

발생초기단계 혈관형성에 관련된 Egr-1 결합단백질의 검색과 그 작용에 관한 연구

부산대학교 자연과학대학 분자생물학과, ¹서울대학교 약학대학 약학과 종합약학연구소

배명호 · 배문경¹ · 정주원¹ · 김세희¹
정철호¹ · 배수경 · 김규원¹

Identification and Functional Analysis of Egr-1-interacting Proteins Involved in Vasculogenesis During Early Stage of Development

Myung-Ho Bae, Moon-Kyoung Bae¹, Joo-Won Jeong¹, Se-Hee Kim¹,
Chul-Ho Jeong¹, Soo-Kyung Bae and Kyu-Won Kim¹

Department of Molecular Biology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

*¹Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy,
Seoul National University, Seoul 152-742, Korea*

Egr-1 is a zinc finger transcription factor and one of immediate early response genes. Egr-1 is upregulated in response to a wide variety of mitogenic and nonmitogenic stimuli, including peptide growth factors, shear stress, urea, hypotonicity and hypoxia. To identify novel Egr-1 interacting protein, we performed yeast two-hybrid screening using Egr-1 baits. In this study, we identified that proteasome subunit α type 3 (PSMA3) and protein inhibitor of activated STAT protein (PIASy) interacts specifically with Egr-1 protein by yeast two-hybrid screening. In addition, we found that the stability of Egr-1 was increased under hypoxic condition. These results suggested the importance of O₂ tension in the degradation processes of Egr-1.

Key Words: Egr-1, Two-hybrid, Proteasome subunit α type 3, Protein inhibitor of activated STAT protein γ , Hypoxia

서 론

인체조직을 구성하고 있는 모든 세포들의 생존은 혈관에 의한 산소와 영양분의 공급 및 대사산물의 배출이 필수적으로 요구된다. 따라서 인체의 각 조직에는 혈관의 미세 그물망이 존재하며, 그

총길이는 ~10만 km에 달할 정도로 체내 구석구석에 도달하고 있다. 혈관과 인체 조직세포의 관계는 배자(embryo)와 태아(fetus)를 거쳐 신생아, 성인, 노화에 이르는 전 생애에 걸쳐 뗄 수 없는 불가분의 관계를 가지고 있다.

배발생과정에서 혈관의 발달은 기관의 형태 및

책임저자 : 김규원, ☎ 151-742, 서울시 관악구 신림 9동 산 56-1, 서울대학교 약학대학 약학과

Tel: 02-880-6988, Fax: 02-872-1795, E-mail: qwonkim@plaza.snu.ac.kr

접수일 : 2002년 5월 17일, 게재승인일 : 2002년 6월 14일

분화유지에 매우 중요한 역할을 하고 있으며, 혈관내피세포는 발생과정에서 위치에 따라 그 기원이 다르며 기능 또한 조금씩 다르다. 특히, 장기 및 신체부위에 따라 혈관발생의 기원 및 양상이 매우 다르고 그 발생조절 또한 복잡하며 아직 기본적인 메카니즘조차 알려져 있지 않은 상태이다. 최근에서야 단편적으로 발생과정에서 혈관을 형성하면서 이에 관여된 유전자들의 연구가 행해지고 있다. 대표적인 예로 VEGF군과 그 수용체, 그리고 angiopoietin과 그 수용체인 Tie receptor와 같은 혈관계를 구축하는 유전자들이 밝혀졌으며 발생과정에서 발현위치, 발현단계가 밝혀졌다.^{1,2)} 또한 동맥과 정맥으로의 분화에 관여하는 유전자, ephrin-B2와 그 수용체인 Eph-B4도 최근에 보고되었다.³⁾ 이와 같이 혈관은 생체의 각 장기 및 부위에 따라 그 형태가 조금씩 다르고 특히 그 분화형태가 그 부위마다 차이가 있는 것으로 보고되어 있어, 혈관 각각은 기본적으로 공통된 분화기작을 가지고 있으며 동시에 혈관형성 부위에 따라 특수한 분화유전자들이 관여하고 있을 것으로 예상된다.

