

의학 석사학위 논문

Protein Kinase C- γ 에 의한 c-Met
활성 증가의 기전

아주대학교 대학원

의학과

김 율

Protein Kinase C- γ 에 의한 c-Met
활성 증가의 기전

지도교수 이 재 호

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

김 율

김윤의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 이 재 호 인

심 사 위 원 조 혜 성 인

심 사 위 원 김 욱 환 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

사랑하는 나의 가족

아빠, 엄마, 오빠 그리고 태희 언니에게 감사함을 전합니다.

Protein Kinase C- γ 에 의한 c-Met 활성화 증가의 기전

Protein kinase C (PKC) family는 11가지의 isoenzyme으로 이루어져 있고 hepatocyte growth factor receptor 인 c-Met의 tyrosine kinase activity를 down modulation 한다고 보고되어왔다. 하지만 HGF/c-Met의 신호 전달에 있어서 각각의 PKC isoenzyme이 어떠한 역할을 하는지는 아직 밝혀지지 않았다. 본 연구에서는 PKC isoenzyme 중 하나인 PKC- γ 가 HGF/c-Met의 신호 전달에 미치는 영향과 그것의 기전을 연구하였다. 이전에 알려진 것과는 반대로 PKC- γ 가 transfection된 NIH3T3 세포주에서 Met의 활성이 증가하는 up-modulation 현상을 최초로 관찰하였다. 이러한 Met의 autophosphorylation의 증가는 PKC- γ 의 inhibitor인 Gö6976에 의해서 저해되었다. 또한 PKC- γ 가 transfection된 NIH3T3 세포주에서 Met의 downstream signaling molecule인 Erk의 인산화도 parental NIH3T3 cell에 비해 현저히 증가하였다. PKC- γ 의 activity을 살펴보기 위하여 membrane으로의 translocation을 살펴본 결과, HGF 처리 후에 PKC- γ 가 membrane으로 이동하는 현상은 관찰할 수 없었지만 많은 양의 PKC- γ 가 PKC- α 와는 다르게 membrane에 constitutive하게 위치하고 있었다. 또한 PKC- γ 는 Met과 결합하고 있음을 co-assay로 확인하였다. PKC- γ 가 어떠한 기전을 통해서 Met의 activity에 영향을 주는지 알아보기 위해서 PKC- γ /NIH3T3 세포주에서 Met을 immunoprecipitation하고 phospho-Serine 항체를 이용하여 살펴본 결과 Met의 serine이 인산화 되는 것을 볼 수 있었다. 따라서 PKC- γ 가 Met의 serine을 인산화 시키는 자리를 찾기 위해서 Met의 cytosol 부분을 나누어 GST fusion protein을 제작하였다. *In vitro* kinase assay 결과 PKC- γ 는 Met의 juxtamembrane 부분을 direct하게 인산화시킴을 알 수 있었고 이 부분의 peptide를 MALDI-TOF로 분석한 결과 serine1020

임이 확인되었다.

핵심어 : hepatocyte growth factor, c-Met, protein kinase C- γ ,
up-modulation

차 례

국문요약	i
차 례	iii
그림차례	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	4
A. 세포주 배양	4
B. 항체 및 시약	5
C. 면역 침전(Immunoprecipitation)과 Western blotting	5
D. 유전자 이입(Transfection)	5
E. 면역형광염색(Immunocytochemistry)	6
F. PKC- γ / Kinase assay	6
G. GST fusion protein 제작	7
H. <i>in vitro</i> kinase assay	8
I. GST pull down assay	9
J. MALDI-TOF 분석	9
III. 결과	10
A. PKC- γ 에 의한 c-Met의 autophosphorylation level 증가	10
B. PKC- γ 에 의한 Erk phosphorylation level의 증가	10
C. PKC- γ 와 c-Met의 결합	11
D. c-Met에 의한 PKC- γ activity의 변화	11

E. PKC- γ 에 의한 c-Met activation	13
F. PKC- γ 와 c-Met의 결합 부분	13
G. PKC- γ 에 의한 c-Met 의 Juxtamembrane 부분의 인산화	14
H. PKC- γ 에 의한 c-Met의 Ser1020의 인산화	14
IV. 고찰	28
V. 결론	31
참고문헌	32
영문요약	37

그림 차례

Fig. 1. In PKC- γ transfected NIH3T3 cells, c-Met autophosphorylation level was increased compared to that of the parental NIH3T3 cells	16
Fig. 2. The Erk phosphorylation level was significantly increased in PKC- γ transfected NIH3T3 cells with the treatment of HGF ..	17
Fig. 3. PKC- γ interacts with c-Met constitutively	18
Fig. 4. Co-immunoprecipitation assay revealed that treatment of HGF does not affect the association of PKC- γ with c-Met	19
Fig.5-1. Translocation of PKC- γ to the membrane was not observed after HGF treatment	20
Fig.5-2. In PKC- γ transfected NIH3T3 cells, tyrosine phosphorylation level of PKC- γ does not change significantly after treatment with HGF	21
Fig.5-3. Kinase activity of PKC- γ does not change after treatment with HGF in both <i>c-met</i> transfected and non transfected PKC- γ /NIH3T3 cells	22
Fig. 6. c-Met was activated by PKC- γ via serine phosphorylation	23
Fig. 7. PKC- γ binds to the juxtamembrane region and N-terminal half of tyrosine kinase domain of c-Met	24
Fig. 8. Juxtamembrane region of c-Met was phosphorylated by PKC- γ	25

Fig. 9. Serine1020 residue of c-Met was phosphorylated by PKC- γ 26

Fig. 10. GST-juxta-Met-S1020A was not phosphorylated by PKC- γ 27

I. 서론

간세포 성장 인자(hepatocyte growth factor, HGF)는 여러 장기의 중배엽 유래 세포로부터 분비되는 성장인자로서 그 수용체는 Met이라고 하는 receptor tyrosine kinase(Park M 등, 1987)이다. Met은 proto-oncogene인 *c-met*에 의하여 encoding되며 이황화 결합(disulfide bond)에 의한 α/β heterodimer 구조를 이루고 있다(Bottaro DP 등, 1991). 145kDa의 β chain은 ligand와 결합할 수 있는 extracellular domain, transmembrane domain 그리고 tyrosine kinase domain과 docking site를 가지고 있는 c-terminal domain으로 이루어져있다. Met의 extracellular 부분에 HGF가 결합하면서 Met의 kinase domain의 두 개의 tyrosine 잔기(Y1234, Y1235)의 인산화가 유도되고 이렇게 활성화된 Met은 multiple docking site의 tyrosine 잔기(Y1349, Y1356)를 인산화 시키는데, 이 docking site에 다양한 down-stream signal molecule들과 adaptor protein이 모여들면서 세포내로 신호를 전달하게 된다(Kyle A 등, 2000 ; Naldini L 등, 1991 ; Ferracini R 등, 1991 ; Rodrigues GA와 Park M, 1994 ; Longati 등, 1994).

많은 인간의 암에서 c-Met이 과발현 되어 있으며, 그렇지 않은 경우와 비교할 때 전이 되거나 예후가 좋지 않은 경우가 많다(Di Renzo 등, 1995 ; Ghossoub 등, 1998 ; Tsarfaty 등, 1999). 또한 c-Met의 tyrosin kinase activity를 증가시키는 c-Met의 germline missense mutation은 childhood hepatocellular carcinoma를 비롯한 여러 암에서 보고된 바가 있다(Park 등, 1999; Lee 등, 2000). 때문에 c-Met이 어떻게 switch 'on' 되고 'off'되는지 분

자적으로 이해하는 것은 암의 치료에 중요한 기초가 될 것이다.

