

의학 석사학위 논문

간세포성장인자 신호 전달계에 의한  
STAT3의 지연형 활성화 유도 물질의 동정

아주대학교 대학원

의학과

이복순

간세포성장인자 신호 전달계에 의한  
STAT3의 지연형 활성화 유도 물질의 동정

지도교수 이 재 호

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 복 순

이복순의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장

이 제 호



심사위원

김 욱 환



심사위원

윤 계 순



아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

## 간세포성장인자 신호 전달계에 의한 STAT3의 지연형 활성화 유도 물질의 동정

Met은 ligand인 간세포성장인자 (hepatocyte growth factor; HGF)와 결합하여 세포의 증식, 분화, 이동, 그리고 신생 혈관 생성 등 여러 가지 다양한 생물학적인 활성을 가지게 된다. 한편 HGF/Met 신호 전달계의 이상 증진은 세포의 암화를 초래할 수 있다.

HGF/Met 신호전달 활성화에 의해 여러 신호전달분자들이 모여드는데 그 중에 STAT3는 Met의 세포질 부위에 결합하여 세포내에 신호를 전달한다. 이 signal transducer의 활성화는 직접적으로 전사를 조절하고, HGF/Met 신호 전달계에 의해 암화 된 세포에서 STAT3는 계속적으로 활성화되어, 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

본 실험 조사 결과 흥미롭게도 HGF/Met 신호전달에 의해 STAT3의 활성이 상당한 시간 경과 후 일어나는 현상을 관찰하였다. 이러한 현상을 잘 알려진 시스템인 IL-6에 의한 STAT3의 인산화와 비교하여 보면 훨씬 늦게 인산화 현상이 일어남을 알 수 있다. 그래서 이러한 지연된 STAT3의 인산화에 초점을 맞추어 어떤 기작에 의해 나타난 것인지 밝혀보고자 하였다.

NIH3T3세포에서 Trk-Met fusion protein을 과발현 시키고 NGF로 자극하였을때, 2시간 뒤에 STAT3의 인산화가 현저하게 증가함을 볼 수 있었다 (STAT3의 지연형 인산화). HGF를 직접 처리한 경우에도 이러한 현상을

Chang cell에서 확인할 수 있었는데, Chang cell의 경우 6시간 이후에 STAT3의 인산화가 현저히 증가함을 관찰하였다. 이 현상이 HGF/Met 신호 전달계의 직접적인 결과가 아니고, 중간에 매개하는 새로운 물질이 있을 가능성을 생각하여 cycloheximide 또는 actinomycin D를 전 처리 하여 각각 단백질 합성과 mRNA 전사를 저해 시켜 보았더니 STAT3의 인산화를 완벽하게 막을 수 있었다. 또한 HGF 또는 NGF 처리 후 지연형 인산화가 일어나는 시간까지 배양된 conditioned media를 별도로 준비된 세포에 처리 하였더니 이번에는 훨씬 빠른 시간인 15분 만에 STAT3가 인산화 되었다. 이는 새롭게 합성된 물질이 세포 밖으로 분비 되며, 이 물질에 의해 STAT3가 인산화 된다는 것을 시사 하고 있다. 이 물질이 무엇인지 동정하기 위해 STAT3를 인산화 시키는 것으로 이미 알려져 있는 여러 후보물질의 양적 변화를 RT-PCR로 확인하여, IL-6의 발현이 ligand의 유무에 따라 현저하게 증가한 것을 보았다. 나아가 recombinant human IL-6가 Chang 세포에서 단 15분만에 STAT3를 인산화 시키는 것을 관찰하였으며, IL-6에 대한 중화 항체가 STAT3의 지연형 인산화를 저해함을 확인할 수 있었다.

결과적으로, 본 연구를 통해 HGF/Met 활성화에 의해 생성된 STAT3의 지연형 인산화 현상을 확인하고, 이를 유발하는 세포의 분비 물질이 IL-6라는 것을 동정하였다.

---

**핵심어** : Met, HGF, STAT3, IL-6

# 차 례

국문요약 .....	i
차 례 .....	iii
그림차례 .....	v
I. 서론 .....	1
II. 재료 및 방법 .....	4
A. 세포주 배양 .....	4
B. Trk-Met <sup>Sm</sup> 의 제작 .....	4
C. 유전자이입 .....	5
D. 역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR) .....	5
E. 세포처리 .....	6
F. Western blotting .....	6
G. 항체 .....	7
H. 핵 분리(nucleus fractionation) .....	7
III. 결과 .....	9
A. HGF/Met 신호 전달에 의한 STAT3의 지연형 인산화 .....	9
B. STAT3 tyrosine 705번 지연형 인산화에 따라 핵으로 이동된 STAT3 확인 .....	9
C. STAT3를 지연형 인산화 시키는 매개물질 존재 여부 확인 .....	10

D. HGF/Met 신호전달 의한 STAT3를 인산화 시키는 물질이 세포 밖 으로 분비됨 .....	10
E. Met 신호 전달 체계는 STAT3 인산화 유도물질을 발현된 이후에는 필요하지 않음 .....	11
F. 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에서 STAT3를 인산화 시키는 후보물질 중 IL-6의 현저한 증가 .....	11
G. Chang세포에서 재조합 사람 IL-6 (recombinant human IL-6)에 의해 15분만에 STAT3의 증가 .....	12
H. 항 중화 IL-6 항체 (Neutralizing IL-6 antibody)에 의한 지연형 STAT3의 인산화 저해 .....	12
IV. 고찰 .....	22
V. 결론 .....	24
참고문헌 .....	25
영문요약 .....	30

## 그림 차례

Fig. 1. Activation of HGF/Met signaling induces delayed STAT3 phosphorylation in Chang cells and NIH3T3 cells .....	13
Fig. 2. Increase of the p-STAT3 protein was accompanied with increased nuclear of localization of the protein .....	14
Fig. 3. The delayed phosphorylation of STAT3 was blocked by pretreatment with cycloheximide in Trk-Met <sup>sm</sup> transfected NIH3T3 cells .....	15
Fig. 4. Treatment of actinomycin D abrogates STAT3 phosphorylation .....	16
Fig. 5. The conditioned media treated with NGF or HGF induced phosphorylation of STAT3 just within 15 minute when applied to a new cell .....	17
Fig. 6. NGF is not necessary for phosphorylation of STAT3 .....	18
Fig. 7. Induction of IL-6 mRNA was prominent after the treatment of corresponding ligands .....	19
Fig. 8. Recombinant human IL-6 induced phosphorylation of STAT3 just within 15 minutes in Chang cell .....	20
Fig. 9. IL-6 neutralizing Ab inhibited delayed STAT3 phosphorylation .....	21



## I. 서론

Met receptor tyrosine kinase는 활성화된 암유전자로 처음 발견이 되었고 (Cooper 등,1984; Park 등,1986)많은 조직의 세포에서 발견되며 세포막을 관통하는 수용체 단백질이다. 이 단백질은  $\alpha$ -아단위( 50kDa)와  $\beta$ -아단위(145kDa)의 이형이합체로 구성되어 있고, 이황화 결합(disulfide bond)으로 결합된 단백질로서 glycosylation이 되어 190kDa에 이르게 된다(Bottato 등, 1991). Met을 활성화 시키는 ligand로 간세포성장인자 (hepatocyte growth factor; HGF)로 알려져 있는데 HGF는 주로 mesenchymal origin에서 발견되고, fibroblast-derived 세포 이동인자로서 scatter인자로도 불린다(Bottato 등, 1991) HGF가 Met에 결합하면 여러 가지 다양한 생물학적인 활성을 가지게 되는데, 즉, 세포 증식(cell proliferation), 세포 생존(cell survival), 세포 이동(cell motility), 그리고 신생혈관생성 (angiogenesis)에 관련이 되고, 발생초기의 발달(embryonic development)에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다 (Schmidt 등, 1995; Zhu 등, 1994).