초기발생과정에서 혈관생성이 일어나는 과정은 두가지 다른 경로에 의해 일어난다고 알려져 있다. 하나는 혈관형성(vasculogenesis)으로서 혈관전구세포인 angioblast의 분열과 분화에 의해 혈관과 혈구세포들이 만들어지는 *de novo* 혈관생성과정이다.⁴⁾ 이 과정은 초기발생과정에서만 일어나며 초기 혈관망을 구성하는 역할을 하고 성인에서는 일어나지 않는다. 또다른 경로는 혈관신생으로서 혈관생성자극에 의해 기존의 혈관으로부터 발아가 일어나서 새로운 혈관이 생성되는 과정이다. 이 혈관신생은 발생과정에서 기관이 형성되고 조직이 성장하는 동안 매우 활발하게 일어나며 출생 후, 성인에 이르기까지 이 기전이 혈관생성을 담당한다.

이와 같이 암화과정과 초기발생과정에서 존재하는 혈관생성과정은 매우 중요한 단계임을 알 수 있다. 이러한 발생단계와 암화과정의 유사성은 세포의 지속적인 분열과 활발한 이동 등에 의해 특징적으로 나타나며, 이와 관련된 유전자들도 공통적으로 발현이 될 것으로 예상된다. 이와 관련해 많은 단백질들이 발생 및 발암과정에서 작

용하여 태생기 발생과 발암과정에 모두 관여하는 oncofetal 단백질로 보고되고 있다.⁵⁻⁷⁾ 이미 본 연구에서 사용된 IGF-II의 mRNA가 초기 발생단계 및 조직에 따라 달리 조절된다는 사실은 알려져 있다.⁸⁾ 따라서 암화과정뿐만 아니라 초기발생과정에서도 IGF-II가 혈관신생과정의 중요한 인자로 사용될 가능성이 있으며 이러한 IGF-II의 생물학적 활성조절기작은 암화과정과 발생과정을 동시에 이해하는데 도움을 줄 수 있을 것이다. 본 연구실에서는 이와 같은 사실에 초점을 맞추어 간암의 진행과정에서 IGF-II가 혈관신생을 유발하는 인자임을 새롭게 증명하였고,^{9,10)} 이러한 IGF-II가 hypoxia 상태에서 발현증가를 보임을 밝혀 내었다.⁹⁾ 또한 IGF-II 유전자의 촉진자 동정을 통하여 hypoxia 상태에서의 IGF-II의 발현증가가 Egr-1 전사인자에 기인한 사실임을 알 수 있었고, Egr-1 전사인자도 hypoxia 상태에서 그 발현이 급격히 증가함을 증명하였다.¹⁰⁾ 즉, Egr-1 전사인자는 간암 발생과정에서 산소의 양에 따른 혈관신생을 일으킬 수 있는 중요한 O₂ sensing factor임을 알 수 있다.

Egr-1은 zinc-finger의 DNA binding domain을 지니는 "immediate-early response protein"으로 많은 종류의 성장인자, cytokine, injurious stimuli (i.e., UV, heat shock, anisomycin, arsenite...) 등에 의해 급격한 발현증가를 보이는 단백질로서 NGFI-A, krox24, Zif268, Tis8 등의 다른 명칭으로도 알려져 있다.^{10,11)} 또한 많은 표적유전자(IGF-II, PDGF A&B, Myc, Nur77, bFGF, EGFR, Rb, cyclin D1, thymidine kinase, c-Ki-ras, TGF-β1, IGF1R...)의 촉진자에 결합하여 유전자 발현을 유도하게 된다. 이들 유전자의 촉진자에 결합한 Egr-1은 coactivator와 corepressor를 통한 기작으로 유전자의 전사를 조절하게 되는데, 대표적으로 CREB-binding protein (CBP), p300 등이 coactivator로서 Egr-1의 trans-activation을 유도하고, NGFI-A-binding protein (NAB) 1과 2가 Egr-1의 활성을 억제하는 인자로 알려져 있다.^{11,12)} 뿐만 아니라 최근의 보고에 의하면 Egr-1이 유도하는 hypoxia하에서의 신호전달 경로가 hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)과는 무관한 독립적인 과정이라는 사실¹³⁾로 보아 Egr-1이 유발하는 신호전달과정은 hypoxia가 유발하는 많

은 과정 중 중요한 또 하나의 줄기임을 시사하고 있다.

