전자들의 mRNA 및 단백질 발현이 시간-의존적으로 유의미하게 증가하였다 (Figures 8A-B). 이 결과들은 세포 수준에서 Tpt1 억제가 근육세포의 분화를 촉진함을 시사한다.

생체 내에서 Tpt1 결핍은 근육조직 증가 효과가 보이지 않았다.

생체 수준에서 Tpt1 의 역할을 검증하기 위해 근육에 Tpt1 shRNA 를 주입한 다음 근육조직 변화를 관찰하였다. 먼저 골격근에 사용할 AAV (Adeno-associated virus)의 serotype 을 결정하기 위하여 마우스 전경골근에 AAV6 와 AAV9 을 주입하였다. 근육에서 작용하는 AAV serotype 은 AAV1, AAV6, AAV9 으로 보고되었다 [77]. 이 중 우리는 근육 실험에서 주로 사용되는 AAV6 와 AAV9 를 비교하였다. 감염 효율을 확인하기 위하여 각각의 AAV 는 GFP 를 발현하도록 제작하였다. 그 결과 근육 주입 시 AAV6 는 AAV9 에 비해 형광 발현이 높은 것을 확인하였으며, 이는 AAV6 의 감염 효율이 AAV9 보다 높음을 의미한다

(Figure 9A). 따라서 본 연구에서는 AAV6 를 선정하여 AAV6-U6-Tpt1 shRNA-CMV-mCherry 를 제작하였다. AAV6-U6-scr-CMV-mCherry (3.02×10^{12} GC/ml) 및 AAV6-U6-Tpt1 shRNA-CMV-mCherry (1.3×10^{12} GC/ml)를 7 주령 된 수컷 C57BL/6 마우스 ($n = 4$)의 전경골근에 2 회 주사하였다. 바이러스 주사한 다음 꼬리를 매달아 뒷다리의 활동을 억제하였다 (Figure 9B). 2 주 후 마우스의 근육조직들을 채취한 다음 western blot 을 이용하여 Tpt1 단백질 발현을 확인하였다. AAV6-U6-Tpt1 shRNA-CMV-mCherry 를 주사한 근육조직에서 Tpt1 발현이 대조군에 비해 현저히 감소한 것을 확인하였다 (Figure 9C). 대조군과 Tpt1 shRNA 처리한 마우스의 몸무게와 근육량에서는 차이가 없었다 (Figures 9D-E). 근육 단면을 H&E 염색하여 근육 면적을 정량 분석한 결과 대조군과 Tpt1 shRNA 처리한 마우스 간에 유의한 차이도 없었다 (Figures 9F-G). 종합하면, Tpt1 의 손실이 세포 수준에서는 근육 분화를 촉진하였으나 적어도 운동 제한 근육에서는 유의한 작용을 하지 못하는 것으로 판단된다.

고찰

본 연구는 근감소증을 유발시킨 마우스 근육조직에서 단백질 분석법을 이용하여 근감소증의 새로운 치료 표적을 발굴하고자 수행되었다. 운동 제한시킨 마우스와 노화된 마우스에서 단백질 발현이 증가하는 인자로 C1qbp 와 Tpt1 을 처음으로 발견하였다. C1qbp 와 Tpt1 은 근육조직에서 높은 발현을 보였기 때문에 근육조직에서 중요한 역할을 할 것이라고 판단하였다. 특히 Tpt1 은 근육세포 분화 동안 증가하였고, Tpt1 감소 시 근육세포 분화가 촉진되었다. 운동 제한 근육에 Tpt1 을 결핍시켜도 근육량과 근육 크기 증가를 예상하였으나 이를 증명하지 못하였다.

뒷다리 고정 마우스와 노화 마우스에서 공통적으로 발현이 상향 조절된 55 개의 단백질 (Figure 3C)은 gene ontology analysis 결과, 유기화합물의 산화에 의한 에너지 유도 (Energy derivation by oxidation of organic compounds)와 전구체 대사산물 및 에너지 생성 (Generation of precursor metabolites and energy) 카테고리들이 각각 1 위와 2 위에 올려졌다 (Figure 3D). 이는 근육 손실이 발생하는 마우스 모델에서 에너지 생산과 관련된 물질들의 단백질 발현이 증가하고 있음을 의미한다. 일반적으로 세포에서 에너지 생산은 미토콘드리아에서 담당하고 있으며 근육량과 활동을 유지하는데 필수적이다 [96]. 특히, 노화나 근육의 사용 중단으로 인한 근육 손실 등은 미토콘드리아의 기능 장애와 에너지 생성에 중요한 산화적 인산화 기능 장애를 유발하고 이는 근감소증을 초래한다고 알려져 있다 [68, 69]. 미토콘드리아의 기능 장애로 인한 에너지 생성 손실에 대한 보상 기전으로 에너지 생성에 관련된 카테고리에 속한 단백질 발현이 상향 조절되는 것으로 보인다. 또한 에너지 발생 관련 유전자들의 단백질 발현 변화는 미토콘드리아 대사 조절에도 영향을 미칠 것으로 보이며 이에 대한 추가 조사가 필요하다.

본 연구에서는 두 가지 동물 모델에서 공통적으로 변화하는 단백질을 대상으로 연구를 진행하였다. 이는 공통 인자가 더 강력하게 근육 생리에 영향을 끼칠 것이라는 판단을 근거로 한다. 그러나 운동 제한은 type I 근육에, 노화는 type II 근육에 상대적으로 더 많은 손실을 끼침이 알려져 있다 [78, 79]. 따라서 본 연구에서 시행된 단백질 분석 결과에서 동물 모델 특이적인 인자를 대상으로 한 연구도 필요할 것으로 생각된다.

이 연구는 C1qbp의 발현이 마우스 근육조직에서 높게 검출되었음을 입증했으며 이는 이전 연구 결과와 일치한다 [70]. 진핵세포의 모든 세포 내 구획에서 발현되는 것 외에도 C1qbp는 세포 외 영역으로 분비된다. 특히 초기 분화 동안 근육세포의 CM에서 C1qbp 수준을 조사하였다. 분비된 C1qbp는 혈관 신생, 혈관 투과성 및 염증을 포함한 다양한 기능을 조절하는 것으로 보고되었다 [32, 71, 72]. 이 연구는 C1qbp가 근육세포에 직접적으로 작용하여 그 분화를 억제한다는 것을 증명하였다. 또한 활성화된 내피세포에서 분비된 C1qbp는 bradykinin receptor 1의 발현을 유도하고 결과적으로 TNF α , IL-1 β , IL-6와 같은 염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokines)과 chemokines IL8 및 MCP1을 상향 조절할 수 있음도 보고된 바 있다 [32, 73, 74]. IL6 및 TNF α 를 포함한 사이토카인은 근육 위축을 촉진한다 [112, 113]. 따라서 분비된 C1qbp는 사이토카인의 방출을 촉진하여 근육 위축 과정에 직접적으로 관여할 수 있으며 이는 향후 연구를 통해 확인되어야 한다.

C1qbp는 노화 마우스와 운동 제한시킨 마우스의 골격근에서 상향 조절되었다. rC1qbp 치료는 근원성 근육량을 감소시켰다. 이는 노화 및 운동 부족으로 인한 근육 위축이 C1qbp의 상향 조절에 의한 것일 수 있음을 시사한다. 더불어, C1qbp는 세포밖에서 주로 작용하였다. 이는 C1qbp가 근육 위축과 관련된 질병 치료에 중요한 치료 표적이 될 수 있음을 뜻한다. 만약 치료제로 개발한다면 anti-C1qbp 차단 항체 등이 가장 효율적인 치료제 형태가 될 수 있기 때문이다.

Ma 등은 최근 세포내 C1qbp 억제가 myoblast의 분화와 증식을 감소시키고 세포사멸을 유도한다고 보고하였다 [75, 104]. 더욱이, myotube에서 C1qbp 발현은 분화 동안 myoblast에서 발현되는 것보다 더 높았다 [75]. 이는 본 연구의 결과와는 대조적인 결과이다. 방법론적으로 본 연구는 마우스 세포를 대상으로 한 연구이고 Ma 등의 연구는 양의 세포를 대상으로 한 연구라는 점이 가장 뚜렷이 차이가 있으나, 아직까지 우리의 연구와 Ma 등의 연구 결과가 일치하지 않는 정확한 원인은 불분명하다.

이전 연구 결과 보고에 따르면 Tpt1은 근육조직에서 발현이 높았으며 [41, 76], 뒷다리 운동을 제한시킨 마우스의 근육조직에서 대조군에 비해 단백질 발현이 증가하였다 [76]. 또한 저칼륨성 근병증 (hypokalemic myopathy)의 마우스 모델에서 상향 조절된 여러 단백질 중 하나라는 것을 보여주었다 [49, 105]. 이러한 이전 연구 보고들은 Tpt1이 근육 위축이나 근육 질병 등이 발생하면 발현이 상향 조절되는 단백질임을 나타내며, 본 연구의

결과와 일치한다. 더불어 본 연구에서는 C2C12 근육세포 실험에서 Tpt1 을 억제하여 근육세포 분화를 향상하는 결과를 보였다. 따라서 Tpt1 은 적어도 세포 수준에서는 근육 위축이나 근감소증을 유발하는 단백질이라고 판단하였다.

