



저작자표시-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

치의학석사 학위논문

신규합성펩타이드의
혈관형성제어에 미치는 영향

Effect of Novel Synthetic Peptide on
angiogenesis

2014 년 2 월

서울대학교 치의학대학원

치 의 학 과

신 동 운

신규합성펩타이드의
혈관형성제어에 미치는 영향
Effect of Novel Synthetic Peptide on
angiogenesis

지도 교수 박 윤 정

이 논문을 치의학석사 학위논문으로 제출함
2013 년 10 월

서울대학교 치의학대학원
치의학과
신 동 운

신동운의 치의학석사 학위논문을 인준함
2013 년 11 월

위 원 장 _____ 이 진 _____ (인)

부위원장 _____ 박 윤 정 _____ (인)

위 원 _____ 조 재 진 _____ (인)

초 록

신규합성펩타이드의 혈관형성제어에 미치는 영향

1. 목 적

골형성단백질 (Bone morphogenic proteins, BMPs)는 transforming growth factor β (TGF β) superfamily 에 속하는 세포 외 신호전달 분자로서 세포사멸, 혈관신생에도 영향을 준다. transforming growth factor β (TGF β) superfamily에 속하는 단백질들은 heparin결합부위를 포함하며, BMP4의 heparin결합부위는 heparin과 결합하여 중요한 생리기전을 일으킬 수 있는 것으로 보인다. VEGF는 heparin-binding domain(HBD)를 포함하며, 이 부분이 heparan sulfate (HS) 세포 외 기질과 작용하여 VEGF를 고착시키고 angiogenesis에 중요한 역할을 한다. Smurf는 TGF- β signaling을 조절하는 것으로 처음 알려졌고 이후 연구들에 따르면 Smurf는 다양한 세포 내 단백질들에 작용하여 세포 증식, 분화, 전이를 조절하는 것으로 보인다.

본 연구에서는 이러한 단백질들의 결합부위들을 도출하여 한분자로 가교제작, 신규합성펩타이드를 합성하여 정제한 뒤 종양세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 제작된 합성 peptide는 HUVEC을 이용, 혈관형성에 미치는 영향을 관찰하였다.

2. 방 법

2.1. Cell viability test: Test peptide, 대조군펩타이드, VEGF, BMP4를 농도별로 MDA-MB-231 cell, HUVEC에 처리하여 각 펩타이드의 세포독성을 측정한다. MTT assay를 이용하여 cell viability를 측정했다.

2.2. Tubular formation assay: Test peptide, 대조군펩타이드, VEGF, BMP4를 농도별로 MDA-MB-231 cell에 처리한 TCM을 수확하여 24-well plate에 matrigel 도포후 각 TCM 내에서 HUVEC의 tubular formation을 관찰했다.

2.3. Cell migration: 6-well plate에 HUVEC seeding후 p200 pipet tip으로 직선을 그어서 세포가 없는 선을 만들고 TCM 하에서 이동한 세포의 수를 확인하였다.

2.4. Western blot: TCM에서 배양한 MDA-MB-231 cell lysate를 MMP1, MMP2, MMP9에 대해서 western blot을 수행했다.

3. 결 과

Test peptide의 농도가 증가함에 따라서 MDA-MB-231 cell의 경우 세포 증식이 억제되고 세포 사멸이 유도되었으며, HUVEC에 대해서는 control group의 cell viability와 유의할만한 차이를 나타내지 않았다. Tubular formation assay에서 Test peptide의 농도가 증가함에 따라서 HUVEC이 형성하는 tubule의 수가 감소했고 대조군펩타이드의 경우 농도와 관계없이 control group과 유사한 tubular formation을 보였다. Cell migration assay에서 Test peptide의 농도가 증가함에 따라서

migration한 세포의 수가 증가했고 대조군펩타이드의 경우 control group과 유의할 만한 차이를 나타내지 않았다. Western blot에서 Test peptide의 농도가 증가함에 따라서 MMP1, MMP2, MMP9의 발현량이 감소하였고 대조군펩타이드의 경우는 control group과 유사한 결과를 나타냈다.

주요어 : Synthetic test peptide, HBP, BMP-4, VEGF, Smurf, angiogenesis

학 번 : 2010-22472

목 차

I. 서 론	1
II. 실험 재료 및 방법	4
III. 실험 결과	8
IV. 참고문헌.....	13
Abstract.....	17

I. 서론

골형성단백질 (Bone morphogenic proteins, BMPs)는 transforming growth factor β (TGF β) superfamily 에 속하는 세포 외 신호전달 분자로서, Human BMP family에 속하는 21종이 밝혀졌다 [1, 2]. 처음에는 이소성 골형성능력 때문에 발견되었으나 이후에 세포 증식, 분화, 이동성 그리고 발생 중에 미치는 다양한 역할을 하는 것으로 알려졌다 [3]. BMP4는 척추동물의 낭배형성, 중배엽형성, 조혈 및 조직과 기관 형태 분화에 영향을 미치며, 임상적으로 비만, 당뇨, 종양 등의 질환들과 관련되어 있다고 알려져 있다[4]. BMPs의 역할 때문에 다양한 질병들, 특히 암 치료의 타겟으로 많은 연구가 행해졌다.

