

Original Article

p21-activated kinase 1 is allosterically inhibited by naphthoquinone (NQ) derivatives.

Sang-Won Oh¹, Kee-In Lee², Joong-Kwon Choi², Kyung-Ah Kim³, Eung-Gook Kim¹, Eun-Young Shin^{1*}

¹Department of Biochemistry, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

²Green Chemistry Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 34114, Korea

³Biomedical Engineering, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

The p21-activated kinases (PAKs) are a family of serine/threonine protein kinases and activated by binding with activated Rho GTPases such as Rac or Cdc42. PAKs regulate actin cytoskeletal remodeling, cell motility, cell survival, and apoptosis. Also, PAKs are involved in several diseases such as cancer, virus infectious diseases, mental retardation, Alzheimer and Parkinson's diseases. Therefore, the substances that are able to inhibit PAK activation can be used as powerful tools and medicines for PAK relative diseases or specific inhibitors for study of PAK signaling pathway. In this study, we investigated and characterized the 5 compounds of 4-benzene-1, 2-naphthoquinone (NQ) family as candidate substances to inhibit the PAK1 activation *in vitro* and in cells. Binding between p21-binding domain (PBD) of PAK1 and Cdc42 was blocked by 5 NQ-compounds in ELISA assay. Myelin basic protein (MBP) phosphorylation was dramatically reduced by treatment of these compounds *in vitro* kinase assay for Cdc42-induced or constitutive active PAK1 mutant. Also, phosphorylation at Thr 423 of transfected PAK1 was inhibited by treatment of 5 NQ-compounds in 293T cells, respectively. Finally, NQ-5 inhibited strongly the PAK1 activation by PDGF stimulation and cell motility in PDGF-induced wound migration assay in NIH 3T3 cells. Therefore, these NQ compounds will be good candidates as target molecules to regulate PAK1-related diseases or inhibitors to study PAK1 signaling pathway.

Key words: PAK1, 4-benzene-1,2-naphthoquinone, Cdc42, phosphorylation, inhibition

Introduction

p21-activated kinase (PAK)은 세린/쓰레오닌 인산화효소로서 Rho GTPase인 Cdc42/Rac1과 결합하여 활성화된다[1]. PAK은 그룹-I (PAK1~3)과 그룹-II (PAK4~6)로 구성된 6개의 아이소폼이 존재한다[2]. PAK의 주요 기능은 세포골격의 형성과 유지, 세포의 운동성, 세포의 주기, 세포의 생존 및 세포의 사멸을 조절한다[3]. 구조적으로 PAK은 N-말단 부위의 조절 도메인(regulatory domain)과 C-말단 부위의 효소활성을 지닌 촉매 도메인(catalytic domain)으로 구성되어 있다[4]. PAK1의 N-말단 부위에는 Rho GTPase 단백질인 Cdc42와 Rac이 결합하는 p21-binding domain (PBD)이 있다[2]. PAK1의 PBD (67-113 아미노산)는 Cdc42와 Rac이 결합하는 최소한의 자리인 Cdc42 and Rac Interactive Binding (CRIB, 75-90 아미노산)이라는 아주 짧은 서열을 갖고 있다[5]. PAK1이 활성이 없을 때에는 PAK1의 조절 도메인과 촉매 도메인이 역으로 결합하고 있는 형태의 homodimer를 이루고 있는 것으로 추정된다[5, 6]. 비활성형의 PAK1에 Rho GTPase가 결합하면 homodimer가 monomer로 분리되고, 쓰레오닌 423 (T423) 부위의 인산화에 이은 N-말단 부위의 다중 인산화에 의해 PAK1은 완전히 활성화된 형태로 바뀐다[7, 8].

뿐만 아니라 PAK은 암 발생, 암세포의 생존 및 사멸과 밀접한 관계를 갖고 있다[9, 10]. 특히, PAK1은 유방암(breast cancer), 결장암(colon cancer), 자궁암(ovarian cancer) 및 방광암(bladder cancer)에서 과발현 되어 있고[9], 과발현에 의한 PAK1의 활성 증가가 발암에서 중요한 역할을 한다고 보고되었다[11]. 따라서 PAK은 암을 치료할 수 있는 주요 표적으로 인식되었고, PAK의 효소 활성을 조절할 수 있는 약물개발에 많은 연구가 진행되고 있다[12-14].