우리는 생체 내에서 Tpt1 의 발현을 조절하여 효과를 확인하기 위해 AAV 를 사용하였다. 골격근에서 주로 작용하는 AAV serotype 은 AAV1, AAV6, AAV9 으로 보고되었다 [77]. 이 중 우리는 AAV6 와 AAV9 의 감염 효율을 비교하여 형광 발현이 더 높은 AAV6 로 Tpt1 shRNA 를 제작해 실험에 사용하였다. 하지만, 예상과는 다르게 근육 위축된 뒷다리 운동 제한 조건에서 Tpt1 shRNA 를 이용하여 Tpt1 발현을 감소시킨 결과 근육조직에는 변화가 없었다.

동물 실험은 많은 인자에 의해 영향을 받을 수 있기 때문에 세포 실험 결과와 동물 실험 결과는 일치하지 않을 수 있다. 동물 실험에 영향을 주는 인자들로 실험 동물의 연령 또는 하위 계통 등이 알려져 있다. 예를 들면, 프랑스 Charles River Laboratories 에서 구입한 C57BL/6J 마우스가 다른 공급업체 (미국 NIA, 프랑스 Elevage Janvier, 독일 하이델베르크 대학)의 C57BL/6J 마우스와 비교하여 심각한 결절성 사구체 경화증이 나타났다 [64]. 즉, C57BL/6J 마우스의 많은 하위 계통들은 서로 유전적으로 다르기 때문에 이러한 차이가 발생하며 실험 결과에 영향을 미칠 수 있다 [64]. 또한 일반적인 동물 모델로 사용되는 8~12 주 연령대에서는 많은 발달 과정이 진행되며 이러한 연령에 따른 생리적 변화는 실험 변수에 영향을 줄 수 있다 [65, 66]. 투여 용량 또한 동물 실험에 중요한 영향을 미치기도 한다. 고용량 (100 µg)의 pAAV-HBV1.2 플라스미드 DNA 를 주입한 마우스에서 HBsAg 발현 및 HBV 지속성에 효과를 보이지 않고 오히려 저용량 (5 µg)을 주입한 마우스에서 유의한 결과를 보인 연구 결과도 있다 [67]. 그러나 이것들 보다는 동물 모델의 종류에 따라 그 결과가 달라질 가능성이 더 많다. 예를 들어, 운동 제한 동물 모델에서 그 결과가 관찰되지 않았다고 하여 노화 모델, 성호르몬 결핍 모델 등에서도 그러할 것이라고 장담하기는 어렵다. 본 연구에서는 운동 제한 모델에서만 Tpt1 의 생체 수준 역할을 점검하였다. 그러나 아쉽게도 유의한 결과를 얻지 못하였는데 이것이 Tpt1 이 세포 수준에서 유의한 역할을 함에도 불구하고 생체 수준에서는 역할이 없음을 뜻하지는 않는다. 향후 다른 동물 모델을 이용하여 생체 수준의 역할을 재점검하여야 할 것으로 판단한다.

결론

마우스 근육 시료에서 단백질 분석을 통해 근육세포 분화에 유의한 작용을 하는 C1qbp와 Tpt1 인자들을 최초로 발굴하였다. 향후 이 인자들의 생체 내 작용 검증이 필요하다.



Gastrocnemius

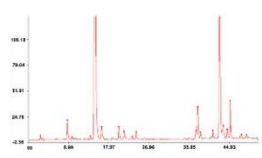
Protein isolation



Protein mixture



Peptides of all proteins



Liquid chromatography / Mass spectrometry

Protein Identification

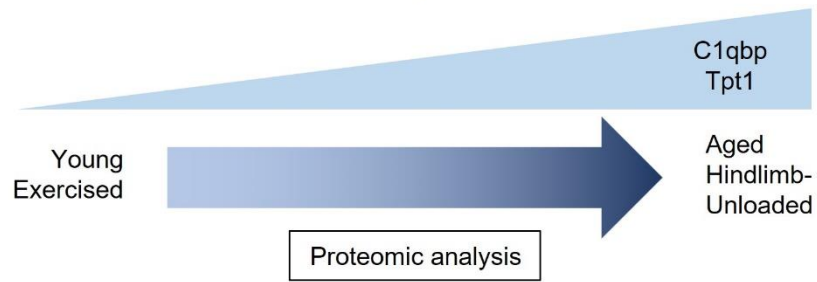


Figure 1. A schematic diagram of a proteomic analysis.

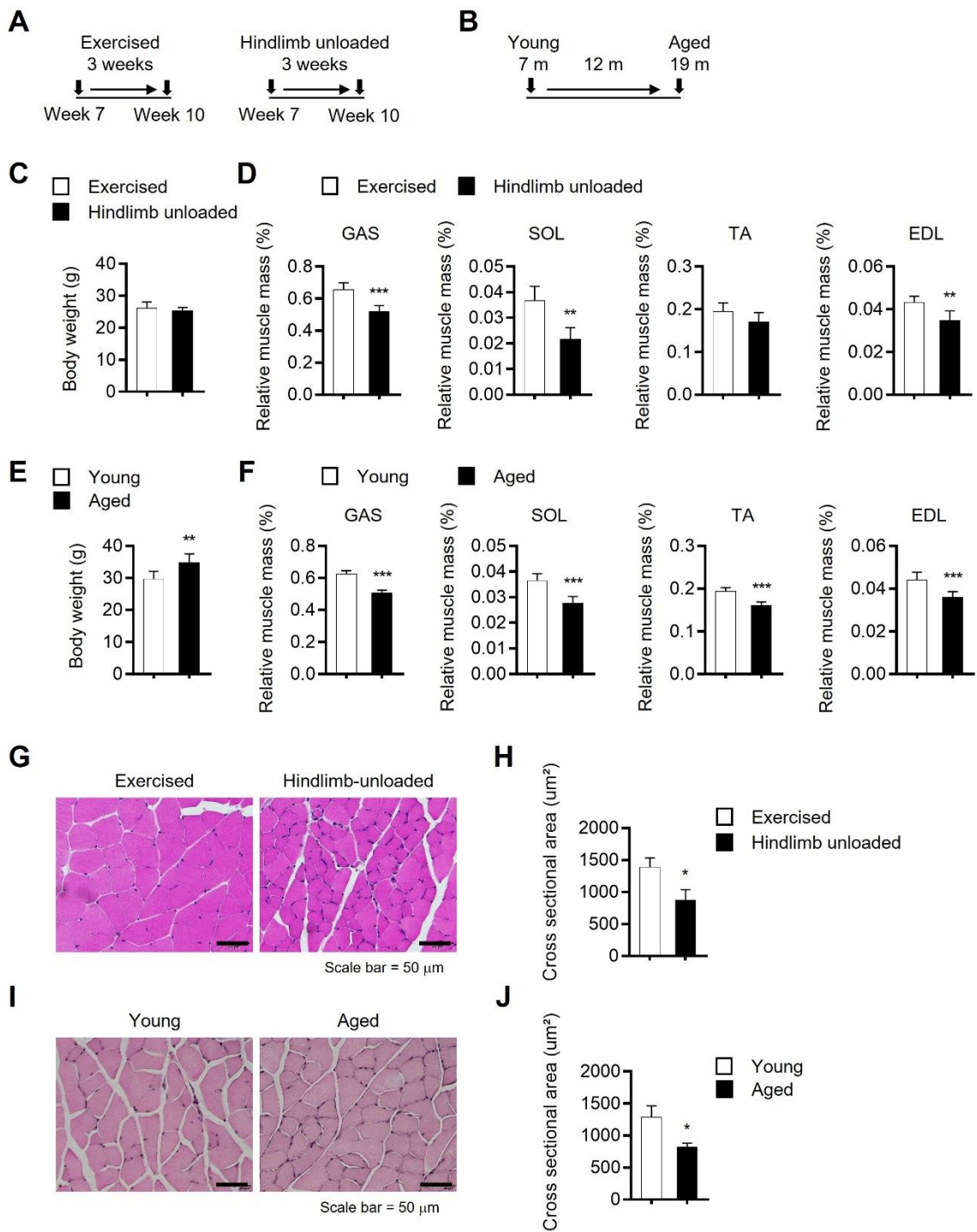
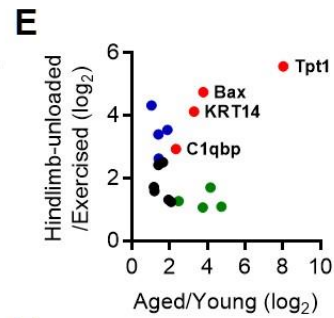
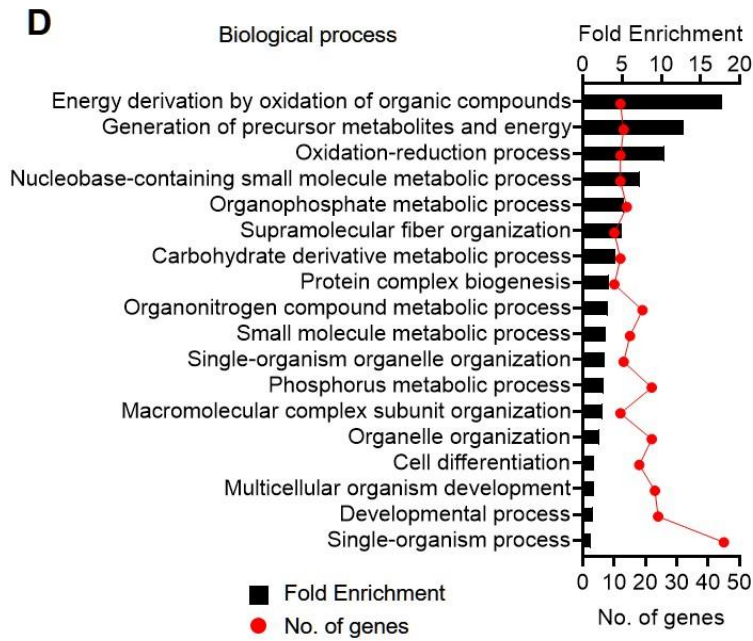
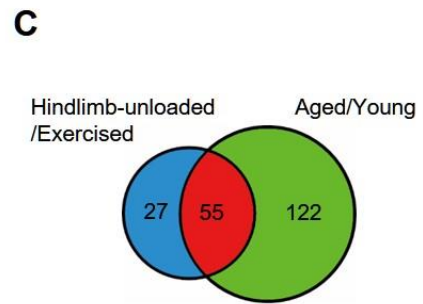
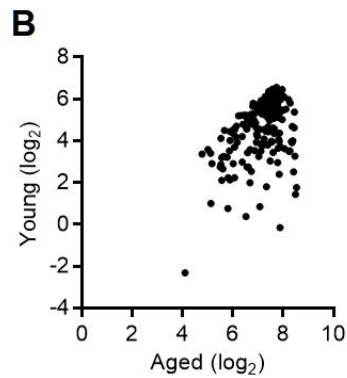
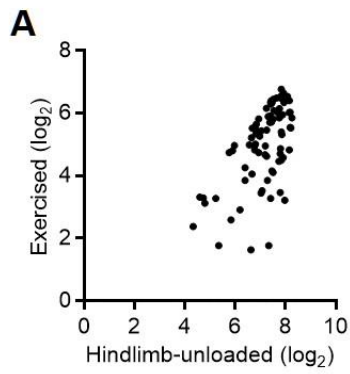


