

Par-4 Modulates Cell Migration through Inhibition of MMP-2 Activity in Human Renal Carcinoma Caki Cells

Seon Min Woo and Taeg Kyu Kwon*

Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, 2800 Dalgubeoldaero, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea

Received April 22, 2016 / Revised May 12, 2016 / Accepted May 16, 2016

The prostate-apoptosis-response-gene-4 (Par-4) protein has been identified as an effector of cell death in response to various apoptotic stimuli in prostate cancer cells. We found that overexpression of Par-4 by stable transfection inhibits cell migration and invasion in Caki cells. The expression of various matrix metalloproteinases (MMPs) has been implicated in the invasion and metastasis of cancer cells. In this study, we investigated whether ectopic expression of Par-4 modulates MMP-2 expression and activity in human renal carcinoma Caki cells. We found that overexpression of Par-4 markedly inhibited MMP-2 activity, but not MMP-9 activity. However, loss of the leucine zipper domain of Par-4 (Par-4 ΔLZ#1 and #2) did not inhibit MMP-2 activity. Further, knock-down of Par-4 with the corresponding siRNA resulted in increased invasion and metastasis of renal carcinoma Caki cells. Interestingly, overexpression or knock-down of Par-4 did not affect the expression levels of MMP-2 mRNA. Taken together, our findings suggest that Par-4 may inhibit MMP-2 activity through its post-transcriptional regulation in renal carcinoma Caki cells.

Key words : Caki cells, cell migration, cell invasion, Matrix metalloproteinase-2, Par-4

서 론

Prostate apoptosis response-4 (Par-4)는 세포 내 경로와 세포 외 경로를 통하여 세포사멸을 유도할 뿐만 아니라 암세포의 성장과 전이를 억제하고 생존에 관련된 전사 인자를 불활성화시키는 강력한 종양 억제 유전자로서의 기능을 가진다[6, 7]. Par-4 단백질은 N말단(N-terminal region)에 두 종류의 nuclear localization sequences (NLS1, NLS2)와 C말단(C-terminal region)에 leucine zipper (LZ) domain과 nuclear export sequences (NES), selective for apoptosis in cancer cells (SAC) domain을 함유하고 있다[6, 7]. Par-4는 LZ domain을 통하여 다른 단백질과 결합하여 세포사멸을 조절하는데, Bcl-2의 전사를 증진시키는 Wilm's tumor protein (WT1)과 결합함으로써 Bcl-2의 발현 감소를 통하여 세포사멸을 증진시킨다[1, 8].

Matrix metalloproteinases (MMPs)는 암세포의 전이 과정에서 세포외 기질을 분해시키는 중요한 효소이고 아연/칼슘의 존성으로 기질 특이성에 따라 30 종류가 있다[9, 14]. 암세포의 침윤과 전이 과정에 gelatinase 활성을 가진 MMP-2와 MMP-9가 밀접한 관련이 있다[3, 13]. 한편 MMP-2와 MMP-9

의 효소활성은 세포 내 자연적으로 발생된 내생적 억제인자로 알려진 tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs)의 발현 증가에 의해 억제되는 것으로 알려져 있다[11, 15].

본 연구에서는 Par-4 단백질 과발현이 신장암 Caki 세포의 이동성과 침윤과정에 관련하는 MMP-2와 MMP-9 활성조절기전에 대하여 연구하였다. 또한 Par-4의 과발현과 knock-down에 의한 MMP-2 mRNA 발현 정도를 확인하고, 세포 이동에 영향을 주는지에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약

본 연구에 사용한 인간 신장암 세포주인 Caki 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포주 배양을 위한 배지는 10% 태아우혈청(fetal bovine serum, Hyclone laboratories, Lagan, Utah, USA)과 1% antibiotics, 0.2% Gentamycin을 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하였으며 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기를 이용하여 배양하였다. 실험에 사용된 억제인 PMA는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Par-4 siRNA와 Par-4 antibody는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

Gelatin substrate gel zymography

MMP-2와 MMP-9의 활성에 Par-4가 미치는 영향을 알아보

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-3882, Fax : +82-53-580-3795

