

Cardiac Ankyrin Repeat Protein의 과량발현이 혈관내피세포에서 갖는 혈관신생 촉진 효과

공훈영 · 변종희*

단국대학교 자연과학대학 분자생물학과 · BK21 RNA 전문인력 양성사업팀 · 나노센서 바이오텍연구소

혈관이 좁아지거나 막혀서 생기는 허혈은 심장, 뇌, 다리와 같은 인체의 여러 장기에 영향을 미친다. 최근 혈관신생 분야에서 많은 진전이 있어 기존 치료법으로 치료가 되지 않는 허혈성 환자들의 치료 가능성에 대한 기대가 많아졌다. 혈관형성은 여러 개의 인자들과 세포들이 관여하는 복잡한 과정이기 때문에, 한 개의 인자보다는 여러 인자들을 병합하는 요법이 점점 많이 시도되고 있는데, 이런 병합요법의 한 예로 전사인자를 전달하는 전략을 생각할 수 있다. 이에 본 연구에서는 cardiac ankyrin repeat protein (CARP)의 유전자를 대상으로 그 혈관신생 능력을 혈관내피세포에서 조사하였다. 아데노바이러스 벡터 내에 human CARP의 cDNA를 클로닝하여 재조합 아데노바이러스를 제조하였으며, 이를 이용한 유전자 전달 실험 결과, CARP 유전자 전달 군에서 유의하게 혈관내피세포의 증식과 모세관 구조 형성, 그리고 vascular endothelial growth factor의 발현 등을 증가시켰음을 확인하였다. 본 연구 결과는 CARP가 혈관신생 연구의 새로운 목표 유전자로서 그 기능에 대한 많은 연구가 필요함을 뒷받침해준다.

Key words □ angiogenesis, blood vessel, cardiac ankyrin repeat protein, endothelial cell, gene therapy

죽상경화증(Atherosclerosis)은 동맥벽에 생기는 만성 염증성 질환으로서 죽상경화반(atherosclerotic plaque)을 형성하여 혈관의 내강을 좁히고, 중막을 약화시켜 각종 합병증을 유발시키는 질환이다(1, 16). 죽상경화증은 혈류 흐름을 저해하여 심장, 뇌, 다리 등 신체 각 장기로의 산소와 영양분 공급의 감소를 초래하는 허혈성 질환의 원인이므로 이를 방지할 경우, 관상동맥질환, 뇌혈관질환, 말초동맥질환 등이 초래된다. 최근 국내에서도 식생활의 서구화와 더불어 노령 인구의 증가로 인해 허혈성 질환의 발병률도 크게 증가하고 있는 추세이다. 이런 허혈성 질환을 치료하기 위해 여러 약제, 동맥성형술, artificial bypass graft 등 여러 치료법이 시행되고 왔지만, 완치되지 않는 경우가 많고, 또 이런 기존의 치료법에 전혀 반응하지 않는 소위 “no-option patients”가 상당수 존재하기 때문에 이들을 위한 새로운 치료법 개발이 절실한 실정이다.

허혈성 질환은 막힌 혈관 주위에 존재하는 측부혈관(collateral vessel)들이 그 임상상 및 예후에 있어 매우 중요한데, 이런 측부혈관의 생성을 촉진시켜 허혈성 질환을 치료하고자 하는 전략을 혈관신생치료법(therapeutic angiogenesis)이라 하며 그간 여러 혈관신생 인자들을 대상으로 연구가 진행되어 왔다(3, 11, 13, 14, 18). 유전자 치료는 이런 혈관신생인자들을 아주 높은 농도로 허혈 부위에 전달할 수 있는 효과적인 방법이 될 수 있는데, 안정적인 발현과 조절이 가능해 허혈성 질환의 새로운 치료대안이

될 수 있다(10, 15). 유전자 치료를 위한 치료 유전자로는 여러 종류의 혈관신생 유전자들이 사용될 수 있는데, 혈관 형성 과정이 많은 유전자들이 동시에 관여하는 복합적인 과정임을 고려할 때, 한 개의 유전자보다는 여러 개의 유전자들의 발현을 동시에 유도할 수 있는 전사인자가 효과적일 수 있다.

Cardiac ankyrin repeat protein (CARP)은 1995년 microvascular endothelial cell에서 cytokine에 의해 발현되는 전사조절인자로 처음 발견되었고(6), 그 후 cardiomyocyte, skeletal muscle, vascular smooth muscle cell 등에서도 발현되는 것으로 밝혀졌다(5, 12, 22). CARP는 human에서 chromosome 10번에 위치하며 alternative splicing form 없이 하나의 transcript를 만들어 낸다(17). CARP는 cardiac hypertrophy의 marker로서 작용하며(2), protein/protein interaction에 중요할 것으로 예상되는 4개의 ankyrin repeats를 갖고 있고 nuclear localization signal을 갖는 등 전사조절인자로서 작용할 수 있는 요건들을 갖추고 있다(Fig. 1). 실제로, 심장에서는 YB-1 transcription factor의 cofactor로 기능함이 밝혀진 바 있다(22).