Figure 2. Muscle loss due to hindlimb-unloading or aging.

(A-B) An experimental protocol for exercise vs unloaded mice and young vs aged mice. (A) To establish the exercise model, male C57BL/6 mice aged 7 weeks were exercised on a treadmill for 30 min a day for 3 weeks. To establish the hindlimb-unloaded model, the tail of male C57BL/6 mice aged 7 weeks was suspended for 3 weeks. (B) To establish the young and aged models, 7-month-old male C57BL/6 mice and 19-month-old male C57BL/6 mice were used, respectively. (C) Body weights of the exercise and unloaded mice. (D) The mice were sacrificed, and relevant muscles were harvested and weighed. Relative muscle mass is expressed as a percentage of body weight. Data are represented as mean \pm SD ($n = 5$ mice). $**P < 0.01$; $***P < 0.001$, *versus* exercised group. (E) Body weights of the young and aged mice. (F) The mice were sacrificed, and relevant muscles were harvested and weighed. Relative muscle mass is expressed as a percentage of body weight. Data are represented as mean \pm SD ($n = 5$). $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ *versus* young group. (G) GAS muscles isolated from exercised and hindlimb-unloaded mice were fixed, embedded, sectioned, and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological analysis. Representative images of H&E-stained sections are shown in the lower panels. Scale bar, 50 μm . Cross sectional areas were analyzed using the Image J program, and their quantification result (H) is shown. Data are represented as mean \pm SD ($n = 3$). $*P < 0.05$ *versus* exercised group. (I) GAS muscles were isolated from 7-month-old (young group) or 19-month-old (aged group) male C57BL/6 mice. Representative images of H&E-stained sections are shown in the lower panels. Scale bar, 50 μm . Cross sectional areas were analyzed using the Image J program, and their quantification result (J) is shown. Data are represented as mean \pm SD ($n = 3$). $*P < 0.05$ *versus* young group. GAS, gastrocnemius; SOL, soleus; TA, tibialis anterior; EDL, extensor digitorum longus.

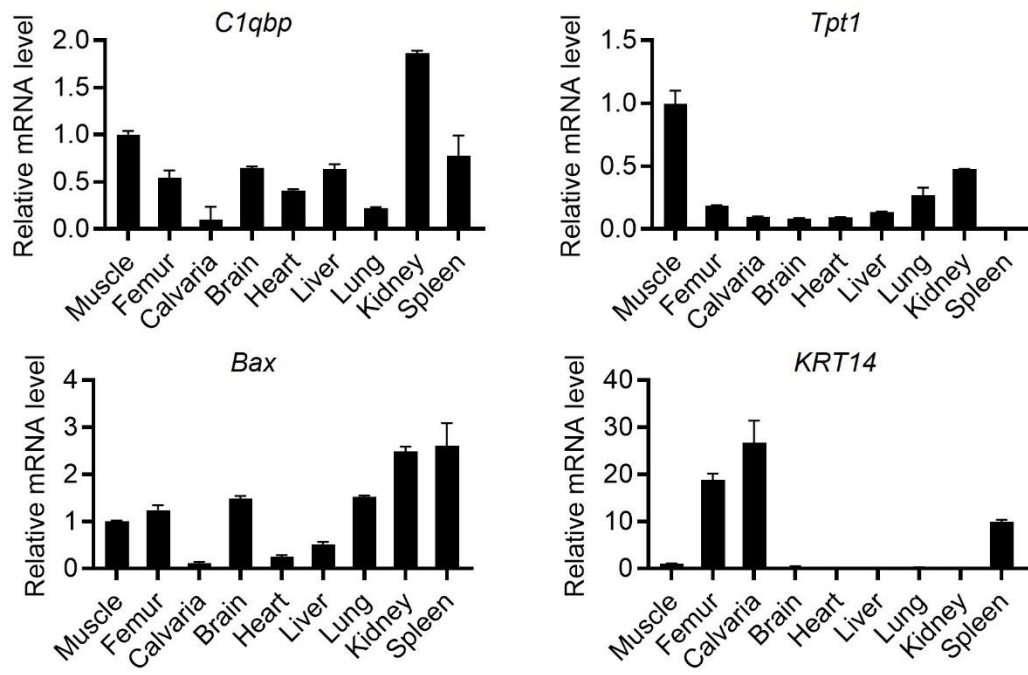
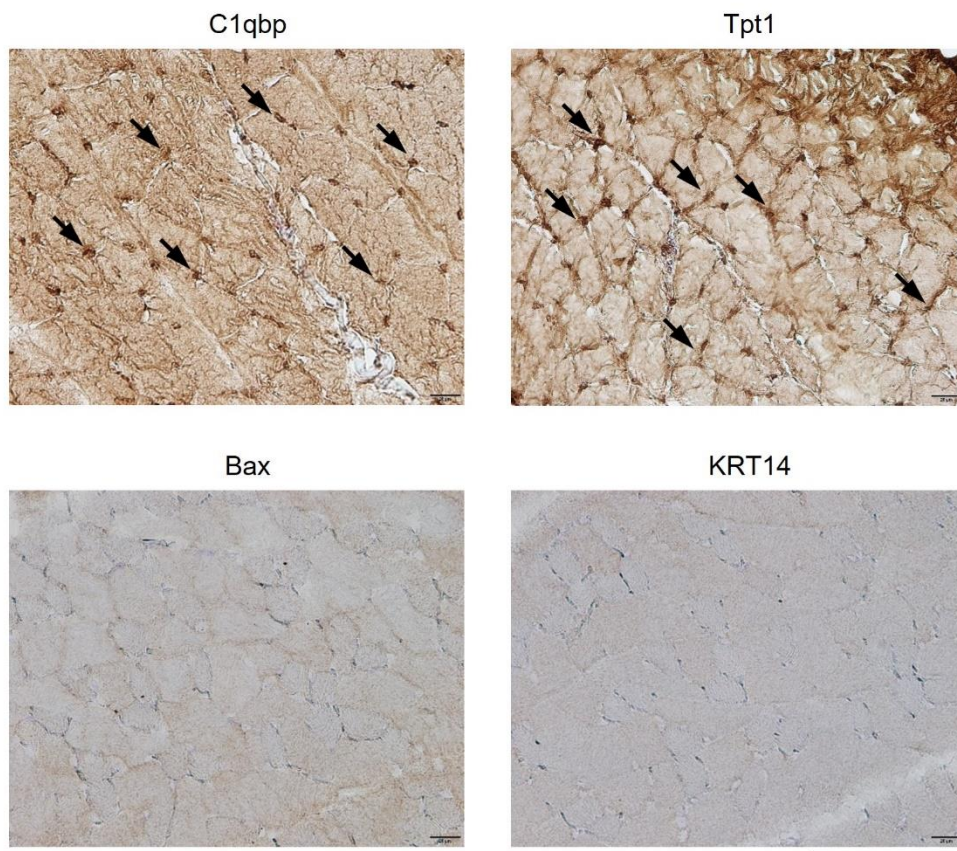