c-Met 신호전달을 'off'시키는 down-regulation system의 기전으로는 다음 몇 가지가 보고되어 있다. 첫째로, c-Met이 활성화될 경우 인산화 된 tyrosine의 인산을 떼어내는 protein tyrosine phosphatase(PTP-S)가 있다. 사람의 위암에서 유래된 GTL 16 세포에 HGF를 처리하여 Met을 활성화 시키면 PTP-S가 c-Met의 juxtamembrane region에 결합하여 인산화 된 tyrosine의 탈인산화를 유도한다(Villa-Moruzzi E 등, 1998). 둘째로, c-Met 단백질의 분해가 있다. 이와 관련하여 최근 receptor tyrosine kinase(RTK)의 조절에 있어서 c-Cbl 전암 유전자에 관련된 보고들이 있다. c-Cbl은 ring finger domain을 가지고 있어 E3 ubiquitin-protein ligase의 기능과 E2-ubiquitin conjugating 효소의 역할을 한다고 알려져 있으며, 또한 tyrosine kinase binding 부위(TKB)를 가지고 있어 리간드에 의해 유도되는 RTK의 polyubiquitination에 중요한 역할을 하고 있음이 밝혀졌다(Lill NL 등, 2000). 그리고 c-Cbl이 직접적으로 결합에 관여하는 c-Met의 juxtamembrane 부분의 Y1003을 phenylalanine으로 치환하여 세포에 유전자 이입시킬 경우 c-Met의 ubiquitination이 현저하게 감소되어 NIH3T3 세포를 암화 시키는 현상을 보고하고 있다(Pascal P 등, 2001). 마지막으로 이전의 보고에는 c-Met의 serine 985가 protein kinase C(PKC)에 의해 인산화 됨으로써 Met의 tyrosine kinase activity가 음성적으로 조절된다고 알려졌다(Gandino L 등, 1990 ; Gandino L 등, 1994).

하지만 본 실험실에서는 이전에 알려진 것과는 반대로 PKC family중 (Kerrie J 등, 2000) PKC- γ 를 transfection 시킨 NIH3T3 세포주에서 Met의 activity가 증가하는 up-modulation 현상을 최초로 관찰하였다.(Kim, 2003) 본

연구에서는 PKC- γ 가 Met과의 결합을 통해 어떻게 HGF/c-Met의 신호 전달을 *up-modulation* 하는지 그 기전을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 세포 배양

NIH3T3 세포와 PKC- γ 와 δ 가 이입된 NIH3T3 세포는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, Grand Island, NY)에 10%(V/V) 우태아 혈청 (fetal bovine serum)과 1%의 antibiotic-antimycotic(Gibco BRL)을 첨가하여 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양되었다.

B. 항체 및 시약

Mouse c-Met에 대한 항체 (B-2), human c-Met에 대한 항체 (c-28), PKC- γ , PKC- δ , PKC- α 에 대한 항체는 Santa Cruz(Santa Cruz, CA)로부터 구입하였다. Mouse anti-phosphotyrosine 항체(4G10)는 Upstate Biotechnologies (Lake Placid, NY)에서, rabbit anti-phosphoserine 항체는 Zymed Laboratories Inc.에서 구입하였다. Rabbit phospho-Erk 항체는 Cell signaling Technology(Beberly, MA) 제품을 사용하였다.

Horseshoe peroxidase(HRP)가 결합된 anti-mouse IgG와 anti-rabbit IgG는 Amersham Pharmacia Biothec Inc. (Piscataway, NJ)에서 구입하였다. 12-O-tetradecanoyl-13 acetate(TPA)는 Calbiochem(La Jolla, CA)에서 구입하였다.

C. 면역 침전(immunoprecipitation)과 western blotting

100mm 배양 접시에 80% 정도 세포를 배양한 후 차가운 phosphate buffer saline(PBS)로 두 번 씻어준 후 protease inhibitors (10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)와 phosphatase inhibitors 5mM NaVO₄, 1mM NaF을 포함하는 RIPA buffer(20mM Tris pH7.4, 150mM NaCl, 1% TritonX-100, 0.1% SDS)로 용해시켰다. 세포의 lysate는 원심분리(10min, 4 $^{\circ}$ C, 11000rpm) 후 상등액을 취했다. 500 μ g의 단백질은 1 μ g의 c-Met 항체와 4 $^{\circ}$ C에서 12시간 이상 면역 반응을 시킨 후 50% slurry protein G-Sepharose(Invitrogen)을 20 μ l 넣고 1시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 이를 원심 분리하여 protein G-Sepharose를 침강시킨 후 RIPA buffer로 세 번 씻어내고 2X SDS sample buffer로 5분간 끓인다. 준비된 sample을 SDS-PAGE로 전기 영동하여 분리하고 nitrocellular membrane으로 전기 이동시켰다. membrane은 1% BSA(bovine serum albumin)가 녹아있는 PBST buffer(0.002% in PBS)로 1시간 동안 실온에서 blocking시킨다. 후에 적절한 농도의 일차 항체를 1% BSA가 녹아있는 PBST buffer에 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다. PBST buffer로 충분히 씻어준 후에 horseradish peroxidase가 결합되어있는 이차 항체를 1시간동안 실온에서 배양시킨다. 마찬가지로 PBST buffer로 씻어준 후에 ECL system (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, England)을 이용하여 발광시켜 X-ray flim에 감광시켰다.

D.유전자 이입 (transfection)

유전자를 세포에서 과발현 시키기 위해 형질도입을 시행하였다. 유전자 이입은 Lipofectamine Plus reagent(Invitrogen)을 사용하였다. 세포가 배양접

시에서 60% 자랐을 때 human c-Met 유전자를 NIH3T3 세포와 PKC- γ /NIH3T3 세포에 이입하였다. 유전자 이입한 후 48시간 후에 실험에 사용하였다.

E. 면역 형광 염색 (immunocytochemistry)

60mm 배양접시에 human c-Met 유전자를 이입하고 12시간 후에 coverslip이 깔려있는 6well plate로 위로 옮겨 키운 후 차가운 PBS로 세척하고 acetone : methanol(1:1) 용액으로 고정하였다. 고정된 세포를 차가운 PBS로 세척한 후 0.075% Triton X-100이 들어있는 PBS로 5분간 permeabilization 시켰다. 1% BSA를 포함한 PBS로 상온에서 1시간 동안 blocking하였다. 이차 항체 c-Met antibody(DL-21, Upstate)과 PKC- γ antibody를 1% BSA가 포함된 PBS에 각각 1:1000과 1:500으로 희석시킨 후 4℃에서 12시간 동안 incubation 하였다. PBS로 세 번 세척 후에 이차 항체 Cy3-conjugated anti-mouse IgG와 FITC-conjugated anti-rabbit IgG 를 상온에서 1시간 반응시킨다. PBS로 충분히 씻어준 후 슬라이드 글라스 위에 mount하고 형광 현미경(Olympus Fluoview)으로 관찰하였다.

F. PKC-g kinase assay

PKC- γ /NIH3T3 세포를 protease inhibitor(10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)와 phosphatase inhibitor (1mM NaF, 0.1mM Na₃VO₄)를 포함하는 PKC extraction buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20, 1mM EDTA, 2.5 mM EGTA, 10% glycerol)로 lysis시켰다. 500 μ g의 cell extract protein을 1 μ g의

anti-PKC- γ 항체와 4°C에서 12시간 incubation시킨 후 20 μ l의 protein G-Sepharose를 넣고 4°C에서 1시간 동안 더 incubation했다. 이를 원심 분리하여 protein G-Sepharose를 침강 시킨 후 PKC extraction buffer로 두 번 세척하고 마지막에 IP kinase buffer (50mM HEPES, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 1mM dithiothreitol, 2.5 mM EGTA, 1mM NaF, 0.1mM Na₃VO₄)로 세척한 후에 20 μ l의 IP kinase buffer를 넣어서 잘 섞어주었다. Kinase 반응은 40 μ l의 IP kinase buffer에 5 μ g의 Histone H1 substrate과 5 μ Ci 의 [γ -³²P] ATP를 넣어서 시작하고 30°C에서 30분동안 반응시켰다. 2X SDS sample buffer를 30 μ l 넣고 5 분간 끓여서 반응을 종결시키고 SDS-PAGE 전기영동을 하고 autoradiography로 확인하였다.