최근에는 BMP4이 종양세포의 증식과 전이, 이동에 미치는 영향을 분석하는 연구가 많이 이루어졌다. BMP4가 종양 세포 증식에 작용하는 양상은 종양세포의 기원조직에 따라서 상이한 양상으로 나타났다 [5]. 골수종이나 유방암 유래 종양세포는 BMP4에 의해서 증식이 억제 되었으나 난소암에서는 효과를 나타내지 않았다 [6, 7]. 유방암 세포에서 BMP4 실험결과는 연구에 따라 상이한 결과를 보였다. 한 연구에서 MDA-231에 BMP4를 처리한 경우 migration과 invasion이 감소한 것으로 나타났지만 다른 실험에서는 반대로 BMP4가 전이와 이동, 상피세포의 중간엽세포로의 전환을 촉진할 수 있는 것으로 나타났다. 반면에 대부분 연구들은 암세포에서 BMP4가 세포의 증식을 억제한다고 주장한다 [5, 8]. 따라서 BMP4는 암세포에 해가 되거나 득이 되는 효과를 둘 다 나타내는 것으로 보인다.

BMP4의 기능적 효과는 세포의 증식과 움직임에만 국한된 것이 아니라 분화와 세포사멸, 혈관신생에도 영향을 준다 [9, 10]. BMP4가 종양세포

에 작용했을 때 세포사멸을 유도하는 Bax의 발현은 증가시키고 세포사멸을 억제하는 Bcl-2의 발현은 억제시켰다 [11]. 새로운 혈관 형성은 종양의 성장과 종양의 진행에 필수적이기 때문에 BMP4는 혈관 형성과 관련된 기능은 암 치료의 중요한 타겟으로 여겨진다.

Transforming growth factor β (TGF β) superfamily에 속하는 단백질들은 Heparin binding domain(HBD)를 포함하며, BMP4 또한 HBD를 가진다. BMP4 단백질의 HBD를 합성하여 골모세포의 분화를 유도한 실험에서 HBD가 heparin과 ERK 신호전달을 통해서 골모세포의 분화를 촉진했다 [12]. 따라서 BMP4의 HBD가 heparin과 결합하여 중요한 생리기전을 일으킬 수 있는 것으로 보인다.

Angiogenesis는 종양의 성장과 전이 그리고 암 단계 진행에 중요한 역할을 한다. 혈액 공급이 부족할 경우 종양의 성장과 전이에 제한이 되기 때문에 종양은 VEGF같은 혈관생성인자를 과발현시킨다 [13]. 때문에 종양 세포를 억제하는데 있어서 VEGF를 대상으로 많은 연구가 이루어졌다 [14].

Vascular endothelial growth factor (VEGF)는 생리적인 배발생과 골격형성 과정에서 혈관 생성을 조절하며 혈관의 투과성을 증가시키고 내피세포의 증식과 이동을 통해 신생 혈관이 만드는 효과를 나타낸다[15]. 또한 VEGF는 종양과 관련된 병리적 혈관 생성에도 연관이 되어있다 [16]. VEGF는 receptor tyrosine kinase (RTKs)를 통해서 세포내부로 신호를 전달하여 효과를 나타내며 co-receptor들이 RTK를 통한 신호전달을 조절한다.[17]

VEGF의 긴 절편 isoform인 VEGF-A는 염기성의 heparin-binding domain(HBD)를 포함하며, 이 부분이 haparan sulfate (HS) 세포 외 기질과 작용하여 VEGF를 고착시킨다 [18]. VEGF-A의 heparin

binding isoform은 배 발생 중의 혈관 분지형성과 출생 후 angiogenesis에 중요한 역할을 한다. Heparin에 결합할 수 없는 VEGF의 isoform을 과발현 시킨 경우 angiogenesis가 억제되었다. [19]. Aptamer가 VEGF의 HBD에 특이적으로 결합하여 angiogenesis를 억제하는 것 또한 HBD가 VEGF의 생리활성에 중요하다는 것을 보여준다 [20].

Smad ubiquitin regulatory factors(Smurfs)는 E3 ubiquitin ligase의 HECT-family이며 Smurf1과 Smurf2가 있다. Smurf는 TGF- β signaling을 조절하는 것으로 처음 알려졌다 [21]. 이후 연구들에 따르면 Smurf2는 다양한 세포 내 단백질들에 작용하여 세포증식, 분화, 전이를 조절하는 것으로 보인다 [22, 23]. Blank et al.의 실험에서 Smurf-2가 불활성화된 세포에서 passage가 늘어남에 따라 종양세포의 형질을 발현하는 것이 유전자 변이가 축적되어 발생하는 것으로 보고 Smurf-2가 DNA 수복에 관련되며, 이를 통해서 tumor suppressor로 작용한다는 것을 알아냈다 [24]. 다른 연구에서는 Smurf가 종양세포의 전이를 촉진하는 결과를 보였기 때문에 Smurf가 tumor promoter와 suppressor 두 가지 상반된 기능을 가질 수 있는 것을 보인다 [25].