*Corresponding author: Eun-Young Shin

Department of Biochemistry, College of Medicine, Chungbuk National University, Cheongju 28644, Korea

Tel: +82-43-261-2865, Fax: +82-43-272-1603 E-mail: eyshin@chungbuk.ac.kr

그룹-I PAK의 대표적인 저해제인 IPA-3는 PAK2의 세린 192/197 잔기의 인산화를 저해함으로써 PAK2의 활성을 억제하는 것으로 보고되었다[15]. IPA-3는 PAK 그룹-I의 조절 도메인에 결합하여 PAK 그룹-I에 대해 특이적인 강한 저해효과를 보인다. PAK1에 대해 95%, PAK2에 대해 70% 및 PAK3에 대해 60%의 활성 억제 효과를 나타내는 저분자 물질(small molecule)로, 그룹-II PAK에는 영향을 주지 않는 것으로 알려졌다[13]. 또한, PAK1이라는 PAK1의 인산화를 억제하고, Ras에 의한 암 성장을 억제할 수 있는 펩타이드 제제가 보고되어 있다[16].

본 연구자는 그룹-I PAK의 조절 도메인에 있는 Cdc42/Rac이 결합하는 PBD 부위에 결합하여 PAK의 효소활성을 억제하는 다른 부위 저해제(allosteric inhibitor)를 발굴하는 ELISA 방법을 고안하였고, 1,4-naphthoquinone 계열의 화합물을 검색하여 PAK1과 PAK3에 대해 특이적으로 작용하는 저해제를 발굴하였다[17]. 본 연구는 1,2-naphthoquinone (1,2-NQ) 계열의 화합물을 이용하여 PAK에 대한 저해 효과를 검증하고자 하였다. 1,2-NQ 유도체들 중 rhinacanthone, beta-lapachone 및 mansonones 등은 자연계에서도 발견되는 물질들이고 세포독성을 가지고 있는 물질로 알려졌다[18-20]. 암세포를 죽이는 신규 후보 물질로 주목 받고 있다. 특히, 최근 1,2-NQ 유도체들이 Hep-G2, MG-63 및 MCF-7 등의 다양한 암세포주에 대해 세포독성을 가진다는 것이 알려지면서 항암제로의 개발 가능성을 검증하기 위한 연구가 진행되고 있다[21]. 본 연구에서는 1,4-NQ 유도체에 대한 선형 연구결과를 바탕으로, 5종의 1,2-NQ 계열 화합물에 PAK1에 대한 저해 효과를 검증하고, 이에 따른 생물학적 활성 조절 효과를 관찰함으로써 NQ 화합물의 PAK1 저해 효과를 검증하고자 하였다.

Materials and Methods

Materials

5종의 4-benzene-1,2-NQ 화합물은 한국화학연구원에서 분양 받아 사용하였다. Carbonate-bicarbonate buffer, phosphate-citrate buffer with sodium perborate, bovine serum albumin (BSA), bicarbonate buffer, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS), anti-GST-horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody, XTT kit 및 myelin basic protein (MBP)는 Sigma Aldrich 제품을 사용하였다. 세포배양에 사용한 배양액 및 fetal bovine serum (FBS)은 Thermo Fisher Scientific 제품을 사용하였다. Myc과 GFP에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구매하였다. 정제된 GST-PAK1-wild type (WT) 단백질은 Abcam에서 구매하였고, 활성형인 GST-PAK1 (T423E) 단백질은 본 연구실에서 발현 정제하여 사용하였다. [γ - 32 P]ATP는 Perkin-Elmer 제품을 사용하였다.

GST-Cdc42와 PBD-His 단백질 발현 및 정제

LB 배양액에서 배양한 GST-Cdc42균은 1mM IPTG를 넣고 6시간 추가 배양하여 단백질 발현을 유도하였다. 단백

질 발현 후 세포를 모아 초음파분쇄기에 처리하여 대장균으로부터 단백질을 용출하였다. 용출된 단백질은 glutathione affinity chromatography를 실시하여 GST-Cdc42 단백질만을 취하였다. PBD-His 균도 위와 같은 과정을 통해 단백질을 발현시킨 후 NTA-Ni affinity chromatography를 실시하여 PBD-His 단백질을 정제하였다. 정제한 단백질은 Lowry 방법을 이용해 단백질을 정량하였고, 정제한 단백질은 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다.