G. GST fusion protein 제작

c-Met의 세포내 부분을 나누기 위해 c-Met-juxtamembrane(956-1077), c-Met-TK1(1088-1174), c-Met-TK2(1175-1337) 그리고 c-Met-c-tail (1338-1390)을 각각 wild type c-Met cDNA로부터 중합 효소 반응 (polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 amplify하였다. PCR 반응물은 *Bam*HI-*Eco*RI 효소로 자른 후 pGEX4T-3 vector(Amersham-Pharmacia Biotech Inc.)에 삽입하여 cloning하였다. DNA sequencing을 의뢰하여 정확한 nucleotide sequence 를 확인하였다.

c-Met-juxtamembrane, c-Met-TK1, c-Met-TK2 그리고 c-Met-c-tail protein들은 pGEX-4T-3 plasmid vector 에 의해 GST (glutathione S-transferase) encoding하는 fusion protein으로 발현된다. expression plasmid 를 *E.coli* BL21 strain에 transformation시키고 transformant는 37°C LB

medium에서 O.D 0.4-0.5 정도까지 배양시켰다. IPTG(isopropyl β -D-thiogalactoside)를 1mM이 되게 넣어주고 30°C에서 3시간 동안 배양시킨 후 BL21 cell을 침강시켜서 얻었다. Protease inhibitor(10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride)와 1m DTT를 포함하는 PBS를 넣고 sonication하여서 단백질을 용해시켰다. 용해도를 높이기 위해서 Triton X-100을 1%(v/v)되게 넣어주었다. Debris를 제거한 후에 GST fusion protein은 4°C에서 2시간 동안 glutathione-Sepahrose 4B bead (Peptron)에 결합시켜 affinity-purified 하였다. Detergent를 제거하기 위해서 bead-bound fusion protein을 6번 이상 차가운 PBS로 세척하고 결합된 GST fusion protein은 mild elution buffer (10mM reduced glutathione)를 이용하여 4°C에서 12시간 동안 incubation 시켜 elution하였다.

H. *in vitro* kinase assay

10X reaction buffer(200mM HEPES, pH7.5, 0.3% TritonX-100) 2.5 μ l, 1mM CaCl₂ 2.5 μ l, PKC lipid activator(Upstate) 2.5 μ l, distilled water 2.5 μ l, 75mM MgCl₂, 5mM EGTA, 10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 1mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄ 를 포함하는 20mM MOPS buffer 10 μ l 에 25ng의 recombinant PKC- γ 를 넣었다. Substrate로써 GST-c-Met-juxtamembrane, GST-c-Met-TK1, GST-c-Met-TK2 그리고 GST-c-Met-c-tail protein 5 μ g 을 각각의 tube에 넣고 5 μ Ci [γ -³²P] ATP와 30°C에서 10분 동안 incubation 시켰다. 6X SDS sample buffe를 넣고 5분간 끓여서 반응을 종결시키고 SDS-PAGE 전기 영동을 한 후 autoradiography로 확인하였다.

I. GST pull-down assay

GST-c-Met-juxtamembrane, GST-c-Met-TK1, GST-c-Met-TK2 그리고 GST-c-Met-c-tail protein을 각각 glutathione-Sepahrose 4B beads pre-incubation시켰다. bead complex는 50 μ g의 PKC- γ /NIH3T3 cell lysate를 포함하는 200 μ l 의 lysis buffer(20mM Tris, pH7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS ,10 μ g/ml aprotinin, 10 μ g/ml leupeptin, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1mM NaF, 0.1 mM Na₃VO₄)와 12시간 이상 4°C에서 incubation하였다. Beads를 lysis buffer로 세 번 세척한 후 , 2X SDS sample buffer를 넣어 5분 동안 끓였다. SDS-PAGE 전기 영동하고 anti -PKC - γ 항체를 이용하여 immunoblotting하여 확인하였다.

J. MALDI-TOF 분석

recombinant PKC- γ 와 GST-c-Met-juxtamembrane을 in vitro kinase assay와 같은 방법으로 반응시킨 후 SDS-PAGE 전기 영동하여 GST-c-Met-juxtamembrane band만 분리한후 trypsin으로 digestion하였다. trypsin-digested peptide는 matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry에 의해서 분석되었다.

III. 결 과

A. PKC- γ 에 의한 c-Met 의 autophosphorylation level 증가

PKC- γ 가 transfection된 NIH3T3 세포에서 c-Met의 autophosphorylation level이 parental NIH3T3 세포와 비교하였을 때 현저하게 증가하는 현상을 보고한 바 있다(Kim, 2003). 본 연구자의 손으로 NIH3T3 세포와 PKC- γ 가 stable하게 transfection된 NIH3T3 세포에 HGF를 40ng/mL의 농도로 10분 동안 처리한 후에 면역 침전 반응(immunoprecipitation) 방법에 따라 c-Met(B-2)을 IP하고 phosphotyrosine 항체(4G10)를 이용하여 immunoblotting하였다. 역시 이전에 알려진 일반적인 PKC의 효과와는 반대로 PKC- γ 에 의해서 Met의 activity가 증가하는 up-modulation 현상을 볼 수 있었다(Fig.1.).

B. PKC- γ 에 의한 Erk phosphorylation level의 증가

PKC- γ 에 의해서 Met의 downstream signaling도 증가하는지 알아보기 위해 downstream signaling molecule인 Erk의 인산화 정도를 알아보았다. NIH3T3 세포와, PKC- γ /NIH3T3 세포에 HGF(40ng/mL)를 10분, 20분, 30분 동안 처리하고 phospo-Erk항체로 western blotting하여 분석해 본 결과 PKC- γ /NIH3T3 세포에서 Erk의 인산화가 현저히 증가하였다(Fig.2.).

NIH3T3 , PKC- γ /NIH3T3 세포주에서 Met의 발현양이 같다는 사실은 이미 Northern blotting과 IP-Western을 통해서 확인된 바 있다(Kim, 2003)

C. PKC- γ 와 c-Met의 결합

PKC- γ 와 c-Met의 관계에 있어서 가능한 기전으로 결합 여부를 살펴 보았다. NIH3T3 세포에는 세포내에서 발현되는 Met의 양이 적기 때문에 PKC- γ /NIH3T3 세포에 human Met을 transfection한 후에 c-Met 혹은 PKC- γ 를 immunoprecipitation하고 PKC- γ 혹은 c-Met 항체로 immunoblotting하였다. 그 결과 PKC- γ 와 c-Met은 constitutive하게 결합하고 있었다(Fig.3A. *left panel*). 반면에 PKC- δ /NIH3T3 세포에서는 PKC- δ 와 c-Met의 결합을 볼 수 없었다(Fig.3A. *right panel*).

또한 PKC- γ 와 c-Met의 localization을 면역 형광 염색법으로 확인하였다. Cover slip에 키운 세포를 고정하고 permeabilization 시키고 anti PKC- γ 항체로 incubation후에 FITC-labeled anti-rabbit 항체로, anti c-Met antibody incubation후에는 Cy3-labeled anti-mouse 항체로 incubation 하였다. Immunofluorescence는 confocal microscope으로 관찰하였다(Fig.3B.).

이 결과들로 PKC- γ 가 c-Met과 constitutive 하게 결합함으로써 영향을 주고 있음을 알 수 있다.

HGF에 의해서 PKC- γ 와 c-Met의 결합의 정도가 달라지는지 알아보기 위하여 PKC- γ /NIH3T3 세포에 HGF/SF(40ng/ml)를 각각 15분, 1시간, 4시간씩 처리하고 c-Met 항체나 PKC- γ 항체로 면역 침전한 후에 anti-PKC- γ 항체나 anti-c-Met 항체로 immunoblotting하였다. Co-immunoprecipitation assay 결과 PKC- γ 와 c-Met의 결합은 HGF-independent하였다(Fig.4).

D. c-Met에 의한 PKC-g 활성화

PKC는 그것이 외부 신호에 의해서 활성화되었을 때 세포질에서 세포

막으로 이동한다고 알려져 있다. HGF에 의한 PKC- γ 의 활성화를 알아보기 위하여 PKC- γ /NIH3T3 세포에 HGF로 자극을 준 후, PKC- γ 가 세포막으로 이동하는지 살펴보았다. 많은 양의 PKC- γ 가 PKC- α 와는 다르게 세포막에 위치하고 있지만 HGF의 자극에 의해서 세포막으로 이동하지 않았다(Fig.5-1. *upper panel*). PKC- α 는 NIH3T3 세포에서 많이 발현되고 있고 비활성화 상태에서는 세포질에만 위치한다고 알려져 있기 때문에 fractionation marker로써 사용하였다. PKC- γ 는 HGF에 의해서 세포막으로 이동하지는 않았으나 PKC의 activator인 TPA(100nM)에 의해서는 30분 만에 이동하며 (Fig.5-1 *lower panel*) 이 세포에서 PKC- γ 의 세포막 이동 능력에 문제가 있는 것은 아님을 보여주었다. 결과적으로 PKC- γ /NIH3T3 세포에서 PKC- γ 는 HGF에 의해서 이동하지는 않으며 기본적으로 세포막과 세포질 부분에 고루 분포하고 있었다.