한편 HGF/Met 신호 전달계의 이상 증진은 세포의 암화를 초래할 수 있다. 그 기전으로는 1)여러 암 조직이나 세포에서 HGF 또는 Met이 과발현 되거나 (Kuniyasu 등, 1992; Fischer 등, 1995), 2)autocrine loop생성에 의한 Met의 비정상적인 활성화(Bellusci 등, 1994; Hasina 등, 1999), 그리고 3)hereditary papillary renal cancer 에서 발견된 Met의 활성화형 돌연변이(Schmidt 등, 1997)가 알려져 있다. 한편, 본 실험실 에서는 새로운 암 발생 기전으로 Lee등이 1994년 마우스 조직에서 보고한 바(Lee와 Yamada, 1994) exon14이 alternative splicing에 의해 결손된 variant(sm-Met)가 세포를 암화 시킬 수 있음을 focus-forming assay 와 agarose colony generation assay, 그리고 *in vivo* nude mouse assay를 통해 확인한 바 있다 (unpublished data).

STAT family는 7개의 member로 구성되어 있는데, 모두 single SH2

domain을 가지고 있다(Darnell, 1997). STAT 단백질은 cytokine 신호 전달계의 매개자로 처음에 알려졌지만, EGF, PDGF, CSF1같은 polypeptide hormone에 의해서도 활성화되는 것으로 알려져 있다(Wang 등, 2000). 그 중 STAT3는 80kDa protein로, 활성화를 위해서는 세포질 내에서 STAT3 단위체의 특정 tyrosine 잔기의 인산화를 필요로 하는데, 인산화에 이어 동형이합체 또는 이형이합체가 형성된다. 인산화된 이합체는 핵 안으로 들어가서 특정 DNA response element와 결합한다. 그러므로 STAT3 단백질은 세포질 내에서는 신호 전달 분자로서 그리고 핵 내에서는 전사인자로서 두 가지 기능을 수행한다 (Darnell 등, 1994; Stark 등, 1998).

이러한 정상 신호 전달에 더하여 최근에는 Src과 같은 다양한 oncoprotein들이 STAT3를 활성화 시키고 계속적으로 활성화된 STAT3들은 직접적으로 암 발생에 관여되는 것이 알려져 있다 (Ponzetto 등, 1994; Rahimi 등, 1998). STAT3 신호전달의 비정상적인 활성화는 암 발생에 중요한 역할을 하는데, leukemia (Migone 등, 1995; Gouilleux-Gruart 등, 1996; Weber-Nordt 등, 1996; Zhang 등, 1996), melanoma (Hallek 등, 1998; Kishimoto 등, 1994), head and neck squamous cell carcinoma (Grandis 등, 1998), breast cancer (Garcia와 Jove, 1998), ovarian carcinoma (Burke 등, 2001)를 포함하는 다양한 human malignancy에서 STAT3가 과발현 되어있거나 계속적으로 활성화 되어 있음이 보고되었다.

HGF/Met 신호전달계에 있어서 STAT3는 다른 RTK 신호 전달계와 마찬가지로 Met이 HGF에 의해서 활성화가 되면 세포질내의 STAT3가 수용체와 결합하여 세포내에 신호를 전달하는 것으로 알려져 있다. 이 signal transducer의 활성화는 직접적으로 전사를 조절하여, 관을 형성하는 형태 발생(tubular morphogenesis)에 필요하다는 것이 보고되고 있고(Boccaccio 등, 1998), 또한 HGF/Met 신호전달계에 의해 활성화되는 downstream 신호 분자로 세포 암화에

중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(Zhang 등, 2002).

이에 더하여 본 실험에서는 조사 결과 흥미롭게도 Trk-Met이 과발현 되어 있는 NIH3T3 세포에서는 NGF 처리 후 2시간 뒤에 STAT3의 형태가 현저하게 증가함을 볼 수 있었고, Chang 세포에서는 HGF처리 후 6시간 뒤에 STAT3가 증가한 것을 볼 수 있었다 (STAT3의 지연형 인산화). 이러한 STAT3의 지연형 인산화 현상은 1997년 Schaper등이 FEBS Letters에 보고한 바 있는데, 이 현상에 대해 결과만 발표 했을 뿐 그 현상에 대한 기작이나 의미에 관해서는 더 연구된 바가 없다. 그래서 본 연구는 위에 기술한 대로, HGF/Met 활성화에 의해 생성된 STAT3의 지연형 인산화 현상을 확인하고, 이를 유발하는 세포의 분비 물질이 무엇인지 동정하는 데 그 목적이 있다.

## II. 재료 및 방법

### A. 세포주 배양

NIH3T3 세포는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco BRL, Grand Island, NY)에 10%의 송아지 혈청(calf serum)과 1%의 antibiotic-antimycotic(Gibco BRL)을 넣은 배양액에서, Chang세포는 DMEM에 10%우태아 혈청(fetal bovine serum)이 들어간 배양액에서 배양하였다. 쥐의 wild type met, small form met 그리고 각각의 세포외 부분을 Trk으로 치환한 Trk-Met<sup>wt</sup>, Trk-Met<sup>sm</sup>을 각각 이입시킨 NIH3T3 세포(wt-Met, sm-Met, Trk-Met<sup>wt</sup>, Trk-Met<sup>sm</sup>) 배양시에는 200ug/ml의 G418(Gibco BRL)을 첨가하여 이입된 유전자의 발현을 유지 하였다. 세포는 모두 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

### B. Trk-Met<sup>sm</sup>의 제작

신호전달 연구를 위해서 Trk-Met cDNA를 제작하였다. Trk-Met은 c-Met의 세포 바깥부분이 NGF를 리간드로 하는 Trk 단백질로 바뀐 융합 단백질로서 세포내 신호전달은 대개 c-Met의 경우와 동일한 것으로 되어있다. 이 cDNA를 사용할 경우 NIH3T3 세포에서 분비되는 HGF에 의해 유도되는 세포신호전달의 영향을 없앨 수 있기 때문에 NGF를 처리할 경우 유전자 이입한 Trk-Met에 의한 세포 신호전달을 연구 할수 있다. 본 실험실에서는 이미 pMEX/Trk-Met<sup>wt</sup> cDNA와 pBAT/Trk-Met<sup>sm</sup> cDNA를 보유하고 있었기 때문에 이것을 이용하여 pMEX/Trk-Met<sup>sm</sup> cDNA를 만들 수 있었는데, 발현백터를 pMEX로 선택한 이유는 각각을 NIH3T3세포에 한시적 유전자이입시켜 발현량을 비교하여 보았을때 pMEX백터의 경우가 단백질발현이 더 높았기 때문이었다.(data not shown)

pMEX 와 pBAT 백터 모두 Trk단백질을 코딩하는 동일부분에 XcmI 제한 효소 절단부위 한곳과 c-Met의 exon 14부분을 포함하여 세포내 부위를 자를수

있는 DraIII 제한효소 절단부위 한곳이 있었다. pMEX/Trk-Met<sup>Wt</sup> cDNA와 pBAT/Trk-Met<sup>Sm</sup> cDNA를 두개의 효소로 잘라 pMEX/trk-Met<sup>Wt</sup>cDNA에서는 벡터부분을 얻고 pBAT/trk-Met<sup>Sm</sup>cDNA에서는 제거된 exon14부분을 포함한 DNA조각을 얻어 그 두 DNA조각을 붙였다. DNA 염기서열을 분석해 본결과 DraIII 효소로 잘려지는 부분중 1651번 adenine염기가 thymine으로 치환되었으나, 코딩되는 아미노산은 valine으로 동일하였다. 최종 확인을 위하여 NIH3T3세포에 이입시켜 발현을 확인하였다.