세포배양

293T 세포는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Thermo Fisher Scientific, USA)에 10% FBS와 $1 \times$ antibiotic-antimycotic solution이 섞인 배지에서 배양하였고, NIH3T3 세포는 DMEM 배양액에 10% calf serum과 $1 \times$ antibiotic-antimycotic solution이 섞인 배지에서 배양하였다. HeLa 세포는 minimum essential medium (MEM) 배양액에 10% calf serum과 $1 \times$ antibiotic-antimycotic solution이 섞인 배지에서 배양하였다. 상기 세포는 모두 37°C, 5% CO₂ 농도의 세포배양기에서 배양하였다.

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) 법을 이용한 결합 관찰

96 well plate에 30 ng PBD-His를 carbonate-bicarbonate buffer와 함께 섞은 후 각 well에 50 μ L씩 넣고 4°C에서 16 시간 동안 결합시켰다. 결합시킨 후 PBS-T (0.1% Tween20 in PBS) 200 μ L를 넣어 3번 세척하였다. 블로킹을 위해 1.5% BSA 용액을 넣고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 200 μ L PBS-T로 3번 세척하였다. GST-Cdc42 단백질은 Tris-HCl (pH7.4)용액에 1 μ g/mL 농도로 희석하여 준비하였다. 이 조건에서 100 μ M의 NQ 화합물을 혼합한 후 각 well에 분주하였다. 반응은 37°C 배양기에서 1시간 동안 유도하였고, 반응 후 PBS-T 용액 200 μ L로 3번 세척하였다. Anti-GST-HRP conjugated antibody (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)는 1:5000으로 희석한 후에 각 well에 50 μ L씩 넣고 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 반응 후 PBS-T 용액으로 3번 세척하였고, 발색시약 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 각 well에 넣은 후 37°C에서 20분간 처리하여 발색을 유도하였다. 결과는 Microplate reader (SpectraMax M2, Molecular Devices, Sunnyvale, USA)로 405 nm에서 흡광도를 측정하여 관찰하였다.

In vitro 인산화효소 활성 측정

정제된 GST-Cdc42 단백질(2 μ g)과 GTP γ S (100 μ M)를 미리 결합시킨 후, GST-PAK1-WT 및 T423E 단백질을 각 200 ng과, 기질로 사용되는 MBP 2.5 μ g를 취해 $1 \times$ kinase buffer, $1 \times$ ATP, [γ - 32 P]ATP (5 μ Ci)를 추가하여 혼합하였다. 이 조건에서 각 NQ 화합물 20 μ M를 섞어준 후 30°C에서 30분 동안 인산화 반응을 유도하였다. 인산화 반응은 SDS loading 용액을 첨가한 후 100°C에서 5분간 끓여 반응을 멈추게 하였다. 반응시료는 12% sodium dodecyl sulfated-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-

PAGE)를 실시한 후 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane으로 이동시켰다. 인산화 단백질을 관찰하기 위해 PVDF membrane은 X-ray 필름을 이용해 -70°C 에서 16시간 동안 방치 후 현상하였다. 첨가된 단백질은 GST 및 MBP 항체를 이용해 면역블롯을 실시하였다.

유전자 트랜스펙션

293T 세포는 트랜스펙션 하루 전에 배양접시에 깔아 놓았다. 트랜스펙션에 사용하는 plasmid DNA 1 μg 과 500 μL OPTI-MEM 배양액(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)을 섞고, 4 μL Lipofectamine 2000(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)과 500 μL OPTI-MEM 배양액을 섞은 2개의 튜브를 각각 준비한 후 2 튜브를 다시 섞어서 상온에 20분간 방치하였다. 준비한 세포는 무혈청 배지로 1회 세척한 후 준비한 혼합액을 세포에 추가하여 4시간 배양하였다. 4시간 후 정상적인 세포배양액으로 교체하고, 24시간 추가 배양하여 트랜스펙션한 DNA가 세포에서 단백질로 발현되도록 유도하였다. 단백질 발현은 적절한 항체를 이용한 면역블롯을 통해 확인하였다.