CARP의 발현은 embryo와 fetal stage의 심장에서 높게 발현되다가 점차 성체로 가면서 그 발현량이 감소하게 되는 특징이 있고, postnatal cardiomyocytes에서의 CARP의 과발현은 cardiac gene들의 발현을 억제시켜 transcriptional co-repressor로도 작용할 것으로 예상되고 있다(21). 또한 CARP는 cytoplasm과 nucleus를 오가며 myopalladin과 상호작용하여 sarcomere와 전사조절을 연결시키는 역할을 할 것으로도 예측되고 있다(4). 최근 연구에 의하면 CARP는 vascular smooth muscle cells에서 TGF- β 의 target

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-31-8005-3194, Fax: 82-31-8005-3191
E-mail: jonghoe@dankook.ac.kr

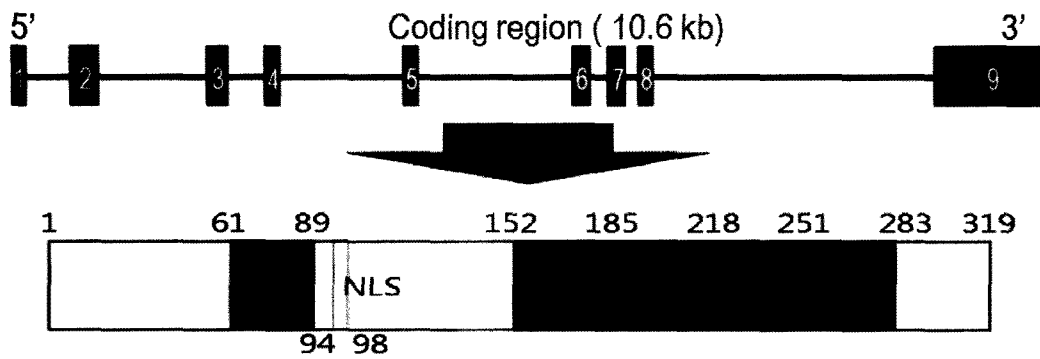


Fig. 1. Gene and protein organization of CARP. Coding region on human chromosome 10 is drawn schematically. Four ankyrin repeat domains (ANK) together with coiled coil (CC) and nuclear localization signal (NLS) are shown.

gene임이 밝혀졌고(12), Smad3에 의해 up-regulation되며, wound healing 동안에 발현량의 증가가 약 2주일간 유지됨을 확인하였다(19). 또한 CARP는 malignant tumor에서 rhabdomyosarcoma의 specific marker가 될 수 있다는 가능성이 제시되었다. 그러나, 이런 CARP의 다양한 역할 및 혈관신생에 관련된 기능들에도 불구하고, 아직까지 CARP의 발현이 혈관내피세포에서 갖는 영향에 대해서는 자세히 조사되지 못하였다. 이에 본 연구에서는 아데노바이러스 벡터를 이용하여 CARP 유전자를 혈관내피세포에 전달하여 과발현시킴으로써 혈관내피세포의 혈관신생에 관련된 기능들에 어떤 변화가 있는지를 조사해보았다. 그 결과 CARP가 혈관내피세포의 증식 및 혈관신생기능을 증가시켰고, 혈관신생에 관련된 유전자의 발현도 유도되어, CARP가 허혈성 질환의 치료에 유용한 유전자가 될 수 있음을 제시하여 준다.

재료 및 방법

동물세포배양

모든 세포는 가슴된 동물세포 배양기에서 5% CO₂, 37°C 조건 하에서 배양하였다. HEK293 세포주는 10% (v/v) 우태아 혈청 (FBS, Gibco BRL, Invitrogen, USA)과 1% antibiotics solution (Wellgene, Korea)을 포함한 DMEM (Gibco BRL, Invitrogen, USA) 배지에서 배양하였고, human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)은 EBM-2 배지(Clonetics, USA)에 EGM-2 Mv growth factor supplement를 포함한 배지에서 배양하였다.

Human CARP cDNA의 클로닝

배양된 HUVEC 세포들을 Trizol (Invitrogen, USA)을 이용하여 total RNA를 isolation하였다. 얻어진 total RNA 2 µg을 10 pmole의 oligo dT (18 mer)와 10 mM의 dNTP mix와 섞은 후 M-MLV Reverse Transcriptase (Finezymes, Finland)를 이용하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 75°C에서 5분 동안 가열하여 역전사 효소의 활성을 억제시켰다. 이렇게 확보한 cDNA를 template로 하여 Ex Taq polymerase (TaKaRa, Japan)를 이용하여 PCR 증폭을 XP cyclor (Bioer, China)를 이용하여 수행하였다(Table 1). 얻어진 PCR product를 agarose gel 상에서 전기영동하여 분리한 후(TaKaRa Power gel extraction kit, TaKaRa, Japan), pGEM-T-Easy vector (Promega, USA)에 4°C, 16시간 incubation하여 ligation하였고, 클로닝된 유전자는 염기서열을 분석하여 진위 여부를 확인하였다.