또한 PKC는 활성화되었을 때 그것의 tyrosine이 인산화 된다고 보고 되었으므로 HGF로 자극을 주었을 때 PKC- γ transfected NIH3T3세포에서 PKC- γ 의 tyrosine 인산화 여부를 확인하였다. PKC- γ transfected NIH3T3세포에 HGF/SF(40ng/ml)를 각각 10분, 1시간, 4시간 처리한 후에 anti-PKC- γ 항체를 이용하여 immunoprecipitation한 후 anti-pTyr 항체를 이용하여 immunoblotting하였다. PKC- γ 의 tyrosine phosphorylation level 역시 HGF 처리 후에 크게 변화하지 않았다(Fig.5-2.).

PKC- γ 의 활성화 여부를 좀 더 확인하기 위해 PKC- γ /NIH3T3 세포에 *c-met*을 transfection하거나 (Fig.5-3. *upper panel*) 혹은 transfection하지 않았을 때 (Fig.5-3. *lower panel*) 각각의 세포를 PKC extraction buffer로 lysis 시킨 후 PKC- γ protein을 immunoprecipitation 하였다. Immunocomplex

kinase를 기질인 histone H1과 kinase reaction 시켜 본 결과 PKC- γ 의 Kinase activity는 *c-met* transfection여부에 관계없이 HGF에 의해 변화하지 않았다. 이상의 실험 결과들을 종합하여 볼 때 PKC- γ 의 활성화는 HGF에 의한 c-Met의 활성화 여부에 무관함을 알 수 있었다.

E. PKC- γ 에 의한 c-Met의 활성화

PKC- γ 에 의해 c-Met의 autophosphorylation 이 up-regulation 되는 기전을 찾기 위하여 c-Met의 serine이 PKC- γ 에 의해서 인산화되는지 살펴보았다. Human c-Met cDNA를 transfection한 NIH3T3 cells, PKC- γ /NIH3T3에 HGF를 10분 동안 처리하고 세포의 lysate를 IP-western blot으로 분석해본 결과 NIH3T3 세포와 비교할 때 PKC- γ /NIH3T3에서 Met의 serine 인산화가 증가하였다(Fig.6. *upper panel*). 또한 HGF-independent한 c-Met의 tyrosine 인산화 역시 PKC- γ /NIH3T3에서 NIH3T3 세포에 비해서 높게 나타났다(Fig.6. *lower panel*). 결과적으로 PKC- γ 가 HGF independent 한 c-Met의 serine 잔기의 인산화를 통해서 c-Met의 tyrosine 인산화를 증가시킴을 유추할 수 있다.

F. PKC- γ 와 c-Met의 결합 부분

PKC- γ 와 c-Met이 constitutive하게 결합하고 있음을 co-IP western을 통해서 확인했었다. 그렇다면 PKC- γ 가 c-Met의 어느 부분에 결합하고 있는지 알아보기 위하여 GST-pull down assay를 수행하였다. GST-c-Met-juxtamembrane, GST-c-Met-TK1, GST-c-Met-TK2 그리고 GST-c-Met-c-tail protein을 glutathione-Sepahrose 4B bead로 침전시킨다.

Bead complex는 PKC- γ /NIH3T3 세포의 lysate와 incubation한 후 SDS-PAGE 전기 영동하고 anti-PKC- γ 항체를 이용하여 immunoblotting하여 확인한 결과 PKC- γ 는 c-Met의 juxtamembrane부분과 kinase domain부분에 결합하고 있었고 많은 양의 PKC- γ 가 juxtamembrane 부분에 강하게 결합하고 있었다(Fig.7.).

G. PKC- γ 에 의한 c-Met의 juxtamembrane 부분의 인산화

이전에 보고된 바에 따르면 TPA에 의해서 유도된 c-Met의 serine 985의 인산화가 c-Met의 tyrosine 인산화를 감소시킨다고 알려졌다. PKC- γ 에 의해서 c-Met의 다른 serine 자리가 인산화 되면서 c-Met의 tyrosine 인산화를 증가 시킬 것이라고 예상된다. 전술한 GST-Met-fusion protein들을 활성형의 recombinant PKC- γ 와 [γ -³²P]-ATP와 함께 30°C 에서 10분 동안 반응시켰다. PKC- γ protein의 activation은 PKC의 기질로 잘 알려진 histone H1과 GST-MARCKS로 확인하였다. 실험 결과, GST-c-Met-juxtamembrane 부분만이 PKC- γ 에 의해서 direct하게 인산화 되었다(Fig.8.).

H. PKC- γ 에 의한 c-Met의 serine1020의 인산화

c-Met의 juxtamembrane 중 어느 serine/threonine 자리가 인산화 되는지 알아보기 위해 GST-c-Met-juxtamembrane을 active PKC- γ 와 반응시킨 후 MALDI-TOF로 인산화 자리를 분석하였다. 분석한 결과 c-Met의 serine1020이 PKC- γ 에 의해 인산화 되었다. (Fig.9).

GST-c-Met- *juxtamembrane*의 serine1020을 site-direct *mutagenesis* 한 후 protein을 purify하여 recombinant PKC- γ 와 반응시킨 결과, PKC- γ 에 의한 GST-c-Met- *juxtamembrane*의 direct한 인산화가 저해되었다. 반면 기존에 알려진 PKC의한 Met의 인산화 자리인 serine985를 site-direct *mutagenesis* 시킨 GST-c-Met- *juxtamembrane*-S985A는 PKC- γ 에 의해서 인산화가 유지되었다(Fig.10). 이는 PKC- γ 에 의한 Met의 인산화가 기존에 알려진 serine985가 아닌 serine1020을 인산화시킴으로써 Met의 tyrosine kinase 활성을 up-regulation 할 가능성을 시사하고 있다

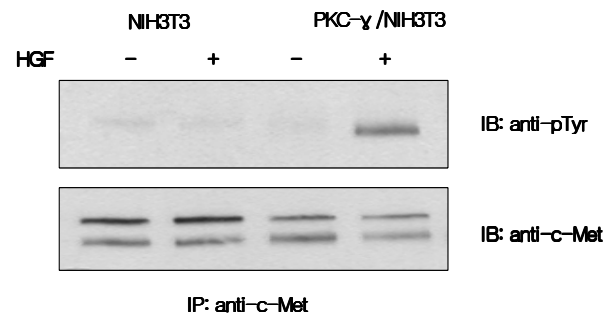


Fig.1. In PKC- γ transfected NIH3T3 cells, c-Met autophosphorylation level was increased compared to that of the parental NIH3T3 cells. -NIH3T3 cells, PKC- γ /NIH3T3 cells were incubated in the presence of HGF/SF(40ng/ml) for 10minutes at 37°C. c-Met was immunoprecipitated by c-Met antibody and immunoblotted by anti-pTyr or anti-c-Met antibody.