F

RANK	Hindlimb-unloaded /Exercised		Aged/Young	
	Gene	Fold (\log_2)	Gene	Fold (\log_2)
1	Tpt1	8.024	Tpt1	5.570
2	Myoc	4.737	Bax	4.753
3	Hbb-b1	4.160	Dsp	4.330
4	Bax	3.778	KRT14	4.135
5	Pdim7	3.748	Krt10	3.544
6	KRT14	3.290	Vapa	3.406
7	Col4a2	2.471	C1qbp	2.938
8	C1qbp	2.330	KRT6A	2.630

Figure 3. Muscle proteome of mice with muscle loss.

(A) A scatter plot comparing fold change between hindlimb-unloaded and exercised mice is shown. Compared with those in the exercised mice, the muscle expression levels of 82 proteins were significantly upregulated in hindlimb-unloaded mice. (B) A scatter plot comparing fold change between aged and young mice is shown. Compared with those in young mice, the muscle expression levels of 177 proteins were significantly upregulated in aged mice. (C) Venn diagrams represent 55 proteins that were upregulated more than two-fold in both hindlimb-unloaded and aged mice compared to exercised and young mice, respectively. (D) Gene ontology enrichment analysis of the 55 common target proteins using the DAVID bioinformatics database (<https://david.ncifcrf.gov>). (E) A scatter plot comparing fold change between aged/young groups and hindlimb-unloaded/exercised groups are shown. The graph includes 17 cell differentiation-related proteins. Upregulated proteins in the hindlimb-unloaded, aged, and both groups are marked in blue, green, and red, respectively. (F) Cell differentiation-related proteins are ranked in the order of fold change in both hindlimb-unloaded vs. exercised and aged vs. young groups. The top seven ranked proteins in both hindlimb-unloaded vs. exercised and aged vs. young are shown. Upregulated proteins in hindlimb-unloaded, aged, and both groups are marked in blue, green, and red, respectively.

A**B**

100μm

Figure 4. C1qbp and Tpt1 expressions in skeletal muscles.

(A) Total RNAs were isolated from various tissues of male C57BL/6 mice aged 8 weeks. The expression levels of *C1qbp*, *Tpt1*, *Bax* and *Krt14* were quantified using qRT-PCR. Muscle indicates gastrocnemius.

(B) Gastrocnemius of male C57BL/6 mice aged 8 weeks were subjected to immunohistochemical analysis with anti-C1qbp, anti-Tpt1, anti-Bax, and anti-Krt14 antibodies. Representative immunohistochemical images are shown. Scale bar, 100 μ m. Arrows indicate the C1qbp/Tpt1-positive signal.

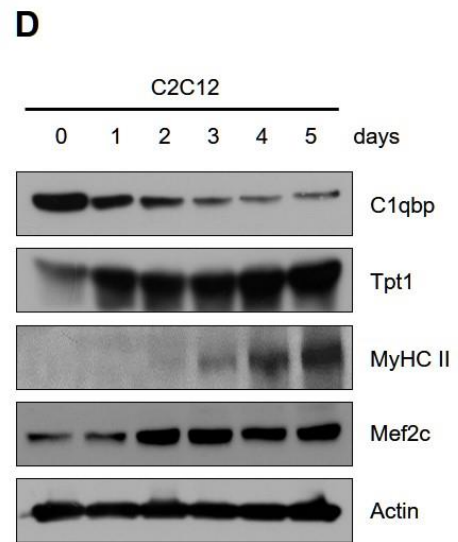
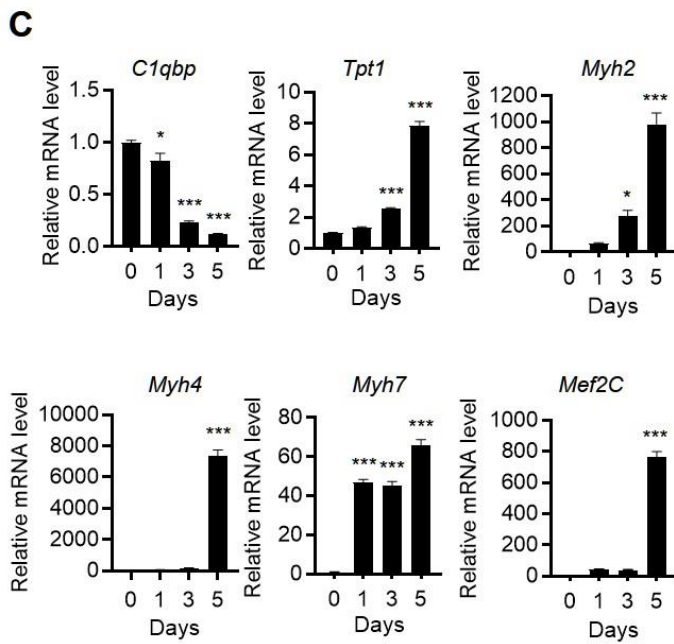
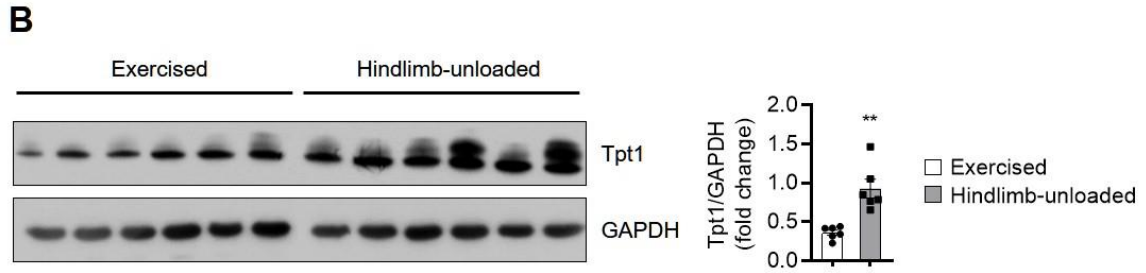
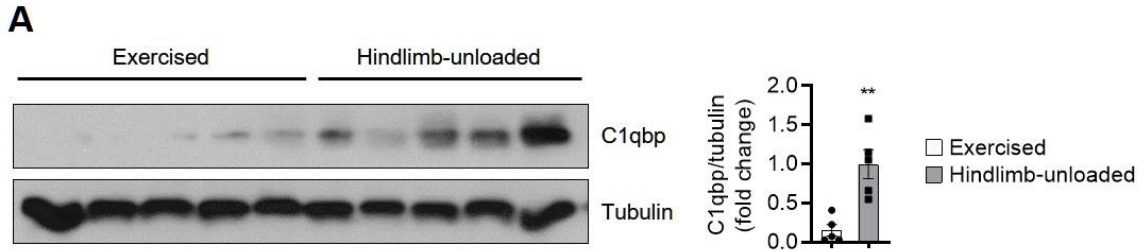


Figure 5. Expression levels of C1qbp and Tpt1 in mice with muscle loss and in muscle cells.

(A and B) Gastrocnemius from exercised and hindlimb-unloaded male C57BL/6 mice were prepared. The expression levels of C1qbp (A) and Tpt1 (B) were analyzed using western blotting (left). The protein levels were quantified and normalized to tubulin (A) and GAPDH (B) levels (right). Tubulin and GAPDH were used as a loading control. Data are represented as mean \pm SEM ($n = 5$). $**P < 0.01$ versus exercise group. (C) C2C12 cells were differentiated using a culture medium containing 2% horse serum for the indicated times. The expression levels of *C1qbp*, *Tpt1*, *Myh2*, *Myh4*, *Myh7*, and *Mef2c* were determined using qRT-PCR. Data are represented as mean \pm SD ($n = 3$). $*P < 0.05$; $***P < 0.001$ versus 0 day. (D) Lysates were prepared from C2C12 cells after differentiation with 2% horse serum for the indicated durations. The expression levels of C1qbp, Tpt1, MyHC II, Mef2c, and Actin were determined using western blotting. Actin was a loading control.

