

## Plasminogen kringle 5 재조합 단백질에 의한 ERK1/2 활성화 및 세포골격 재배열 억제

하정민<sup>†</sup> · 김현경<sup>†</sup> · 김명래 · 조영애<sup>\*</sup>

가톨릭대학교 의과대학 생명과학과, 암연구소

Received September 15, 2006 / Accepted October 11, 2006

**Inhibition of ERK1/2 Activation and Cytoskeleton Rearrangement by the Recombinant Protein of Plasminogen Kringle 5.** Jung-Min Ha<sup>†</sup>, Hyun-Kyung Kim<sup>†</sup>, Myoung-Rae Kim and Young Ae Joe<sup>\*</sup>  
Cancer Research Institute and Department of Biomedical Sciences College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea – Plasminogen kringle 5 is a potent inhibitor of endothelial cell proliferation like an endogenous angiogenesis inhibitor, angiostatin consisting of plasminogen kringles 1-4. In this study, we produced the recombinant protein of plasminogen kringle 5 (PK5) employing an *Pichia* expression system and examined its effect on endothelial cell migration and its possible inhibitory mechanism. PK5 was expressed in *Pichia pastoris* GS115 by fusion of the cDNA spanning from Thr456 to Phe546 to the secretion signal sequence of  $\alpha$ -factor prepro-peptide. After methanol induction, the secreted PK5 was purified by using S-spin column. SDS-PAGE analysis of the purified protein showed one major band of approximately 10 kDa. In *in vitro* migration assays, the purified protein inhibited dose-dependently the migration of human umbilical endothelial cells (HUVECs) induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) or vascular endothelial growth factor (VEGF) with an IC<sub>50</sub> of approximately 500 nM. Accordingly, it inhibited bFGF-stimulated extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) phosphorylation in HUVECs at 500 nM. In addition, it also potently inhibited bFGF-induced cytoskeletal rearrangement of HUVECs. Thus, these results suggest that *Pichia*-produced PK5 effectively inhibits endothelial cell migration, in part by suppression of ERK1/2 activation and blocking cytoskeleton rearrangement.

**Key words** – Angiogenesis inhibitor, endothelial cell, migration, cytoskeletal rearrangement, plasminogen kringle.

### 서 론

Angiogenesis는 기존의 혈관으로부터 새로운 혈관이 생성되는 것을 의미하여 암의 성장과 전이에 필수적이다 [11,14,19,21]. 이러한 관점에서 혈관 신생 억제는 암의 치료를 위한 중요한 전략으로 제시되어 왔고, 이에 따라 혈관신생 억제제들에 대한 수많은 연구가 계속되고 있다 [1,10,15,21,22]. Plasminogen의 첫 번째부터 네 번째까지의 4개의 kringle 도메인으로 구성되어 있다고 알려져 있는 angiostatin은 혈액 단백질인 plasminogen이 proteinase에 의해 생성된 단백질 조각으로 내피세포의 성장과 이동을 억제함으로써 암의 성장 및 전이를 억제한다고 알려져 있다 [21].

Kringle 도메인은 약 80개의 아미노산으로 이루어져 있고, 엄격히 잘 보존된 3개의 이황화 결합으로 묶인 2중 고리 구조를 이루고 있으며, 여러 가지 혈액 응고와 관련된 단백질들 내에 존재하는 domain이다 [16]. 독특한 kringle domain만으로 이루어진 angiostatin이 강력한 혈관신생 억제 효과 및 항암 효과가 있다는 것이 보고된 이래, 여러 다양한

단백질에서 기원한 kringle만으로 구성된 펩타이드들도 혈관신생 억제 효과가 있다는 연구 결과들이 보고되었다 [16, 17,24,27]. 그렇지만 모든 kringle이 혈관신생 억제를 나타내기 위해 내피세포의 기능들을 동일하게 저해하는 것은 아니며 kringle마다 차별적인 활성이 보고되었다. 예를 들어 angiostatin을 구성하는 각각의 kringle을 대상으로 한 연구 보고에 의하면, plasminogen kringle 1-3 (PK1-3)는 내피세포의 성장을 억제하는 반면, 이동에는 거의 효과가 없고, plasminogen kringle 2-3 (PK2-3)는 세포증식에는 효과가 없는 반면 이동은 강력하게 억제하였다 [2,8].

Angiostatin의 경우 아직 세포적, 분자적 작용기전이 명확히 밝혀지지 않았으나 가능한 작용기전들이 제시되었다. F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub> ATP synthase와 angiostatin이 직접 결합함으로써 apoptosis를 유도하여 anti-proliferation 작용을 가져온다는 보고 외에도 [19,20] integrin  $\alpha v \beta 3$ 와 결합함으로써 plasmin이 유도한 세포의 이동을 억제한 다른 연구 결과도 보고되었다 [28]. 또한, angiostatin이 angiomin과 결합하여 focal adhesion kinase (FAK)의 activation을 가져옴으로써 내피세포의 이동을 조절할 수 있다고 보고되었다 [30].

Plasminogen kringle 5 (PK5)는 cell cycle G1 arrest와 apoptosis 유도를 통해 growth factor가 유도한 angiogenesis

<sup>†</sup>Equal contributors

<sup>\*</sup>Corresponding author

Tel : +82-2-590-2404, Fax : +82-2-532-0575

E-mail : youngjoe@catholic.ac.kr

를 억제한다고 알려져 있고[1,9] 이러한 anti-angiogenic activity는 분열중인 내피세포의 표면에 노출된 receptor인 glucose-regulated protein 78과의 binding 이 중요한 역할을 한다는 최근의 보고가 있었다[3]. 특히 이들은 다른 plasminogen kringle과의 활성 비교에서 내피세포의 성장 억제에 가장 강력한 활성을 지니는 것으로 보고되었다[1]. 그렇지만 이들이 PK5의 혈관 신생 억제와 관련된 작용 기전을 충분히 설명하지 못하고 있다. 또한 PK5의 경우 내피세포 증식에 관한 연구가 중심을 이루고, 내피세포를 이용한 세포 이동에 대한 효과가 보고된 바 있으나, 이에 대한 작용기전은 연구된 바 없다[9].