이전 연구에 따르면 BMP4 유래 HBD가 MDA-MB-231 cell의 세포 사멸을 유도하고 세포투과능력을 가지며 VEGF와 결합하는 성질을 가진 것으로 나타났다.

본 연구에서는 Smurf에 결합하는 단백질과 헤파린 결합성 도메인서열이 융합된 신규 합성펩타이드를 합성, 정제한 뒤 종양세포에 미치는 영향을 알아보고 HUVEC을 이용하여 Test peptide가 angiogenesis에 미치는 영향을 관찰하였다. 그리고 대조군펩타이드 단독으로 종양세포와 angiogenesis에 어떤 영향을 나타나는 지도 평가하였다.

II. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

Phosphate-buffered saline (PBS), Fetal bovine serum (FBS), 0.25% (w/v) trypsin-EDTA, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) Gibco-BRL (Gaithersburg, MD, USA), Dimethyl sulfoxide (DMSO) Sigma (St. Louis, US), Bone morphogenetic protein (BMP)-4 R&D Systems (Abingdon, UK), VEGF BD Biosciences (San Jose, CA, USA), Matrigel (BD Bioscience), MTT, EBM-2 (Lonza), Antibody (Cell Signaling technology),

모델 종양 세포주로서 MDA-MB 231 세포를 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하여, 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다. MDA-MB 231 세포는 100 mm dish에 1 x 10⁵ 개씩 분주하여 10% FBS (Fetal Bovine Serum)과 1% antibiotic-antimycotic 용액이 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배지에서 배양하였다. 세포는 trypsin-EDTA로 떼어내어 새로운 culture flask에 분주하여 배양하였고, 배지는 1일에 한 번씩 교환하였다.

2.2. Peptide 합성

펩타이드를 standard fluorenylmetoxycarbonyl (F-moc) chemistry

에 기반한 펩타이드 합성기 (APEX 396, AAPPTEC, Louisville, KY, USA)를 이용, Rink amide resin에 Fmoc-Amino acids을 coupling과 deprotection을 반복하여 연결해 내가는 고정상 합성 방법(Solid Phase Peptide Synthesis, SPPS)을 통해 peptide를 합성하였다.

Rink amide resin에 아미노산을 DMF, 10 당량의 DIPEA, 5당량의 HBTU를 이용하여 coupling을 진행하고, 20 % piperidine을 사용하여 F-moc을 제거하였다. 펩타이드-레진은 THF에서 건조하였다. 3시간 동안 TFA/EDT/TIS/H₂O를 사용하여 펩타이드-레진을 분리하였다. 합성된 펩타이드는 C18 column이 설치된 reverse-phase high-performance liquid chromatography (Shimadzu AutoPrep system, Japan)로 정제하였다.

2.3. TCM 제작

MDA-MB-231 cell을 100mm dish에 1×10^5 cell/well 씩 seeding 하고 DMEM 5ml을 첨가한다. 11개의 seeding된 dish를 준비하고 각 dish에 Test peptide, 대조군펩타이드가 25, 50, 100, 200 μ M 농도가 되도록 정제된 peptide를 첨가하였다. VEGF와 BMP4는 각각 20ng/ml, 100ng/ml가 되도록 첨가하고 남은 한 개의 dish는 medium만 첨가하였다. 24시간뒤에 media을 채취해서 1회 1500rpm, 5분동안 원심분리하고 다시 상층액만 수확하였다.

2.4. Cell viability assay

HUVEC 현탁액을 96-well plate에 1×10^4 cells/well 의 밀도로 첨가하였다. 각 well에 Control group, Test peptide 25, 50, 100, 200 μ M, 대조군펩타이드 25, 50, 100, 200 μ M, VEGF 20ng/ml, BMP4 100ng/ml의 농도로 포함된 media를 100 μ l 씩 첨가하고 24시간 동안 배양하였다. 5 mg/ml MTT를 각 well에 20 μ l 첨가한다. 4시간 배양 후에 상층액을 제거하고 DMSO 200 μ l를 첨가한다. Optical density (OD) 값은 microplate reader에서 490 nm 파장으로 측정하였다.

2.5. Tubular formation assay

24-well plate에 Matrigel 300 μ l/well 도포 후 37 °C에서 30분간 굳힌다. 2×10^5 cells/well의 밀도로 각 well에 seeding 후에 500 μ l의 Control group, Test peptide 25, 50, 100, 200 μ M, 대조군펩타이드 25, 50, 100, 200 μ M, VEGF 20ng/ml, BMP4 100ng/ml TCM을 처리하여 37 °C 에서 배양한다. 2~4시간 후에 microscope를 통해서 tubular formation을 관찰하고 사진촬영 하였다.

2.6. Cell migration assay

6-well plate($\times 2$)에 1×10^6 cells/well 밀도로 세포를 seeding 하고 24시간이 지난 후 p 200 yellow tip으로 세포 단층을 긁어서 scratch를 내었음. Cell debris를 1ml media로 씻어내고 각각의 Control group, Test peptide 25, 50, 100, 200 μ M, 대조군펩타이드 25, 50, 100, 200 μ M, VEGF 20ng/ml, BMP4 100ng/ml 농도의 TCM 3ml을 처리하여

16시간동안 배양한 뒤 위상차 현미경(X20) 으로 관찰하였다.