세포 이동성 측정

NIH3T3 세포는 6 well plate에 충분히 짝 차도록 깔았다($6 \times 10^5/\text{well}$). 배양한 세포는 yellow tip끝을 이용해 상처를 내어 움직인 부분만큼의 세포를 제거하여 빈 공간을 만들고, 세포를 무혈청 배지로 1회 세척한 후 0.5% calf serum을 포함한 DMEM를 추가하였다. 이 조건에서 25 ng/mL PDGF와 NQ 화합물을 농도별(0, 5, 10, 20 μM)로 첨가한 후 24시간 동안 세포배양기에서 배양하며 세포이동 저해효과를 관찰하였다. NQ 화합물은 각각 3 well씩 준비하여 실험하였다. 세포 이동 유도 전후의 빈 공간의 길이 변화를

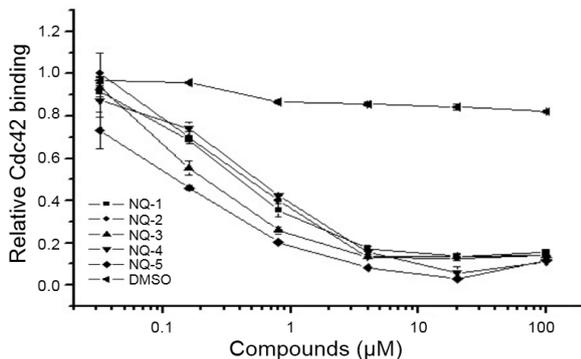


Fig. 1. Inhibitory effect of Cdc42-PBD interaction by NQ compounds. PBD-His (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) coated microplates were incubated with 5 compounds (0, 0.032, 0.16, 0.8, 4, 20, 100 μM) and GTP bound GST-Cdc42 (100 ng/mL) for 1 hr at room temperature (RT). Then ELISA reaction was performed with HRP-conjugated anti-GST antibody. The relative Cdc42 binding to PBD was calculated from ELISA data. Each experiment was carried out in triplicates and the data are a representative of three independent experiments. The value is expressed as mean \pm SD (the value obtained from DMSO treatment as a control was arbitrarily set to 1)

측정하여 세포이동거리를 분석하였고, 세포이동은 Cooled CCD 카메라(Cascade 512B, Photometrics, Tucson, USA)가 부착된 역위상차 현미경(Olympus IX81-ZDC, Japan)을 이용해 촬영하였고, 이동거리 분석은 MetaMorph software, version 7.1.7(Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하였다.

면역침전 및 면역블롯

차가운 세포용출액(50 mM HEPES, pH 7.5; 150 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Triton X-100, 500 μM EDTA, 200 μM sodium-pyruvate, and 50 mM β -glycerol-phosphate)에 처리하여 세포를 용해시킨 후 단백질 용출액을 준비하였다. 면역침전을 위해서 단백질 용출액 1 mg을 면역침전하고자 하는 일차항체 1 μg 을 넣고 4°C 에서 16시간 동안 반응시킨 후 protein G-agarose (GE Healthcare, Little Chalfont Bucks, UK)와 결합시켰다. 항체와 결합한 단백질은 PBS로 3회 세척한 후 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동 후 단백질은 PVDF membrane으로 이동시킨 후 면역블롯을 실시하였다. 면역블롯은 PVDF membrane을 3% 무지방 우유 용액에 30분간 처리하여 블로킹하였다. 일차 항체는 3% BSA 용액에서 1:1000으로 희석한 후 상온에서 1시간동안 반응시켰다. PBS-T 용액에서 3회 세척한 후 HRP-conjugated 2차 항체를 희석한 용액에서 1시간 처리하고 3회 세척하였다. 면역블롯의 결과는 enhanced chemiluminescence (ECL) 시약을 처리에 반응을 유도한 후 Luminescent 영상 분석 장비 (LAS-3000, Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan)를 이용해 관찰하였다.