따라서, 본 연구에서는 *Pichia pastoris*로부터 plasminogen kringle 5를 재조합 단백질로 발현, 정제하고, 정제된 단백질이 내피세포 이동을 효과적으로 저해하는지 조사하였고, PK5의 내피세포 이동 억제 작용에 대한 작용기전에 알아보기 위해, 내피세포 이동에 중요한 신호 전달체인 ERK1/2의 활성화와 세포골격의 재배열에 어떠한 영향을 주는지 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

Restriction enzyme은 Roche Molecular Biochemical (Mannheim, Germany)에서, Medium 199 (M199), Dulbesco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), TOP10F', pPICZa-C vector, *P. pastoris* GS115 그리고 trypsin solution, Probond™ resim은 Invitrogen (Carlsbad, CA)에서, PCR에 사용되는 모든 primer들은 Life Technologies (Gland Island, NY)에서, endothelial cell growth supplement (ECGS), heparin, gelatin, RNase A는 Sigma (St. Louis, MO)에서, Basic fibroblast growth factor (bFGF)는 R&D system (Minneapolis, MN)에서, Quikchange multi site-directed mutagenesis kit, DNA polymerase pfu는 Stratagene (La Jolla, CA)에서, LB broth는 DIFCO (Detroit, MI)에서, isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG)는 Amresco (Solon, OH)에서, DNase I, Xba I, Cla I은 Boehringer Mannheim (Mannheim, Germany)에서, Glass Econo Column은 Bio-Rad (Hercules, CA)에서, Labscale TFF system과 Centricon 100은 Millipore (Bedford, MA)에서, Anti-vinculin, rhodamine-conjugated phalloidin, FITC (fluorescein isothiocyanate)-labeled secondary antibodies는 Chemicon (Temecula, CA)에서 구입하였다.

### *P. pastoris* 발현 벡터의 제작

Plasminogen kringle 5 (PK5) 발현 벡터를 제작하기 위하여 목암 생명 공학 연구소의 윤엽 박사로부터 제공받은 PK5

cDNA를 주형으로 kringle 특이 5'-primer (PK5 5'-CAGTATCGATCACTCCTTCCGAAGAAGAC)와 3'-primer (PK5 3'-CTGATCTAGATCAAAATGAAGGGGCCGC)를 Pfu 중합효소를 이용한 PCR을 수행하여 kringle에 해당하는 DNA 조각만을 denaturation (95°C, 1 분), annealing(55°C, 1 분), extension(72°C, 12 분)의 조건으로 30회 반복시켜 증폭시켰다. 이때 얻어진 DNA 단편을 Cla I과 Xba I을 이용하여, pPICZa-C 벡터에 클로닝 하였다. 그 후 벡터를 다시 추출하여 염기서열을 확인하였고, 재조합 단백질의 발현을 위해, 발현 목적으로 이용되는 *P. pastoris* GS115 균주에 형질 도입 하였다.

### *P. pastoris*에서 재조합 단백질 발현

재조합 균주로부터 분리한 *Pichia* 발현 플라스미드 (pPICZa-C/PK5) 10 µg을 Sac I으로 절단하여 선형화 한 후, *P. pastoris* GS115 80 µg에 형질도입 하였다. 약 10 µg의 선형화된 플라스미드 DNA와 *P. pastoris* 80 µl를 0.2 cm cuvette에서 현탁한 후 Gene pulser (Bio-Rad Hercules, San Jose, CA)를 이용하여 1.5 kV, 25 µF, 400 Ω의 조건에서 electroporation 방법에 의해 형질도입 하였다. Pulsing 후 즉시 1 M sorbitol 1 ml을 cuvette에 첨가하였고, 30°C에서 1 시간 동안 배양하였다. *P. pastoris* GS115는 1000 µg/ml의 Zeocin이 포함된 YPD에 도포한 후, 약 3일간 30°C 배양기에서 단일 균체가 형성될 때까지 배양하여 zeocin에 대해 내성인 균주를 선별하였다. *P. pastoris* 형질 도입체는 BMGH (buffered minimal glycerol histidine) 10 ml에 접종한 후, OD<sub>600</sub>=3이 될 때까지 30°C 배양기에서 배양하였다. *P. pastoris* 형질 도입체를 1,500 × g에서 5분간 원심분리 한 후, 30개의 균체 각각을 BMMH (buffered minimal methanol histidine) 2 ml에 현탁하였다. 그 후, 4일 동안 24시간마다 최종농도가 0.5%가 되도록 메탄올을 첨가하였고, 단백질이 분비된 배양액을 SDS-PAGE로 분석하여 높은 수율로 발현하는 균주를 선별하였다.