2.7. Western blot

60 mm dish에 MDA-MB-231 cell를 3×10^6 cell/well 씩 분주하고, 10% FBS와 1% antibiotics가 포함된 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO₂ 조건으로 24 시간 동안 배양하였다. 24 시간 후, 배지를 제거하고 각각 Control group, Test peptide 25, 50, 100, 200 μ M, 대조군펩타이드 25, 50, 100, 200 μ M, VEGF 20ng/ml, BMP4 100ng/ml 씩 처리하여 0.5% FBS와 1% antibiotics가 포함된 DMEM 배지 (serum free medium)에서 추가로 48 시간 동안 배양하였다. 48시간 배양 후에, 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 60 mm dish에 배양된 세포를 scraper로 긁어 모으고, 4°C, 13,000 rpm에서 5 분간 원심 분리하여 cell pellet을 취하였다. 세포들을 30 분 동안 얼음 속에서 lysis buffer(20 mM Tris-HCL pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1% Triton X-100)에 protease inhibitor cocktail (Roche, Penzberg, Germany) 와 phosphatase inhibitor cocktail 2 (Sigma, St. Louis, MO)를 첨가한 용액으로 용해시킨 뒤, 4°C, 13,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 취하였다. 단백질을 Bradford protein assay kit (BioRad, Hercules, CA)를 이용해 단백질을 정량하였다. 시료는 5X loading buffer로 5분 동안 열처리한 다음 분석하였다. 8% polyacrylamide gel에서 1 시간 동안 130 V에서 전기 영동하였다. 전기 영동 완료 후, 단백질을 transfer buffer (12.5 mM Tris, 0.1 M glycine, pH 8.3)에서 310 mA로 100분 동안 니트로 셀룰로오스 막 (nitrocellulose membrane)에 전

이시켰다. 막을 1X T-TBS (20mM Tris-HCl pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 세척하고, 1X T-TBS에 녹인 5% skim milk로 상온에서 1시간 동안 막을 블록 (block)하였다. 막을 3회 세척하고, 상기 블록킹 용액에 각각 1:300의 농도로 MMP1, MMP2, MMP9 1차 항체를 넣은 용액에서 4℃, 24 시간 동안 반응시켰다. 막을 3회 세척한 후, 상온에서 1시간 동안 1:1000 농도로 2차 항체인 Horseradish peroxidase가 결합된 goat anti-rabbit IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)를 반응시킨 뒤 다시 T-TBS로 5분씩 3회 세척하였다. ECL (Enhanced Chemo-Luminescence Detection Kit)을 사용하여 밴드를 검출하고, Luminescent image analyzer로 분석하였다. 단백질 loading 양이 일정한지 비교하기 위해 β -Actin을 동일한 방법을 이용하여 검출하였다.

III. 실험 결과

3.1. Cell Viability assay

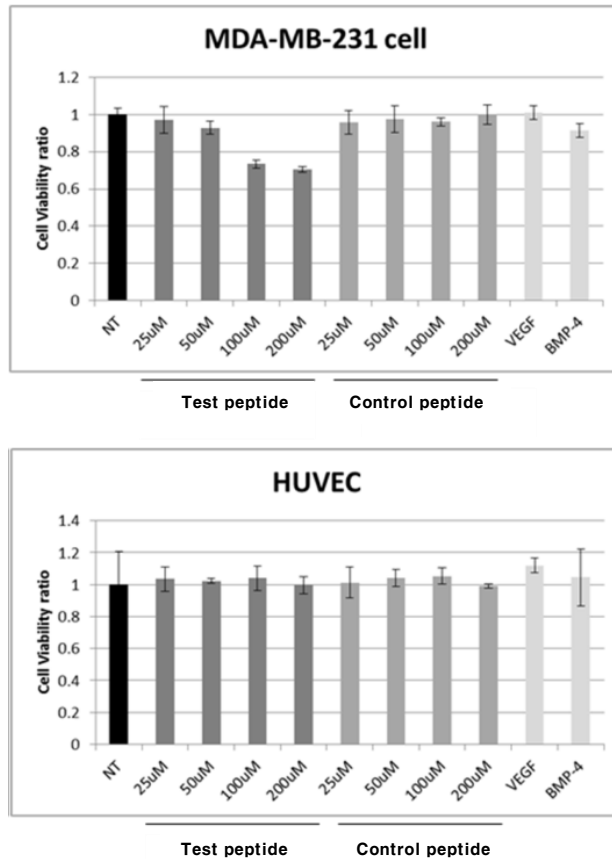


Figure 1 Test peptide, 대조군펩타이드의 MDA-MB 231 cell에 대한 세포 독성 효과 확인. NT, Test peptide 25, 50, 100, 200 μ M, 대조군펩타이드 25, 50, 100, 200 μ M, VEGF 20ng/ml, BMP4 100ng/ml를 첨가한 DMEM medium에서 MDA-MB-231 cell, HUVEC을 배양한 뒤 MTT assay를 수행하여 Cell Viability를 관찰하였다.