### C. 유전자 이입

유전자를 세포에서 과발현시키기 위해 형질도입을 시행하였다. 유전자 이입은 LIPOFECTAMINE PLUS<sup>TM</sup> Reagent를 사용하였다. 먼저 60mm 배양 접시에 유전자 이입 전날  $3.0 \times 10^5$ 개의 NIH3T3 cell 을 분주하고 16-18시간 뒤 지침서에 따른 방법을 통하여 wt-Met, sm-Met, Trk-Met<sup>Wt</sup>, Trk-Met<sup>Sm</sup> cDNA 와 pSV2neo 유전자를(19:1) 함께 이입 시켰다. 유전자 이입 48시간 뒤 trypsin-EDTA(Gibco BRL)를 처리하여 세포를 배양접시에서 떼어낸 후 계대배양 하였으며, 이와 동시에 800ug/ml의 geneticin(Sigma, Saint Louis, MO)을 첨가하여 cDNA가 들어간 세포만을 선택적으로 배양하였다. 2-3주 동안 3-4일 주기로 배지와 geneticin을 갈아주어 세포군집이 형성된 후 이것을 pooling 하여 실험에 사용하였다. 200ug/ml의 geneticin을 지속적으로 넣어 계대배양하였다.

### D. 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)

Met이 과발현 되어 있는 NIH3T3세포를 100mm 배양 접시에서 배지를 제거한 다음 TRIZOL reagent(Gibco BRL)를 이용하여 얻은 RNA를 가지고 RT-PCR을 하였다. RNA-PCR kit(TaKaRa,Japan)의 AMV 역전사 효소와 oligo-dT를 이용하였고, 역전사 반응은 42℃에서 90분, 94℃에서 2분 조건에서

시행하였다. 중합 효소 연쇄 반응 primer로서, TNF- $\alpha$ (F)5'-ATGAGCACAGA AAGCATGATC-3',(R)5'-TACAGGCTTGTCACCTCGAATT-3';IL-1 $\beta$ (F) 5'-G CAACTGTTCTGAACTC-3',(R)5'-CTCGGAGCCTGTAGTGCA-3';IL-6 (F)5'-TGTACTCCAGGTAGCTATGG-3',(R)5'-GTTCTCTGGGAAATCGT GGA-3';IP-10(F)5'-TCCAGAAGCACCATGAACC-3',(R)5'-GCTGAAGAGA TTAGTACCT-3';MCP-1(F)5'-CTCACCTGCTGCTACTCATTC,(R)5'-GCTTG AGGTGGTTGTGGAAAATGTGGAAAA-3'을 사용하여 TaKaRa Taq<sup>TM</sup>(Ta KaRa) 중합효소로 30주기까지 DNA를 증폭시켰다.

### E. 세포처리

Human HGF는 R&D systems(Minneapolis, MN)에서 구입하였다. 10% 우 태아혈청이 포함된 배지에 pro-HGF를 넣어 활성화된 형태로 만들어 적절한 농 도로 희석하여 사용하였다. 사용한 최대 농도는 100unit/ml 이었다. NGF (Grade II)는 Boehringer Mannheim(Indianapolis, Ind)에서 구입했고, 100ng/ml까지 사용 하였다. NGF의 기능을 막기 위해서 사용한 항NGF 중화 항체(anti-NGF neutralizing Ab)는 sigma(Saint Louis, MO)에서 구입하였고, IL-6의 기능을 막 기 위해서 사용한 항 IL-6 중화 항체(anti-IL-6 neutralizing Ab)는 R&D systems에서 구입하였으며, 최대 20ug/ml의 농도까지 사용하였다.

### F. Western blotting

Trk-Met<sup>sm</sup>이 과발현 되어 있는 NIH3T3 세포 또는 Chang 세포를 각각 NGF와 HGF를 처리한 다음 PBS(phosphate buffered saline)로 두 번 깨끗이 씻 어내고 dish에 있는 세포를 소량의 PBS를 넣어 긁어냈다. PBS에 있는 세포를 원심분리(10min, 4 $^{\circ}$ C, 5000rpm)에서 가라앉히고 상등액인 PBS는 버렸다. 그리고 Complete<sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail tablets(Boehringer Mannheim)과

phosphatase inhibitors( $\text{NaVO}_4$ , 5mM; NaF, 1mM)가 포함된 RIPA buffer(20mM Tris[pH 7.4], 150mM NaCl, 1% Triton X 100, 0.1% SDS)를 넣고 얼음 위에서 40분간 두어 세포를 용해시켰다. Cell lysate는 원심분리(30min, 4°C, 11,000rpm)하여 얻은 상등액만을 취하였고. Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 사용하여 단백질의 양을 측정하였다. 정량된 70ug의 단백질을 8%의 SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동을 하여 분리시킨 후, nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Keene, NH)으로 300mA에서 1시간 30분 동안 전기 이동시켰다. 단백질을 이동시킨 nitrocellulose membrane은 PBST(0.02% Tween20 in PBS)에 1% BSA (bovine serum albumin)를 넣은 blocking buffer로 1시간 동안 상온에서 배양 시켰다. Blocking 후 일차 항체를 1% BSA blocking buffer에 적절한 농도로 희석하여 4°C에서 밤새 배양 하였다. 이때 PBST로 일차 항체를 충분히 씻어 낸 후, horseradish peroxidase가 결합되어 있는 이차항체를 붙였다. PBST로 충분히 이차항체를 씻어낸후 ECL system(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)를 이용하여 발광시키고 X-ray film에 감광시켰다.

## G. 항체

STAT3의 항체는 polyclonal pSTAT3(cell signaling technology, Beberly, MA)를 사용하였고, Erk의 항체는 polyclonal pErk(cell signaling technology, Beberly, MA)를 사용하였다.

## H. 핵 분리(nucleus fractionation)

배양을 마친 세포를 차가운 PBS에 2번 씻은 후 모아진 세포를 TM-2 완충용액(20mM Tris-Cl, 5mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.3M Sucrose, Complete<sup>TM</sup> protease inhibitor cocktail tablets(Boehringer Mannheim)과 phosphatase inhibitors( $\text{NaVO}_4$ ,

5mM; NaF, 1mM)에 용해 시킨 후 얼음위에 5분 넣어 둔다. 그리고 0.5% TritonX-100 을 넣고 얼음위에 5분동안 넣은 후 주사기 needle (22-gauge)로 세포막을 부수고, 4℃ 15분동안 1500g에서 원심분리를 한다. 그런 후에 상층액은 세포질이고, 아래 가라앉은 것은 핵이다. 그래서 상층액은 새로운 tube에 옮기고, 핵은 다시 TM-2 완충용액과 0.5% Triton에서 용해시킨 후 10분동안 얼음위에 놓은 다음 원심분리(4℃, 14000rpm, 2분)한다. 그래서 얻은 상층액이 핵안의 추출물이다.



### III. 결 과

#### A. HGF/Met 신호 전달에 의한 STAT3의 지연형 인산화

Trk-Met<sup>wt</sup>, Trk-Met<sup>sm</sup> 이 과발현 되어있는 NIH3T3세포에 NGF를 100ng/ml 농도로 처리하고, 1시간, 2시간, 4시간 그리고 최고 6시간까지 배양시킨 다음 세포를 모아 용해시킨 후 western blotting을 하여 STAT3의 단백질 발현을 확인해 보았다.(Fig. 1.A) 또한 wt-Met과 sm-Met을 발현하는 NIH3T3 세포와 Chang세포는 HGF (100unit/ml)를 처리하여 western blotting 을 하였다.(Fig. 1B,C) STAT3의 활성화 형태인 tyrosine 705번 인산화 p-STAT는 80kDa부근에서 관찰되었는데, Met이 과발현 되어있는 NIH3T3 세포에서는 2시간 이후에 STAT의 지연형 인산화가 나타났고, Chang 세포에서는 6시간이 되어야 현저하게 증가된 지연형 인산화를 볼 수 있었다. 이로써 HGF/Met 신호 전달계의 활성화는 NIH3T3 섬유아세포와 Chang 상피세포 모두에서, 그리고 endogenous와 exogenous Met 모두에서, 그리고 Trk-Met hybrid receptor를 통한 경우에도 모두 STAT3의 지연형 인산화가 존재함을 알 수 있었다. 이에 반해 STAT3 활성화의 대표적인 upstream인 IL-6는 처리후 15분만에 STAT3의 인산화를 초래하였다(Fig. 7). 또, Chang 세포에서 HGF를 농도별로 처리하였는데 빠른 시간인 10분안에 농도 의존적으로 Met이 인산화 된 것을 볼수 있다(Fig. 1.D).