### 재조합 PK5의 발현 및 정제

높은 수율로 발현하는 균주를 BMGH 배양액 10 ml에 접종하여 약 4일간 배양하였다. 10 ml 배양액을 1,500 × g로 10분간 원심분리한 후 BMMH 2 l에 접종하여 5일간 배양하였다. 5일 후 배양액을 1,500 × g에서 5분간 원심분리한 후 400 ml의 BMMH로 배양액을 교체하고 4일 동안 24시간마다 최종농도가 0.5%가 되도록 메탄올을 첨가하여 최종 430 ml의 배양액 중 195 mg의 단백질을 발현하였다. 원심분리하여 배양액을 회수한 후 Amicon kit. (Beverly, MA)로 농축시켜 40 ml이 되게 하고 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.2, 350 ml을 넣어 재농축한 후 평형화 완충용액 (20 mM potassium phosphate 완충액, pH 5.5, 20 mM

NaCl)으로 투석하였다. 먼저 강 양이온 교환수지가 충전된 S column에 평형화 완충 용액을 5 ml 첨가한 후, 500 × g에서 5 분간 2 회 원심 분리하여 컬럼을 평형화시켰다. 후 시료를 컬럼에 가한 후, 500 × g에서 5 분간 원심분리 하였다. 5 ml 의 평형화 완충용액을 컬럼에 첨가하여 2 회 세척하였다. 그 후, 용출 완충액 (20 mM potassium phosphate 완충액, pH 5.5, 1M NaCl)을 1 ml씩 가한 후, 500 × g에서 5 분간 원심 분리하여 용출하였다. 용출된 용액을 투석 bag(MWCO 6000~8000)에 넣은 후 증류수로 3 회, PBS로 4 회 투석을 실시하였다. 투석을 마친 시료를 centricon 100에 넣어 3,000 rpm에서 원심 분리하여 분자량 크기에 의한 정제 과정을 수행하였다. 얻은 하층액을 QCL-1000 kit (Cambrex, NJ)를 이용하여 endotoxin level을 조사하였을 때, 0.2 EU/mg 이하였다.

### 세포 배양 및 분리

내피세포는 Jaffe 등의 방법[7]에 의해 사람의 탯줄에서부터 분리하였다. 탯줄의 정맥을 PBS로 세척한 후, collagenase 를 0.2% 농도로 넣어준 M199으로 채워서 37°C에 15분 동안 반응시켰다. 그 후, 20 ml의 M199배지로 정맥을 세척하여 분리되어 떨어져 나온 세포들을 원심 분리하여 collagenase를 제거한 후, 혈청이 첨가된 M199 (M199, 20% FBS, 90 µg/ml heparin, 30 µg/ml ECGS)에 현탁시켰다. 이것을 gelatin이 도포되어있는 T25 flask에 넣고, 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 배양기에서 배양하였다.

### 내피세포를 이용한 이동 실험

bFGF로 자극된 내피세포의 이동에 대한 PK5의 효과는 단층 나화 실험과 Boyden-chamber를 이용한 실험에 의해서 평가되었다. 우선 단층 나화 실험은 내피 세포를 1% gelatin이 도포된 6 well 배양 접시에 EGM-2를 첨가하여 confluency 될 때까지 배양하였다. Confluent하게 성장한 내피 세포를 2~200 µl pipette tip으로 긁어서 well에 상처를 만들었다. 배양된 세포는 세포 잔해를 제거하기 위하여 PBS로 2 회 세척하였다. 그리고 정제된 PK5를 여러 농도로 가해 30분간 전처리 한 후, 5% CO<sub>2</sub> 조건하 37°C에서 30 분간 배양하였다. 30분 후, 0.1% fetal bovine serum (FBS), 3 ng/ml bFGF를 첨가하고 8 시간 동안 배양하였다. 대조군은 bFGF 없이 1% FBS가 첨가된 EBM-2 배지에서 배양하였다. 8 시간 후에 나화된 지역으로 이동된 세포는 Olympus C-5050 디지털 카메라로 촬영하였고, 이동한 세포 수를 계수하였다.

Boyden-chamber를 이용한 내피세포 이동 실험은 혈청이 첨가되지 않은 EBM-2 배지에서 내피세포를 4 시간동안 배양하고 PK5를 30분간 전처리 하였다. 혈청이 첨가되지 않은 EBM-2 배지나 VEGF를 2 ng/ml 농도로 가한 배지를 보이든 챔버의 아랫부분에 27 µl 씩 넣어주었다. Boyden-chamber의

아랫부분과 윗부분 사이에 세포가 통과할 수 있도록 8 µm의 구멍 크기의 막을 넣고 조립하고, 챔버의 윗부분에 준비한 세포들을 2 × 10<sup>4</sup> 개씩 (56 µl) 넣어주었다. 5% CO<sub>2</sub>조건 하 37°C에서 약 4 시간에 걸쳐 세포 이동을 실시하였으며 이동이 끝난 막은 H&E 염색을 실시하여 웰 마다 5 시야를 무작위로 촬영하여 이동한 세포 수를 계산하였다.

### Western blot

1% gelatin이 피복된 60 mm 배양접시에 내피세포를 sub-confluency 될 때까지 배양하였다. 성장한 내피세포에 500 nM의 PK5를 30 분간 전처리 한 후 다시 bFGF 3 ng/ml을 30 분간 처리하였다. 처리가 끝난 세포들을 차가운 PBS로 세척하여 모든 반응을 중단시킨 후 세포를 긁어서 tube에 모은 후 원심분리 하여 pellet을 얻었다. 세포의 단백질을 얻기 위하여 pasive lysis buffer (Promega, Madison, WI)를 첨가하여 10 분마다 한번씩 vortex하며 30 분간 ice에서 반응시켰다. 14,000 rpm에서 30 분간 (4°C) 원심분리 하여 얻은 세포 추출액을 Bradford 단백질 정량법을 이용하여 정량 한 후 동량의 단백질을 5× SDS-PAGE gel sample buffer와 잘 섞어준 후, 10 분간 끓여주었다. SDS-PAGE 실시 후, 0.2 µm 니트로셀룰로오스 막에 전기적으로 이동시켰다. 니트로셀룰로오스 막을 30 분간 blocking 완충액 (5% skim milk in TBST; 10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20)으로 처리한 후, TBST로 10 분씩 3 회 세척하였다. phospho-ERK1/2 antibody (Cell Signaling, Danvers, MA)를 1:1000의 비율로 blocking 완충액에 희석하여 하루 동안 반응시킨 후, 이 막을 TBST로 10 분씩 3 회 세척하고 blocking 완충액으로 1:1000 희석한 anti-rabbit IgG-HRP (Cell signaling)를 2차 항체로 1 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 TBST로 10 분씩 3 회 세척한 후 ECL solution (Amersham, UK)으로 처리 후 X선 필름에 노출시켰다.