재조합 아데노바이러스의 생산

재조합 아데노바이러스를 제조하기 위하여 pGEM-T-Easy-hCARP를 *NorI* (Roche, Germany)으로 절단한 뒤 pShuttle-CMV vector 안으로 subcloning하였다. 얻어진 constructs는 *ApaI*, *BglIII*, *HindIII*로 절단하여 방향성을 확인 후, pSC-hCARP로 명명하였다. pSC-hCARP와 아데노바이러스 backbone (ΔE1/E3)인 pAdEzsy-1을 homologous recombination 시키기 위해 homologous recombination repair 기작이 없는 *E. coli* strain 중 하나인 BJ5183 (recA-)에 electroporation을 가해 co-transformation하였다. 이때의 조건은 2,500 volt, 25 µF의 capacitance, 200 Ω의 resistance로 2

Table 1. Human CARP primers and schematics of PCR conditions

Primer	Forward	5'-ATAAGAATGCGGCCGCATGATGGTACTGAAAG-3'
	Reverse	5'-GCTCTAGATCAGAATGTAGCTAT-3'
PCR condition		

mm cuvette를 이용하였다.

pSC-hCARP를 *PacI* 제한효소로 digestion하여 linearization한 후, 1 µg을 calcium phosphate transfection reagent (Promega, USA)로 HEK293 cell이 70% confluence로 존재하는 100 mm dish에 fresh media로 갈아준 후 transfection하였고, 이를 37°C 5% CO₂ 조건에서 5시간 배양 후 정상 배양 배지로 교체하였다. 약 5일이 지난 후 cytopathic effect가 보이기 시작할 때, 세포 및 배지를 dry ice로 cooling한 absolute ethanol과 37°C water bath를 이용하여 freezing/thawing을 3회 반복하여 cell안에 남아있는 바이러스들도 모두 빠져나오도록 만들어준 후, clinical centrifuge에서 4°C, 200×g로 15분간 centrifuge하여 debris를 제외한 Ad-hCARP 바이러스액을 얻었다. Ad-LacZ 바이러스도 동일한 과정을 거쳐 확보하였다.

재조합 아데노바이러스의 정제 및 역가 결정

Crude viral solution은 Vivapure AdenoPACK (Sartorius, Germany)를 이용하여 Ad-LacZ와 Ad-hCARP를 순수하게 정제하였다. 얻어진 Ad-LacZ와 Ad-hCARP의 역가(titer)는 96-well plate를 이용한 Tissue Culture Infectious Dose 50 (TCID₅₀)를 통해 측정하였다. MEM media (2% FBS [v/v], 1% antibiotics 포함)를 사용하여 1×10⁴ cell/100 µl로 cell을 split하고, 1일이 지난 후 cell이 adhesion된 후 virus를 10⁶에서 10¹³까지 희석하여 감염시키고, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 10일간 배양하여 TCID₅₀ titer를 측정하였다.

세포증식 분석

HUVEC을 gelatin-coated 96-well plate에 5×10³ cell/well (n=8)로 24시간동안 배양 후, 0.5% (v/v) FBS containing media로 starvation을 16시간 동안 진행한다. Starvation된 세포에 Mock (PBS), Ad-LacZ, Ad-hCARP virus를 50, 100, 200 MOI로 infection하여 24시간 후 Premix WST-1 solution (TaKaRa, Japan)을 10:1의 비율로 첨가하여 415 nm파장에서 30분 간격으로 측정하여 세포증식 결과를 산출하였다.

Capillary Tube-Like Structure 형성 정도의 분석

HUVEC을 gelatin-coated dish (60 mm)에 1×10⁵ cells/well로 24시간 배양 후 Mock, Ad-LacZ, Ad-hCARP virus를 50 MOI로 24시간동안 infection시켰다. Pre-cooled 96 well plate에 well당

50 µl의 Matrigel (BD bioscience, USA)을 넣어주고 30분 동안 37°C에서 굳힌 후 pre-infected cell을 trypsinization하여 3×10³ cells/well (n=8)을 배양하며 0시간부터 1시간 간격으로 사진을 촬영하였다. 이후 tubule이 형성된 HUVEC의 선의 수를 꼭지점의 수로 나누어 data를 산출하였다(수치가 1에 가까울수록 완벽한 tubule을 형성했음을 의미함).

감염된 HUVEC에서의 RNA 분석

Gelatin-coated dish (60 mm)에 1×10⁵ cells를 plating하여 24시간 배양 후, Mock, Ad-LacZ, Ad-hCARP virus를 50 MOI로 24시간동안 infection 시켰다. Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 total RNA를 isolation하여 각각 2 µg을 10 pmole의 18 mer의 Oligo dT와 10 mM의 dNTP mix, MuMLV reverse transcriptase (Finezymes, Finland)를 이용하여 37°C 1시간 incubation하여 reverse transcription 후 75°C 5분 동안 heat inactivation하고, 확보한 각각의 cDNA로 NeoTherm Taq polymerase를 이용하여 PCR을 수행하였다. VEGF mRNA 분석을 위한 primer는 각각 5'-AGACCCTGGTGGACATCTTC-3'와 5'-TGCAITTCACATTTGTGTGTC-3'로서 이들은 VEGF의 exon 3번과 4번을 검출할 수 있다. 오차보정을 위한 GAPDH primer로는 5'-TGACATCAAGAAGGTGGTGA-3'와 5'-TCCACCACCTGTGCTGTA-3'를 사용하였다.

통계 분석

각각의 실험군들은 Student's *t*-test (paired)를 이용하여 대조군 (PBS control 및 Ad-LacZ)과 비교하였다. P value가 0.05보다 작을 경우 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 간주하였다.