E-mail : kwontk@dsmc.or.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기 위하여 Caki세포에 다양한 Par-4 발현 plasmid를 transfection한 후 stable 세포주를 구축하였다. Par-4와 leucine zipper domain이 결실된 Par-4 (Par-4 ΔLZ) 과 발현 세포주에 PMA를 처리하여 gelatin zymography를 시행하였다. 6-well plate에 0.4×10^6 의 세포를 분주 한 후 시약을 처리하여 24시간 배양 한 후 세포 배양액을 거두어 2% gelatine이 함유된 10% SDS polyacrylamide gel에서 전기영동을 실시하였다. 2.5% Triton X-100으로 1시간 동안 gel을 세척하여 SDS를 제거한 다음, 5 mM CaCl₂과 ZnCl₂가 포함된 완충액에 넣고 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 0.25% Coomassie blue를 이용하여 30분 동안 Gel을 염색한 후, acetic acid와 methanol이 포함된 탈색 완충액을 처리하여 흰색 밴드를 관찰하였다.

Plasmid transfection assays

Par-4에 의한 MMP-2 유전자의 전사제어에 대한 영향을 분석하기 위하여 Par-4 발현 plasmid를 사용하였다. 6-well plate에 12시간 배양한 세포에 Par-4 plasmid를 lipofectamine 방법에 따라 transfection을 하였고, 24시간 배양 후 mRNA를 추출하였다.

RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

Par-4에 의해 증가한 MMP-2 mRNA 발현 변화를 알아보기 위해서 RT-PCR을 이용하여 MMP-2의 mRNA 발현을 분석하였다. 시료를 처리한 세포에 Trizol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA)를 처리하여 total RNA를 분리 한 후, M-MLV 역전사효소(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 MMP-9 primer를 이용하여 유전자를 증폭시켰다. PCR에 사용한 MMP-2 primer sequence는 forward: 5'-ATG ACA GCT GCA CCA CTG AG-3', reverse: 5'-TGA TGT CAT CCT GGG ACA GA-3'이고, actin의 primer sequence는 forward: 5'- GGC ATC GTC ACC AAC TGG GAC-3', reverse: 5'- CGA TTT CCC GCT CG GCC GTG G-3'이다. 그 양적 차이를 비교하기 위해서 1.5% agarose gel에 각각의 PCR 산물을 loading 하여 전기영동을 한 다음 ethidium bromide (EtBr)로 염색 한 후 UV 상에서 발현의 정도를 확인하였다.

Western blotting

Par-4 단백질 발현을 확인하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 세포를 모아 40 μl lysis buffer (137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 25 mM MOPS, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 mM leupeptin, pH 7.2)를 첨가하고 5분 간격으로 15초 동안 3번 vortex하여 세포를 파쇄한 후 13,000 rpm, 4°C, 15분간 원심 분리하여 시료를 준비하였

다. 시료는 BCA 단백질 정량 kit를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량 하였으며, 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 단백질을 분리한 후, immobilon membrane (Millipore, Bedford, MA)으로 transfer하였다. Membrane은 5% milk/TBST (20 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.1% Tween 20, pH 7.4)로 실온에서 1시간 유지한 후, Par-4 (Santa Cruz, CA, USA)과 actin (Sigma, Louis, MO)을 회색한 5% milk/TBST로 실온에서 12시간 유지하였다. Anti-mouse 또는 rabbit Ig horseradish peroxidase/TBST (Amersham Buckinghamshire, England)로 1시간 반응 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL, Pierce, IL, USA) 용액을 가하여 발색시켜서 단백질을 확인하였다.

Invasion Assay

Caki세포의 침투 분석은 Boyden chambers (6.5 mm diameter filters, 8 μm pore size)를 사용하여 측정하였다. Chamber 바깥쪽 바닥에는 세포 배양액 200 μl에 PMA를 넣고, 위쪽에는 세포(5×10^4 /well) 200 μl 분주하였다. 5% CO₂, 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음, 메탄올로 1분간 고정시킨 후 crystal violet으로 염색한 후 현미경으로 관찰하였다.

Wound healing assay

PMA에 의한 Caki 세포의 이동에 Par-4의 효과를 확인하기 위하여, Caki 세포를 12 well plate에 12시간 동안 배양한 후, white tip을 이용하여 세포에 wound를 준다. 무혈청 배지로 교체하고, PMA를 24시간 처리하여, 현미경을 이용하여 확인하였다(Carl Zeiss microscope, Jena, Germany).