### 면역형광 분석

HUVEC을 gelatin이 coating 되어진 cover slip위에 seeding하고 배양하였다. 세포는 혈청이 첨가되지 않은 EBM-2 배지로 4 시간 동안 배양한 후 PK5를 30 분간 전처리 하여주고, 3 ng/ml bFGF를 30 분간 더 처리하였다. 세포는 4% paraformaldehyde로 고정하고 1% BSA로 비특이적 결합을 없애주었다. Anti-vinculin antibody는 1:1000으로 실온에서 3 시간 동안 반응하였고, FITC가 결합된 2 차 항체를 1:500으로 희석하여 반응시켰다. Rhodamin이 결합된 phalloidin으로 actin을 염색하고 핵 염색을 위해 DAPI를 사용하였다. Coverslip은 0.05% tween-20이 포함된 PBS로 세척하고 마운틴 용액을 이용하여 형광 해상력을 증가시켰다. 형광 이미지는 OLYMPUS AX70 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) fluorescence microscope을 통해 관찰하였고 DP70 camera via

DP Manger version 2, 1, 1, 163 software (OLYMPUS)를 사용하여 사진 촬영을 실시하였다.

### 결과 및 고찰

#### *P. pastoris*에서 재조합 PK5의 발현 및 정제

Kringle로서 가장 강력하게 내피세포 증식을 억제하는 것으로 알려진 PK5를[1] 재조합 단백질로 발현하기 위하여, Thr456부터 Phe546에 이르는 plasminogen의 서열을 암호화하는 cDNA 부분에 대해 PCR 증폭을 수행하여 pPICZa-C 벡터의 Cla I-Xba I, site에 in frame으로 클로닝 하였다. 제한 효소 Cla I, Xba I 으로 잘랐을 때-삽입된 DNA가 258bp 크기임을 확인하였고, 염기서열을 조사하였을 때 PK5 서열이 정확함을 확인하였다. SacI으로 자른 재조합 플라스미드를 *P. pastoris* GS115에 electrophoration하는 방법으로 형질도입시키고 고농도 (1000 µg/ml)의 Zeocin이 포함된 YPD 평판에서 배양하였을 때 약 55개의 단일 군체가 형성되었다. 높은 수율로 단백질을 발현하는 단일 군체를 선별하기 위해서 4 일간 BMMH 배지에 0.5%가 되도록 메탄올을 첨가하여 단백질 발현을 유도한 후 군체가 분비한 단백질을 함유한 배양액을 SDS-PAGE 실시한 결과 2 번 군체가 가장 많이 발현하는 것으로 확인하였다. 따라서, 이를 2 l BMGH 배지에서 배양한 후, 400 ml BMMH 배지로 교환하여 96 시간 동안 메탄올 유도를 실시한 후, 얻은 배양액을 농축하였고, 투석 후 S-spin 컬럼을 이용하여 정제하였다. 최종적으로 정제된 단

백질은 Bicinchoninic acid assay 분석에 의해 약 26 mg 얻어진 것을 확인하였다(Fig. 1A). SDS-PAGE상에서 Coomassie blue 염색에 의해 확인하였을 때, 한 개의 major 단백질 밴드만 보여 정제 시 비특이 결합에 의한 불순 단백질은 관찰되지 않았고, 비환원 조건에서 이동한 단백질 밴드가 약 10 kDa 예상 크기 부분에서 나타났고, 환원 조건에서는 좀 더 느리게 이동함을 관찰하였다. 이황화 결합 파괴에 의한 환원 조건에서 단백질 이동이 느린 것으로 볼 때, 재조합단백질의 이황화 결합이 유지된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 1B). 선행 연구를 통해서도 구조가 유사한 urokinase kringle domain을 효율적으로 *Pichia* 발현 시스템을 통해 발현하여 보고한 바가 있어[12].kringle 구조가 효모에서 효율적으로 발현됨을 알 수 있다. 또한 PK5를 대장균에서 발현 시켰을 때 inclusion body를 형성하므로, 시간, 노동을 요구하는 *in vitro* refolding 과정이 필수적으로 요구된다. 따라서, *pichia* 발현을 통해 PK5를 가용성 형태로 배지에 분비되도록 발현시킨 후, 배양액을 정제하는 방법은 PK5를 효율적으로 생산할 수 있는 길을 제시한다 하겠다.

#### PK5의 내피세포 이동에 대한 억제 효과

정제한 재조합 PK5가 일차 배양한 내피세포의 이동에 어떠한 영향을 미치는 지 조사하였다. 먼저, wound migration assay에서 bFGF에 의해 유도된 내피세포 이동에 대한 효과를 보았을 때, 정제된 재조합 PK5가 1-1000 nM 농도 범위에서 농도 의존적으로 이동을 억제 하였다(Fig. 2A). 또한