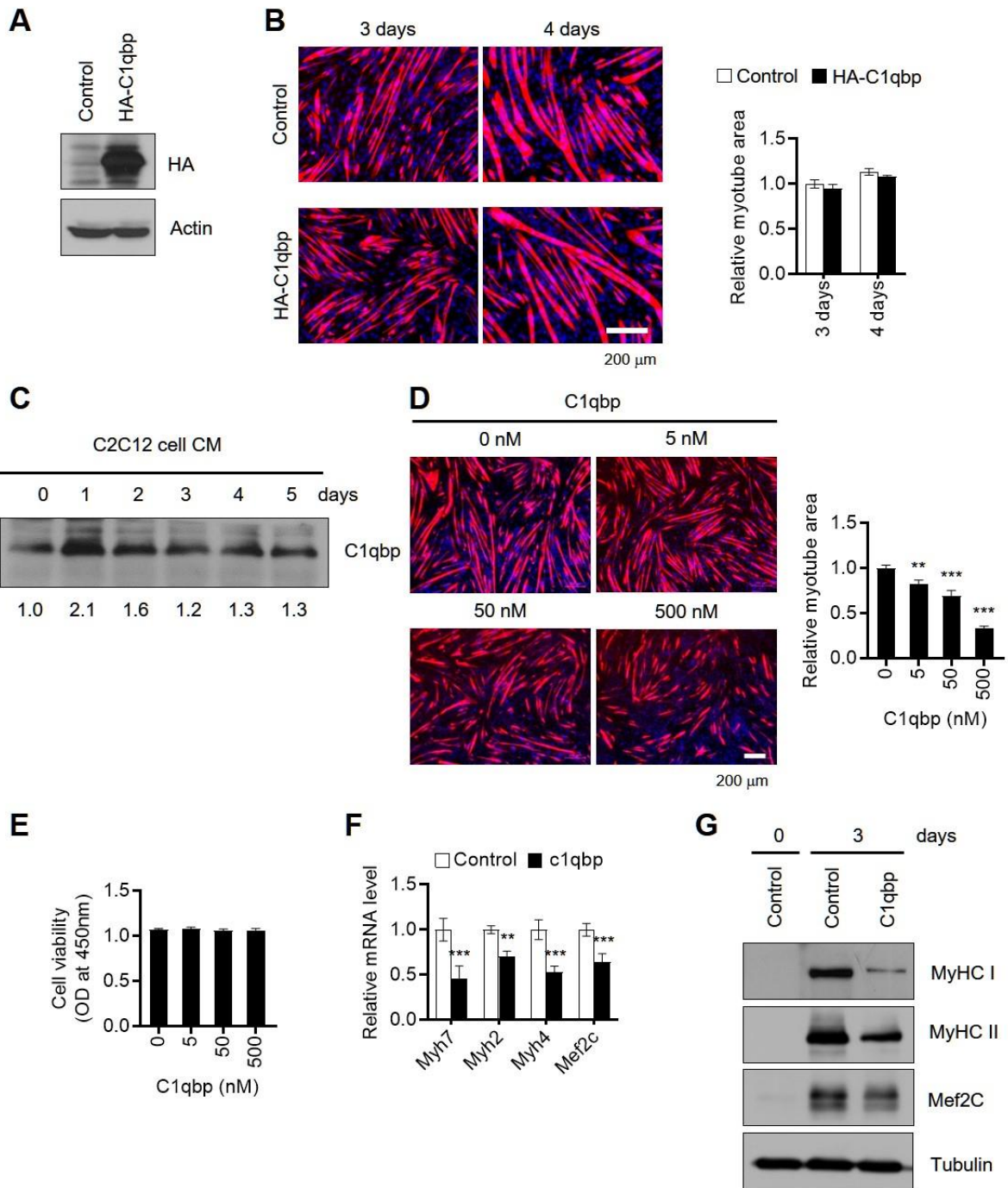


Figure 6. Suppression of myogenic differentiation upon rC1qbp treatment.

(A) C2C12 cells were transfected with mock (control) or hemagglutinin (HA)-tagged C1qbp (HA-C1qbp) plasmids for 48 h. The expression levels of HA-C1qbp were analyzed using western blotting. Actin was used as a loading control. (B) C2C12 cells were transfected with the HA-C1qbp construct for 48 h and differentiated into myotubes for 3 and 4 days. The cells were immunostained with anti-MyHC (red) antibody, while the nuclei were stained with DAPI (blue). Representative immunostaining images are shown. The myotube areas were analyzed using the Image-Pro Plus program, and their quantification results are shown in the right panel. Data are represented as mean \pm SD ($n = 5$). Scale bar, 200 μ m. (C) C2C12 cells were induced to differentiate with 2% horse serum for the indicated times. The conditioned medium (CM) was harvested. The expression of C1qbp in the CM was analyzed using western blotting. (D) C2C12 cells were treated with the indicated concentrations of recombinant C1qbp (rC1qbp) and differentiated into myotubes for 3 days. The cells were fixed and immunostained with anti-MyHC (red) antibodies, while the nuclei were stained with DAPI (blue). Representative immunostaining images are shown in the left panels. The myotube areas were analyzed using the Image-Pro Plus program. Scale bar, 200 μ m. Data are represented as mean \pm SD ($n = 5$). $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ *versus* control. (E) C2C12 cells were treated with rC1qbp for 3 days. Cell viability was measured using the cell counting kit assay. Data are represented as mean \pm SD ($n = 5$). (F) C2C12 cells were treated with vehicle (control) or 500 nM of rC1qbp and differentiated into myotubes for 3 days. The expression levels of *Myh7*, *Myh2*, *Myh4*, and *Mef2c* were analyzed using qRT-PCR. Data are represented as mean \pm SD ($n = 3$). $**P < 0.01$; $***P < 0.001$ *versus* control. (G) C2C12 cells treated with vehicle (control) or rC1qbp (500 nM) were induced to differentiate for 3 days. The expression levels of MyHC I, MyHC II, and *Mef2c* were analyzed using western blotting. Tubulin was used as a loading control.

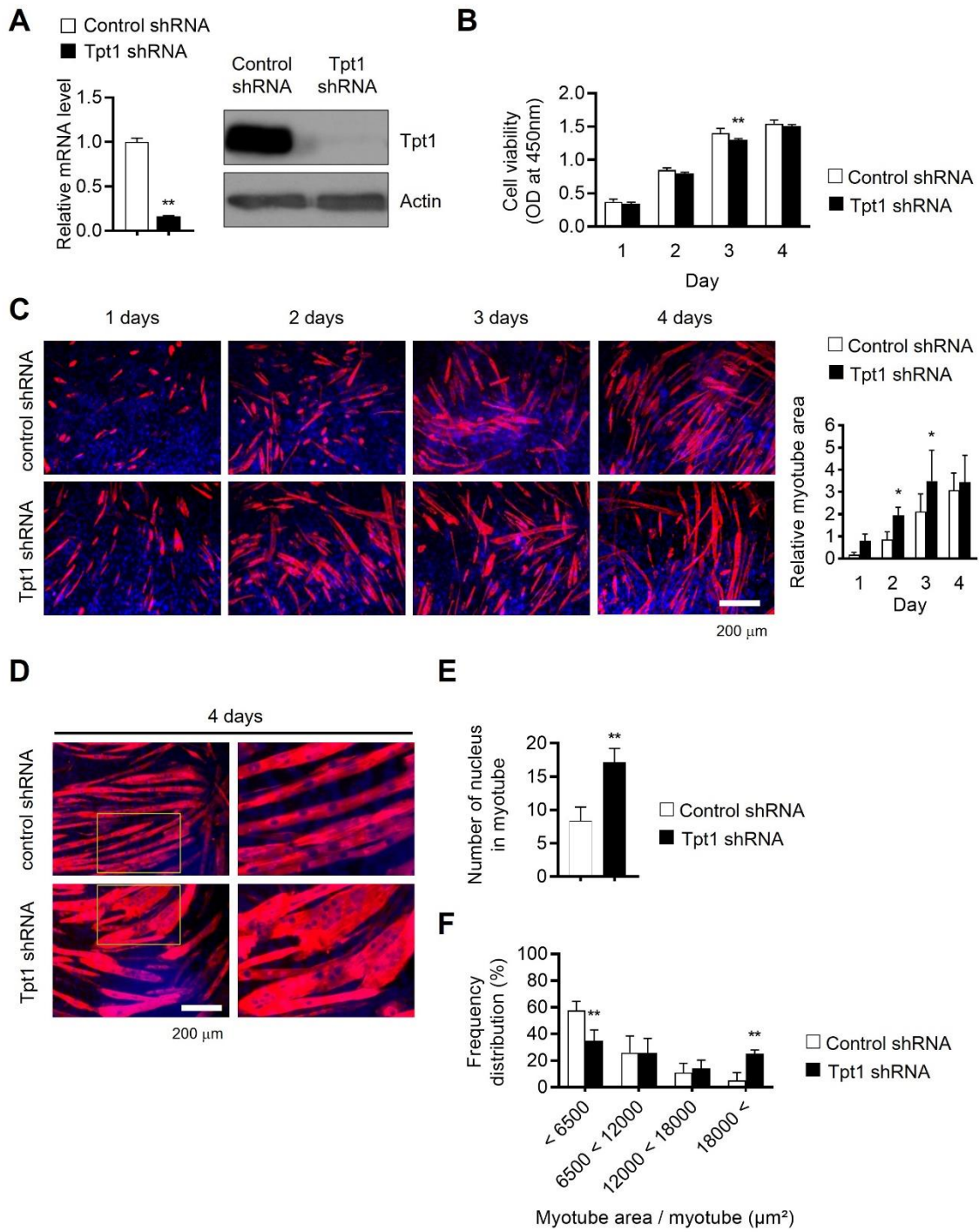


Figure 7. Enhancement of myogenic differentiation upon Tpt1 knockdown.