결 과

Human CARP 유전자를 함유한 재조합 아데노바이러스의 제조

본 연구에서는 인체 혈관내피세포(HUVEC)에서 total RNA를 추출하여 RT-PCR 과정을 통해 human CARP (hCARP) 유전자를 클로닝하였는데, 염기서열 분석을 통해 얻어진 아미노산 서열이 기존에 NCBI에 보고된 아미노산 서열과 완벽하게 일치하였다(Fig. 2). 이는 NIH3T3에서 얻은 murine CARP 서열이 NCBI 아미노산 서열과 차이가 있었던 기존의 결과(A920G로 인한

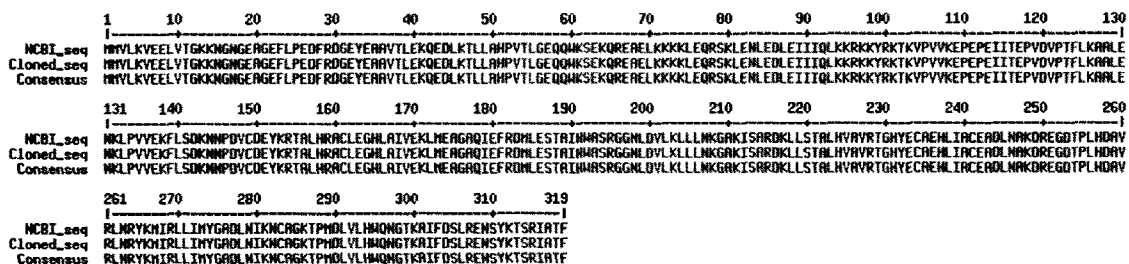


Fig. 2. Amino acid sequence of the human CARP cDNA isolated from HUVEC. The deduced amino acid sequence was aligned with the NCBI sequence using the multiple sequence alignment software (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>) by Florence Corpet (7)

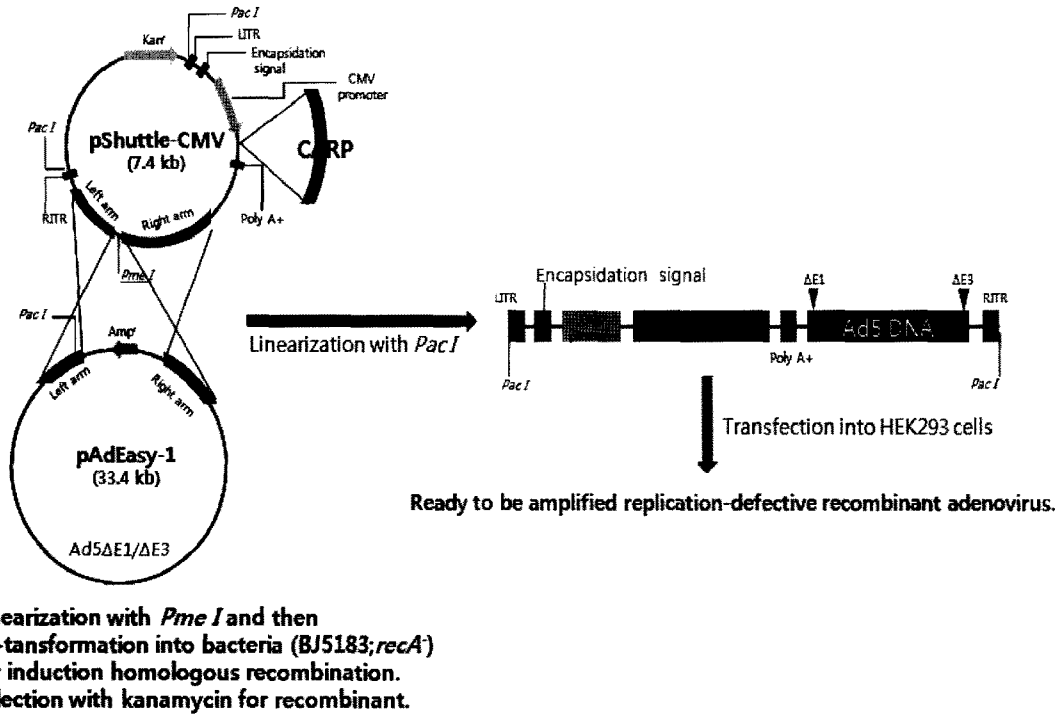


Fig. 3. Generation of recombinant adenovirus harboring human CARP cDNA. Homologous recombination is carried out in *recA*-deficient bacteria and the resulting recombinant DNA is cut with *PacI*. Then the resulting linearized DNA is transfected into HEK293 cells for production of the adenovirus harboring human CARP.

E286K)와 대비되는 결과로서, hCARP 유전자가 성공적으로 클로닝 되었음을 보여준다. 이렇게 확보한 hCARP를 효과적으로 세포에 전달할 수 있는 벡터로서 아데노바이러스 벡터를 선정하였고, 재조합 아데노바이러스 생산을 용이하게 하기 위해 *recA*가 없는 BJ5183 대장균에서 아데노바이러스 유전자(E1과 E3 부위가 결손된 adenovirus type 5 genome을 갖는 pAd-Easy1)와 hCARP 유전자가 포함된 shuttle vector (pShuttle-CMV-hCARP)를 같이 형질전환 시켜 homologous recombination을 유도하였다 (Fig. 3). 그 결과 left arm과 right arm 부위에서 성공적으로

homologous recombination이 일어나 hCARP를 함유하게 된 recombinant adenovirus DNA가 얻어졌고, 이를 *PacI* 제한효소로 linearize 시킨 뒤 HEK293 세포주(human embryonic kidney cell line으로서 sheared adenovirus type 5 DNA가 들어가 있음)에 transfection시켜 Ad-hCARP 바이러스를 확보하였다. 이렇게 하여 얻어진 Ad-hCARP를 Vivapure AdenoPACK을 이용하여 정제한 뒤의 역가는 TCID₅₀ 측정법으로 2.5×10¹¹ pfu/ml이었다. Ad-LacZ도 동일한 방법으로 제조하여 그 역가가 2.5×10⁹ pfu/ml 이었다.