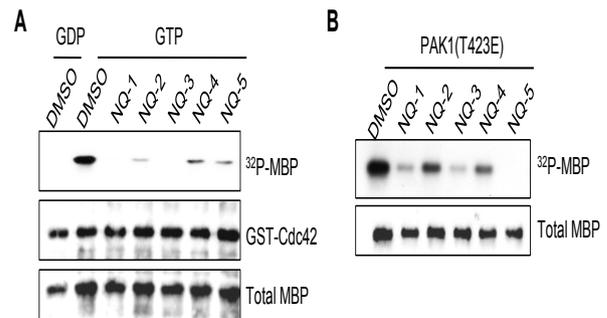


Fig. 2. Inhibitory effect for PAK1 activation by NQ-5 compounds *in vitro* kinase assay. (A) Inhibition of Cdc42-dependent PAK1 activation by 5 compounds *in vitro* kinase assay. GTP-Cdc42, PAK1 (200 ng), MBP (2.5 μg), and [γ - ^{32}P]-ATP were incubated with each 20 μM compound for 30 min at 30°C and resolved in SDS-PAGE. MBP phosphorylation was analyzed by autoradiography. GST-Cdc42 and MBP proteins were analyzed by Western blotting with anti-GST or MBP antibody. (B) Direct inhibitory effect on active PAK1 *in vitro* kinase assay. Active PAK1(T423E), MBP, and [γ - ^{32}P]-ATP were incubated with each 20 μM compound for 30 min at 30°C and MBP phosphorylation was analyzed by autoradiography. MBP protein was analyzed by Western blotting using anti-MBP antibody.

Results

NQ 화합물에 의한 PAK1의 PBD와 Cdc42 사이의 결합 억제

PAK1의 PBD에 활성형인 GTP-Cdc42가 결합하면 PAK1은 인산화되며, 이는 곧 PAK1의 활성화를 의미한다. 이런 특성을 이용하여 PBD와 Cdc42간의 결합을 억제할 수 있는 물질을 개발함으로써 PAK1의 활성 저해제를 발굴하고자 하였다. 본 연구팀은 선행연구에서 이와 같은 방법으로 1,4-NQ 유도체를 이용하여 PAK1의 저해제를 개발하여 보고 하였다[17]. 본 연구는 이를 변형한 5개의 1,2-NQ 유도체 화합물을 이용하여 PAK1의 PBD와 Cdc42 사이의 결합을 억제할 수 있는가를 관찰하였다(Fig. 1). 박테리아에서 발현 및 정제한 PBD-His와 GST-Cdc42 단백질을 이용하여 NQ 화합물이 두 단백질간의 결합을 억제할 수 있는지 ELISA 방법으로 분석하였다. 5종의 NQ 화합물 모두 PBD와 Cdc42 사이의 결합을 처리한 농도(0, 0.032, 0.16, 0.8, 4, 20, 100 μM)에 비례하여 억제함을 관찰할 수 있었다(Fig. 1 & Table 1).

NQ 화합물에 의한 PAK1의 효소활성 억제

5종의 NQ 화합물을 이용하여 GTP-Cdc42에 의해 유도되는 GST-PAK1의 활성화와 활성화된 돌연변이 GST-PAK1 (T423E)의 효소활성 조절 여부를 *in vitro* kinase 활성조사를 통해 확인하였다(Fig. 2). 이때 PAK1의 활성화는 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP가 있는 조건에서 기질로 사용한 myelin basic protein (MBP)의 인산화 정도를 autoradiography로 분석함으로써 확인하였다. Cdc42에 의해 활성화되는 GST-PAK1-WT는 20 μM 농도로 NQ 화합물을 처리하였을 때 5종 모두 뚜렷하게 MBP의 인산화를 억제하는 것을 관찰할

수 있었다(Fig. 2A). NQ 화합물이 GTP-Cdc42와 PAK1 안에 있는 PBD 부위와의 결합을 특이적으로 저해함으로써 PAK1의 인산화 효소 활성을 억제함을 의미한다. 뿐만 아니라 이 화합물들은 활성형의 GST-PAK1 (T423E)이 MBP를 인산화시키는 것도 억제하였다(Fig. 2B). 즉, NQ 화합물은 이미 활성화된 PAK1에 대해서도 저해효과를 나타냄을 의미한다. 그러나, NQ 화합물들은 활성형인 GST-PAK1 (T423E)을 억제하는 것 보다 GTP-Cdc42에 의해 유도되는 GST-PAK1-WT의 활성화를 억제하는 데 보다 효과적임을 알 수 있었다(Fig. 2A). 이러한 연구결과를 바탕으로 본 연구는 5종의 NQ 화합물 중에 두 가지 조건 모두에서 가장 강한 저해 효과를 나타내는 NQ-5 화합물을 선택하여 농도에 따른 PAK1에 대한 활성 저해효과를 보다 구체적으로 확인하였다.