(A) C2C12 cells were infected with Tpt1 shRNA, and the expression levels of Tpt1 were analyzed using qRT-PCR and western blotting. Actin was used as a loading control. Data are represented as mean \pm SD ($n = 3$). (B) C2C12 cells were transfected with Tpt1 shRNA. Cell viability was measured using the cell counting kit assay. Data are represented as mean \pm SD ($n = 5$). (C) C2C12 cells were infected with the Tpt1 shRNA and differentiated into myotubes for 4 days. The cells were immunostained with anti-MyHC (red) antibody, while the nuclei were stained with DAPI (blue). (D-F) differentiated independently from (C) for 4 days. The relative myotube area (C), number of nuclei per myotube (E), and frequency distribution of myotubes (F) were analyzed and quantified using the Image J program. Scale bar, 200 μ m. Data are represented as mean \pm SD ($n = 5$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *versus* control.

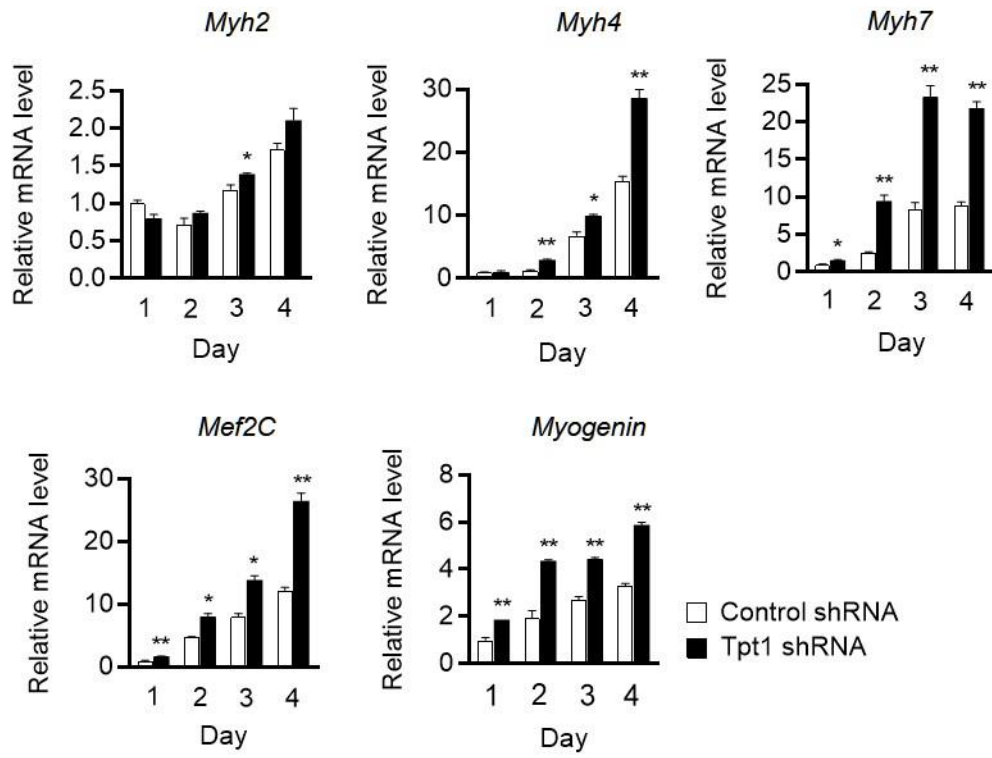
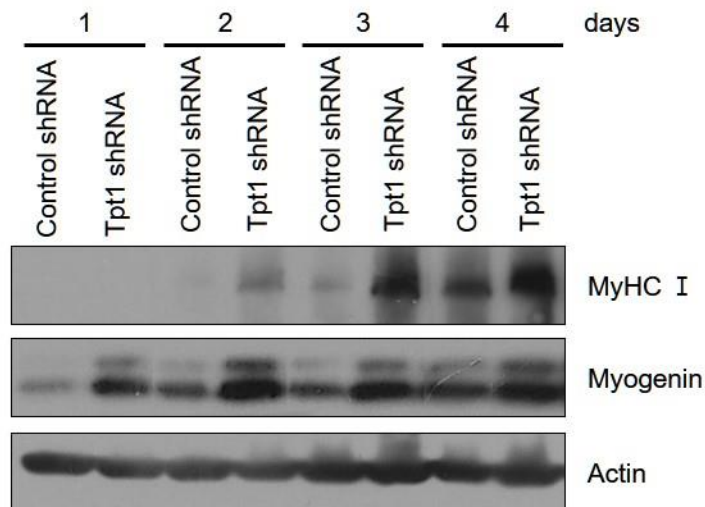
A**B**

Figure 8. Upregulation of myogenic differentiation-related genes upon Tpt1 knockdown.

(A) C2C12 cells were infected with the Tpt1 shRNA and differentiated into myotubes for 4 days. The expression levels of *Myh2*, *Myh4*, *Myh7*, *Mef2c* and myogenin were determined using qRT-PCR. Data are represented as mean \pm SD ($n = 3$). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ versus untreated control. (B) Lysates were prepared from C2C12 cells after differentiation with 2% horse serum for the indicated durations. The expression levels of MyHC I and myogenin were determined using western blotting. Actin was used as a loading control.



Figure 9. Muscle mass after Tpt1 knockdown in hindlimb-unloaded mice.

(A) To confirm the efficacy of AAV, AAV6 and AAV9 were injected into the TA muscles of mice. After 4 weeks, mice were sacrificed to obtain TA muscles. The TA muscles were sectioned and stained with DAPI (Blue). Fluorescence images were obtained using an Axio Imager microscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) at 100 magnifications. Green areas represent AAV-infected areas. Scale bar, 200 μm . (B) To establish the *in vivo* model, male C57BL/6 mice aged 7 weeks were separated into two groups based on body weight. They were injected twice on the 0 and 3 days into the Tibialis anterior (TA) muscles. AAV6-control and AAV6-Tpt1 shRNAs were injected. Their tails were immobilized for the next two weeks to restrict hindlimb movement. IM, Intramuscular injection. (C) Lysates were collected from TA muscles of sacrificed mice. Tpt1 knockdown efficiency was examined by western blotting. GAPDH was used as the loading control. $*P < 0.05$ versus control. (D and E) Body weight (D) and muscle weight (E) of the AAV6-control and AAV6-Tpt1 shRNAs were measured. Relative muscle mass is expressed as a percentage of body weight. (F and G) TA muscles were fixed, embedded, sectioned, and stained with H&E. Representative immunostaining images (F) are shown. Scale bar, 50 μm . Cross sectional areas were analyzed using the Image J program, and their quantification result (G) is shown. Data are represented as mean \pm SD ($n = 4$). TA, tibialis anterior.

참고문헌

1. de Resende E Silva D. T. et al. Physical exercise as a modulator of the purinergic system in the control of sarcopenia in individuals with chronic kidney disease on hemodialysis. *Purinergic Signal*. (2023).
2. Cao L, Morley J. E. Sarcopenia is recognized as an independent condition by an international classification of disease, tenth revision, clinical modification (ICD-10-CM) code. *J Am Med Dir Assoc*. **17**, 675-677 (2016).
3. Jang J. Y., Kim D. & Kim N. D. Pathogenesis, Intervention, and Current Status of Drug Development for Sarcopenia: A Review. *Biomedicines*. **11**, 1635 (2023).
4. Baumgartner R. N., Koehler K. M., Gallagher D, Romero L, Heymsfield S. B., Ross R. R. et al. Epidemiology of sarcopenia among the elderly in New Mexico. *Am J Epidemiol*. **147**, 755-763 (1998).
5. Razaq S, Kara M, Ozcakar L, Rathore F. A. Diagnosis, management strategies and research horizons in sarcopenia. *J Pak Med Assoc*. **72(5)**, 998-1001 (2022).
6. Sayer A. A., Cruz-Jentoft A. Sarcopenia definition, diagnosis and treatment: consensus is growing. *Age Ageing*. **51(10)**, afac220 (2022).
7. Cannataro R. et al. Sarcopenia: Etiology, Nutritional Approaches, and miRNAs. *Int J Mol Sci*. **22(18)**, 9724 (2021).