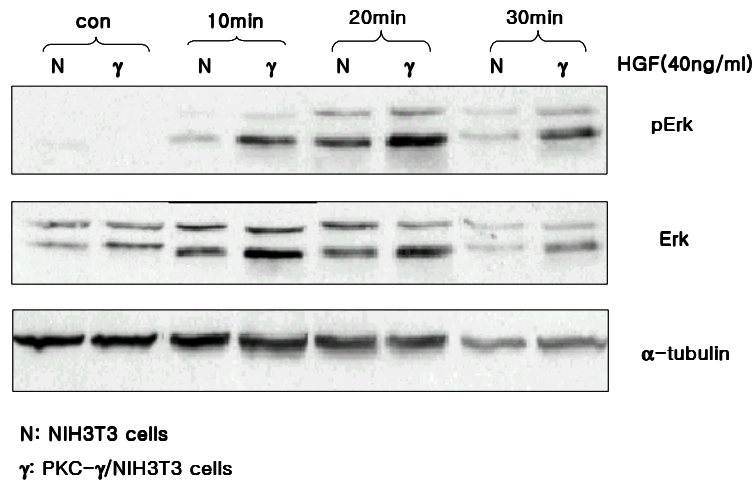


Fig.2. The Erk phosphorylation level was significantly increased in PKC- γ -transfected NIH3T3 cells with the treatment of HGF. NIH3T3 cells and PKC- γ NIH3T3 cells were incubated in the presence of HGF/SF(40ng/ml) for 10minutes, 20minutes and 30minutes at 37°C. Cell lysate from each cell line was subjected to western blot analysis with an phospho-Erk antibody.

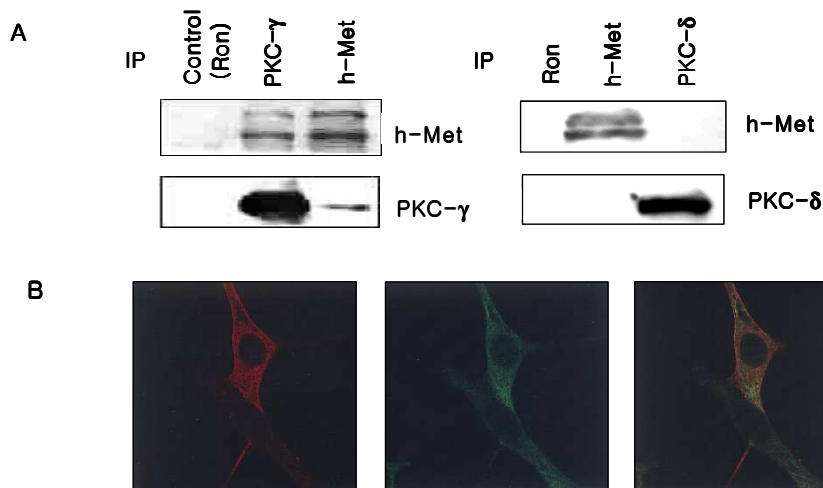


Fig.3. PKC- γ interacts with c-Met constitutively. A. Human c-Met cDNA was transfected into PKC- γ /NIH3T3 cells. After the transfection, co-immunoprecipitation of c-Met/PKC - γ was performed in human c-Met transfected PKC- γ /NIH3T3 or PKC- δ /NIH3T3 cells. PKC- γ interacts with c-Met constitutively. B. *Immuno-cytochemistry* of c-Met and PKC - γ . Cells grown on sterilized cover slips were fixed and then were permeabilized. The cover slips were incubated with anti PKC- γ antibody followed by incubation with FITC-labeled anti-rabbit antibody and with anti c-Met antibody followed by incubation with Cy3-labeled anti-mouse antibody. *Immunofluorescence* was visualized by confocal *microscope*. *Left*:c-Met (red),*middle* : PKC- γ (green),*right* : merge

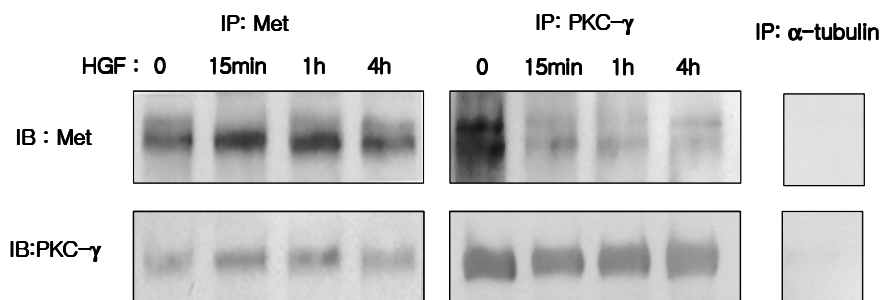


Fig.4. Co-immunoprecipitation assay revealed that treatment with HGF does not affect the association of PKC- γ with c-Met. Human c-Met cDNA was transfected into PKC- γ /NIH3T3 cells. PKC- γ /NIH3T3 cells were incubated in the presence of HGF/SF(40ng/ml) for 15minutes, 1hour and 4 hours, respectively at 37°C. Cell lysate was obtained. And c-Met was immunoprecipitated by c-28 antibody or PKC- γ was immunoprecipitated by anti-PKC- γ antibody and immunoblotted by anti-PKC- γ antibody or anti c-Met antibody.

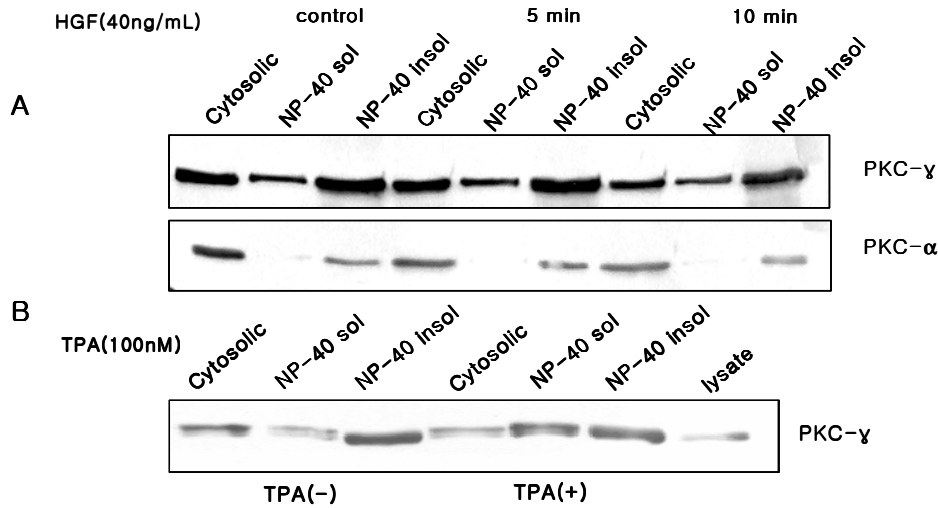


Fig.5-1. Translocation of PKC-g to the membrane after HGF treatment was not observed. PKC-g/NIH3T3 cells were stimulated with HGF/SF(40ng/ml) for 5minutes and 10minutes, respectively. Fractionation was performed according to NP-40 solubility. Western blotting was performed using anti-PKC- γ antibody. PKC- α was used as a fractionation marker. A significant amount of PKC- γ revealed to be constitutively localized at membrane fraction, unlike PKC- α . Cell was treated with TPA(100nM) for 30 min before western blotting to show that overexpressed PKC- γ translocated normally when activated by TPA.

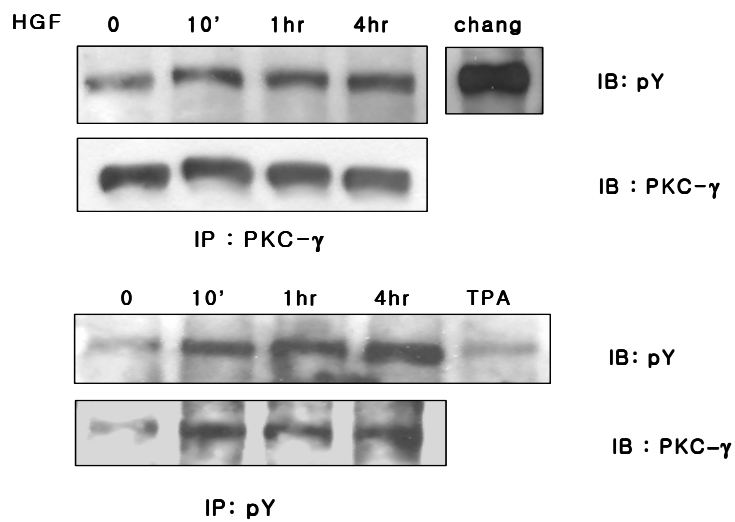


Fig.5-2. In PKC- γ transfected NIH3T3 cells, tyrosine phosphorylation level of PKC- γ does not change significantly after treatment with HGF. PKC- γ transfected NIH3T3 cells were incubated with HGF/SF(40ng/ml) for 10minutes, 1hour and 4 hours, respectively at 37°C. PKC- γ was immunoprecipitated by anti-PKC- γ antibody and immunoblotted by anti-pTyr antibody.