NQ-5의 PAK1 활성 저해 효과 조사

농도에 따른 NQ-5의 PAK1 활성 저해효과를 *in vitro* kinase assay를 통해 확인하였다(Fig. 3). GST-PAK1-WT 단백질과 GTP가 결합된 GST-Cdc42-GTP 단백질을 이용하여 0, 5, 10, 25, 50 μM 농도의 NQ-5를 처리한 후 기질인 MBP의 인산화 정도를 비교하였다. 처리한 NQ-5의 농도

Table 1. Structure and IC₅₀ (μM) of NQ compounds

Compound	Structure	Cdc42-PBD interaction IC ₅₀ (μM) ³
NQ-1		0.47 ± 0.15
NQ-2		0.53 ± 0.165
NQ-3		0.27 ± 0.097
NQ-4		0.54 ± 0.098
NQ-5		0.13 ± 0.028

^ameans ± S.D. NQ = Naphthoquinone
These compounds are modified from NQ.

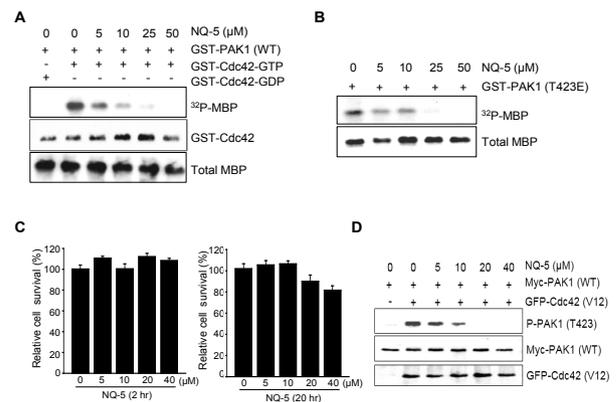


Fig. 3. Inhibitory effect for PAK1 activation of NQ-5 compound. (A) Inhibition of Cdc42-dependent PAK1 activation by NQ-5 *in vitro* kinase assay. GTP-Cdc42, PAK1 (200 ng), MBP (2.5 μg) and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP were incubated with NQ-5 compound (0, 5, 10, 25, and 50 μM) for 30 min at 30°C, and MBP phosphorylation was analyzed by autoradiography. (B) Direct inhibitory effect on active PAK1 *in vitro* kinase assay. Active PAK1(T423E), MBP, and $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP were incubated with NQ-5 (0, 5, 10, 25, and 50 μM) for 30 min at 30°C and MBP phosphorylation was analyzed by autoradiography. (C) 293T cells in a 96-well plate were incubated with 0, 5, 10, 20, 40 μM NQ-5 for 2 hr (left) or 20 hr (right) and then added to XTT solution for 4 hr. Cell viability was analyzed to read absorbance at 450 nm. (D) Inhibition of Cdc42-dependent PAK1 activation by NQ-5 in 293T cells. Cells were transfected with myc-PAK1 (Wild type) and GFP-Cdc42 (V12). After 24 hr, cells were treated with 0, 5, 10, 20, and 40 μM NQ-5 for 2 hr. Cell lysates were analyzed on Western blotting with anti-phospho-PAK1 (T423), Myc or GFP antibody.

가 5 μM 일때부터 현저하게 PAK1의 활성이 억제되어 MBP의 인산화가 감소됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 3A). 또한 대장균에서 발현 정제된 활성형의 GST-PAK1 (T423E)에 대해 같은 실험을 수행하였을 때도 5 μM 의 농도에서부터 뚜렷하게 MBP 인산화 억제효과를 관찰 할 수 있었다(Fig. 3B). 본 결과로부터 NQ-5는 5~10 μM 농도에서 PAK1의 인산화효소 활성을 매우 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

In vitro kinase assay에서 NQ-5는 농도 의존적으로 PAK1의 효소 활성을 억제하였다. 그러므로 NQ-5가 실질적으로 세포 내에서도 PAK1의 활성을 억제할 수 있는가를 알아보았다. NQ-5의 세포 내에서 처리한 농도 의존적으로 PAK1의 활성을 억제할 수 있는가를 알아보기 위해 먼저 NQ-5의 세포 독성 여부를 검증하여야 하였다. NQ-5를 0, 5, 10, 20, 40 μM 농도로 각각 2시간(Fig. 3C, left)과 20시간 처리(Fig. 3C, right) 한 세포에 대한 독성을 XTT 활성 측정법으로 관찰하였다. 그 결과 NQ-5를 2시간 처리하였을 때 모든 농도에서 세포독성은 나타나지 않았고, 20시간 처리 시 저농도에서는 거의 세포독성이 나타나지 않았으나 20 μM 과 40 μM 농도에서 약 10~20%의 세포가 죽는 것이 관찰되었다(Fig. 3C). 293T 세포에 pCMV-Myc-PAK1 (WT)