8. Antuña E, Cachán-Vega C, Bermejo-Millo J. C., Potes Y, Caballero B, Vega-Naredo I, Coto-Montes A, Garcia-Gonzalez C. Inflammaging: Implications in Sarcopenia. *Int J Mol Sci.* **23(23)**, 15039 (2022).
9. Kalinkovich A, Livshits G. Sarcopenic obesity or obese sarcopenia: A cross talk between age-associated adipose tissue and skeletal muscle inflammation as a main mechanism of the pathogenesis. *Ageing Res Rev.* **35**, 200-221 (2017).
10. Anker S. D., Morley J. E., von Haehling S. Welcome to the ICD-10 code for sarcopenia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* **7**, 512-514 (2016).
11. Kwak J. Y., Kwon K. S. Pharmacological Interventions for Treatment of Sarcopenia: Current Status of Drug Development for Sarcopenia. *Ann Geriatr Med Res.* **23**, 98-104 (2019).
12. Feike Y, Zhijie L, Wei C. Advances in research on pharmacotherapy of sarcopenia. *Aging Med (Milton).* **4**, 221-233 (2021).
13. Ohlendieck K. Skeletal muscle proteomics: current approaches, technical challenges and emerging techniques. *Skelet Muscle.* **1(1)**, 6 (2011).
14. Hochstrasser D. F., Sanchez J. C., Appel R. D. Proteomics and its trends facing nature's complexity. *Proteomics.* **2(7)**, 807-12 (2002).
15. Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature.* **422(6928)**, 198-207 (2003).
16. Yates J. R., Ruse C. I., Nakorchevsky A. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng.* **11**, 49-79 (2009).

17. Zhu H, Bilgin M, Snyder M. Proteomics. *Annu Rev Biochem.* **72**, 783–812 (2003).
18. Gstaiger M, Aebersold R. Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat Rev Genet.* **10**, 617–627 (2009).
19. Walther T. C., Mann M. Mass spectrometry-based proteomics in cell biology. *J Cell Biol.* **190**, 491–500 (2010).
20. Chakravarti B, Mallik B, Chakravarti D. N. Proteomics and systems biology: application in drug discovery and development. *Methods Mol Biol.* **662**, 3–28 (2010).
21. Isfort R. J. Proteomic analysis of striated muscle. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **771**, 155–165 (2002).
22. Doran P, Donoghue P, O'Connell K, Gannon J, Ohlendieck K. Proteomic profiling of pathological and aged skeletal muscle fibres by peptide mass fingerprinting. *Int J Mol Med.* **19**, 547–564 (2007).
23. Doran P, Donoghue P, O'Connell K, Gannon J, Ohlendieck K. Proteomics of skeletal muscle aging. *Proteomics.* **9**, 989–1003 (2009).
24. Ali-Khan N, Zuo X, Speicher DW. Overview of proteome analysis. *Curr Protoc Protein Sci.* **22**, Unit 22.1 (2003).
25. Muta, T., Kang, D., Kitajima, S., Fujiwara, T. & Hamasaki, N. p32 protein, a splicing factor 2-associated protein, is localized in mitochondrial matrix and is functionally important in maintaining oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **272**, 24363-24370 (1997).

26. Sengupta, A., Banerjee, B., Tyagi, R. K. & Datta, K. Golgi localization and dynamics of hyaluronan binding protein 1 (HABP1/p32/C1QBP) during the cell cycle. *Cell Res.* **15**, 183–186 (2005).
27. Fogal, V., Zhang, L., Krajewski, S. & Ruoslahti, E. Mitochondrial/cell-surface protein p32/gC1qR as a molecular target in tumor cells and tumor stroma. *Cancer Res.* **68**, 7210-7218 (2008).
28. Hu, M. et al. p32 protein levels are integral to mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology, cell metabolism and survival. *Biochem. J.* **453**, 381-391 (2013).
29. Yagi, M. et al. p32/gC1qR is indispensable for fetal development and mitochondrial translation: importance of its RNA-binding ability. *Nucleic Acids Res.* **40**, 9717-9737 (2012).
30. Fogal, V. et al. Mitochondrial p32 protein is a critical regulator of tumor metabolism via maintenance of oxidative phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 1303-1318 (2010).
31. Li, Y. et al. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection promotes C1QBP secretion to enhance inflammatory responses. *Vet. Microbiol.* **241**, 108563 (2020).
32. Ghebrehiwet, B. et al. Soluble gC1qR is an autocrine signal that induces B1R expression on endothelial cells. *J. Immunol.* **192**, 377-384 (2014).
33. Yu, L., Loewenstein, P. M., Zhang, Z. & Green, M. In vitro interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Tat transactivator and the general transcription factor TFIIB with the cellular protein TAP. *J. Virol.* **69(5)**, 3017-3023 (1995).

34. Deb, T. B. & Datta, K. Molecular cloning of human fibroblast hyaluronic acid-binding protein confirms its identity with P-32, a protein co-purified with splicing factor SF2. Hyaluronic acid-binding protein as P-32 protein, co-purified with splicing factor SF2. *J. Biol. Chem.* **271**, 2206-2212 (1996).
35. Ghebrehiwet, B., Lim, B. L., Peerschke, E. I., Willis, A. C. & Reid, K. B. Isolation, cDNA cloning, and overexpression of a 33-kD cell surface glycoprotein that binds to the globular "heads" of C1q. *J. Exp. Med.* **179**, 1809-1821 (1994).
36. Herwald, H., Dedio, J., Kellner, R., Loos, M. & Müller-Esterl, W. Isolation and characterization of the kininogen-binding protein p33 from endothelial cells. Identity with the gC1q receptor. *J. Biol. Chem.* **271**, 13040-13047 (1996).
37. Lim, B. L. et al. The binding protein for globular heads of complement C1q, gC1qR. Functional expression and characterization as a novel vitronectin binding factor. *J. Biol. Chem.* **271**, 26739-26744 (1996).
38. Simos, G. & Georgatos, S. D. The lamin B receptor-associated protein p34 shares sequence homology and antigenic determinants with the splicing factor 2-associated protein p32. *FEBS Lett.* **346**, 225-228 (1994).
39. Itahana, K. & Zhang, Y. Mitochondrial p32 is a critical mediator of ARF-induced apoptosis. *Cancer Cell.* **13**, 542-553 (2008).
40. Ghate, N. B. et al. p32 is a negative regulator of p53 tetramerization and transactivation. *Mol. Oncol.* **13**, 1976-1992 (2019).

41. Verbrugge Sander A. J. et al. Genes Whose Gain or Loss-Of-Function Increases Skeletal Muscle Mass in Mice: A Systematic Literature Review. *Front Physiol.* **9**, 553 (2018).
42. Li F, Zhang D, Fujise K. Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J Biol Chem.* **276(50)**, 47542-9 (2001).
43. Neuhäuser K, Küper L, Christiansen H, Bogdanova N. Assessment of the role of translationally controlled tumor protein 1 (TPT1/TCTP) in breast cancer susceptibility and ATM signaling. *Clin Transl Radiat Oncol.* **15**, 99-107 (2019).
44. Bommer U. A., Thiele B. J. The translationally controlled tumour protein (TCTP). *Int J Biochem Cell Biol.* **36(3)**, 379-85 (2004).
45. Acunzo J, Baylot V, So A, Rocchi P. TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treat Rev.* **46**, 760–769 (2014).
46. Amson R, Pece S, Marine J. C., Di Fiore P. P., Telerman A. TPT1/ TCTP-regulated pathways in phenotypic reprogramming. *Trends Cell Biol.* **23**, 37–46 (2013).
47. Bae S. Y. et al. TPT1 (tumor protein, translationally-controlled 1) negatively regulates autophagy through the BECN1 interactome and an MTORC1-mediated pathway. *Autophagy.* **13(5)**, 820–833 (2017).
48. Bommer UA. The Translational Controlled Tumour Protein TCTP: Biological Functions and Regulation. *Results Probl Cell Differ.* **64**, 69-126 (2017).

49. Thongboonkerd V, Kanlaya R, Sinchaikul S, Parichatikanond P, Chen S. T., Malasit P. Proteomic Identification of Altered Proteins in Skeletal Muscle During Chronic Potassium Depletion: Implications for Hypokalemic Myopathy. *J Proteome Res.* **5**, 3326–3335 (2006).
50. Inose M, Higuchi I, Nakagawa M, Kashio N, Osame M. Caveolin-3 and sarcoglycans in the vacuolar myopathies and centronuclear myopathy. *Muscle Nerve.* **22**, 1080–1086 (1999).
51. Kim M, Jung Y, Lee K, Kim C. Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch Pharm Res.* **23(6)**, 633-6 (2000).
52. Yoon T, Jung J, Kim M, Lee K. M., Choi E. C., Lee K. Identification of the self-interaction of rat TCTP/IgE-dependent histamine-releasing factor using yeast two-hybrid system. *Arch Biochem Biophys.* **384(2)**, 379-82 (2000).
53. Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjoyan Z. H., Fujise K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J Biol Chem.* **277(40)**, 37430-8 (2002).
54. Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, Telerman A. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99(23)**, 14976-81 (2002).
55. Acunzo J, Baylot V, So A, Rocchi P. TCTP as therapeutic target in cancers. *Cancer Treat Rev.* **40(6)**, 760-9 (2014).
56. Ahn, H. S. et al. Convergence of plasma metabolomics and proteomics analysis to discover signatures of high-grade serous ovarian cancer. *Cancers (Basel).* **12**, 3447 (2020).