따라서 본 연구에서는 IGF-II 유전자의 촉진자에 결합하여 혈관신생을 유발하는 Egr-1 전사인자의 새로운 결합단백질을 동정하기 위해 yeast two-hybrid 스크리닝을 실시하였다. 뿐만 아니라 검색된 인자가 hypoxia 조건 하에서 어떠한 발현 변화를 보이는지를 Western blot analysis를 통해 살펴 봄으로써 혈관신생이 조절되는 근본적인 기전을 규명하고 혈관신생질환들의 예방 및 새로운 치료법의 개발에 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

1) Yeast two-hybrid 스크리닝

(1) **Bait construction:** Egr-1을 yeast two-hybrid screening에 bait로 이용하기 위하여 bait로 사용할 부위를 PCR로 증폭하고, 이를 pGEMT 벡터에 ligation한다. Ligation된 벡터를 EcoRI/BamHI으로 자르고, 나온 단편을 yeast GAL4 DNA binding domain을 가지는 pBHA 벡터에 ligation한다.

(2) **cDNA library 분리:** Screening에 필요한 cDNA library는 mouse 17-day embryo cDNA library (Clontech)로서 3.5×10^6 개의 independent colony를 함유하고 있다. 먼저 library titering과정을 통해 위의 independent colony의 숫자만큼 spreading을 하고, 이를 large scale DNA purification column을 이용하여 library를 분리하고자 한다. 분리된 library는 enzyme cutting (EcoRI/XhoI)을 통하여 확인하게 된다.

(3) **Yeast strain and yeast transformation:** Yeast strain은 GAL4 binding site에 의해 조절되는 lacZ reporter를 가지는 Yeast *Saccharomyces cerevisiae* HF7C [MAT α , ura3-52, his3-200, lys2-801, ade2-101, trp1-901, leu2-3112, gal4-542, gal80-538]와 SFY526를 two-library system에 사용하였다. Two-hybrid vector를 HF7C에 삽입하기 위하여 sequential transformation 방법을 이용하였다. YPD (2% pepton, 1% yeast extract, 2% glucose)에 yeast의 cell density가 OD=0.2되게 2~3시간 동안 30°C에서 배양한 후 cell을 모은다. 모은 cell을 증류수로 washing하고 1XTE/1XLiAc에 resuspension한다. 이

렇게 준비된 competent cell에 pGBT9-AD2와 hering sperm carrier DNA, pACT2 mouse embryo 17 day library, PEG/LiAc를 섞어 30°C에서 30분간 배양한다. 10% DMSO를 첨가하여 42°C, 15분간 heat shock을 한 후 ice 상에서 1~2분 배양하여 다시 cell을 모아서 증류수나 TE에 resuspension하여 histidine, Leucin, Tryptophan이 결핍된 SD plate (6.7% nitrogen base, 2% glucose, 선택된 아미노산)에 spreading하여 30°C에서 3일간 배양시킨다.

(4) **β -galactosidase assay:** Plate에서 자란 yeast transformants를 nitrocellulose filter membrane에 transfer하여 이 filter를 액체질소에 10분간 담근다. 이 filter를 5-bromo-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (0.32 mg/ml) (X-gal)를 함유하는 Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaHPO₄, 10 mM MgCl₂, 50 mM KCl)에 적셔 놓은 3 MM paper에 올려 30°C 또는 상온에서 방치시킨다. 1~2시간 내에 파란색으로 변하는 colony를 선택한다.

(5) **Recovery of pACT2-mouse embryo 17 cDNA clones:** β -galactosidase 활성을 띠는 transformants를 pGBTAD2를 제거하기 위해 leucine이 결핍된 SD 액체배지에 넣어 30°C, 16시간 이상 배양시킨다. 이렇게 배양된 yeast를 모아서 lysis buffer에 resuspension시키고, 동량의 phenol/chloroform 및 1/3의 glass bead를 첨가하여 vortex하여 yeast cell을 파쇄시킨다. 상층액에 100% 에탄올을 첨가하여 yeast DNA를 precipitation하여 E.coli에 electro- poration시킨다.

(6) **E-coli electroporation:** 먼저 screening을 통하여 histidine growth 및 β -galactosidase 활성을 보인 yeast DNA를 desalting solution (100 mM glucose · 1% agarose)에 5 μ l loading 한다. Loading된 DNA를 ice에서 1시간 30분 동안 반응시켜 salt를 없앤다. 이후 미리 제작한 electroporation cell 40 μ l와 DNA를 섞는다. 이 mixture를 electroporation 용 cuvette에 넣은 뒤, electroporation에서 2.5 V의 pulse를 10초 동안 주게 된다. 이 반응물에 1 ml의 LB media를 넣고 1시간 동안 37°C에서 re-generation 시켜준 뒤 LB-Ampicillin plate에 spreading한다.