결 과

Par-4 과 발현 세포주 확인

본 실험에서는 Par-4의 과발현이 세포의 이동성과 침윤의 영향을 조사하였다. Par-4 및 leucine zipper domain이 결실된 Par-4(Par-4 ΔLZ)를 Caki세포에 transfection 한 후 G418인 험유한 배지에서 성장할 수 있는 Par-4 과발현 세포주를 구축하였다. Par-4 및 Par-4 ΔLZ 발현 정도를 Western blot으로 확인하였다(Fig. 1).

Par-4 와 Par-4 ΔLZ 과발현 세포에서 PMA 처리 시 세포 이동성과 침윤 효과 확인

Protein kinase C (PKC) 활성 물질인 phorbol myristate acetate (PMA)에 의해 다양한 세포에서 MMPs의 활성화를 유도하는 것으로 알려져 있다[17]. Fig. 2A 및 2B의 결과에서 알 수 있듯이 control인 vector 세포에서 PMA 처리 시 세포의 이동과 침윤이 현저히 증가함을 보였다. 흥미롭게도 Par-4 과발현 세포에서는 세포의 이동 및 침윤이 억제됨을 알 수 있다.

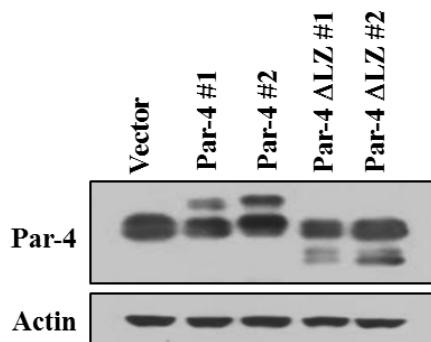


Fig. 1. Expression levels of Par-4 in Caki cells. The protein expression levels of Par-4, Par-4 ΔLZ and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as the loading control.

하지만 leucine zipper domain이 결실된 Par-4 ΔLZ 과발현 세포주에서는 control인 vector세포와 비슷한 결과를 보였다.

Par-4와 Par-4 ΔLZ 과발현 세포에서 PMA 처리 시 MMP-2 및 MMP-9 활성측정

Par-4 와 Par-4 ΔLZ 과발현 세포에서 PMA를 24시간 처리한 후 세포 배양액을 이용하여 MMP-2와 MMP-9의 활성을 측정하였다(Fig. 3). PMA가 존재하지 않는 상태에서는 MMP-9의 활성을 측정한 모든 세포주에서 미약하였다. 하지만 Par-4 가 과발현된 세포주에서는 MMP-2의 basal 활성이 감소됨을 확인하였다. MMP-2의 basal 활성감소는 leucine zipper domain이 결실된 Par-4 ΔLZ 과발현 세포에서 확인 되지 않았다. PMA처리 시 MMP-9의 활성을 증가하였으나 각 세포주에서의 차이점을 확인 할 수가 없었다.

Par-4 knock-down에 의한 PMA 처리 시 세포 이동성과 침윤 효과 확인

Par-4에 의한 세포 이동 및 침윤의 영향을 더 확인 하기 위하여 Par-4 siRNA를 처리하여 Par-4 발현을 knock-down한 후 PMA처리 시 세포의 이동성과 침윤을 조사하였다(Fig. 4A, 4B). Par-4 knock-down시 PMA처리에 의한 세포의 이동 및 침윤이 control siRNA 처리군 보다 증가됨을 확인 하였다. Par-4 siRNA처리 시 Par-4 mRNA 발현 정도가 현저히 감소함을 RT-PCR로 확인하였다(Fig. 4C). Par-4 siRNA처리 시