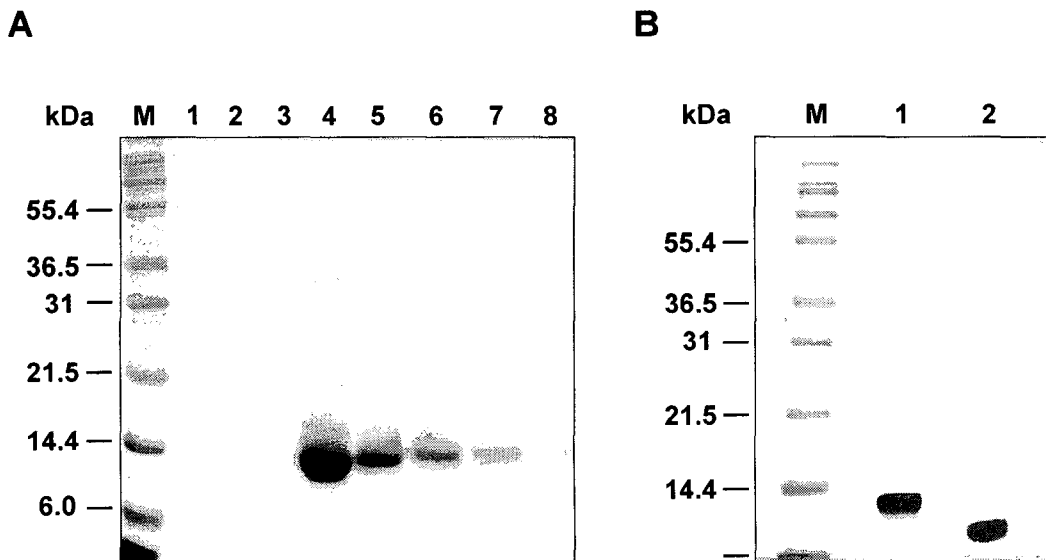


Fig. 1. Expression and purification of the recombinant PK5. (A) SDS-PAGE of the fractions obtained from S maxi spin column chromatography. Samples were subjected to electrophoresis on a 14% SDS-polyacrylamide-gel in Tris-glycine buffer under reducing condition. The gel was stained with Coomassie Brilliant Blue. Lane 1, pass-through fraction; lane 2-3, fractions washed with 20 mM potassium phosphate buffer (pH 5.5); lane 4-8, fractions eluted with 20 mM potassium phosphate buffer (pH 5.5, 1 M NaCl). (B) The purified PK5 was analyzed under reducing (1) and non-reducing conditions (2). M represents molecular mass standards.

modified Boyden-chamber assay를 실시하여 VEGF에 의한 chemotactic motility에 대한 재조합 PK5의 효과를 조사하였을 때, 강력하게 HUVEC의 이동을 억제함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2B). 두 assay 방법에서 IC<sub>50</sub> (최대 저해 효과의 50%를 나타내는 농도)는 대략 500 nM로 추정되었다. 따라서, PK5가 이동인자와 관계없이 내피세포 이동을 효과적으로 저해하는 것을 알 수 있었다. 이러한 내피 세포 이동 억제 효과는 *E.coli*에서 발현하여, denaturation, 정제, *in vitro* refolding 과정을 거쳐 얻은 PK5를 500 nM의 농도로 처리했을 때에도 관찰되었다(data not shown). Urokinase kringle도 PK5와 마찬가지로 내피세포의 이동을 성장인자에 따른 차별성을 보이지 않고 VEGF 또는 uPA가 유도한 HUVEC의 이동을 억제한다[13]. 흥미로운 것은 lysine binding 능력이 있는 PK4 domain의 경우 세포 증식 억제 효과는 없으나, 세포 이동 효과는 강력한 것으로 보고된 바 있다[2]. PK5의 경우엔 lysine 결합 능력을 갖고 있고 동일한 kringle 구조를 가졌어도 세포 증식 억제 효과와, 세포 이동 억제 효과를 동시에 보이므로 PK4와는 차별성이 보인다. 이는 3 차원적 구조는 유사하더라도 아미노산 서열 동일성이 52.5% 이므로, 두 kringle 간의 증식과 이동 억제에 작용하는 기능적 motif에 차이가 있을 것으로 예상되며, 이것이 무엇인지 밝혀 보는 것은 중요할 것 같다.

**ERK1/2 활성화 및 cytoskeleton 재배열 억제**

ERK1/2의 활성화는 내피세포 이동에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었으므로[6,29], 내피세포 이동억제와 관련된 신호 전달에 대한 PK5의 영향을 조사하였다. 혈청이 결핍된 배지에서 굵긴 배양 HUVEC에 재조합 PK5를 30 분간

전처리한 후 3 ng/ml의 bFGF로 세포를 자극하였다. 대조군으로 TK1-2를 전처리하지 않은 경우 bFGF의 처리 시 15 분 후 ERK1/2가 인산화 되었으나, PK5를 전처리한 세포에서는 인산화 정도가 감소된 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 이러한 결과는 PK5가 내피세포의 이동과 관련된 신호 전달계에 이상을 초래함으로써 내피세포의 이동을 억제하는 것으로 보여 진다.

Growth factor와 세포의 상호작용은 actin stress fiber와 focal adhesion plaque의 형성을 촉진하고 이는 세포의 이동에 영향을 미친다[18,26]. bFGF에 의해 유도된 세포골격의 재배열에 PK5가 어떤 영향을 미치는지를 알아보기 위해 phalloidin과 vinculin항체로 세포 면역 염색을 실시하였다. bFGF만을 처리한 세포는 세포 전반에 걸쳐 actin stress fiber

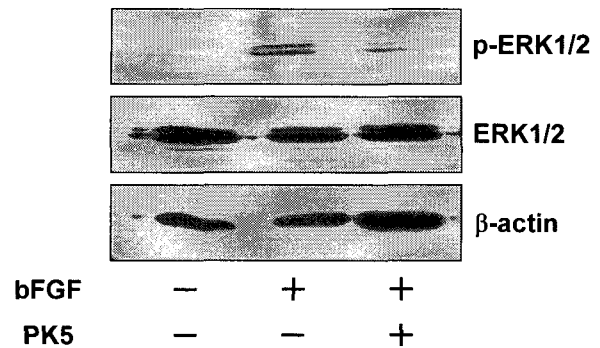


Fig. 3. Inhibition of ERK1/2 phosphorylation by PK5. HUVECs were stimulated with bFGF (3 ng/ml) for 30 min after pre-treatment of PK5 at 500 nM. Cell were harvested and subjected to western blot analysis. PK5 decreased ERK1/2 phosphorylation upon bFGF stimulation.