MTT assay를 이용하여 Test peptide, 대조군펩타이드가 농도에 따라 MDA-MB-231 Cell과 HUVEC의 세포 생존에 미치는 영향을 알아보았다. Test peptide는 농도가 25, 50, 100, 200 μ M로 증가함에 따라서 MDA-MB-231 Cell의 세포 생존률이 감소하는 경향성을 보였다.

HUVEC의 경우는 Test peptide의 농도가 증가해도 control과 비교했을 때 세포 생존률에 유의한 차이가 나타나지 않았다. 대조군펩타이드는 MDA-MB-231 Cell과 HUVEC 두 가지 세포 모두에서 control의 세포 생존률과 유의한 차이를 보이지 않았다.

3.2. Vascular formation assay

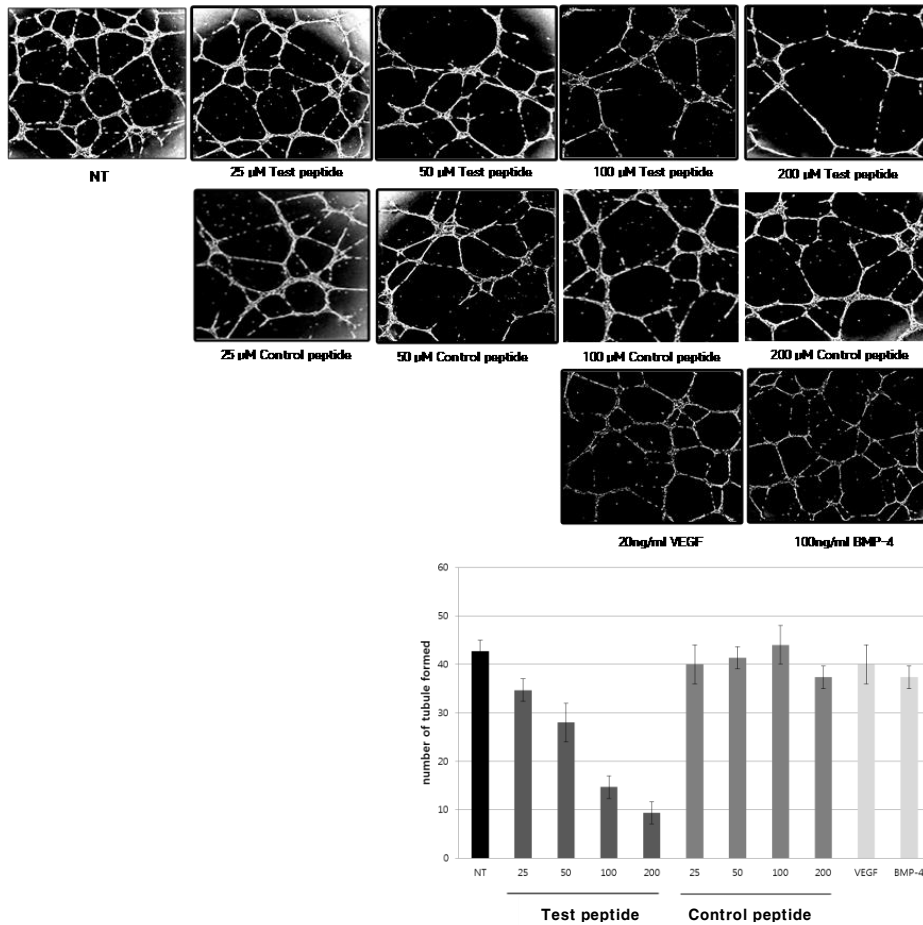


Figure 2 Test peptide, 대조군펩타이드를 처리한 tubular formation capacity

에 미치는 영향 확인. 24-well plate에 Matrigel 300 μ l/well 도포 후 37 °C에서 굳혔다. 2×10^5 cells/well의 밀도로 각 well에 seeding후에 500 μ l의 TCM 하에서 배양하여 2시간 후에 tubular formation을 microscope로 관찰하고 사진 찍었다.

각 peptide의 혈관생성유도능을 확인하기 위해서 matrigel이 도포된 plate에 HUVEC과 TCM을 넣고 2시간 동안 배양했다. 대조군펩타이드가 처리된 실험군에서는 control과 유사한 수준의 세포분지가 형성됨을 확인할 수 있었으며 농도에 따른 차이는 관찰되지 않았다. Test peptide 실험군은 농도가 증가함에 따라서 세포분지의 수가 감소하는 양상을 나타냈으며 200 μ M Test peptide의 경우 control과 비교했을 때 세포분지의 수가 1/4가량 감소한 것을 관찰할 수 있다.