과 활성형의 GFP-Cdc42(V12) 유전자를 트랜스펙션하여 24시간동안 발현 시킨 후 NQ-5를 0, 5, 10, 20, 40 μM 농도로 2시간 처리하였다. 이 과정을 통해 얻은 세포 용출액을 전기영동한 후 발현시킨 Myc-PAK1의 쓰레오닌 432번 아미노산(T423) 잔기의 인산화를 PAK1의 T423의 인산화 특이적인 항체 [P-PAK1(T423)]를 이용해 면역블롯을 실시하였다(Fig. 3D). PAK1의 T423 인산화는 곧 PAK1의 활성화를 확인하는 대표적인 방법이다. NQ-5의 처리한 농도 의존적으로 세포 내 PAK1의 인산화를 현저하게 억제하는 것을 관찰하였다(Fig. 3D). 그러므로 NQ-5가 세포 내에서도 PAK1 활성을 저해할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

PDGF에 의해 유도되는 PAK1의 활성화에 대한 NQ-5의 저해효과

외부 자극에 의한 PAK1의 활성화를 이 화합물이 억제할 수 있는가 알아보기 위해 platelet-derived growth factor (PDGF)에 의한 PAK1의 활성화를 유도하였다. NIH3T3 세포에 PDGF를 처리하면 PAK1 활성화된다[3]. PDGF에 의해 활성화되는 PAK1의 하부 신호전달과정이 NQ-5에 의해 조절되는지 관찰하였다(Fig. 4). NIH3T3 세포에 pCMV-Myc-PAK1 (wild type) 유전자를 트랜스펙션하여 Myc-PAK1을 과발현 시킨 후 40 μM NQ-5를 2시간 처리한 후 PDGF를 30분간 처리 하였다(Fig. 4A). 이 조건에서 과발현 된 Myc-PAK1의 인산화가 현저히 감소하는 것을 관찰하였다. 뿐만 아니라 NIH3T3 세포에 NQ-5를 각각 20 μM 과 40 μM 를 각각 2시간 처리한 후 PDGF를 30분간 처리하여, PDGF 자극에 대한 NQ-5가 세포 내에 존재하는 endogenous PAK1의 T423 아미노산의 인산화를 뚜렷하게 억제하는 것을 관찰하였다(Fig. 4B). 이는 NQ-5가 세포 내에서 PDGF 자극에 의한 PAK1의 활성화 기전을 효과적으로 저해할 수 있음을 시사하는 결과이다.

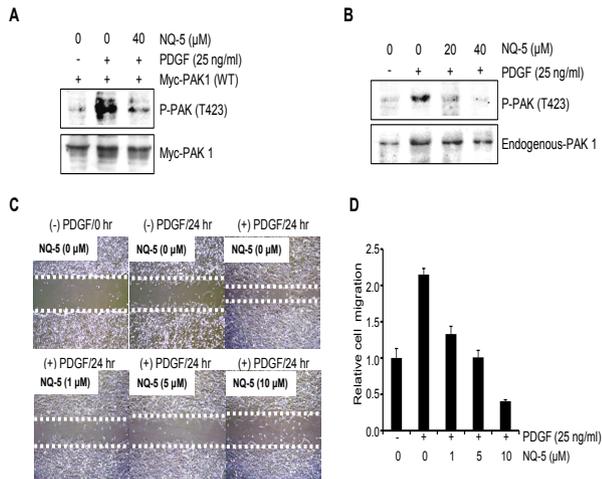


Fig. 4. Inhibitory effect for PDGF-induced PAK1 activation and cell migration by NQ-5 in NIH3T3 cells. (A) Inhibitory effect for PDGF-stimulated PAK1 activation by NQ-5. NIH3T3 cells were transfected with myc-PAK1 (wild type). Serum starved cells were pretreated with 0 or 40 μM NQ-5 for 2 hr and stimulated with 25 ng/mL PDGF for 30 min. Cell lysates were immunoblotted with indicated antibodies. (B) Inhibitory effect for PDGF-induced endogenous PAK1 activation by NQ-5. Serum starved NIH3T3 cells were pretreated with 0, 20, or 40 μM NQ-5 for 2 hr and stimulated with 25 ng/ml PDGF for 30 min. Cell lysates were immunoblotted with indicated antibodies. (C) Photograph for PDGF-induced wound migration in NIH3T3 cells. Wounded NIH3T3 cells were stimulated with 25 ng/ml PDGF with NQ-5 (0, 1, 5, and 10 μM) for 24 hr. Then migrating areas were imaged by Olympus IX81-ZDC inverted microscope equipped with a cooled CCD camera. (D) Migration activity was analyzed using MetaMorph software.