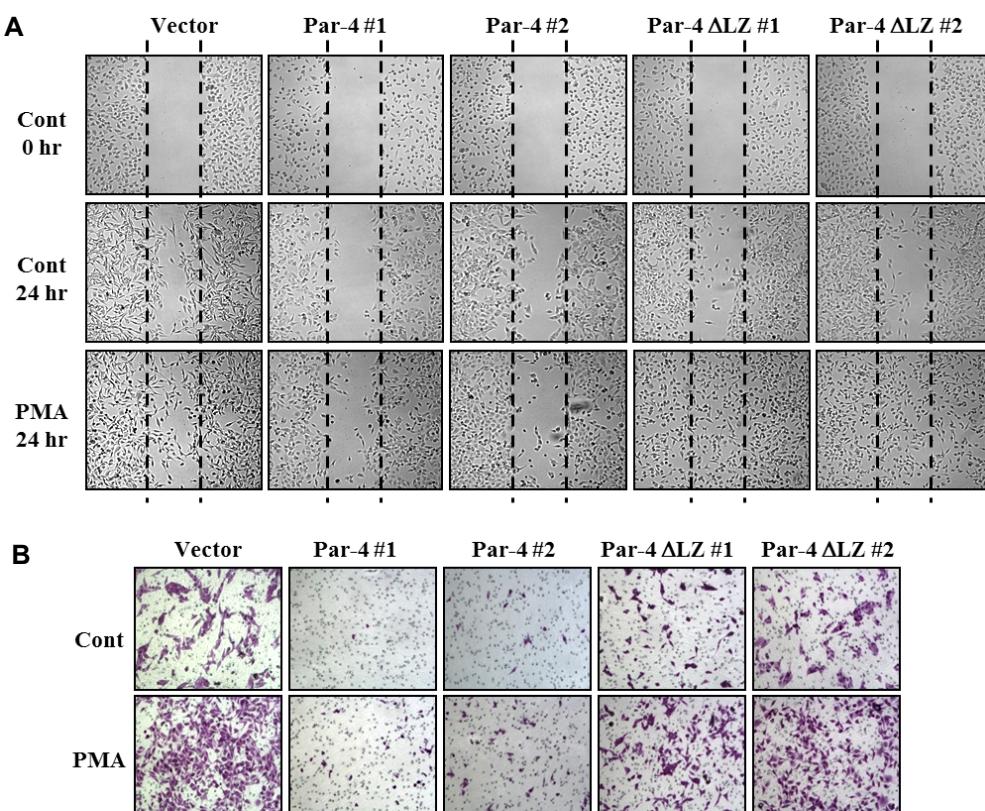


Fig. 2. Effect of Par-4 on PMA-induced Caki cell migration and invasion. (A) Confluent monolayer of Caki cells was wounded and images were taken immediately (control-0 hr). After washing with PBS, Caki cells were treated with 70 nM PMA for 24 hr. Wound gap was observed and cells were photographed using a Carl Zeiss microscope. The data represent three independent experiments. (B) Caki cells were treated with 70 nM PMA for 24 hr and the migrating cells were counted. Cell invasion was determined using Boyden Chamber.

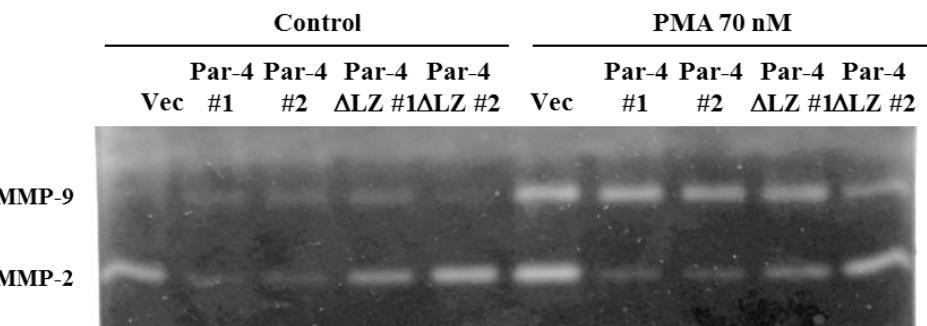


Fig. 3. Effect of Par-4 on PMA-induced MMP-2 and MMP-9 activity. (A) Various Caki cells were treated with 70 nM PMA for 24 hr. Conditioned media were collected, and MMP-2 and MMP-9 activity were analyzed using gelatin zymography. The data represent three independent experiments.