2) Automatic DNA sequencing

β -galactosidase를 통해 푸르게 변한 colony의 염기서열 결정을 위해 ABI 377 automatic DNA sequencer를 이용한다. 먼저 terminator ready mix (Perkin Elmer)와 template, primer를 섞고, PCR (96°C 10초, 50°C 5초, 60°C 4분) 25 cycle을 실시한다. 이후 ethanol precipitation을 통해 sample을 purify하고, loading buffer (formamide; 25 mM EDTA)와 섞어 2 μ l 정도 loading한다. 7시간 running시킨 후에 염기서열을 분석한다.

3) HepG2 세포의 배양

KIST cell bank에서 구입한 human hepatocellular carcinoma (HepG2) cell를 사용한다. HepG2 cell은 10% fetal bovine serum (FBS) 을 첨가한 minimum essential medium (MEM)에 1% Penicillin-Streptomycin (P-S)을 첨가한 배지에서 단층 배양되며, 2일에서 3일에 한번씩 trypsinization으로 subculture하여 유지하고 세포배양 환경은 37°C 포화 습도로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 시행된다.

4) 이중 가스 주입 배양기를 이용한 hypoxia 조건의 확립

N₂와 CO₂의 이중 가스 주입이 가능한 CO₂ incubator를 이용한다. 즉 N₂를 주입하여 배양기 내의 O₂의 농도를 적당하게 낮추면서 동시에 CO₂를 공급하여 세포를 배양하여 체내에서 생성되는 hypoxia 상태와 유사한 조건을 제공한다.

5) Western blot analysis

추출한 단백질 extract를 gel loading buffer에 녹여 3분간 boiling한 뒤 SDS-PAGE를 행한다. Gel로부터 NC filter로의 transfer는 transfer kit를 사용하고 transfer가 끝난 filter는 3% BSA가 들어 있는 PBS buffer로 하루 동안 blocking시킨 뒤 충분한 washing을 한다. 항원 항체 반응은 filter에 Egr-1에 대한 primary Ab를 적당량 (대략 1 : 1,000 정도) 첨가하여 상온에서 1~2시간 정도 반응을 진행시킨다. 이어 반응이 끝나면 washing을 한 후 secondary Ab를 처리하여 상온에서 1~2시간 동안 반응시킨다. PBST (PBS/0.1% Tween 20)으로 washing을 한 filter는 ECL 반응을 끝낸 뒤 X-ray film

에 감광하여 signal을 조사한다.

결 과

1) Egr-1 bait의 제작

Egr-1의 전체 domain 중 C-terminal 부위의 transcription activation domain을 중심으로 bait를 2가지 제작하였다(Fig. 1). 또한 yeast two-hybrid screening을 위하여 mouse embryo 및 human Hela cell cDNA library를 대량 분리하였고, 분리된 library를 bait의 파트너로 하여 screening을 실시하였다.

2) Yeast two-hybrid screening에 의한 결합단백질 검색

Bait와 library를 yeast strain HF7c에 co-transformation하고, 2차에 걸친 스크리닝을 통하여 여러 개의 클론이 검색되었다. β -galactosidase assay와 His growth test를 통한 1차 스크리닝 결과, 대략 100여 개의 클론이 검색되었고, 이어지는 2차 스크리닝을 통해 10여 개의 클론이 동정되기에 이르렀다. 이들은 다시 DNA sequencing으로 mouse proteasome subunit type-3 (PSMA3)과 human protein inhibitor of activated STATy (PIASy)인 것으로 판명되었고, 또 다른 yeast strain인 SFY526에 다시 transformation 하여 β -galactosidase assay를 해 본 결과 서로 특이적으로 결합함을 알 수 있었다 (Table 1, 2).

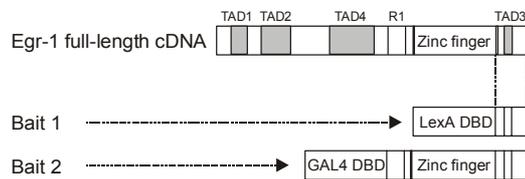


Fig. 1. PSMA3 binds the C-terminal region of Egr-1. Structures of Egr-1 proteins tested in yeast two-hybrid screening are shown. TAD, transactivation domain; DBD, DNA binding domain; R1, repression domain.