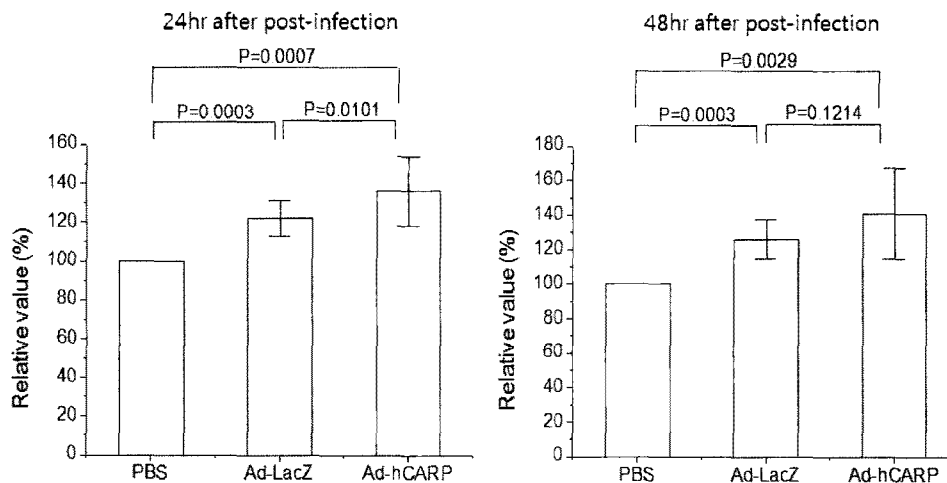


Fig. 4. Comparison of endothelial cell proliferation at 24 hr and 48 hr after infection. HUVECs were infected with the indicated recombinant adenovirus at 50 multiplicity of infection (MOI). The value was normalized against PBS control. Values are Mean±SEM (n=8).

Human CARP 유전자 전달에 따른 혈관내피세포의 증식 촉진

혈관 신생이 일어나기 위해서는 혈관내피세포의 증식이 필수적이므로, CARP 유전자 전달에 따른 혈관내피세포의 증식이 촉진되었는지를 WST-1 분석을 통해 조사하였다. 이를 위해 0.5% (v/v) FBS를 함유한 starvation 배지에서 HUVEC을 16시간 동안 배양한 후, Mock (PBS), Ad-LacZ, Ad-hCARP virus를 infection 하여 24시간 후 세포증식 결과를 산출하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이, Ad-hCARP virus를 처리한 군에서 가장 높은 세포증식을 관찰할 수 있었으며, 이는 PBS나 Ad-LacZ군 모두에 대해 통계적으로 유의한 차이였다($P=0.0007$ & $P=0.0101$). 이런 결과는 Ad-hCARP가 혈관내피세포의 성장을 촉진시킬 수 있음을 반증하는 것이다. 그런데, Ad-LacZ군도 PBS군에 비해 통계적으로 유의한 증가가 있어($P=0.0003$), 아데노바이러스 감염 혹은 LacZ 유전자 전달에 따라 혈관내피세포의 증식이 촉진될 수도 있음을 보여주었다. 그러나, 같은 아데노바이러스 처리군에서 비교해 볼 때 (Ad-LacZ vs. Ad-hCARP), hCARP군이 Ad-LacZ 군에 비해 통계적으로 유의한 차이가 있었으므로, hCARP의 세포증식 효과는 분명하다고 할 수 있다. 아데노바이러스 감염 후 48시간에서도 거의 비슷한 결과가 얻어졌으며, MOI 증가(100 MOI & 200 MOI)에 따른 세포증식의 변화는 관찰되지 않았다(자료 미제시).

Capillary-like structure 형성의 비교 분석

세포 증식 외에도 혈관신생의 또 다른 측면으로 혈관내피세포가 모세관 모양의 구조를 얼마나 잘 형성하는가를 조사할 수 있

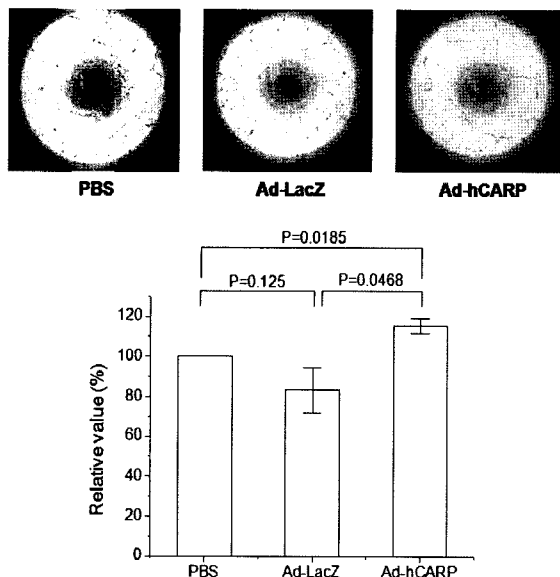


Fig. 5. Comparison of capillary-like structure formation. HUVECs were seeded onto 96 well plate precoated with Matrigel and then infected with the indicated adenovirus at 50 multiplicity of infection for 24 hr. Top panel: representative photographs of the infected HUVECs at 7 hr are shown. Magnification (16 \times). Bottom panel: quantification of capillary-like structure is shown in graph. Values are Mean \pm SEM (n=3).