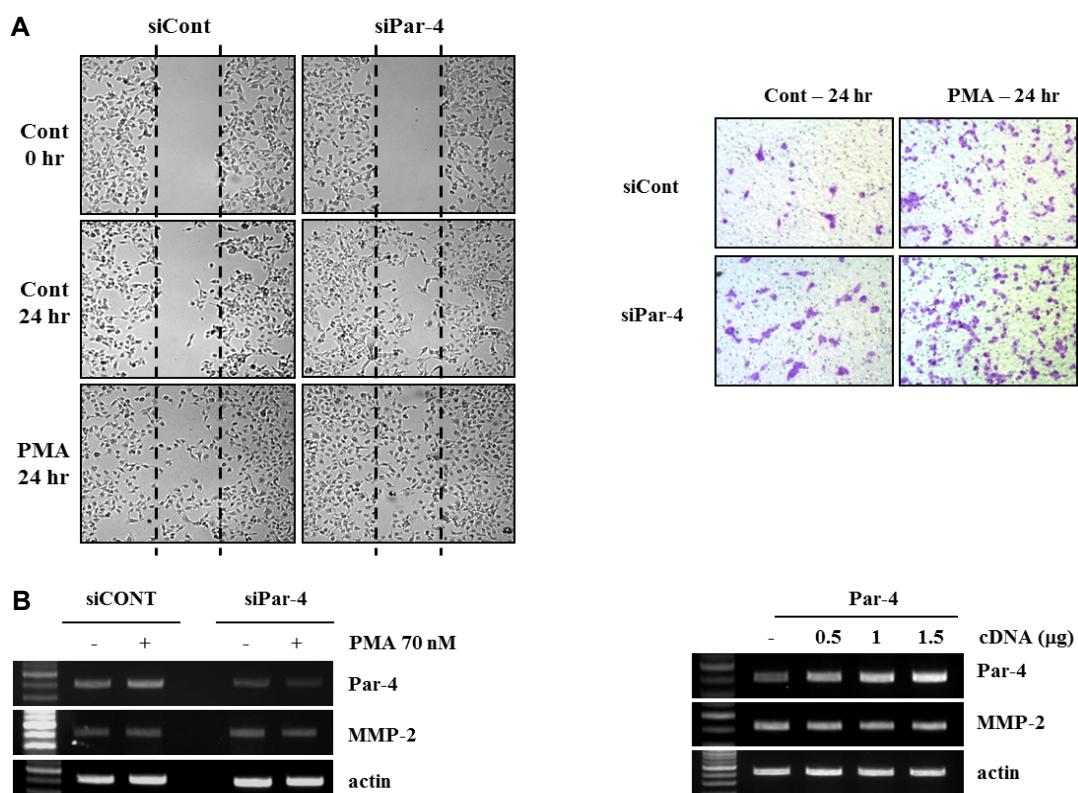


Fig. 4. Effect of knock-down of Par-4 protein on PMA-induced cell migration and invasion. (A) Caki cells were transfected with a control siRNA or Par-4 siRNA. Twenty-four hours after transfection, cells were wounded and images were taken immediately (control-0 hr). After washing with PBS, Caki cells were treated with 70 nM PMA for 24 hr. Wound gap was observed and cells were photographed using a Carl Zeiss microscope. The data represent three independent experiments. (B) Caki cells were treated with 70 nM PMA for 24 hr and the migrating cells were counted. Cell invasion was determined using Boyden Chamber. (C) Caki cells were transfected with either control siRNA or Par-4 siRNA, and then treated with 70 nM PMA for 24 hr. Par-4 mRNA and MMP-2 mRNA expression were determined using RT-PCR. (D) Caki cells were transiently transfected with Par-4 expression plasmid, and then further cultured for 24 hr. Par-4 mRNA and MMP-2 mRNA expression were determined using RT-PCR.

PMA 존재 유무와 관계 없이 MMP-2 mRNA 발현 변화를 확인 할 수가 없었다. 또한 Par-4 발현 plasmid를 농도별로 transfection 하였을 때 MMP-2 mRNA 발현에 변화를 확인 할 수가 없었다(Fig. 4D).

고 칠

본 연구에서는 신장암세포인 Caki세포에서 tumor suppressor 단백질인 Par-4가 암 전이 및 침윤에 미치는 영향에

대하여 조사 하였다. Par-4 단백질의 과발현에 의하여 암세포 이동 및 침윤이 억제되었으며 이는 암세포 전이 중요하게 작용하는 단백질 분해효소인 MMP-2의 활성화 억제에 기인함을 확인하였다.