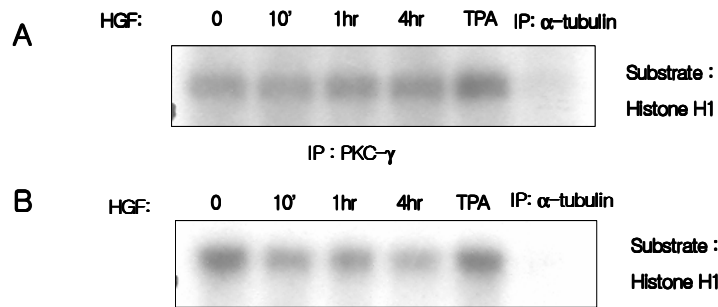


Fig.5-3. Kinase activity of PKC- γ does not change after treatment with HGF in both *c-met* transfected and non transfected PKC- γ /NIH3T3 cells. PKC- γ /NIH3T3 cells were transfected with A or without B *c-met*, and cellular proteins were extracted by cell lysis in PKC extraction buffer. The PKC- γ proteins were immunoprecipitated from these extracts using anti PKC- γ antibody, and then immunocomplex kinase reactions were performed using histone H1 as a substrate.

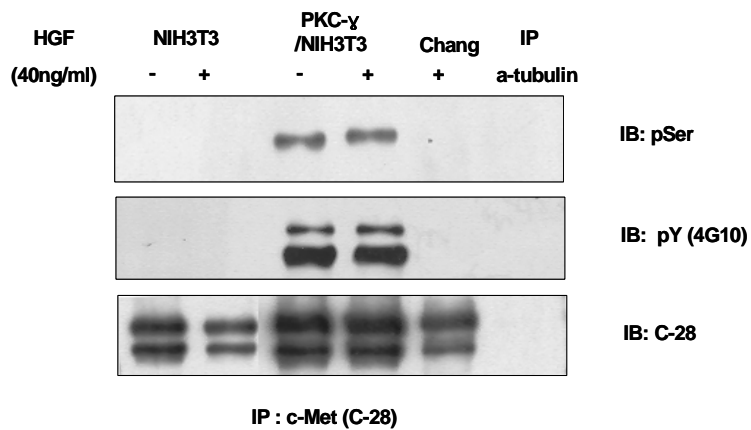


Fig.6. c-Met was activated by PKC-g via serine phosphorylation. Human c-Met cDNA was transfected into PKC- γ /NIH3T3 and parental NIH3T3 cells. Cell lysates from each cell line were subjected to IP-western blot analysis. c-Met was immunoprecipitated by anti c-Met antibody and immunoblotted by anti-pSer antibody or anti-pTyr antibody.

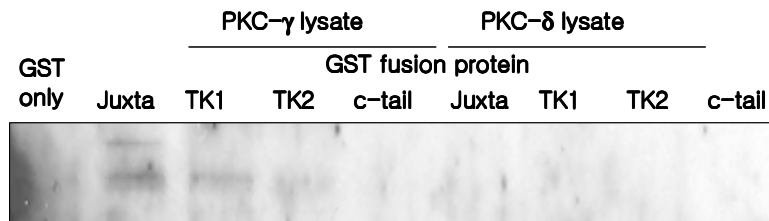
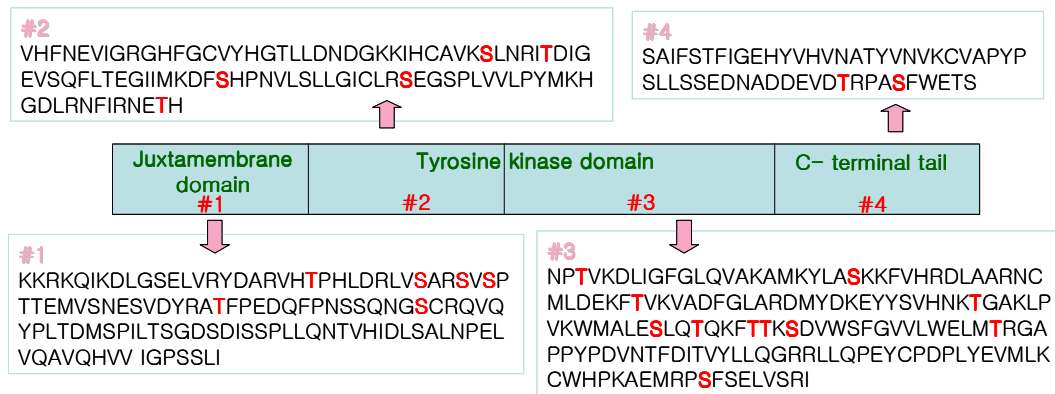


Fig.7. The Binding of PKC-g and GST-Met.

GST-c-Met-juxtamembrane, GST-c-Met-TK1, GST-c-Met-TK2 and GST-c-Met-c-tail proteins were pre-incubated with glutathione-Sepahrose 4B beads and the bead complex were incubated with 50 μ g of PKC- γ /NIH3T3 cell lysate in 200 μ l of lysis buffer overnight at 4 $^{\circ}$ C. After washed three times with lysis buffer, beads were boiled in 2X SDS sample buffer for 5 min. The products were analyzed by SDS-PAGE and detected with anti-PKC- γ antibody.

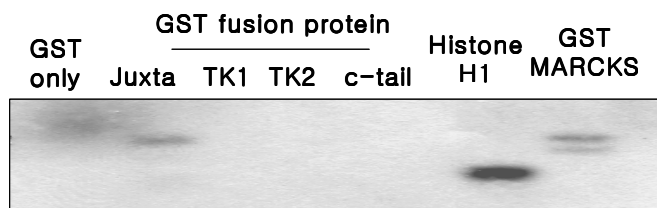


Fig.8. Juxtamembrane region of c-Met was phosphorylated by PKC-g. GST-Met fragments and active recombinant PKC-g were incubated with [γ - 32 P]ATP for 10min at 30°C in reaction buffer. The activation of PKC- γ proteins was performed using histone H1 and GST-MARCKS as the substrate.

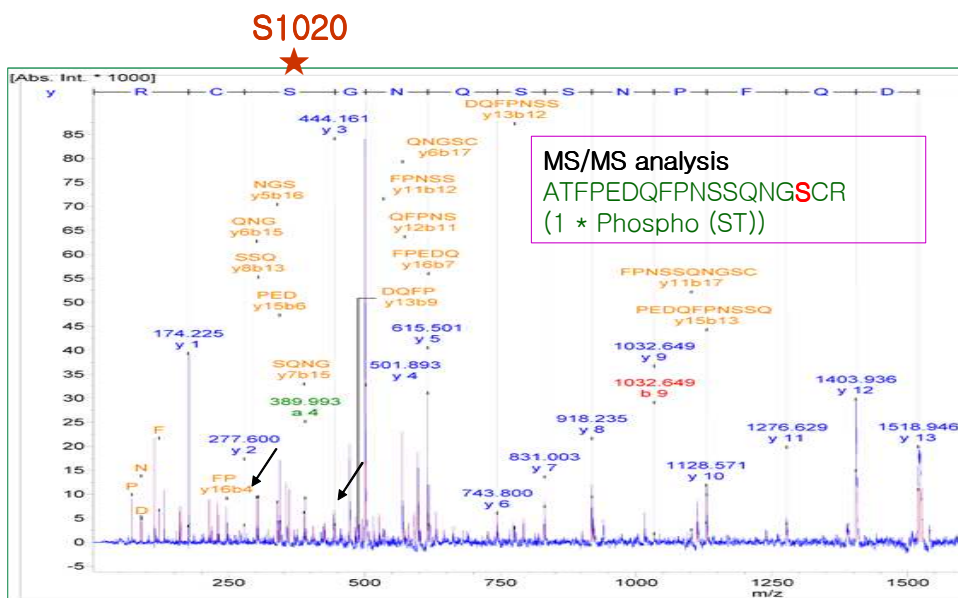


Fig.9. Serine1020 residue of c-Met was phosphorylated by PKC-g
Phosphorylation of GST-Met-juxtamembrane fragment by recombinant active PKC- γ was carried out and phosphorylated GST-Met-juxtamembrane was digested by trypsin. Fragments were subjected to mass spectrometry.