Table 1. Interaction of Egr-1 with PSMA3 assayed using the yeast two-hybrid system. Yeast strain SFY526 was co-transformed with combinations of indicated plasmids and interaction was evaluated by filter assays of β -galactosidase activity

Protein Fused to Gal4 domain		
DNA binding	Activation	Filter color
VA3	TD1	Blue
GBT9	PSMA3	White
GBT9	PIASy	White
Egr-1	PSMA3	Blue
Egr-1	PIASy	Blue

3) Hypoxia하에서 Egr-1의 발현 확인

Hypoxia 상태에서 혈관신생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 Egr-1의 발현을 Western blot analysis로 살펴보았다(Fig. 2). 그림에서 보는 바와 같이 normoxia와 같은 정상적인 상태에서 proteasome inhibitor인 LLnL을 처리하였을 경우, 현저한 Egr-1 단백질의 증가를 관찰할 수 있었다. 즉, normoxia 상태에서는 Egr-1 단백질의 분해가 활발히 일어나고 있음을 알 수 있다. 그러나 hypoxia에서는 LLnL의 작용이 미약한 것으로 보아, Egr-1 단백질의 분해작용이 hypoxia 상태에서는 현저히 감소함을 알 수 있었다.

Table 2. The property of positive Egr-1 interacting clones

A. PSMA3

>gi|13528948|gb|AAH05265.1|AAH05265 (BC005265) Similar to proteasome (prosome, maropain) subunit, alpha type, 3 [Homo sapiens], Length=248
Score=265 bits (677), Expect=6e-71
Identities=134/141 (95%), Positives=134/141 (95%)

```
Query: 1  MSSIGTGYDLSASTFSPDGRVFPVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVVFGVEKLVLSKLYE 60
          MSSIGTGYDLSASTFSPDGRVFPVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVVFGVEKLVLSKLYE
Sbjct: 1  MSSIGTGYDLSASTFSPDGRVFPVEYAMKAVENSSTAIGIRCKDGVVFGVEKLVLSKLYE 60

Query: 61  EGSNKRLFNVDHRHVGMAVAGLLADARSLADIAREEASNFRSNFGYNIPLKHLADRVA 120
          EGSNKRLFNVDHRHVGMAVAGLLADARSLADIAREEASNFRSNFGYNIPLKHLADRVA  V
Sbjct: 61  EGSNKRLFNVDHRHVGMAVAGLLADARSLADIAREEASNFRSNFGYNIPLKHLADRVA 120

Query: 121 HAYTLYS AVRPF GCRSXWGLQ 141
          HAYTLYS AVRPF G      G Q
Sbjct: 121 HAYTLYS AVRPF GCSVNDGAQ 141
```

B. PIASy

gi|3643111|gb|AAC36703.1|(AF077952) protein inhibitor of activated STAT protein PIASy [Homo sapiens], Length=510, Score=207 bits (527), Expect=2e-53
Identities=106/110 (96%), Positives=106/110 (96%)

```
Query: 1  MAAELVEAKNMVMSFRVSDLQMLLGFVGRSKSGLKHELVTALQLVQIDCSPFLFKKIKE 60
          MAAELVEAKNMVMSFRVSDLQMLLGFVGRSKSGLKHELVTALQLVQDCSPFLFKKIKE
Sbjct: 1  MAAELVEAKNMVMSFRVSDLQMLLGFVGRSKSGLKHELVTALQLVQDFCSPFLFKKIKE 60

Query: 61  LYETRYAKKNSEAPQSHRXLPLTMHSTYDRAGAVPRTPLAGPNIDXPV 110
          LYETRYAKKNSEAPQ HR LDPLTMHSTYDRAGAVPRTPLAGPNIDPV
Sbjct: 61  LYETRYAKKNSEAPQSHRPLDPLTMHSTYDRAGAVPRTPLAGPNIDYPV 110
```

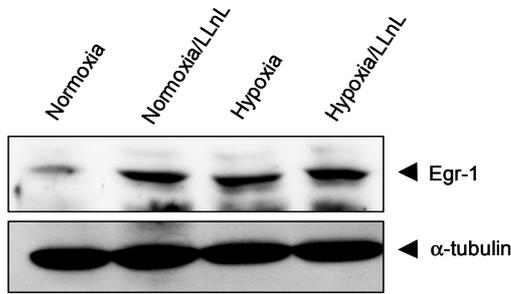


Fig. 2. Effects of proteasome-specific inhibitors on the levels of Egr-1 protein under hypoxic condition. HepG2 cells were treated with proteasome inhibitors, LLnL, for 4 h. The total proteins were analyzed by Western blotting with Egr-1 and α -tubulin antibodies, respectively.