Par-4 단백질은 4개의 특이적인 domain을 함유하고 있다. 2개의 nuclear localization sequences (NLS1, NLS2), leucine zipper (LZ) domain과 selective for apoptosis in cancer cells (SAC) domain을 함유하고 있다[6]. Par-4 단백질의 과발현은 PMA 유도의 세포 이동 및 침윤을 억제 하였으나, LZ domain이 결실된 Par-4 단백질 과발현은 억제 현상을 보이지 않았다. 또한 MMP-2 활성 저해 현상도 확인 할 수가 없었다. 이 결과는 Par-4의 MMP-2 활성 저해에 LZ domain이 중요한 역할을 함을 제시 하여 준다. LZ domain은 40개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 단백질-단백질간의 상호작용에 관여한다. LZ domain은 Par-4 단백질의 homodimer를 형성할 뿐만 아니라 Wilm's tumor protein (WT1) [8], Dlk [10], PKC [2], Akt [4, 5]와 heterodimer를 형성하여 Par-4의 기능 조절에 중요한 역할을 한다. 따라서, Par-4에 의한 신장암세포에서 MMP-2 활성화 억제에 LZ domain의 작용 기전에 대한 추가적인 연구가 더 필요하다.

이전 보고에서 withaferin A 유도체인 3-azido withaferin A가 HeLa세포 와 PC-3세포에서 MMP-2의 존적으로 침윤을 억제한다[12]. 3-Azido withaferin A는 세포외부로 Par-4 분비를 촉진하여 MMP-2의 활성을 저해한다고 알려져 있다[12]. 본 연구에서는 Par-4 siRNA를 이용한 knock-down 실험에서 PMA유도의 세포 이동 및 침윤을 증가시켰다. Par-4 siRNA 처리 시 MMP-2 mRNA의 발현 증가를 확인 할 수 없었다(Fig. 4). 또한 Par-4 발현 유전자 transfection 실험에서도 MMP-2 mRNA 발현 감소를 확인 할 수 없었다(Fig. 4). 이는 Par-4 매개의 MMP-2 활성 억제는 MMP-2 전사 단계의 조절 보다는 전사 후 조절에 의하여 야기됨을 암시 한다. 또 다른 가능성은, MMP-2 및 MMP-9은 세포 내에 존재하는 내생적 억제인자인 TIMP-1과 -2에 의해 발현 및 활성이 조절되는 것으로 알려져 있다[16]. 따라서 Par-4에 의한 신장암세포에서 MMP-2 활성화 억제가 전사조절 외 다른 작용 기전에 대한 추가적인 실험이 필요하다.

최근 국내외에서도 MMPs 저해제 개발에 대한 연구가 활발히 수행되고 있다. 그러나 Par-4 단백질을 표적으로 하여서 암세포 침윤과 전이에 주요한 인자인 MMP-2에 대한 억제 효과는 아직 일반적으로 확인되지 않아 이 연구결과의 의미가 더욱 중요할 것이라 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2013년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을(NRF-2013R1A1A2061138) 받아 수행되

었으며 이에 감사드립니다.