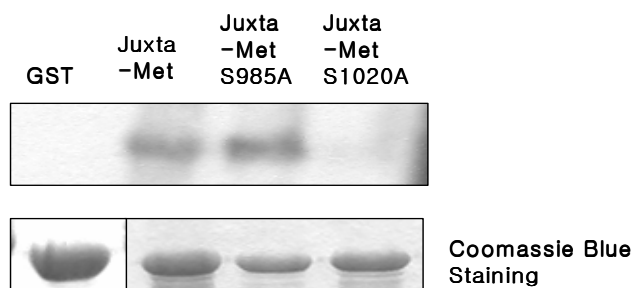


Fig.10. GST-juxta-Met-S1020A was not phosphorylated by PKC-g
 GST-juxta-Met, GST-juxta-Met-S1020A and GST-juxta-Met-S985A were
 incubated with active PKC- γ for 10min at 30°C in reaction buffer
 containing [γ - 32 P]-ATP. The reaction products were analyzed by
 SDS-PAGE and autoradiography.

IV. 고 찰

c-Met에 의한 암 발생과 암전이 원인은 세포막내에 존재하고 있는 β -아단위의 세포질내 부위에 존재하는 tyrosine kinase 효소 활성화 기능과 관련이 있다. 왜냐하면 HGF가 c-Met에 결합하여 c-Met이 활성화 되었을 때 tyrosine kinase 활성화에 의해 카르복실 말단 부위에 인산화가 되면서 여러 가지 세포 신호 전달 분자들의 활성을 유도하기 때문이다. 현재까지 tyrosine kinase 효소 활성화 부위에 관련된 암 발생 기전에는 비교적 많은 연구가 되어 왔다. Tpr-Met 융합 단백질에 의한 c-Met의 지속적인 활성화, HGF 자가 분비에 의한 c-Met의 지속적인 활성화, HGF와 Met의 비정상적인 과발현으로 인한 c-Met 활성화, 효소 활성화 부위의 점 돌연변이 등이 c-Met의 tyrosine kinase 효소 활성을 계속적으로 활성화 시켜 암을 일으킬 수 있다는 것이다. 이렇게 c-Met의 지속적인 활성화로 인하여 c-Met의 *downstream* 분자들의 신호 전달에도 지속적인 활성화를 가지게 하여 암 발생의 원인을 제공할 수 있다. 때문에 이러한 c-Met의 신호 전달을 음성적으로 조절하는 *down-regulation*에 관한 기전의 연구가 중요한 의미를 지니게 된다.

이전의 연구에서, receptor tyrosine kinase의 Ser/Thr 의 인산화는 receptor의 tyrosine 인산화를 저해하고 이는 특정한 Ser/Thr의 인산화가 receptor tyrosine kinase의 *autoinhibitory mechanism*을 제공할 수 있다는 것이 알려졌다. EGFR(Cochet C 등, 1984), insulin receptor(Takayama S 등,

1984), c-kit(Blume-Jensen P 등,1995), RET(Andreozzi F 등, 2003)과 같은 receptor tyrosine kinase가 PKC에 의해서 Ser/Thr 잔기가 인산화되고, 그 결과 tyrosine의 인산화가 저해됨이 알려져 있다.

c-Met에서도 마찬가지로 serine 985 잔기가 protein kinase C(PKC)에 의해 인산화 됨으로써 Met의 tyrosine kinase 활성이 음성적으로 조절된다는 보고가 있다. 하지만 PKC의 11가지의 다양한 isoenzyme들이 어떻게 c-Met을 조절하는지는 아직 연구되어 있지 않다. 본 실험실에서는 흥미롭게도 이전에 알려진 것과는 반대로 PKC family중 PKC- γ 를 transfection 시킨 NIH3T3 세포주에서 Met의 activity가 증가하는 up-modulation 현상을 최초로 관찰한 바 있다(Kim, 2003)(Fig.1.). 또한 PKC- γ 가 transfection된 NIH3T3 세포주에서 Met의 downstream signaling molecule인 Erk의 인산화도 parental NIH3T3 cell에 비해 현저히 증가하였다(Fig.2). 이렇게 PKC- γ 와 c-Met의 관계에 있어서 가능한 기전으로 그 둘의 결합을 살펴본 결과 두 분자는 HGF-independent하게 결합하고 있었다(Fig.3 and 4.). GST-pull down assay 결과 PKC- γ 는 c-Met의 juxtamembrane 부분에 많은 양이 결합하고 있고 tyrosine kinase domain 부분에도 적은 양의 PKC- γ 가 결합하고 있었다(Fig.7.).

PKC- γ 의 활성화를 여러 가지 방법으로 알아본 결과 HGF에 의해서 활성화 정도가 변하지는 않았으나 PKC- γ /NIH3T3 세포의 경우 일정양의 PKC- γ 가 항상 활성화되어 있었다(Fig.5).

PKC- γ 가 Met과의 결합을 통해 c-Met의 serine 인산화를 증가시키는 것을 관찰하였고 이때의 tyrosine의 인산화 역시 증가하였다(Fig.6.). 그렇다면 기존에 알려진 것과는 반대로 PKC- γ 가 c-Met의 활성화를 증가시키는 현상은 알려진 serine985 이외의 다른 자리를 통해서 이루어질 것이라고 예상하였

고 PKC- γ 에 의한 c-Met의 인산화 자리를 찾기로 시도하였다. c-Met의 세포질내 부분을 네 부분으로 나누어 GST-fusion protein을 만들고 PKC- γ 와 *in vitro* kinase assay를 수행한 결과 PKC- γ 는 c-Met의 juxtamembrane 부분만을 인산화 시킴을 관찰하였다(Fig. 8).

지금까지 알려진 바에 의하면 c-Met의 juxtamembrane 부분은 음성 조절 작용에 있어서 매우 중요한 역할을 한다. PKC에 의해 인산화 되는 Ser985 자리를 포함해서 Cbl이 결합하여 c-Met의 degradation을 일으키는 Tyr1003 자리 등 음성 조절에 필요한 부분이 집중적으로 모여 있기 때문이다(Peschard P 등,2001). PKC- γ 는 흥미롭게도 c-Met의 juxtamembrane에 위치한 Ser1020을 인산화시킴으로써, c-Met을 up-regulation 할 가능성이 있다(Fig.9과 Fig.10). c-Met의 Ser985 자리가 TPA에 의해서 인산화 되면 receptor의 dimerization을 inhibition하거나 phosphatase의 결합을 유도함으로써 c-Met의 활성을 저해할 수 있을 것이다. 반대로 PKC- γ 에 의한 Ser1020의 인산화는 c-Met의 dimerization을 촉진시키거나 phosphatase가 결합하는 부분을 구조적으로 inhibition 함으로써 c-Met의 활성을 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다. Juxtamembrane과 Ser985, Ser1020 그리고 다른 PKC isoenzyme에 의해서 인산화 될 수 있는 자리를 통한 조절 기전을 연구함으로써 암 치료에 관련된 HGF/c-Met 신호 전달 체계를 좀 더 이해할 수 있을 것이다.

V. 결론

본 연구에서는 PKC에 의해 HGF/c-Met 신호 전달이 감소된다고 알려진 것과는 반대로 PKC family 중 하나인 PKC- γ 가 c-Met의 활성을 증가시키는 현상의 기전을 찾고자 하였다. 그 결과 PKC- γ 는 c-Met과 constitutive 하게 결합하고 있었고 이전에 알려진 PKC에 의한 인산화 자리인 serine985가 아닌 serine1020 자리를 인산화 시킴으로써 c-Met의 활성을 up-regulation 하였을 가능성을 확인하였다.