고찰

인체조직을 구성하고 있는 모든 세포 내에서 작용하는 수많은 조절 단백질들은 기본적으로 상당히 불안정하다. 특히, 특정 신호에 의해 유도되는 전사인자의 경우, 표적유전자에 영향을 미칠 수 있는 정도로 특정신호에 의한 양적인 변화가 뚜렷하다 하겠다. 따라서 이들 전사인자들의 세포 내 분해정도를 이해하는 것은 세포내의 신호전달을 이해하는 중요한 열쇠가 될 수 있을 것으로 사료된다.

Egr-1은 immediate-early 전사인자로서, 여러 가지 자극에 의해 빠른 시간 내에 증가하는 단백질로 알려져 있다.¹⁴⁾ 이러한 Egr-1은 정상상태에서는 철저한 조절을 받으며, 특정 자극에 의해 그 발현이 증가하게 된다. 비정상적인 Egr-1의 발현은 여러 병적인 상태를 유발하게 되는데, 대표적인 질병으로는 Burkitt lymphoma, 폐암 그리고 간암 등이 알려져 있다.^{14~16)} 또한 Egr-1이 간암에서 혈관신생인자로 알려져 있는 IGF-II의 발현에 관여하고 있으며 hypoxia에 의해 증가한다는 사실은 이전의 보고에서 나타나 있으나,¹¹⁾ Egr-1 단백질의 분해 조절에 대해서는 알려진 바가 없다.

한편, Egr-1과 같은 short-lived 단백질의 분해는 ubiquitin-dependent 26S proteasome pathway에 의해 수행됨이 잘 알려져 있으며, proteasome에 의한 단백질 분해는 cell cycle, 세포증식, 발생, 분화 등 광범위한 세포 내 활동에 영향을 끼치는 것으로

알려져 있다.¹⁷⁾ 26S proteasome complex는 약 2.5 MDa의 거대한 단백질 복합체로서, 20S와 19S 두 개의 커다란 부분으로 나뉜다.¹⁸⁾ 19S 복합체는 ubiquitination 된 단백질을 인지하며, 20S 복합체의 안쪽에서 단백질의 분해가 일어나게 된다. 이 20S 복합체는 4개의 링구조를 이루는데, 각각 7개의 서로 다른 subunit으로 이루어져 있어서, 안쪽의 두 개의 β -type subunit과 바깥쪽의 α -type subunit으로 구성되어 있다. 이 중 α -type subunit의 작용은 그리 잘 알려져 있지 않았으나, 최근 PSMA7 subunit이 HIF-1 α 의 분해에 관여하고 있음이 밝혀져,¹⁹⁾ 조금씩 그 기능이 알려지고 있다.

본 연구에서는 yeast two-hybrid 스크리닝에 의하여 Egr-1과 특이하게 결합하는 단백질로서 PSMA3와 PIASy를 검색하였다(Table 1, 2). 이와 같은 사실을 바탕으로 하여 Egr-1 단백질의 안정성을 정상산소분압과 hypoxia에서 각각 proteasome inhibitor를 처리하여 살펴 본 결과, hypoxia 상태에서 Egr-1의 단백질 분해가 정상산소분압에 비해 저해되는 것을 관찰하였다(Fig. 2). 이는 hypoxic stress가 Egr-1 단백질의 안정성을 증대시키고 있다는 것을 증명하고 있다.

이상의 결과는 기존의 다양한 short-lived 단백질의 분해과정과 일치하는 결과이며, Egr-1이 작용할 수 있는 cell cycle progression, 발생 및 암화 과정에 Egr-1 단백질의 분해정도가 관여할 가능성을 제시하고 있다.