#### B. STAT3 tyrosine 705번 지연형 인산화에 따라 핵으로 이동된 STAT3 확인

STAT3가 전사 인자로서 역할을 하기 위해서는 세포질에서 활성화된 STAT3는 tyrosine 705번이 인산화 되어 이합체를 이루고 이합체를 이룬 STAT3는 핵으로 이동되는 것이 알려져 있고, 이때 serine 727번이 인산화 되면

tyrosine만 인산화 되었을때 보다 2배이상의 transcriptional activity를 보인다. 그래서 이 실험에서는 STAT3의 지연형 인산화가 tyrosine 705번 인산화 후에 transcriptional activity의 정도를 알아보기 위해 STAT3의 serine 727번 인산화 여부를 보았다. Trk-Met<sup>sm</sup>이 과발현 되어있는 NIH3T3세포에 NGF(100ng/ml)를 시간별로 처리하여 세포를 모은 후에 핵 분리를 하였고 핵 추출물을 이용하여 STAT3의 tyrosine 705번 인산화 여부와 serine 727번 인산화 여부를 보았다 (Fig. 2.) 그 결과 NGF처리 후 2시간 후에 핵 추출물 부분에서 tyrosine이 인산화 되어있는 동시에 serine 727번도 인산화 되어있는 것을 볼 수 있었다. 분리의 정확성 여부는 tubulin 항체로 확인하였다.

### C. STAT3를 지연형 인산화 시키는 중간 매개물질 여부 확인

일반적으로 HGF/Met 신호전달에 의해 직접적으로 활성화된 분자라면 보통 15분에서 최대 인산화가 되어 활성화 되는데 STAT3의 지연형 인산화는 중간에 어떠한 물질이 매개로 하여 시간이 늦어져 인산화 되고 간접적으로 STAT3에 신호전달을 주는 것이 아닐까 생각해 보았다. 그래서 이를 확인하기 위해 단백질 합성 저해제인 cycloheximide (Fig. 3.) 또는 RNA 합성 저해제인 actinomycin D (Fig. 4.)를 1시간 전 처리를 하고 난 후 Trk-Met<sup>sm</sup>의 ligand인 NGF를 2시간 처리하여 p-STAT3를 본 결과 각각의 저해제가 처리된 세포에서는 STAT3의 인산화가 저해된 것을 볼 수 있었다. 이 현상이 각각의 저해제의 독성에 의한 것이 아니라는 것은 다른 신호 전달체계인 Erk의 인산화가 여전히 잘 진행되고 있는 것을 보아 확인 할 수 있었다.

### D. HGF/Met 신호전달에 의해 STAT3를 인산화 시키는 물질이 세포 밖으로 분비됨.

STAT3의 지연형 인산화가 중간에 밝혀지지 않는 물질(unknown product)

에 의해 일어난 것을 보았는데 그럼 이 물질이 세포 안에서 만들어져 바로 세포 안에서 영향을 주는 것인지 또는 이 물질이 세포 안에서 만들어져 세포 밖으로 분비되어 세포에 영향을 주는 것인지 알아보기 위해 STAT3를 인산화 시키는 시간의 conditioned media를 모아 새로운 접시의 세포에 처리하여 보았다. Trk-Met<sup>sm</sup>이 과발현 되어 있는 NIH3T3세포에 NGF를 2시간 처리하고 그 conditioned media를 모아 별도로 준비된 같은 세포에 처리를 하여 보았더니 단 15분만에 STAT3가 인산화 된 것을 볼 수 있었고, 위와 같은 현상은 Chang 세포에서도 보였다.(Fig. 5.) 이는 HGF/Met 신호전달에 의해 새로운 단백질이 합성되어 세포 밖으로 분비되며, 이 물질이 STAT3의 인산화를 초래했음을 강력히 시사하고 있다.

#### **E. Met/HGF 신호 전달 체계는 STAT3 인산화 유도물질을 발현된 이후에는 필요하지 않음**

Met/HGF 신호 전달계에 의해 STAT3의 인산화를 유도하는 물질이 발현 되는데, 그 물질이 발현된 이후에 STAT3를 인산화 시키는 데 있어서 Met/HGF 신호 전달계가 계속 필요한 지 알아 보기 위해 다음 실험을 하였다. Trk-Met<sup>sm</sup>이 과발현 되어 있는 NIH3T3세포에 NGF를 2시간 처리하고 난 후, 그 conditioned media를 모아 항 NGF 중화 Ab(neutralizing antibody)를 가지고 1:500 또는 1:5000을 넣어 4시간동안 CO<sub>2</sub> incubator에 넣고 중화 시킨 후 별도로 준비된 Trk-Met<sup>sm</sup>이 과발현 되어 있는 NIH3T3세포에 15분 처리를 하였다. 그 결과 STAT3는 NGF를 중화 시켰음에도 불구하고 여전히 인산화가 된것을 알수 있었고, 항 NGF 중화 Ab의 작용여부는 Erk가 저해된 것을 보아 알 수 있다 (Fig. 6.)

#### **F. 역전사-중합효소 연쇄 반응(RT-PCR)에서 STAT3를 인산화 시키는 후보**

### 물질 중 IL-6의 현저한 증가

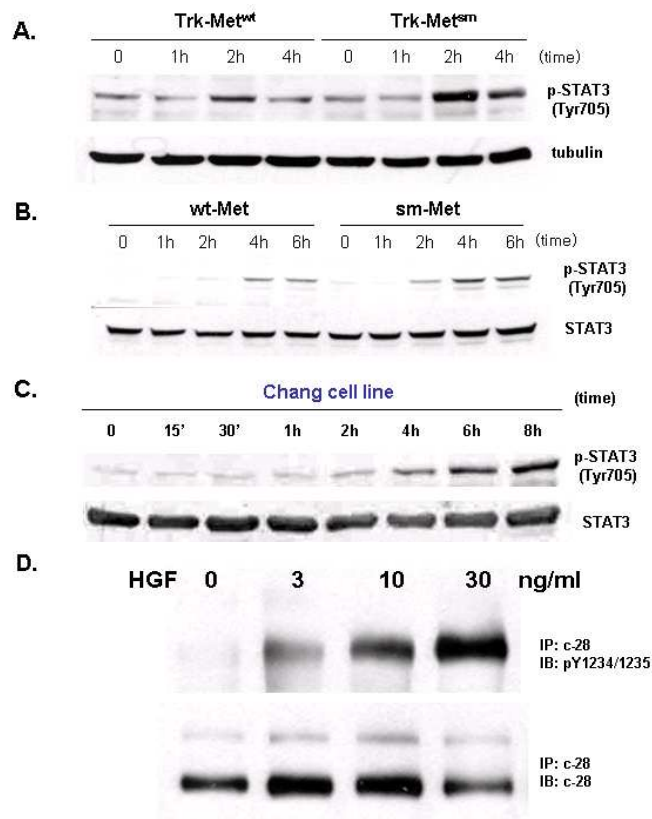
STAT3를 인산화 시키는 이 밝혀지지 않은 물질이 세포 밖으로 나와 다시 세포에 영향을 주는 것을 보았는데 다음 실험에서는 STAT3를 인산화 시키는 이 물질을 동정하는 실험을 하였다. STAT3를 인산화 시키는 것으로 이미 많이 보고 되어 있는 IL-6, MCP-1, IP-10, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  primer를 Trk-Met<sup>Wt</sup>, Trk-Met<sup>Sm</sup>가 과발현 되어있는 NIH3T3세포에 NGF를 시간별로 처리해서 얻은 mRNA로부터 만들어낸 cDNA를 갖고 중합효소 연쇄반응을 하였다. 그 결과 다른 primer에서는 NGF 유무에 따른 변화를 보이지 않았지만, IL-6는 NGF를 처리하고 2시간째에 RNA 발현이 현저하게 증가됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 7.).