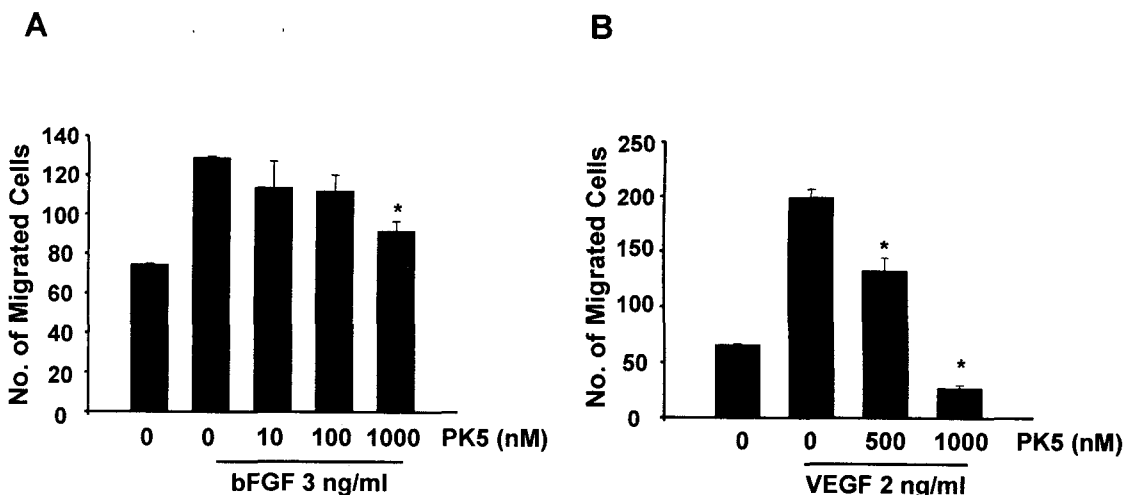


Fig. 2. Inhibitory effect of the purified PK5 on endothelial cell migration. (A) Wound migration assay; HUVECs were plated, scraped, and incubated in EBm-2 supplemented with 3 ng/ml bFGF in the absence or presence of various concentrations of PK5. (B) Modified Boyden chamber assay; HUVEC migration was induced in a 48 well chemotactic chamber by VEGF (2 ng/ml) in the presence or absence of PK5 (500 nM or 1000 nM). Values represent the mean of three independent experiments (mean ± S.E). \*P<0.01, compared with non-treated cells.

가 형성 되는 것이 확인된 반면 PK5를 30 분간 전처리 한 세포들에서는 이러한 actin stress fiber 형성이 전반적으로 억제 되는 것이 관찰되었다(Fig. 4).

따라서, 이들의 결과들은 PK5가 세포이동에 관련한 신호 전달 과정에 ERK1/2 활성화를 저해하고 세포 이동에 필요한 세포 골격 재배열을 저해하여 내피세포 이동을 억제함을 시사한다. 이러한 PK5의 억제 효과는 apolipoprotein kringle V (LK8)의 경우에도 actin stress 형성과 focal adhesion 형성을 저해하는 것이 관찰되어 상응하는 양상을 보인다[14]. 그러나, 이 경우 ERK의 인산화를 저해하지 못하였고 FAK의 티로신 인산화를 감소시켰다. 반면에 angiotatin은 integrin  $\alpha v\beta 3$ 에 결합하여 내피세포의 이동을 억제하는 것이 관찰된 바 있고[28], 다른 독립된 연구에서 ERK1/2 활성을 억제하는 것이 보고되었다[25]. PK5가 어떤 기전에 의해 ERK 인산화를 저해하는지, 그리고 세포 재배열을 억제하는 지는 후속 연구를 통해 밝혀져야 할 것 같다.

현재 까지 제안된 PK5의 수용체는 다양하다. 한 예로 voltage-dependent anion channel에 작용하여 세포내 pH를 감소시키고 mitochondria 막의 hyperpolarization을 유도하여 세포증식을 억제하는 것이 보고된 바 있다[5]. 또한 다른 그룹에서는 세포 표면에 발현하는 glucose-regulated protein 78을 매개로하여 내피세포와 암세포에 세포 고사를 유도한다고 보고하였다[3]. 그렇지만 이들은 세포 증식에 초점을 두고 세포이동에 이들 수용체가 관여 하는 지는 보고하지 않아

세포 이동에 영향을 주는 지는 확실하지 않다. 세포이동과 증식에 차별화된 kringle의 활성을 볼 때 이 두 과정에 대한 kringle의 작용점이 다를 것이 예상되므로, 이 두 수용체가 세포 이동에 관여하지 않을 가능성도 있다. 따라서, 본 연구에서 제시한 세포 이동에 대한 PK5의 작용기전에 대한 정보는 PK5의 작용에 대한 이해를 넓히는 데 도움을 줄 것으로 사료된다.