다. 이를 위해 혈관내피세포가 tubule 구조를 형성할 수 있는 Matrigel 위에서 모세관 구조 형성을 비교분석하였다. Figure 5에서 보는 바와 같이 capillary-like structure 형성 정도는 Ad-hCARP 군에서 가장 높게 나타났는데, PBS군이나 Ad-LacZ군 모두에 대해 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P=0.0185$ & $P=0.0468$). 이는 Matrigel에 상에 각각의 recombinant adenovirus로 감염된 HUVEC을 키우기 시작한지 7시간째에서의 결과로서, capillary-like structure를 형성한 HUVEC의 선의 수를 꼭짓점으로 나눈 값을, PBS control을 100%로 하여 normalization한 결과이다(n=3). 또한 형성된 capillary-like structure들의 안정성 및 형태 유지 여부를 60시간이 지난 후 비교하여 보았을 때, 그 형태가 대부분 사라진 PBS군이나 Ad-LacZ군에 비해 Ad-hCARP군이 capillary-like structure들의 형태를 잘 유지함을 확인할 수 있었다(자료 미제시). 이런 결과는 CARP 유전자가 모세관을 잘 만들 뿐 아니라, 그 형태를 유지하는데 있어서도 중요함을 제시하여 준다. 한 가지 흥미로운 점은 Ad-LacZ군의 수치가 PBS군에 비해 작다는 것으로, 세포 증식 효과에서의 경향과는 반대되는 결과처럼 보인다. 그러나 이 차이는 통계적으로 유의하지 않았다($P=0.125$).

혈관내피세포에서의 혈관신생관련 유전자 분석

다음으로, CARP가 전사인자로서 혈관신생에 관련된 유전자들의 발현을 증가시킬 수 있는지의 여부를 조사하였다. 이를 위해 대표적 혈관신생 유전자인 vascular endothelial growth factor (VEGF) gene의 발현을 total RNA를 추출하여 quantitative real-time RT-PCR로 비교 분석하였다. VEGF의 exon 3번과 4번을 검출하여 분석하였고, 오차 보정을 위해 GAPDH를 internal standard로 같이 사용하였다. 그 결과 Fig. 6에서 보는 바와 같이 Ad-hCARP에서 가장 높은 VEGF 발현을 확인할 수 있었다. 이

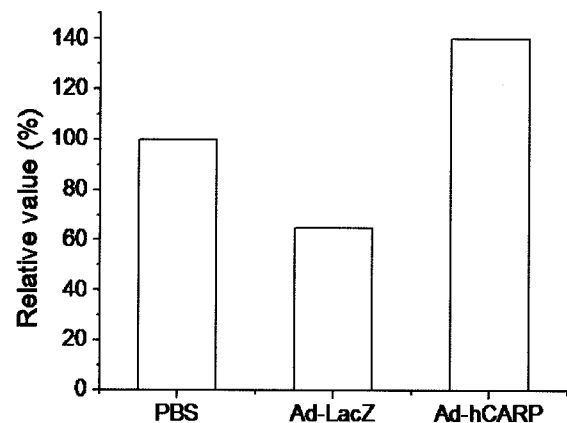


Fig. 6. Comparison of VEGF mRNA level after gene transfer. The total RNA was extracted from the HUVEC 24 hr post-infection and subjected to real-time RT-PCR analysis using CYBR green I and Rotor-Gene 6000 rotary analyzer (Corbett). The y-axis represents relative value (%) against PBS control. The VEGF primers (Table 2) detects the exons 3 and 4 and thus can detect all forms of VEGF isoforms.

는 CARP가 혈관내피세포에서 효율적으로 VEGF 유전자 발현을 유도하였음을 반증한다. 한편, Ad-LacZ에서의 VEGF mRNA 양이 PBS에서 보다 낮게 측정된 것은 Fig. 5의 capillary-like structure 형성 결과와 일치한다.

고 찰

본 연구에서는 전사인자로 추정되는 CARP 유전자를 이용한 혈관신생 치료법 개발의 가능성을 조사하기 위해 혈관내피세포를 대상으로 아데노바이러스를 이용한 human CARP 유전자 전달 실험을 수행하였다. Ad-hCARP를 제작하여 HUVEC에서의 혈관신생 능력의 향상을 조사하였는데, Ad-hCARP 군에서 HUVEC의 proliferation과 capillary tubule의 형성이 대조군에 비해 증가하였음을 확인할 수 있었다. 또한 CARP의 도입으로 인하여 어떠한 혈관생성인자들의 발현이 mRNA level에서 변하는지를 real time RT-PCR로 조사하여 본 결과, 대표적인 혈관신생인자인 VEGF의 발현이 증가함을 확인할 수 있었다. 그간 CARP에 대해 산발적으로 여러 연구가 있어 왔지만, 혈관신생을 촉진시킬 수 있는 지에 대한 연구는 미미하였다. 특히, 혈관내피세포를 대상으로 CARP를 과량 발현시켜 그 효과를 조사한 연구는 아직 없기에, 본 연구가 갖는 의미가 크다고 할 수 있다.