참 고 문 헌

1. Andreozzi F, Melillo RM, Carlomagno F, Oriente F, Miele C, Fiory F, Santopietro S, Castellone MD, Beguinot F, Santoro M, Formisano P: Protein kinase C α activation by RET: evidence for a negative feedback mechanism controlling RET tyrosine kinase. *Oncogene* 22: 2942-2949, 2003
2. Blume-Jensen P, Wernstedt C, Heldin CH, Ronnstrand L: Identification of the Major Phosphorylation Sites for Protein Kinase C in Kit/Stem Cell Factor Receptor in Vitro and in Intact Cells. *J Biol Chem* 270: 14192-14200, 1995
3. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, VandeWoude GF and Aaronson SA: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the *c-met* proto-oncogene product. *Science* 251: 802-804, 1991
4. Cochet C, Gill GN, Meisenhelder J, Cooper JA, Hunter T: C-kinase phosphorylates the epidermal growth factor receptor and reduces its epidermal growth factor-stimulated tyrosine protein kinase activity. *J Biol Chem* 259: 2553-2558, 1984
5. Di Renzo MF, Olivero M, Giacomini A, Porte H, Chastre E, Mirossay G, Gespach C, Comoglio PM: Overexpression and amplification of the *met* /HGF receptor gene during the progression of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1: 147-154, 1995

6. Ferracini R, Longati P, Naldini L, Vigna E, Comoglio PM: Identification of the major autophosphorylation site of the Met/hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem* 266: 19558-19564, 1991
7. Gandino L, Flavia Di Renzo M, Silvia Giordano, Federico Bussolino, Paolo M Comoglio: Protein Kinase C activation inhibits tyrosine phosphorylation of the *c-met* protein. *Oncogene* 5: 721-725, 1990
8. Gandino L, Paolo Longati, Enzo Medico, Maria Prat and Paolo M Comoglio: Phosphorylation of Serine 985 Negatively Regulate the Hepatocyte Growth Factor Receptor Kinase. *J Biol Chem* 269: 1815-1820, 1994
9. Ghossein RA, Dillon DA, D'Aquila T, Rimm EB, Fearon ER, Rimm DL: Expression of *c-met* is a strong independent prognostic factor in breast carcinoma. *Cancer* 82: 1513-1520, 1998
10. Kerrie J. Way, Eva Chou, George L. King: Identification of PKC-isoform -specific biological actions using pharmacological approaches. *Trends Pharmacol Sci* 2: 181-187, 2000
11. Kim MD: Up-modulation of Hepatocyte Growth Factor/ *c-Met* Signaling by Protein Kinase C- γ and its Mechanism(Thesis). Suwon, Korea, Ajou University
12. Kyle A Furge, u-Wen Zang, George F Vande Woude: Met receptor tyrosine kinase enhances signaling through adapter proteins.

Oncogene 19: 5582-5589, 2000

13. Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM: Tyrosine 1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene(HGF receptor). *Oncogene* 9: 49-57, 1994
14. Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK: Hepatocyte growth factor(HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-Met. *Oncogene* 6: 501-504, 1991
15. Naldini L, Vigna E, Ferracini R, Longati P, Gandino L, Part M: The tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene is activated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 11: 1793-1803, 1991
16. Lee JH, Han SU, Cho H, Jennings B, Gerrard B, Dean M, Schmidt L, Zbar B, Vande Woude GF: A novel germ line juxtamembrane Met mutation in human gastric cancer. *Oncogene* 19: 4947-4953, 2000
17. Ma PC, Kijima T, Maulik G, Fox EA, Sattler M, Griffin JD, Johnson BE, Salgia R: MET mutational analysis in small cell lung cancer: novel juxtamembrane domain mutations regulating cytoskeletal functions. *Cancer Res* 63: 6272-6281, 2003
18. Lill NL, Douillard P, Awwad RA, Ota S, Lupper ML, Jr Miyake S, Meissner-Lula N, Hsu VW, Band H: The evolutionarily conserved N-terminal region of Cbl is sufficient to enhance down-regulation of the epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem* 275: 367-377, 2000

19. Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, VandeWoude GF: Sequence of Met protooncogene cDNA has features characteristics of the tyrosine kinase family of growth factor receptors. *Proc. Natl Acad. Sci* 84: 6379-6383, 1987
20. Park WS, Dong SM, Kim SY, Na EY, Shin MS, Pi JH, Kim BJ, Bae JH, Hong YK, Lee KS, Lee SH, Yoo NJ, Jang JJ, Pack S, Zhuang Z, Schmidt L, Zbar B, Lee JY: Somatic mutations in the kinase domain of the Met /hepatocyte growth receptor gene in childhood hepatocellular carcinomas. *Cancer Res* 59: 307-310, 1999
21. Pascal P, Tanya MF, Louie L, Monica AN, Hamid B, Wallace YL, Morag P: Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor Tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Molecular Cell* 8: 995-1004, 2001
22. Peschard P, Fournier TM, Lamorte L, Naujokas MA, Band H, Langdon WY, Park M: Mutation of the c-Cbl TKB domain binding site on the Met receptor tyrosine kinase converts it into a transforming protein. *Mol Cell* 8: 995-1004, 2001
23. Rodrigues GA and Park M: Autophosphorylation modulated the kinase activity and oncogenic potential of the Met receptor tyrosine kinase. *Oncogene* 9: 2019-2027, 1994
24. Takayama S, White MF, Lauris V, Kahn CR: Phorbol esters modulate insulin receptor phosphorylation and insulin action in cultured hepatoma cells. *Proc Natl Acad Sci* 81: 7797-7801, 1984

25. Tsarfaty I, Alvord WG, Resau JH, Altstock RT, Lidereau R, Bieche I, Bertrand F, Horev J, Klabansky RL, Keydar I, Vande Woude GF: Alteration of Met protooncogene product expression and prognosis in carcinomas. *Anal Quant Cytol Histol* 21: 397-408, 1999

26. Villa-Moruzzi E, Puntoni F, Bardelli A, Vigna E, De Rosa S, Comoglio PM: Protein tyrosine phosphatase PTP-S binds to the juxtamembrane region of the hepatocyte growth factor receptor Met. *Biochem J* 336: 235-239, 1998

–ABSTRACT–

Up–modulation of Hepatocyte Growth Factor/ c–Met
Signaling by Protein Kinase C– γ and its
Mechanism

Yool Kim

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(supervised by Associate Professor Jae–Ho Lee)

Protein kinase C (PKC) family is composed of 11 isoenzymes, and has been known to down–modulate the tyrosine kinase activity of c–Met, the receptor for hepatocyte growth factor (HGF). However, specified roles by PKC isoenzymes on the regulation of HGF/c–Met signaling have never been addressed yet. In this study, attempts have been made to investigate the effect of PKC– γ , an isoenzyme of PKC, on the HGF/c–Met signaling and its mechanism. In PKC– γ –transfected NIH3T3 cells, c–Met autophosphorylation level was increased compared to that of the normal NIH3T3 cells, which was partly abolished by the pre–treatment of Gö6976;

an inhibitor of PKC- α , β 1 and γ . Also, the Erk phosphorylation level was significantly increased in these cells with the treatment of HGF. The expression levels of both c-Met mRNA and protein were not altered in PKC- γ transfected cells. Translocation of PKC- γ to the membrane after HGF treatment was not observed either. Interestingly, a significant amount of PKC- γ revealed to be constitutively localized at the membrane, unlike PKC- α . Furthermore, co-immunoprecipitation assay revealed that PKC- γ interacts with c-Met constitutively. Treatment with HGF does not affect the association of PKC- γ with c-Met or the tyrosine phosphorylation level of PKC- γ . Instead, the serine phosphorylation level of c-Met was increased. To define phosphorylation site of c-Met by PKC- γ , we perform *in vitro* kinase assay using various GST fusion proteins with different domains of cytosolic Met. This result indicates that juxtamembrane domain of c-Met is directly phosphorylated by PKC- γ . It seems that the up-modulation of c-Met signaling in PKC- γ transfected NIH3T3 cells is not associated with HGF-induced rapid change but with the constitutive association of c-Met with PKC- γ and effect on c-Met activation via phosphorylation of specific serine1020 residue in juxtamembrane domain.

Key words : hepatocyte growth factor, c-Met, protein kinase C- γ , up-modulation