### G. Chang세포에서 재조합 사람 IL-6 (recombinant human IL-6)에 의해 15분만에 STAT3의 증가.

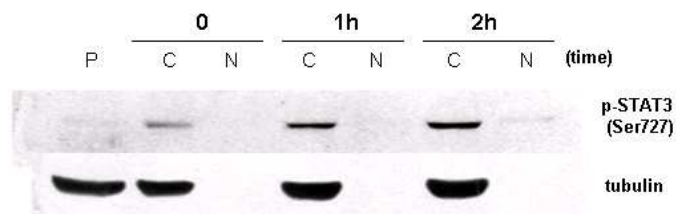
IL-6의 RNA 발현이 NGF 유무에 따라 현저히 증가 된 것을 보고 본 실험에서는 IL-6가 실제로 STAT3를 인산화 시키는 지 Chang 세포를 가지고 알아보았다. 그 결과 재조합 사람 IL-6는 15분만에 농도 의존적으로 STAT3를 인산화 시키는 것을 보았다 (Fig. 8.).

### H. 항중화 IL-6 항체 (Neutralizing IL-6 antibody)에 의한 지연형 STAT3의 인산화 저해

Chang 세포에서 HGF에 의해서 IL-6의 RNA 발현이 증가하고, recombinant HGF를 처리했을 때 단 15분만에 STAT3의 인산화를 유도하는 현상을 관찰하였다(Fig. 8.). 그래서 다음실험으로 STAT3의 지연형 인산화를 유도하는 시간의 conditioned media를 가지고, 이를 항 중화 IL-6 항체(5ug/ml)로 저해 하였을 때 STAT3의 인산화의 변화를 관찰하였다. 그 결과 conditioned media에 있는 IL-6의 저해에 의해 STAT3의 인산화가 저해된것을 확인할 수 있었다(Fig. 9.).

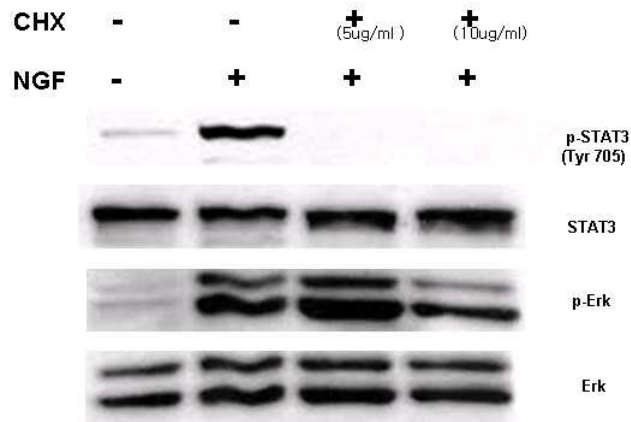


**Fig. 1. Activation of HGF/c-Met signaling induces delayed Stat3 phosphorylation in Chang cells and NIH3T3 cells.** (A),(B) Time course of Stat3 phosphorylation during HGF/SF(100unit/ml) or NGF(100ng/ml) treatment of NIH3T3 cells transfected with wt-Met and sm-Met or Trk-Met<sup>wt</sup> and Trk-Met<sup>sm</sup>. (C) Time course of STAT3 phosphorylation during HGF/SF in Chang cells. Normalized whole cell extracts were used for Western blot analysis with an anti-phosphoSTAT3 antibody recognizing Tyr705 or anti-STAT3 antibody or tubulin. (D) Met was phosphorylated dose-dependent by HGF within 10min. Normalized whole cell extracts were immunoprecipitated using c-28 anti-Met antibody and then analysed by western blot analysis using anti-pY1234/1235, a specific phospho-Met antibody.

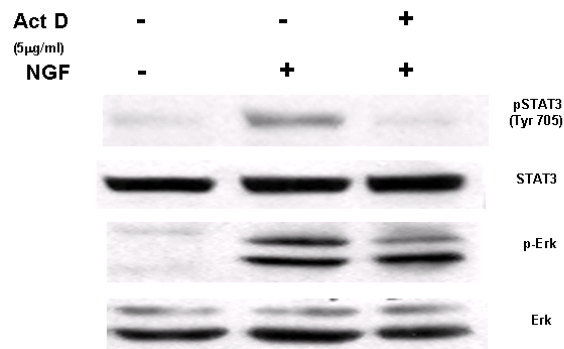


P:positive control  
 C: cytosol  
 N: nucleus

**Fig. 2. Increase of the p-STAT3 protein was accompanied with the increase of p-STAT3 protein in the nucleus.** NIH3T3 cells were transfected with Trk-Met<sup>sm</sup> and harvested following treatment with NGF(100ng/ml). The cells were fractionated into the cytoplasmic and nuclear portion, and the STAT3 protein was measured by western blot analysis with anti-phospho STAT3 antibody(Ser727). The blots were stripped and re-probed with anti-tubulin (cytoplasmic marker).



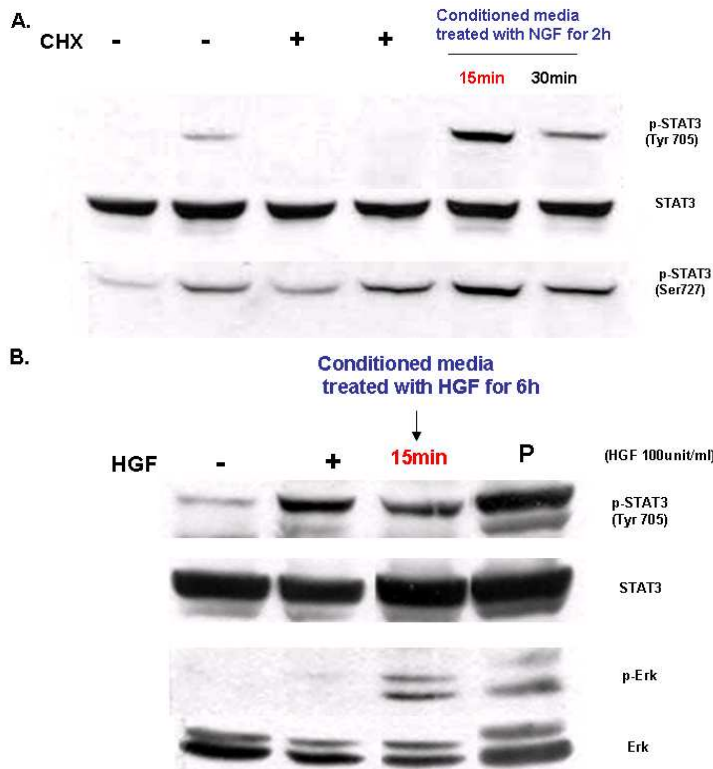
**Fig. 3. The delayed phosphorylation of STAT3 was blocked by pretreatment with cycloheximide in Trk-Met<sup>sm</sup> transfected NIH3T3 cells.** Cultured NIH3T3 cells were either pretreated with 10ug/ml or 15ug/ml cycloheximide for 1hour and then incubated NGF(100ng/ml) for 2hour. Normalized whole cell extracts were used for Western blot analysis with an anti-phosphoSTAT3 antibody recognizing Tyr705 or anti-STAT3 antibody.