CARP는 4개의 ankyrin repeat domain을 갖고 있는데, 이는 IκB family에서 많이 연구된 바 있다(20). IκB의 ankyrin repeats는 NFκB와 직접 결합하여 그 기능을 억제하는 것이 알려져 있으므로, CARP가 binding하여 억제자로서의 기능을 담당할 수 있는 전사인자 및 단백질들에 대한 연구도 앞으로 행해져야 할 것이다. 이와 관련하여 CARP의 발현을 유도할 수 있는 물질들로는 TGF-β와 activin A가 알려져 있는데(8, 12), activin A가 혈관내 병변을 억제할 수 있는 것으로 알려진 바(9), CARP가 죽상경화과정을 억제시킬 수 있는 직접적 인자일 가능성에 대한 연구도 앞으로 더 필요할 것이다.

1990년대 초부터 angiogenic factor나 그 유전자를 허혈부위에 투여하여 우회 혈관, 즉 측부혈관의 형성을 증진시키고자하는 혈관신생 치료법이 많이 연구되어 왔다(3, 10, 11, 13-15, 18). 측부혈관의 형성은 넓은 의미에서 혈관신생(angiogenesis)의 한 형태인 바, 기존 혈관에서 새로이 모세혈관(capillary)이 만들어지는 것을 뜻하고, 실제로 angiogenic factor를 투여하여 혈관신생을 유도할 수 있다. 그러나, VEGF 등을 이용한 임상시험 결과에 의하면 새로이 형성되는 혈관은 모세혈관 내지는 매우 가느다란 세동맥 수준에 지나지 않아 개선된 치료전략의 개발이 요구되는 실정이다. 실제로 허혈 부위에서의 혈류의 개선 효과는 모세혈관보다는 굵은 혈관이 훨씬 큰 바, 대다수 허혈증상을 개선시키기 위해서는 세동맥 이상의 굵은 혈관을 만드는 동맥형성 과정(arteriogenesis)이 촉진되어야 한다. 이런 맥락에서 전사인자로 작용하여 여러 혈관신생 관련 유전자들의 발현을 촉진시켜 혈관내피세포의 증식과 혈관형성을 촉진시킬 수 있는 CARP의 잠재적 가능성이 크다고 할 수 있고, 허혈성 질환의 새로운 치료대안으로서 그 연구의 가치가 충분히 있다고 사료된다. 향후 허혈허

동물모델 등의 허혈조직을 대상으로 보다 더 체계적인 연구가 진행되면 많은 수의 허혈성 질환 환자들, 특히 기존 치료법으로 치료할 수 없는 환자들에게 새로운 치료희망을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

감사의 말

이 논문은 2007년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2007-331-E00071). 본 연구의 일부는 한국과학재단의 바이오연구개발사업에서 지원받아 수행되었음(M10534040001-08N3404-00110).

참고문헌

1. 박정의. 2006. 죽상경화증의 병태생리. *HANYANG MEDICAL REVIEWS* 26, 4-10.
2. Aihara, Y., M. Kurabayashi, Y. Saito, Y. Ohyama, T. Tanaka, S. Takeda, K. Tomaru, K. Sekiguchi, M. Arai, T. Nakamura, and R. Nagai. 2000. Cardiac ankyrin repeat protein is a novel marker of cardiac hypertrophy: role of M-CAT element within the promoter. *Hypertension* 36, 48-53.
3. Banai, S., M.T. Jaklitsch, M. Shou, D.F. Lazarous, M. Scheinowitz, S. Biro, S.E. Epstein, and E.F. Unger. 1994. Angiogenic-induced enhancement of collateral blood flow to ischemic myocardium by vascular endothelial growth factor in dogs. *Circulation* 89, 2183-2189.
4. Bang, M.L., R.E. Mudry, A.S. McElhinny, K. Trombitas, A.J. Geach, R. Yamasaki, H. Sorimachi, H. Granzier, C.C. Grogorio, and S. Labeit. 2001. Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J. Cell Biol.* 153, 413-427.
5. Baumeister, A., S. Arber, and P. Caroni. 1997. Accumulation of muscle ankyrin repeat protein transcript reveals local activation of primary myotube endcompartments during muscle morphogenesis. *J. Cell Biol.* 139, 1231-1242.
6. Chu, W., D.K. Burns, R.A. Swerlick, and D.H. Presky. 1995. Identification and characterization of a novel cytokine-inducible nuclear protein from human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 10236-10245.
7. Corpet, F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res.* 16, 10881-10890.
8. De Waard, V., T.A. Van Achterberg, N.J. Beauchamp, H. Pannekoek, and C.J. De Vries. 2003. Cardiac Ankyrin Repeat Protein (CARP) expression in human and murine atherosclerotic lesion: activin induces CARP in smooth muscle cells. *Arterioscler Tromb. Vasc. Biol.* 23, 64-68.
9. Engelse, M.A., J.H. Lardenoye, J.M. Neele, J.M. Grimbergen, M.R. De Vries, M.L. Lamfers, H. Pannekoek, P.H. Quax, and C.J. De Vries. 2002. Adenoviral activin A expression prevents intimal hyperplasia in human and murine blood vessels by maintaining the contractile smooth muscle cell phenotype. *Circ. Res.* 90, 1128-1134.
10. Heilmann, C.A., T. Attmann, A. Thiem, E. Haffner, F. Beyersdorf, and G. Lutter. 2003. Gene therapy in cardiac surgery: intramyocardial injection of naked plasmid DNA for chronic myocardial ischemia. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 24, 785-793.