References

- Cheema, S. K., Mishra, S. K., Rangnekar, V. M., Tari, A. M., Kumar, R. and Lopez-Berestein, G. 2003. Par-4 transcriptionally regulates Bcl-2 through a WT1-binding site on the bcl-2 promoter. *J. Biol. Chem.* **278**, 19995-20005.
- Diaz-Meco, M. T., Municio, M. M., Frutos, S., Sanchez, P., Lozano, J., Sanz, L. and Moscat, J. 1996. The product of par-4, a gene induced during apoptosis, interacts selectively with the atypical isoforms of protein kinase C. *Cell* **86**, 777-786.
- Festuccia, C., Giunciuglio, D., Guerra, F., Villanova, I., Angelucci, A., Manduca, P., Teti, A., Albini, A. and Bologna, M. 1999. Osteoblasts modulate secretion of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in human prostate cancer cells promoting migration and matrigel invasion. *Oncol. Res.* **11**, 17-31.
- Goswami, A., Burikhanov, R., de Thonel, A., Fujita, N., Goswami, M., Zhao, Y., Eriksson, J. E., Tsuruo, T. and Rangnekar, V. M. 2005. Binding and phosphorylation of par-4 by akt is essential for cancer cell survival. *Mol. Cell.* **20**, 33-44.
- Gurumurthy, S., Goswami, A., Vasudevan, K. M. and Rangnekar, V. M. 2005. Phosphorylation of Par-4 by protein kinase A is critical for apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 1146-1161.
- Hebbar, N., Wang, C. and Rangnekar, V. M. 2012. Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor Par-4. *J. Cell. Physiol.* **227**, 3715-3721.
- Irby, R. B. and Kline, C. L. 2013. Par-4 as a potential target for cancer therapy. *Expert. Opin. Ther. Targets* **17**, 77-87.
- Johnstone, R. W., See, R. H., Sellis, S. F., Wang, J., Muthukumar, S., Englert, C., Haber, D. A., Licht, J. D., Sugrue, S. P., Roberts, T., Rangnekar, V. M. and Shi, Y. 1996. A novel repressor, par-4, modulates transcription and growth suppression functions of the Wilms' tumor suppressor WT1. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6945-6956.
- Kato, Y., Yamashita, T. and Ishikawa, M. 2002. Relationship between expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 and invasion ability of cervical cancer cells. *Oncol. Rep.* **9**, 565-569.
- Kogel, D., Plottner, O., Landsberg, G., Christian, S. and Scheidtmann, K. H. 1998. Cloning and characterization of Dlk, a novel serine/threonine kinase that is tightly associated with chromatin and phosphorylates core histones. *Oncogene* **17**, 2645-2654.
- Lambert, E., Dasse, E., Haye, B. and Petitfrère, E. 2004. TIMPs as multifacial proteins. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **49**, 187-198.
- Rah, B., Amin, H., Yousuf, K., Khan, S., Jamwal, G., Mukherjee, D. and Goswami, A. 2012. A novel MMP-2 inhibitor 3-azidowithaferin A (3-azidoWA) abrogates cancer cell invasion and angiogenesis by modulating extracellular

- Par-4. *PLoS One* **7**, e44039.
13. Ramos-DeSimone, N., Hahn-Dantona, E., Sipley, J., Nagase, H., French, D. L. and Quigley, J. P. 1999. Activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) via a converging plasmin/stromelysin-1 cascade enhances tumor cell invasion. *J. Biol. Chem.* **274**, 13066-13076.
 14. Soreide, K., Janssen, E. A., Korner, H. and Baak, J. P. 2006. Trypsin in colorectal cancer: molecular biological mechanisms of proliferation, invasion, and metastasis. *J. Pathol.* **209**, 147-156.
 15. Uzui, H., Harpf, A., Liu, M., Doherty, T. M., Shukla, A. and Chai, N. 2002. Increased expression of membrane type 3-matrix metalloproteinase in human atherosclerotic plaque: role of activated macrophages and inflammatory cytokines. *Circulation* **106**, 3024-3030.
 16. Visse, R. and Nagase, H. 2003. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ. Res.* **92**, 827-839.
 17. Woo, J. H., Lim, J. H., Kim, Y. H., Suh, S. I., Min, D. S., Chang, J. S., Lee, Y. H., Park, J. W. and Kwon, T. K. 2004. Resveratrol inhibits phorbol myristate acetate-induced matrix metalloproteinase-9 expression by inhibiting JNK and PKC delta signal transduction. *Oncogene* **23**, 1845-1853.
-

초록 : 인간 신장암 Caki세포에서 Par-4에 의한 MMP-2 활성 저해를 통한 세포 이동 조절

우선민 · 권택규*

(계명대학교 의과대학 면역학 교실)

Par-4는 다양한 세포사멸 자극에 세포 사멸을 조절하고, 종양 억제기능을 가지고 있다. 그러나, Par-4에 의한 암세포의 이동 및 침윤에 대한 연구는 수행되지 않았다. 본 연구에서 Par-4단백질의 과발현이 인간 신장암 Caki세포에서 MMP-2의 활성화를 억제하지만 MMP-9 활성에는 영향을 주지 않았다. Par-4에 의한 MMP-2의 활성 억제는 leucine zipper domain이 결실된 Par-4에서는 확인되지 않았다. Par-4 siRNA를 이용한 knock-down 실험에서 PMA 처리 시 세포이동 및 침윤 증가함을 확인하였다. Par-4의 과발현과 knock-down에서 MMP-2 mRNA 발현의 변화를 확인 할 수 없었다. 이 점은 Par-4 매개의 MMP-2 활성 억제는 전사 후 조절을 통하여 야기됨을 추측 할 수 있다.