57. Kim, E. Y. et al. An exploratory pilot study with plasma protein signatures associated with response of patients with depression to antidepressant treatment for 10 weeks. *Biomedicines*. **8**, 455 (2020).
58. Hardin D. S. et al. Muscle group-specific regulation of GLUT 4 glucose transporters in control, diabetic, and insulin-treated diabetic rats. *Metabolism*. **42(10)**, 1310-5 (1993).
59. Talbot J & Maves L. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*. **5(4)**, 518-34 (2016).
60. Martin J. F. et al. Myocyte enhancer factor (MEF) 2C: a tissue-restricted member of the MEF-2 family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **90(11)**, 5282-6 (1993).
61. Reiss J, Iglseider B, Alzner R. et al. Consequences of applying the new EWGSOP2 guideline instead of the former EWGSOP guideline for sarcopenia case finding in older patients. *Age Ageing*. **48**, 719-724 (2019).
62. Chen L. K., Liu L. K., Woo J, Assantachai P, Auyeung T. W., Bahyah K. S. et al. Sarcopenia in Asia: consensus report of the Asian Working Group for sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc*. **15**, 95-101 (2014).
63. Gang E. J. et al. Skeletal myogenic differentiation of mesenchymal stem cells isolated from human umbilical cord blood. *Stem Cells*. **22(4)**, 617-24 (2004).
64. Bafi R, Korstanje R. The impact of genetic background on mouse models of kidney disease. *Kidney Int*. **102(1)**, 38-44 (2022).

65. Jackson S. J. et al. Does age matter? The impact of rodent age on study outcomes. *Lab Anim.* **51(2)**, 160–169 (2017).
66. Fu Y. H. et al. Cellular composition characterizing postnatal development and maturation of the mouse brain and spinal cord. *Brain Struct Funct.* **218(5)**, 1337-54 (2013).
67. Li L. et al. The dose of HBV genome contained plasmid has a great impact on HBV persistence in hydrodynamic injection mouse model. *Virol J.* **14(1)**, 205 (2017).
68. Abbatecola A. M. et al. Discovering pathways of sarcopenia in older adults: a role for insulin resistance on mitochondria dysfunction. *J Nutr Health Aging.* **15(10)**, 890-5 (2011).
69. Kim M. J. et al. The Link between Mitochondrial Dysfunction and Sarcopenia: An Update Focusing on the Role of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4. *Diabetes Metab J.* **47(2)**, 153-163 (2023).
70. Ghebrehiwet, B., Geisbrecht, B. V., Xu, X., Savitt, A. G. & Peerschke, E. I. B. The C1q Receptors: Focus on gC1qR/p33 (C1qBP, p32, HABP-1). *Semin Immunol.* **45**, 101338 (2019).
71. Joseph, K. & Kaplan, A. P. Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response. *Adv Immunol.* **86**, 159-208 (2005).
72. Ghebrehiwet, B. et al. Targeting gC1qR domains for therapy against infection and inflammation. *Adv Exp Med Biol.* **735**, 97-110 (2013).

73. Khan, M. M. et al. High-molecular-weight kininogen fragments stimulate the secretion of cytokines and chemokines through uPAR, Mac-1, and gC1qR in monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **26(10)**, 2260-2266 (2006).
74. van den Berg, R. H., Faber-Krol, M. C., Sim, R. B. & Daha, M. R. The first subcomponent of complement, C1q, triggers the production of IL-8, IL-6, and monocyte chemoattractant peptide-1 by human umbilical vein endothelial cells. *J. Immunol.* **161**, 6924-6930 (1998).
75. Ma, J. et al. The expression pattern of p32 in sheep muscle and its role in differentiation, cell proliferation, and apoptosis of myoblasts. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 5161 (2019).
76. Goodman CA. et al. Insights into the role and regulation of TCTP in skeletal muscle. *Oncotarget.* **8**, 18754-18772 (2017).
77. Asokan A. et al. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Mol Ther.* **20(4)**, 699-708 (2012).
78. Ohira Y. et al. Gravitational unloading effects on muscle fiber size, phenotype and myonuclear number. *Adv Space Res.* **30(4)**, 777-81 (2002).
79. Nilwik R. et al. The decline in skeletal muscle mass with aging is mainly attributed to a reduction in type II muscle fiber size. *Exp Gerontol.* **48(5)**, 492-8 (2013).
80. [93] Wang J. et al. Complement C1q Binding Protein (C1QBP): Physiological Functions, Mutation-Associated Mitochondrial Cardiomyopathy and Current Disease Models. *Front Cardiovasc Med.* **9**, 843853 (2022).

81. [101] Peerschke E. I., Ghebrehiwet B. The contribution of gC1qR/p33 in infection and inflammation. *Immunobiology*. **212(4-5)**, 333-42 (2007).
82. [103] Plomgaard P, Penkowa M, Pedersen B. K., Fiber type specific expression of TNF-alpha, IL-6 and IL-18 in human skeletal muscles. *Exerc Immunol Rev*. **11**, 53-63 (2005).
83. [105] Thongboonkerd V. et al. Proteomic identification of altered proteins in skeletal muscle during chronic potassium depletion: Implications for hypokalemic myopathy. *J Proteome Res*. **5(12)**, 3326-35 (2006).
84. [91] Amson R. et al. Reciprocal repression between P53 and TCTP. *Nat Med*. **18(1)**, 91-9 (2011).
85. [110] Arcuri F. et al. Translationally controlled tumor protein (TCTP) in the human prostate and prostate cancer cells: expression, distribution, and calcium binding activity. *Prostate*. **60(2)**, 130-40 (2004).
86. [96] Romanello V., Sandri M. Implications of mitochondrial fusion and fission in skeletal muscle mass and health. *Semin Cell Dev Biol*. **143**, 46-53 (2023).
87. [104] Hu M. et al. p32 protein levels are integral to mitochondrial and endoplasmic reticulum morphology, cell metabolism and survival. *Biochem J*. **453(3)**, 381-91 (2013).
88. [102] Thoma A., Lightfoot A. P. NF-kB and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol*. **1088**, 267-279 (2018).
89. [112] Haddad F. et al. IL-6-induced skeletal muscle atrophy. *J Appl Physiol (1985)*. **98(3)**, 911-7 (2005).

90. [113] Zhou J. et al. Cytokine Signaling in Skeletal Muscle Wasting. *Trends Endocrinol Metab.* **27(5)**, 335-347 (2016).

Abstract

Background

A condition in which exercise ability is reduced due to a decrease in muscle mass and strength is called sarcopenia. Sarcopenia is caused by various factors such as aging, hormonal imbalances, poor nutrition, and lack of activity. The prevalence of age-related sarcopenia is expected to increase significantly as the global population ages, but there is no approved treatment for sarcopenia.

Methods

We aimed to discover factors that cause a decrease in skeletal muscle mass using proteomic analysis methods in animal muscle samples, establish their actions and mechanisms, and verify the mechanisms at the biological level to present target factors for the treatment of sarcopenia. Skeletal muscle tissues were extracted from exercised mice, exercise-restricted mice with hindlimb suspension, young and aged mice, and proteomic analysis identified C1qbp and Tpt1 with increased expression. Then, the expression of C1qbp or Tpt1 was regulated in C2C12 muscle cells, and then muscle cell differentiation and growth were investigated. In addition, the expression of differentiation-related genes during differentiation in myoblasts with regulated expression of C1qbp or Tpt1 was examined using real-time PCR and western blot assays. To confirm the effect *in vivo*, we injected Tpt1 shRNA into mouse muscle tissues and then the skeletal muscle mass of the mice was observed through histological analysis.

Results

In skeletal muscle samples from mice with induced muscle loss (hindlimb unloaded and aged mice), we identified C1qbp and Tpt1 for increased protein expression by proteomic analysis. C1qbp expression decreased during C2C12 cell differentiation, and recombinant C1qbp protein treatment significantly inhibited muscle cell differentiation. In contrast, Tpt1 expression increased during muscle

cell differentiation, and Tpt1 depletion promoted muscle cell differentiation. Finally, we injected Tpt1 shRNA into mouse hindlimb muscle tissue to observe muscle mass and found no significant difference from the control group.

Conclusions

Through proteomic analysis in mouse muscle samples, C1qbp and Tpt1 factors that play a significant role in muscle cell differentiation were discovered. Verification of the *in vivo* actions of these factors is needed in the future.

Keywords : C1qbp, Tpt1, Sarcopenia, Differentiation