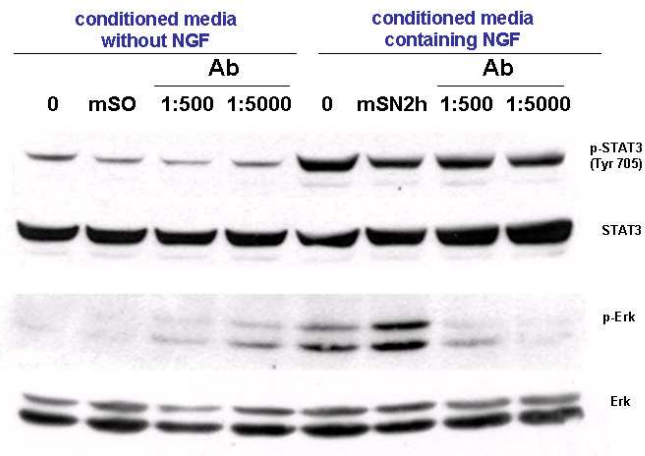
**Fig. 4. Treatment of actinomycin D abrogates STAT3 phosphorylation.**

Cultured NIH3T3 cells were either pretreated with 5ug/ml actinomycin D for 30 min and then incubated with NGF(100ng/ml) for 2hour. Normalized whole cell extracts were used for western blot analysis with an anti-phospho STAT3 antibody recognizing Tyr705 and anti-STAT3 antibody or p-Erk and Erk antibody.

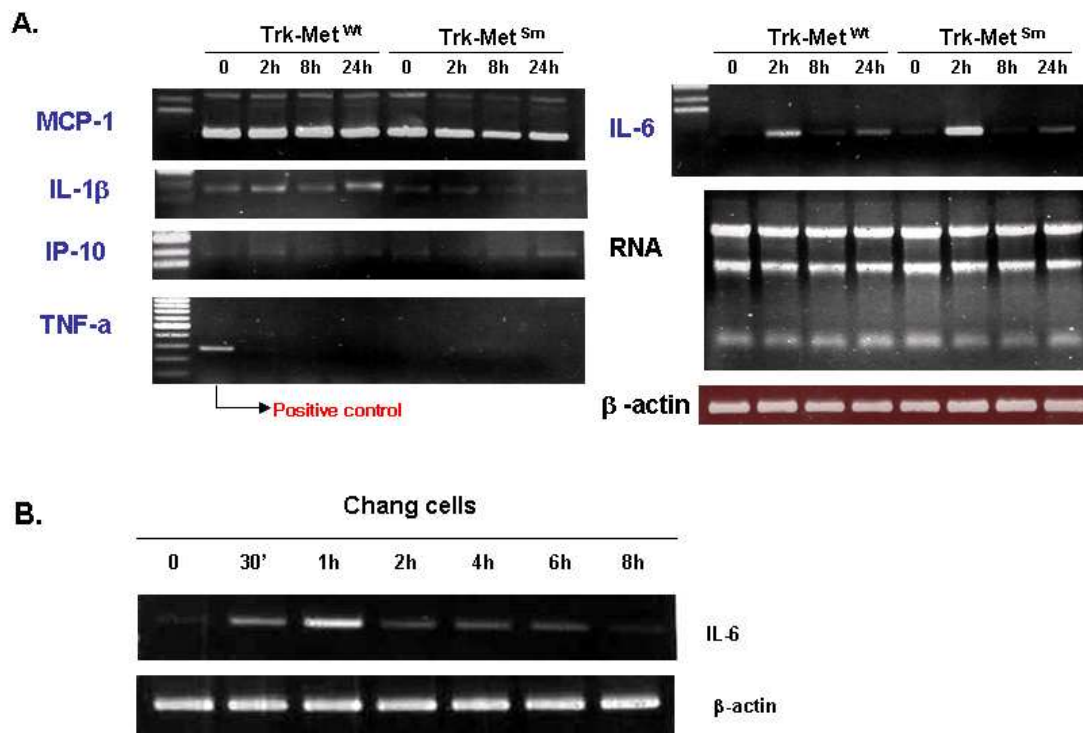




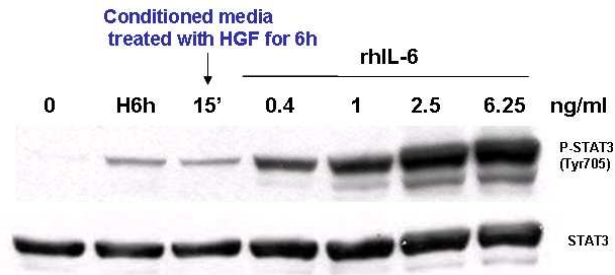
**Fig 5. The conditioned media treated with ligand induced phosphorylation of STAT3 just within 15 minutes when applied to a new cell.** (A) NIH3T3 Cells transfected Trk-Met<sup>sm</sup> were treated with NGF (100ng/ml) for 2 hours. And then the conditioned media were treated newly prepared NIH3T3 cells for 15 minute. (B) Chang Cells were treated with HGF(100unit/ml) for 6 hour. And then the conditioned media were treated newly prepared Chang cells for 15 minute. Normalized whole cell extracts were used for Western blot analysis with an anti-phosphoSTAT3 antibody recognizing Tyr705 and anti-STAT3 antibody.



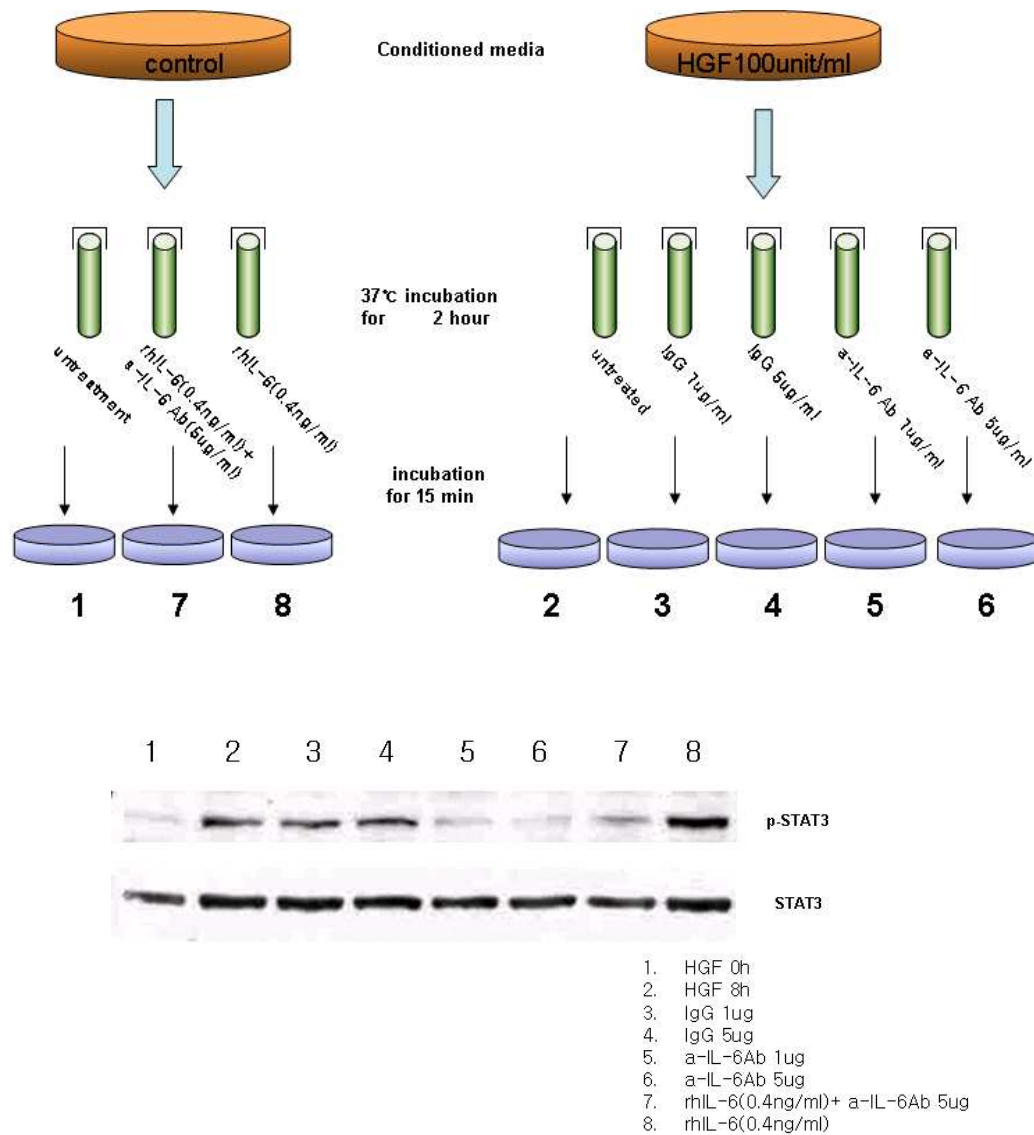
**Fig. 6. NGF is not necessary for phosphorylation of STAT3.** NIH3T3 Cells transfected Trk-Met<sup>sm</sup> were treated with NGF (100ng/ml) for 2 hours. And then the conditioned media were collected and neutralized with NGF antibody (1:500, 1:5000) for 4 hour in CO<sub>2</sub> incubator. Normalized whole cell extracts were used for Western blot analysis with an anti-phospho STAT3 antibody recognizing Tyr705, anti-STAT3 antibody, p-Erk and Erk.