3.3. Cell migration assay

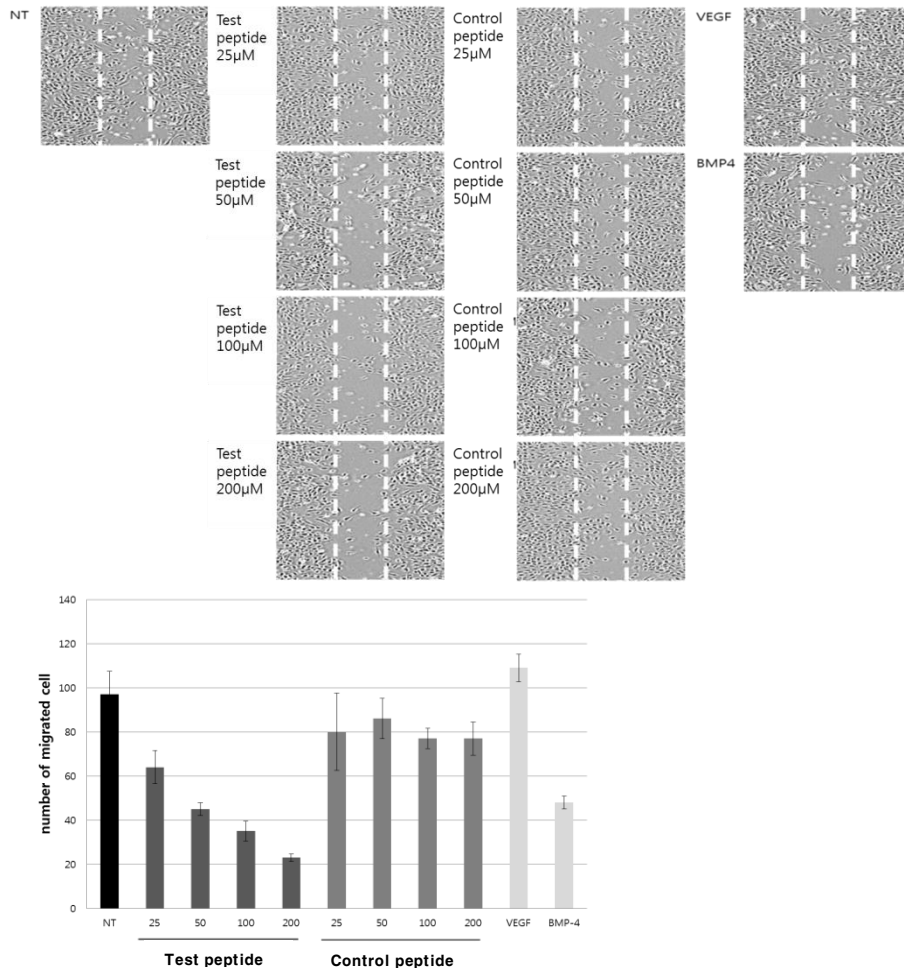


Figure 3 Test Peptide, 대조군 펩타이드를 처리한 TCM의 cell migration에 미치는 영향 확인. 6-well plate(×2)에 1×10^6 cells/well 밀도로 세포를 seeding 후 p200 pipet tip으로 세포 단층을 긁어서 직선을 긋는다. Cell debris를 1ml media로 씻어내고 각각의 농도의 TCM 3ml을 처리하여 16시간 동안 배양한 뒤 위상차 현미경으로 관찰했다. 관찰영역을 3등분 하여 선으로 넘어온 세포의 수를 세서 평균값으로 도표를 작성하였다.

각 Peptide이 Cell migration에 미치는 영향을 알아보기 위해 HUVEC 이 파종된 plate well을 pipet tip으로 긁어서 세포가 없는 선을 만들고

각 농도 별 TCM에서 배양하여 선으로 넘어온 세포수의 양상을 관찰했다. 대조군펩타이드를 처리한 TCM에서 배양한 HUVEC의 경우 대조군 펩타이드의 농도가 증가해도 control과 유사한 migration 양상을 나타냈다. Test peptide를 처리한 TCM에서 배양한 HUVEC은 Test peptide의 농도가 증가할수록 선을 넘은 세포의 수가 control에 비해서 줄어들고 migration이 감소하는 것이 관찰됐다.

3.4. Western blot

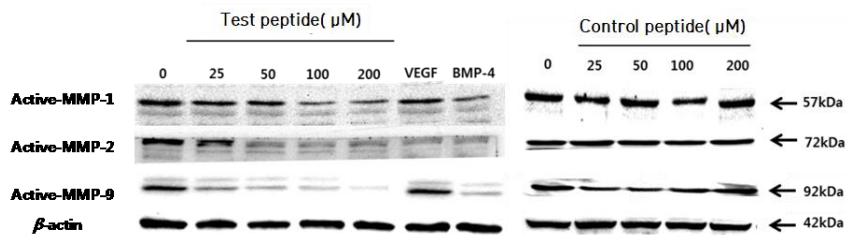


Figure 4 각각의 농도로 Test peptide, 대조군펩타이드를 처리한 MDA-MB 231 cell에서의 MMP-1, MMP-2, MMP-9의 protein expression 비교. MDA-MB-231 cell에 각각 CONTROL GROUP, Test peptide 25, 50, 100, 200 μ M, 대조군펩타이드 25, 50, 100, 200 μ M, VEGF 20ng/ml, BMP4 100ng/ml를 처리한 뒤 MMP1, MMP2, MMP9에 대상으로 Western blot을 수행했다.