### 요 약

Plasminogen kringle 5는 plasminogen kringles 1-4로 구성된 내생의 혈관 신생 억제제인 angiotatin과 같이 내피세포의 분열을 강력하게 억제한다고 알려져 있다. 본 연구에서는 plasminogen kringle 5의 재조합 단백질을 효모 발현 체계에서 생산하여 내피세포의 이동에 대한 저해 효과와 이에 대한 작용기전을 조사하였다. 재조합 단백질 PK5는 plasminogen의 Thr456에서 Phe546까지 이르는 cDNA 부분을  $\alpha$ -factor prepro-peptide의 분비 신호 서열 뒤에 도입하여 *Pichia pastoris* GS115에서 발현시켰다. 페탄올 유도 후 얻은 배양액을 S-spin column을 이용하여 정제하였다. 정제된 단백질을 SDS-PAGE하였을 때 약 10 kDa의 단일 밴드를 나타냄을 확인할 수 있었다. 정제된 PK5는 bFGF나 VEGF에 의해 유도된 인간의 제대 유래 내피 세포의 이동을 약 500 nM의  $IC_{50}$  값으로 농도 의존적으로 감소시켰다. 내피 세포에 PK5

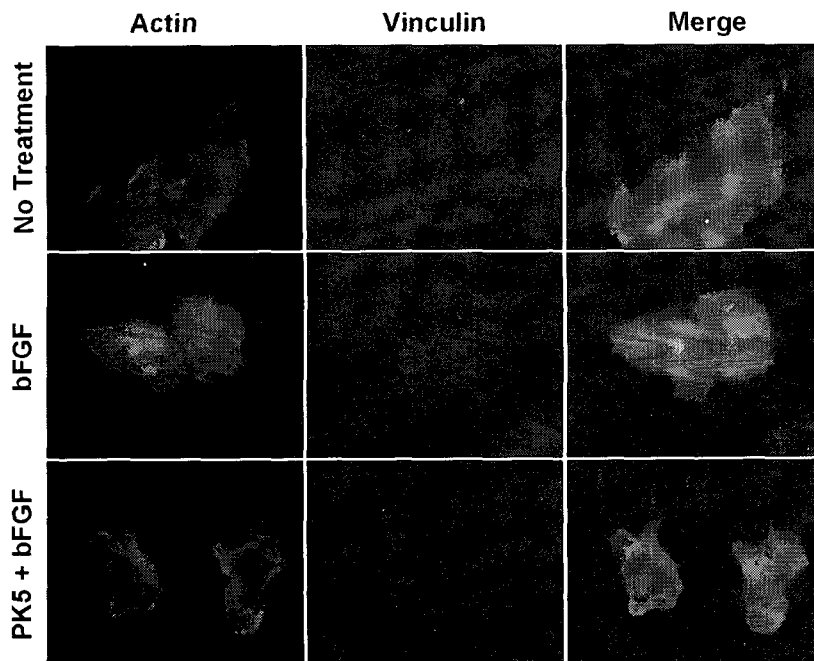


Fig. 4. PK5 potently inhibits cytoskeletal rearrangement. HUVECs were grown on glass coverslip and serum-starved for 4 h. Cells were pre-treated with PK5 for 30 min and then added with bFGF for 30 min. The cells were fixed, immunostained with antibodies against vinculin, and then stained with rhodamin-conjugated phalloidin and DAPI. Treatment of PK5 suppressed the formation of actin stress fibers compared with that of bFGF alone. (400 x magnification)

500 nM을 처리한 결과 bFGF에 의해 유도된 ERK1/2의 인산화를 감소시켰다. 또한, PK5는 bFGF에 의해 유도된 내피세포의 골격 재형성을 강력하게 억제하는 것으로 관찰되었다. 따라서, 이러한 결과들은 효모 생산 PK5가 내피세포의 이동을 효과적으로 억제하며, 이는 ERK1/2의 활성화와 세포골격의 재배열을 억제함으로써 나타나는 것으로 부분적으로 설명될 수 있다.

## 감사의 글

이 논문은 2003년 한국학술진흥재단의 지원에 의해 연구되었음. (KRF-2003-015-C00446)