**Fig. 7. Induction of IL-6 mRNA was prominent after the treatment of corresponding ligands.** Cells were treated with (A) NGF(100ng/ml) or (B) HGF(100unit/ml). RT-PCR was performed with molecules known to induce activation of STATs. Total RNA was isolated from respective confluent cells and analyzed by gel running on an 1.5% agarose gels.



**Fig. 8. Recombinant human IL-6 induced phosphorylation of STAT3 just within 15 minutes in Chang cell.** Normalized whole cell extracts were used for Western blot analysis with an anti-phosphoSTAT3 antibody recognizing Tyr705 and anti-STAT3 antibody.



**Fig. 9. IL-6 neutralizing antibody inhibited delayed STAT3 phosphorylation.** Chang cells were treated with HGF(100unit/ml) for 8h and then the conditioned media was incubated with control IgG or IL-6 neutralizing antibody for 2h in the 37°C incubator. Newly prepared Chang cells were treated with the conditioned media for 15min. The lysates were immunoblotted with p-STAT3 and STAT3 antibody.

## IV. 고찰

STAT3의 지연형 인산화는 NIH3T3세포에 wt-Met과 그것의 alternative splicing form으로 exon14번이 결손된 sm-Met을 과발현 시킨 세포와 Trk-Met<sup>wt</sup>, Trk-Met<sup>sm</sup> 을 과 발현 시킨 세포 그리고 Chang 세포 에서도 같은 현상을 보았다(Fig. 1). 사실, STAT3의 지연형 인산화는 1997년 Peter C Heindrich가 FEBS Letters에 보고한 바 있는데, 이 현상에 대해 결과만 발표했을 뿐 그 현상에 대한 기작이나 의미에 관해서는 더 연구된 바가 없다. 그래서 본 연구에서는 HGF/Met 활성화에 의해 생성된 STAT3의 지연형 인산화 현상을 확인하고, 이를 유발하는 세포의 분비 물질이 무엇인지 동정하는 데 그 목적을 두었다. HGF/Met 신호전달 체계에 의해 STAT3의 지연형 인산화를 관찰하였고, 이러한 현상은 transcription 저해제인 actinomycin D와 단백질 합성 저해제인 cycloheximide를 전처리하여 그 결과 중간에 밝혀지지 않은 물질이 HGF/Met 신호전달체계에 의해 발현되어(Fig. 3,4), STAT3의 인산화를 유도하는 것을 알 수 있었다.

일반적으로 STAT3는 JAK-STAT3 신호 전달 체계로 많은 cytokine과 관련된 염증반응 연구 뿐만 아니라 성장인자 (growth factor) 와 호르몬과도 관련되어 보고 되어있다 (Kishimoto 등,1994; Igaz 등 2001). 그래서 이 물질을 동정하는 처음 접근한 방법은 이미 STAT3를 인산화 시키는 것으로 알려져 있는 분자들을 찾아보아 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)을 하는 것이었다. 그래서 역시 염증반응에 관여하는 것으로 알려져 있는 MCP-1, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IP-10 과 같은 primer로 확인해 본 결과 ligand의 유무에 따라 IL-6의 RNA 발현 정도가 유의하게 상승된 것을 관찰하였다. 다음으로는 recombinant human IL-6에 의해서 단 15분만에 STAT3의 인산화가 유도된 것을 보았다. 이는 본 실험에서 찾고 있는 물질이 IL-6일 가능성을 보여준다. 또 항 중화IL-6 항체로

conditioned media로 2시간동안 배양시킨 다음 새로이 준비된 Chang 세포에 15분 처리 했을때, STAT3의 인산화가 현저히 저해된 것을 볼수 있었다. 이를 정리해 보면 STAT3의 지연형 인산화는 HGF/Met signaling에 의해 IL-6가 발현되고 이후에 나타나는 이차적인 신호전달임을 관찰하였다. 사실, IL-6가 유도되어 autocrine하게 작용하는 것은 최근에 나온 보고에서도 볼 수 있다. cAMP로 C6 Glioma 세포를 astrocyte로 분화 시켰을때, IL-6가 autocrine하게 작용한다는 보고가 있다. 이때도 STAT3가 24시간이 되어 인산화가 이루어지고 cAMP에 의해 IL-6가 발현되고, 이것을 향 IL-6 중화항체를 가지고 저해 시켰더니 STAT3의 인산화가 저해된 것을 관찰하였다. (Takanaga 등, 2004) 이것으로 본 실험에서는 HGF/Met 신호전달에 의해 STAT3의 지연형 인산화를 관찰하였고, 중간 매개물질이 IL-6라는 것을 밝혀 내었다. 이러한 신호전달이 생리적으로 어떠한 의미를 갖을 지는 더 연구를 해 봐야 겠다.

## V. 결 론

본 연구를 통해 HGF/Met 활성화에 의해 생성된 STAT3의 지연형 인산화 현상을 확인하였고, 이를 유발하는 세포의 분비 물질이 IL-6라는 것을 알게 되었다. STAT3의 지연형 인산화가 일어나는데, HGF/Met 세포 신호전달에 의해 세포 분비 물질이 발현되고, IL-6에 의해 이차적인 STAT3 세포 신호전달을 이룬다는 것이 어떠한 의미를 갖을 지 더 연구를 해 봐야 겠다.



## 참 고 문 헌

1. Bellusci S, G Moens, G Gaudino, P Comoglio, T Nakamura, JP Thiery, and J Jouanneau: Creation of an hepatocyte growth factor/scatter factor autocrine loop in carcinoma cells induces invasive properties associated with increased tumorigenicity. *Oncogene* 9: 1091-1099, 1994
2. Bhattacharyya, T., Karnezis, A.N., Murphy, S.P., Hoang, T., Freeman, B.C., Phillips, B., and Morimoto, R.I: Cloning and subcellular localization of human mitochondrial hsp70. *J. Biol. Chem.* 270: 1705-1710
3. Boccaccio C, Ando M, Tamagnone L, Bardelli A, Michieli P, Battistini C, Comoglio PM: Induction of epithelial tubules by growth factor HGF depends on the STAT pathway. *Nature.* 391:285-288, 1998
4. Bottaro DP, Rubin JS, Faletto DL, Chan AM, Kmieciak TE, Vande Woude GF, Aaronson SA: Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-Met proto-oncogene product. *science* 251: 802-804, 1991
5. Burke WM, Jin X, Lin HJ, Huang M, Liu R, Reynolds RK, Lin J: Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses growth of human ovarian and breast cancer cells. *Oncogene.* 20: 7925-7934, 2001
6. Cooper CS, Blair DG, Oskarsson MK, Tainsky MA, Eader LA, Vande Woude GF: Characterization of human transforming genes from chemically transformed, teratocarcinoma, and pancreatic carcinoma cell lines. *cancer Res.* 44: 1-10, 1984
7. Darnell JE Jr: STATs and gene regulation. *Science.* 277: 1630-1635, 1997

8. Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR: Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.. *Science*. 264: 1415-1421, 1994
9. Fisher U, Muller HW, Sattler HP, Feiden K, Zang KD and Meese E: Amplification of the MET gene in glioma. *Genes Chromosomes Cancer* 12: 63-65, 1995
10. Garcia R, Jove R: Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J Biomed Sci*. 5: 79-85, 1998
11. Gouilleux-Gruart V, Gouilleux F, Desaint C, Claisse JF, Capiod JC, Delobel J, Weber-Nordt R, Dusanter-Fourt I, Dreyfus F, Groner B, Prin L: STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood*. 87: 1692-1697, 1996
12. Grandis JR, Drenning SD, Chakraborty A, Zhou MY, Zeng Q, Pitt AS, Tweardy DJ: Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth In vitro. *J Clin Invest*. 102: 1385-1392, 1998
13. Hasina R, Matsumoto K, Matsumoto-Taniura N, Kato I, Sakuda M, Nakamura T: Autocrine and paracrine motility factors and the involvement in invasiveness in a human oral carcinoma cell line. *Br J Cancer*. 11: 1708-1717, 1999
14. Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC: Multiple myeloma increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 91: 3-21, 1998

15. Igaz P, Toth S, Falus A: Biological and clinical significance of the JAK-STAT pathway; lessons from knockout mice. *Inflamm Res.* 50: 435-41. 2001
16. Kishimoto T, Taga T, Akira S: Cytokine signal transduction. *Cell.* 76: 253-62, 1994
17. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H and Tahara E: Frequent amplification of the c-Met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 189: 227-232, 1992
18. Lee CC, Yamada KM: Identification of a novel type of alternative splicing of a tyrosine kinase receptor. Juxtamembrane deletion of the c-met protein kinase C serine phosphorylation regulatory site. *J Biol Chem.* 269: 19457-19461, 1994
19. Maria V. Panchenko, William G. Stetler-Stevenson, Olga V. Trubetskoy, Stephen N. Gacheru, and Herbert M. Kagan: Metalloproteinase Activity Secreted by Fibrogenic Cells in the Processing of Prolysyl Oxidase *J. Biol. Chem.* 271: 7113-7119, 1996
20. Migone TS, Lin JX, Cereseto A, Mulloy JC, O'Shea JJ, Franchini G, Leonard WJ: Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I. *Science.* 269: 79-81, 1995
21. Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM: A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell.* 77: 261-271. 1994

22. Rahimi N, Hung W, Tremblay E, Saulnier R, Elliott B: c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem.* 273: 33714-33721, 1998
23. Schaper F, Siewert E, Gomez-Lechon MJ, Gatsios P, Sachs M, Birchmeier W, Heinrich PC, Castell J: Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) signals via the STAT3/APRF transcription factor in human hepatoma cells and hepatocytes. *FEBS Lett.* 405: 99-103,1997
24. Schmidt C, F Blatt, S Goedecke, V Brinkmann, W Zschiesche, M Sharpe, E Gherardi, and C Birchmeier: Scatter factor/ hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature.* 373: 699-702, 1995
25. Schmidt L, Duh FM, Chen F, Kishida T, Glenn G, Choyke P, Scherer SW, Zhuang Z, Lubensky I, Dean M, Allikmets R, Chidambaram A, Bergerheim UR, Feltis JT, Casadevall C, Zamarron A, Bernues M, Richard S, Lips CJ, Walther MM, Tsui LC, Geil L, Orcutt ML, Stackhouse T, Zbar B, et al. : Germline and somatic mutations in the tyrosine kinase domain of the MET proto-oncogene in papillary renal carcinomas. *Nat. Genet.* 16: 68-73, 1997
26. Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons.Stark GR, Kerr IM, Williams BR, *Annu Rev Biochem.* 67: 227-264, 1998
27. Takanaga H, Yoshitake T, Hara S, Yamasaki C, Kunimoto M: cAMP-induced astrocytic differentiation of C6 glioma cells is mediated by autocrine interleukin-6. *J Biol Chem.* 279: 15441-15447, 2004

28. Wang YZ, Wharton W, Garcia R, Kraker A, Jove R, Pledger WJ: Activation of Stat3 preassembled with platelet-derived growth factor beta receptors requires Src kinase activity. *Oncogene*. 19: 2075-85, 2000
29. Weber-Nordt RM, Egen C, Wehinger J, Ludwig W, Gouilleux-Gruart V, Mertelsmann R, Finke J: Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*. 88: 809-816, 1996
30. Zhang Q, Nowak I, Vonderheid EC, Rook AH, Kadin ME, Nowell PC, Shaw LM, Wasik MA: Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 9148-53, 1996
31. Zhang YW, Wang LM, Jove R, Vande Woude GF: Requirement of Stat3 signaling for HGF/SF-Met mediated tumorigenesis. *Oncogene*. 21: 217-26, 2002
32. Zhu H, MA Naujokas, ED Fixman, KTorossian, and M Park: Tyrosine 1356 in the carboxyl-terminal tail of the HGF/SF receptor is essential for the transduction of signals for cell motility and morphogenesis. *J.Biol.Chem*. 269: 29943-29948, 1994

**-ABSTRACT-**

## **Activation of HGF/Met Signaling Induces Delayed STAT3 Phosphorylation**

Bok Soon Lee

Department of Medical Sciences  
The Graduate School, Ajou University

(supervised by Associate Professor Jae-Ho Lee)

Met is a receptor tyrosine kinase which mediates pleiotropic cellular responses following activation by its ligand, hepatocyte growth factor (HGF, also known as scatter factor). Activation of HGF-Met signaling is known to play potentially important roles in tumorigenesis. STATs mediate many of the cellular responses that occur following cytokine, growth factor, and hormone stimulation. STATs are activated by tyrosine and serine phosphorylation, which normally occurs as a tightly regulated process. Constitutively activated STATs have been found in many tumors. In this study, we observed delayed phosphorylation of STAT3 by activation of HGF-Met signaling in Sm Met transfected cells and Chang cells. NIH3T3 cell line was transfected with Trk-Met and Trk-Met<sup>sm</sup> to exclude the effects of endogenous HGF and Met. The phosphorylation of STAT3 following treatment with NGF(100ng/ml) was

checked by Western blot analysis. RT-PCR, 2D electrophoresis and MALDI-TOF analysis was performed to identify possible mediator(s).

We found the tyrosine phosphorylation of STAT3 from 2 hours after the activation of HGF-Met signaling. The delayed phosphorylation of STAT3 was blocked by pretreatment with cycloheximide and actinomycin D. Interestingly, the conditioned media treated with NGF for 2 hour induced phosphorylation of STAT3 just within 15 minute when applied to the new culture of NIH3T3 cells. Thus, we supposed that a newly synthesized product was released from the cells, which leads to the phosphorylation of STAT3 on themselves. when we treated human Chang liver cells with HGF, we could observe essentially the same results. To identify the soluble product, we performed RT-PCR for several cytokines which have known to induce activation of STATs. The results showed significant induction of IL-6 mRNA expression in the presence of the lignd. Furthermore, treatment of Chang cells with rhIL-6 resulted in STAT3 phosphorylation within 15 minute. In addition, IL-6 neutralizing antibody dramatically reduced STAT3 phosphorylation, suggesting IL-6 was the secreted protein inducing delayed phosphorylation of STAT3 following the activation of HGF/Met signaling.

---

Key words: HGF, Met, STAT3, IL-6