11. Isner, J.M., P.R. Vale, J.F. Symes, and D.W. Losordo. 2001. Assessment of risks associated with cardiovascular gene therapy in human subjects. *Circ. Res.* 89, 389-400.
12. Kanai, H., T. Tanaka, Y. Ailara, S. Takeda, M. Miyazono, R. Nagai, and M. Kurabayashi. 2001. Transforming growth factor-beta/Smads signaling induces transcription of the cell type restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 88, 30-36.
13. Kim, H.J., S.Y. Jang, J.I. Park, J. Byun, D.I. Kim, Y.S. Do, J.M. Kim, S. Kim, B.M. Kim, W.B. Kim, and D.K. Kim. 2004. Vascular endothelial growth factor-induced angiogenic gene therapy in patients with peripheral artery disease. *Exp. Mol. Med.* 36, 336-344.
14. Lazarous, D.F., M. Shou, M. Scheinowitz, E. Hodge, V. Thirumurti, A.N. Kitsiou, J.A. Stiber, A.D. Lobo, S. Hunsberger, E. Guetta, S.E. Epstein, and E.F. Unger. 1996. Comparative effects of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor on coronary collateral development and the arterial response to injury. *Circulation* 94, 1074-1082.
15. Lee, Y.S., H.S. Jang, J.M. Kim, J.S. Lee, J.Y. Lee, K.L. Kim, I.S. Shin, W. Suh, J.H. Choi, E.S. Jeon, J. Byun, and D.K. Kim. 2005. Adenoviral-mediated delivery of early growth response factor-1 gene increases tissue perfusion in a murine model of hindlimb ischemia. *Mol. Ther.* 12, 328-336.
16. Libby, P. 2003. Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art. *Am. J. Cardiol.* 91, 3A-6A.
17. Miller, M.K., M.L. Bang, C.C. Witt, D. Labeit, C. Trombitas, K. Watanabe, H. Granzier, A.S. McElhinny, C.C. Gregorio, and S. Labeit. 2003. The muscle ankyrin repeat proteins: CARP, ankrd2/Arpp and DARP as a family of titin filament-based stress response molecules. *J. Mol. Biol.* 333, 951-964.
18. Ruel, M. and F.W. Sellke. 2003. Angiogenic protein therapy. *Semin. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 15, 222-235.
19. Shi, Y., B. Reitmaier, J. Regenbogen, R.M. Slowey, S.R. Opalenik, E. Wolf, A. Goppelt, and J.M. Davidson. 2005. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is up-regulated during wound healing and induces angiogenesis in experimental granulation tissue. *Am. J. Pathol.* 166, 303-312.
20. Simeonidis, S., D. Stauber, G. Chen, W.A. Hendrickson, and D. Thanos. 1999. Mechanisms by which IkappaB proteins control NF-kappaB activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96, 49-54.
21. Zolk, O., M. Marx, E. Jckel, A. El-Armouche, and T. Eschenhagen. 2003. Beta adrenergic stimulation induces cardiac ankyrin repeat protein expression: involvement of protein kinase A and calmodulin-dependent kinase. *Cardiovasc. Res.* 59, 563-572.
22. Zou, Y., S. Evans, J. Chen, H.C. Kuo, R.P. Harvey, and K.R. Chien. 1997. CARP, a cardiac ankyrin repeat protein, is downstream in the Nkx2-5 homeobox gene pathway. *Development.* 124, 793-804.

(Received November 11, 2008/Accepted November 13, 2008)

ABSTRACT : Angiogenic Effect of Cardiac Ankyrin Repeat Protein Overexpression in Vascular Endothelial Cell

Hoon Young Kong and Jonghoe Byun* (Department of Molecular Biology, BK21 Graduate Program for RNA Biology, Institute of Nanosensor and Biotechnology, Dankook University, Yongin 448-701, Republic of Korea)

Tissue ischemia resulting from the constriction or obstruction of blood vessels leads to an illness that may affect many organs including the heart, brain, and legs. In recent years, considerable progress has been made in the field of therapeutic angiogenesis and the new approaches are expected to cure those "no-option patients" who are unsuited to conventional therapies. Although single angiogenic growth factor may be successful in inducing angiogenesis, combination of multiple growth factors is increasingly sought these days to augment the therapeutic responses. This trend is proper in light of the fact that blood vessel formation is a complex and multi-step process that requires the actions of many different factors. To meet the growing need for functionally significant blood flow recovery in the ischemic tissues, a novel strategy that can provide concerted actions of multiple factors is required. One way to achieve such a goal is to use a transcription factor that can orchestrate the expression of multiple target genes in the ischemic region and thus induce significant level of angiogenesis. Here, a putative transcription factor, cardiac ankyrin repeat protein (CARP), was evaluated in adenoviral vector context for angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells. The results indicated significant increase in proliferation, capillary-like structure formation, and induction of vascular endothelial growth factor, a typical angiogenic gene. Taken together, these results suggest that CARP represents itself as a novel target for therapeutic angiogenesis and warrants further investigation.