## 참고 문헌

- Cao, Y., A. Chen, S. S. An, R. W. Ji, D. Davidson and M. Llinas. 1997. Kringle 5 of plasminogen is a novel inhibitor of endothelial cell growth. *J. Biol. Chem.* **272**, 22924-22928.
- Cao, Y., R. W. Ji, D. Davidson, J. Schaller, D. Marti, S. Sohndel, S. G. McCance, M. S. O'Reilly, M. Llinas, J. Folkman. 1996. Kringle domains of human angiostatin. Characterization of the anti-proliferative activity on endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 29461-29467.
- Davidson, D. J., C. Haskell, S. Majest, A. Kherzai, D. A. Egan, K. A. Walter, A. Schneider, E. F. Gubbins, L. Solomon, Z. Chen, R. Lesniewski, J. Henkin. 2005. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. *Cancer Res.* **65**, 4663-4672.
- Gimbrone, M. A., R. S. Jr. Cotran, S. B. Leapman and J. Folkman. 1974. Tumor growth and neovascularization: an experimental model using the rabbit cornea. *J. Natl. Cancer Inst.* **52**, 413-427.
- Gonzalez-Gronow, M., T. Kalfa, C. E. Johnson, G. Gawdi and S. V. Pizzo. 2003. The voltage-dependent anion channel is a receptor for plasminogen kringle 5 on human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **278**, 27312-27318.
- Huang, C., K. Jacobson and M. D. Schaller. MAP kinases and cell migration. 2004. *J. Cell. Sci.* **117**, 4619-4628.
- Jaffe, E. A., R. L. Nachman, C. G. Becker and C. R. Minick. 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin. Invest.* **52**, 2745-2756.
- Ji, W. R., F. J. Castellino, Y. Chang, M. E. Deford, H. Gray, X. Villarreal, M. E. Kondri, D. N. Marti, M. Llinas, J. Schaller, R. A. Kramer, and P. A. Trail. 1998. Characterization of kringle domains of angiostatin as antagonists of endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Faseb J.* **12**, 1731-1738.
- Ji, W. R., L. G. Barrientos, M. Llinas, H. Gray, X. Villarreal, M. E. DeFord, F. J. Castellino, R. A. Kramer, and P. A. Trail. 1998. Selective inhibition by kringle 5 of human plasminogen on endothelial cell migration, an important process in angiogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **247**, 414-419.
- Joe, Y. A., Y. K. Hong, D. S. Chung, Y. J. Yang, J. K. Kang, Y. S. Lee, S. I. Chang, W. K. You, H. Lee, and S. I. Chung. 1999. Inhibition of human malignant glioma growth in vivo by human recombinant plasminogen kringles 1-3. *Int. J. Cancer* **82**, 694-699.
- Kim, K. J., B. Li, J. Winer, M. Armanini, N. Gillett, H. S. Phillips and N. Ferrara. 1993. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature* **362**, 841-844.
- Kim, H. K., Hong, Y. K., Park, H. E., Hong, S. H. and Joe, Y. A.. 2003. Secretory production of recombinant urokinase kringle domain in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **13**, 591-597.
- Kim, K. S., Hong, Y. K., Joe, Y. A., Lee, Y., Shin, J. Y., Park, H. E., Lee, I. H., Lee, S. Y., Kang, D. K., Chang, S. I., Chung, S. I. Anti-angiogenic activity of the recombinant kringle domain of urokinase and its specific entry into endothelial cells. 2003. *J. Biol. Chem.* **278**, 11449-11456
- Kim, J. S., Yu, H. K., Ahn, J. H., Lee, H. J., Hong, S. W., Jung, K. H., Chang, S. I., Hong, Y. K., Joe, Y. A., Byun, S. M., Lee, S. K., Chung, S. I. and Yoon, Y.. 2004. Human apolipoprotein(a) kringle V inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo* by interfering with the activation of focal adhesion kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **313**, 534-540.
- Lee, T. H., Rhim, T. and Kim, S. S. 1998. Prothrombin kringle-2 domain has a growth inhibitory activity against basic fibroblast growth factor-stimulated capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 28805-28812.
- Magnusson, S., L. Sottrup-Jensen, H. Claeys, M. Zajdel and T. E. Petersen. 1975. Proceedings: Complete primary structure of prothrombin. Partial primary structures of plasminogen and hirudin. *Thromb. Diath. Haemorrh.* **34**, 562-563.
- McLean, J. W., J. E. Tomlinson, W. J. Kuang, D. L. Eaton, E. Y. Chen, G. M. Fless, A. M. Scanu and R. M. Lawn. 1987. cDNA sequence of human apolipoprotein(a) is homologous to plasminogen. *Nature* **330**, 132-137.
- Morales-Ruiz, M., D. Fulton, G. Sowa, L. R. Languino, Y. Fujio, K. Walsh, W. C. Sessa. 2000. *Circ. Res.* **86**, 892-896.
- Moser, T. L., D. J. Kenan, T. A. Ashley, J. A. Roy, M. D. Goodman, U. K. Misra, D. J. Cheek and S. V. Pizzo. 2001. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 6656-6661.
- Moser, T. L., M. S. Stack, I. Asplin, J. J. Enghild, P. Hojrup, L. Everitt, S. Hubchak, H. W. Schnaper, S. V. Pizzo. 1999. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2811-2816.
- O'Reilly, M. S., L. Holmgren, Y. Shing, C. Chen, R. A. Rosenthal, M. Moses, W. S. Lane, Y. Cao, E. H. Sage, J. Folkman. 1994. Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor

- that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79**, 315-328.
22. O'Reilly, M. S., T. Boehm, Y. Shing, N. Fukai, G. Vasios, W.S. Lane, E. Flynn, J. R. Birkhead, B. R. Olsen, J. Folkman. 1997. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell* **88**, 277-285.
  23. Parangi, S., M. S. O'Reilly, G. Christofori, L. Holmgren, J. Grosfeld, J. Folkman and D. Hanahan. 1996. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 2002-2007.
  24. Pennica, D., W. E. Holmes, W. J. Kohr, R. N. Harkins, G. A. Vehar, C. A. Ward, W. F. Bennett, E. Yelverton, P. H. Seeburg, H. L. Heyneker, D. A. Goeddel, D. Collen. 1983. Cloning and expression of human tissue-type plasminogen activator cDNA in *E. coli*. *Nature* **301**, 214-221.
  25. Redlitz, A., G. Daum, E. H. Sage. 1998. Angiostatin diminishes activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and ERK-2 in human dermal microvascular endothelial cells. *J. Vasc. Res.* **36**, 28-34.
  26. Rousseau, S., F. Houle and J. Hout. Integrating the VEGF signals leading to antin-based motility in vascular endothelial cells. 2000. *Trends Cardiovasc Med.* **10**, 321-327.
  27. Steffens, G. J., W.A. Gunzler, F. Otting, E. Frankus and L. Flohe. 1982. The complete amino acid sequence of low molecular mass urokinase from human urine. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* **363**, 1043-1058.
  28. Tarui, T., M. Majumdar, L. A. Miles, W. Ruf and Y. Takada. 2002. Plasmin-induced migration of endothelial cells. A potential target for the anti-angiogenic action of angiostatin. *J. Biol. Chem.* **277**, 33564-33570.
  29. Tournaire, R., M. R. Simon, F. I. noble, A. Eichmann, P. England and J. Pouyssegur. A short synthetic peptide inhibits signal transduction, migration and angiogenesis mediated by Tie2 receptor. 2004. *EMBO Reports* **5**, 262-267.
  30. Troyanovsky, B., T. Levchenko, G. Mansson, O. Matvijenko and L. Holmgren. 2001. Angiomotin: an angiostatin binding protein that regulates endothelial cell migration and tube formation. *J. Cell. Biol.* **152**, 1247-1254.