MMPs 는 zinc-dependent 분해효소로서, 혈관주변의 Extracellular matrix 의 모든 구성성분을 degradation 하는 결정적인 역할을 하며, Cancer 조직에서 발현이 뚜렷하게 증가됨. 따라서 MMPs 는

Angiogenesis 및 Tumor progression에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며 이번 실험에서는 MMPs 중 표지인자인 MMP1, MMP2, MMP9에 대하여 MDA-MB-231 cell에 각각의 Peptide를 농도별로 처리 후에 western blot을 수행했다. Test peptide를 처리한 세포의 경우 농도가 증가함에 따라서 MMP1, MMP2, MMP9의 발현량이 점차 감소하는 것을 볼 수 있다. 대조군펩타이드의 경우 농도가 증가해도 MMP1, MMP2, MMP9의 발현량이 NT에 비해 별다른 차이가 없는 것을 관찰할 수 있었다.

IV. 고찰 및 결론

Cell viability assay에서 Test peptide는 MDA-MB-231 Cell에 대해서만 농도가 증가함에 따라서 세포독성을 나타내고 HUVEC에 대해서는 농도와 상관없이 별다른 영향을 미치지 않았다. 따라서 Test peptide가 종양 성장 억제 및 종양 세포 사멸을 유도한다는 것을 알 수 있다. 대조군펩타이드를 처리했을 때는 MDA-MB-231 Cell과 HUVEC에 대해서 별다른 영향을 주지 못했으므로 Test peptide의 HBP가 종양 세포에 대한 세포특이적 활성을 나타내는데 중요한 것을 알 수 있다.

HUVEC의 tubular formation과 migration을 관찰한 실험에서는 대조군펩타이드는 별다른 효과를 나타내지 않았고 Test peptide만이 농도에 따라서 HUVEC의 tubular formation과 migration을 억제했다. 이것은 Test peptide의 HBP가 tubular formation 및 migration을 억제하는데 중요한 것으로 보인다.

Western blot 실험에서 세포 전이에 관계가 있는 MMP1, MMP2, MMP9의 발현이 각 단백질에 의해서 어떻게 조절되는지 관찰하였다.

Test peptide의 농도가 올라올수록 발현되는 MMP1, MMP2, MMP9의 발현량이 감소하였으며 대조군펩타이드의 경우는 농도 변화와 관계 없이 MMP1, MMP2, MMP9의 발현량이 NT와 유의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 Test peptide가 metastasis를 억제하며 HBP가 그 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

추후 연구를 통해서 VEGF의 HBD의 ERK signaling과 BMP4 유래의 HBP에 의한 영향이 어떤 관계가 있는지 알아보는 것이 중요할 것이라고 생각된다. 연구에 따르면 HBP가 heparin 뿐만 아니라 VEGF와도 결합하는 경향성을 보이기 때문에 VEGF에 HBP가 결합해서 VEGF의 heparin binding affinity를 억제하여 angiogenesis 유도능을 상실하게 할 가능성이 있다. Test peptide의 세포투과기능도 실험에 영향을 미칠 수 가능성도 배제할 수 없다. 이후의 실험으로 Test peptide가 세포내부로 들어갈 수 있는지 그리고 세포내부로 들어간 대조군펩타이드가 종양 세포에 어떤 영향을 줄 수 있는지도 고려해봐야 할 것이다.

V. 참고 논문

1. Bragdon, B., et al., *Bone morphogenetic proteins: a critical review.* Cellular signalling, 2011. **23**(4): p. 609-620.
2. Schmierer, B. and C.S. Hill, *TGF β -SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility.* Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(12): p. 970-982.
3. Wozney, J.M., et al., *Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities.* Science, 1988. **242**(4885): p. 1528-1534.
4. Kim, M. and S. Choe, *BMPs and their clinical potentials.* BMB reports, 2011. **44**(10): p. 619.
5. Kallioniemi, A., *Bone morphogenetic protein 4—a fascinating regulator*

- of cancer cell behavior. Cancer genetics*, 2012. **205**(6): p. 267-277.
6. Hjertner, Ö., et al., *Bone morphogenetic protein-4 inhibits proliferation and induces apoptosis of multiple myeloma cells Presented in part at the 41st annual meeting of the American Society of Hematology, New Orleans, December 1999. Blood*, 2001. **97**(2): p. 516-522.
 7. Kawamura, C., M. Kizaki, and Y. Ikeda, *Bone morphogenetic protein (BMP)-2 induces apoptosis in human myeloma cells. Leukemia & lymphoma*, 2002. **43**(3): p. 635-639.
 8. Alarmo, E.-L. and A. Kallioniemi, *Bone morphogenetic proteins in breast cancer: dual role in tumourigenesis? Endocrine-related cancer*, 2010. **17**(2): p. R123-R139.
 9. Lombardo, Y., et al., *Bone morphogenetic protein 4 induces differentiation of colorectal cancer stem cells and increases their response to chemotherapy in mice. Gastroenterology*, 2011. **140**(1): p. 297-309. e6.
 10. Rothhammer, T., et al., *Functional implication of BMP4 expression on angiogenesis in malignant melanoma. Oncogene*, 2006. **26**(28): p. 4158-4170.
 11. Flores, M.L., et al., *Paclitaxel sensitivity of breast cancer cells requires efficient mitotic arrest and disruption of Bcl-xL/Bak interaction. Breast cancer research and treatment control group*, 2012. **133**(3): p. 917-928.
 12. Choi, Y.J., et al., *The identification of a heparin binding domain peptide from bone morphogenetic protein-4 and its role on osteogenesis. Biomaterials*, 2010. **31**(28): p. 7226-7238.
 13. Folkman, J. *Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. in Seminars in oncology*. 2002. Elsevier.
 14. Jain, R.K., et al., *Lessons from phase III clinical trials on anti-VEGF therapy for cancer. Nature Clinical Practice Oncology*, 2006. **3**(1): p. 24-40.
 15. Grünewald, F.S., et al., *Structure–function analysis of VEGF receptor activation and the role of coreceptors in angiogenic signaling. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 2010.