결론

Hypoxia에 의해 유도되는 단백질인 Egr-1의 새로운 결합단백질로서 PSMA3와 PIASy가 검색되었고, 이를 바탕으로 하여 hypoxia에 의해 Egr-1 단백질의 분해정도가 감소될 수 있음을 밝히고 있다. 이는 암화과정 및 발생과정에 관여하고 있는 Egr-1 단백질의 새로운 조절기작을 나타내고 있다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 혈관연구센터(VSRC) 연구비의 지원으로 이루어진 것으로 이에 감사드

립니다.

참고 문헌

- 1) Shibuya M. Structure and dual function of vascular endothelial growth factor receptor-1 (Flt-1). *Int J Biochem Cell Biol* 2001; 33: 409-420.
- 2) Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 2000; 407: 242-248.
- 3) Wang HU, Chen ZF, Anderson DJ. Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 1998; 93: 741-753.
- 4) Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; 386: 671-674.
- 5) Ariel I, Ayesh S, Perlman EJ, Pizov G, Tanos V, Schneider T, Erdmann VA, Podeh D, Komitowski D, Quasem AS, de Groot N, Hochberg A. The product of the imprinted H19 gene is an oncofetal RNA. *Mol Pathol* 1997; 50: 34-44.
- 6) Myers KA, Rahi-Saund V, Davison MD, Young JA, Cheater AJ, Stern PL. Isolation of a cDNA encoding 5T4 oncofetal trophoblast glycoprotein. An antigen associated with metastasis contains leucine-rich repeats. *J Biol Chem* 1994; 269: 9319-9324.
- 7) Wilkinson MF, Kleeman J, Richards J, MacLeod CL. A novel oncofetal gene is expressed in a stage-specific manner in murine embryonic development. *Dev Biol* 1990; 141: 451-455.
- 8) Hothuizen PE, Rodenberg RJT, Van Dijk MA, Koonen-Reemst AMCB, Charnay P, Sussenbach JS. Transcriptional regulation of the human IGF-II gene. *Ann NY Acad Sci* 1993; 684: 214-217.
- 9) Kim KW, Bae SK, Lee OH, Bae MH, Lee MJ, Park BC. Insulin-like Growth factor II (IGF-II) induced by hypoxia may contribute to angiogenesis of Human Hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1998; 15: 348-351.
- 10) Bae SK, Bae MH, Ahn MY, Son MJ, Lee YM, Bae MK, Lee OH, Park BC, Kim KW. Egr-1 mediates transcriptional activation of IGF-II gene in response to hypoxia. *Cancer Res* 1999; 59: 5989-5994.
- 11) Swirnoff AH, Apel ED, Svaren J, Severson BR, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. Nab1, a corepressor of NGFI-A (Egr-1), contains an active transcriptional repression domain. *Mol Cell Biol* 1998; 18: 512-524.
- 12) Svaren J, Severson BR, Apel ED, Zimonjic DB, Popescu NC, Milbrandt J. NAB2, a corepressor of NGFI-A (Egr-1) and Krox20, is induced by proliferative and differentiative stimuli. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 3545-3553.
- 13) Yan SF, Lu J, Zou YS, Soh-Won J, Cohen DM, Buttrick PM, Cooper DR, Steinberg SF, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM. Hypoxia-associated induction of early growth response-1 gene expression. *J Biol Chem* 1999; 274: 15030-15040.
- 14) Lim CP, Jain N, Cao X. Stress-induced immediate-early gene, egr-1, involves activation of p38/JNK1. *Oncogene* 1998; 16: 2915-2926.
- 15) Huang RP, Liu C, Fan Y, Mercola D, Adamson ED. Egr-1 negatively regulates human tumor cell growth via the DNA-binding domain. *Cancer Res* 1995; 55: 5054-5062.
- 16) Park BC, Huh MH, Seo JH. Differential expression of transforming growth factor alpha and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 1995; 22: 286-294.
- 17) Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-479.
- 18) Gerards WL, de Jong WW, Boelens W, Bloemendal H. Structure and assembly of the 20S proteasome. *Cell Mol Life Sci* 1998; 54: 253-262.
- 19) Cho S, Choi YJ, Kim JM, Jeong ST, Kim JH, Kim SH, Ryu SE. Binding and regulation of HIF-1alpha by a subunit of the proteasome complex, PSMA7. *FEBS Lett* 2001; 498: 62-66.