- 1804**(3): p. 567-580.
16. Leung, D.W., et al., *Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen*. *Science*, 1989. **246**(4935): p. 1306-1309.
 17. Ferrara, N., H.-P. Gerber, and J. LeCouter, *The biology of VEGF and its receptors*. *Nature medicine*, 2003. **9**(6): p. 669-676.
 18. Keyt, B.A., et al., *The carboxyl-terminal domain (111165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency*. *Journal of Biological Chemistry*, 1996. **271**(13): p. 7788-7795.
 19. Grunstein, J., et al., *Isoforms of vascular endothelial growth factor act in a coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature*. *Molecular and cellular biology*, 2000. **20**(19): p. 7282-7291.
 20. Lee, J.-H., et al., *A therapeutic aptamer inhibits angiogenesis by specifically targeting the heparin binding domain of VEGF165*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005. **102**(52): p. 18902-18907.
 21. Zhu, H., et al., *A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation*. *Nature*, 1999. **400**(6745): p. 687-693.
 22. Huang, C., *Roles of E3 ubiquitin ligases in cell adhesion and migration*. *Cell Adhesion & Migration*, 2010. **4**(1): p. 10-18.
 23. Osmundson, E.C., et al., *The HECT E3 ligase Smurf2 is required for Mad2-dependent spindle assembly checkpoint*. *The Journal of cell biology*, 2008. **183**(2): p. 267-277.
 24. Blank, M., et al., *A tumor suppressor function of Smurf2 associated with controlling chromatin landscape and genome stability through RNF20*. *Nature medicine*, 2012. **18**(2): p. 227-234.
 25. Jin, C., et al., *Smad ubiquitination regulatory factor 2 promotes metastasis of breast cancer cells by enhancing migration and invasiveness*. *Cancer research*, 2009. **69**(3): p. 735-740.

Abstract

Effect of Novel Synthetic peptide on angiogenesis

Dong–Woon, Shin

Dentistry

The Graduate School

Seoul National University

1 . Purpose

Bone morphogenetic proteins (Bone morphogenetic proteins, BMPs) are extracellular signaling molecules which belong to transforming growth factor β (TGF β) superfamily and have effect on apoptosis, angiogenesis. Proteins which belong to transforming growth factor β (TGF β) superfamily have Heparin binding domain (HBD) , HBD of BMP4 binds to heparin and seem to induce important physiological mechanisms. VEGF also have heparin–binding domain (HBD) and this domain binds to haparan sulfate (HS) extracellular matrix localizing VEGF and plays an important role angiogenesis. Smurf was known first as it regulate the TGF– β . Smurf2 acts on a wide variety of cellular proteins and cell proliferation, differentiation, migration.

In this study, novel synthetic peptide bearing the specific domain of

above protein was prepared, purified and then we find out the effect of the protein on tumor cells. Using HUVEC, we observed the effects of test peptide on angiogenesis. We also estimated effect of SBP alone on tumor cells and angiogenesis.

2 . Method

2.1 Cell viability test: Each concentration of test peptide, control peptide, VEGF, BMP4 were treated on MDA–MB–231 cell, HUVEC treated and we measured the cytotoxicity of each. MTT assay was used to measure cell viability .

2.2 Tubular formation assay: Each concentration of test peptide, control peptide, VEGF, BMP4 were treated on MDA–MB–231 cell and we harvested TCM. And then we observed tubular formation of HUVEC in each TCM on the matrigel coated 24–well plate.

2.3 Cell migration: After seeing HUVEC on 6–well plate, we scratched the plate with p200 pipet tip to create a a cell–free straight line. We measured the number of cells crossed the line in the TCM.

2.4 Western blot: With MDA–MB–231 cell lysate cultured in TCM, western blot were performed on MMP1, MMP2, MMP9.

3 . Results

With increasing concentrations of test peptide, proliferation of MDA-MB-231 cell was inhibited and its apoptosis was induced, but the cell viability of HUVEC did not show significant differences from the control group. With increasing concentrations of test peptide, the number of tubule formed by HUVEC decreased but regardless of the concentration of control peptide, the number of tubule formed was similar to that of control group. In cell migration assay, with increasing the concentration of test peptide, the number of migrated cells but in the case of control peptide, the number of migrated cells did not show any significant difference with that of the control group. In Western blot, as the concentration of test peptide increase, the expression level of MMP1, MMP2, MMP9 decreased but in the case of control peptide, expression level of them showed similar to that of control group .

Keywords : Synthetic test peptide, HBP, BMP-4, VEGF, Smurf, angiogenesis

Student Number : 2010-22472