PDGF에 의해 유도되는 세포이동에서 NQ-5의 저해효과

NQ-5 화합물이 PAK1의 활성을 억제함을 확인하였으므로 PAK1에 의해 조절되는 생물학적 기능을 조절하는지 알아보려 하였다. PDGF는 PAK1을 활성화시키고 이는 세포의 이동성을 조절한다[22]. 그러므로 이를 검증하기 위해 NQ-5를 이용하여 PDGF에 의해 유도되는 wound migration assay를 실시하였다. NIH3T3 세포는 yellow tip으로 상처(wound)를 만든 후 25 ng/mL PDGF를 24시간 동안 처리하여 세포이동을 유도한다. 이때 각각 0, 1, 5, 10 μM 의 NQ-5를 함께 처리하여 이 화합물이 세포이동에 미치는 영향을 조사하였다. PDGF를 처리하지 않은 조건과 PDGF만을 처리한 조건을 비교하면 PDGF에 의해 약 2 배 세포이동이 증가 하였다(Fig. 4C). 그러나 NQ-5를 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 세포이동이 점진적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있다(Fig. 4D). 이상의 결과로부터 NQ-5는 PDGF에 의한 PAK1의 활성을 저해함으로써 PDGF에 의해 세포이동을 억제할 수 있다는 것을 관찰하였다.

Discussion

단백질 인산화효소의 과발현 혹은 돌연변이 등에 의한 활성의 변화는 다양한 질병과 연관이 있고, 특히 암에서 중요한 역할을 한다. 1990년대 후반부터 개발된 Trastuzumab,

Gefitinib, Cetuximab 등은 세포 표면의 수용체에 연결된 타이로신(tyrosine) 인산화효소의 활성을 억제하는 암 치료제이다[23]. 골수성 백혈병 치료제인 Imatinib의 출현 이후, 인산화효소를 표적으로 하는 신약개발이 본격화 되었다[24, 25]. 인산화효소 저해제에 대한 관심은 새로운 표적단백질의 발굴과 인산화효소 활성 저해제를 검색하는 방법의 개발로 이어지고 있다. 최근 들어 저비용으로 대용량의 라이브러리를 신속하고 정확하게 검색하는 방법의 개발은 신약 개발에 있어 해결해야 할 중요한 과제 중의 하나라고 할 수 있다. 근래에 인산화효소에 대한 선택성을 높이기 위하여, ATP 결합자리가 아닌 기질의 결합자리나 조절 도메인의 결합자리에 작동하는 다른자리(allosteric) 저해 물질의 발굴에 관심이 집중되고 있다[24].

PAK1은 PAK family 중에서 가장 많이 연구되었으며, PAK1의 발현 및 활성 증가가 대장암, 유방암, 자궁암 등 다양한 암에서 보고 되어 있다[2, 11]. 6개의 아소자임을 가지는 PAKs은 C-말단에 아미노산 서열이 매우 유사한 인산화효소 도메인을 가진다. 특히 그룹 안에서 인산화효소 도메인 뿐만 아니라 N-말단 부위의 조절 도메인도 매우 유사한 구조를 가진다. ATP 결합 부위를 표적으로 사용할 경우, 저해효과는 강하지만 인산화효소 간의 구조적 유사성으로 인해 특이성이 부족한 경우가 많다. 그래서 인산화효소 도메인이 아닌 조절 도메인에 작용하는 저해제를 발굴하고자 하지만 쉽지 않다. 그 예로, PAK1의 활성 저해제로 개발된 IPA-3는 PAK1의 조절 도메인에 결합하는 다른자리 저해제이며, 중앙의 활성을 억제하는 것으로 보고되었다[26]. IPA-3는 PAK1의 다른자리 저해제로 개발되었지만 PAK1뿐만 아니라 그룹 I에 속하는 PAK2와 PAK3에 대해서도 유사한 저해효과를 보이는 것으로 알려졌다[14]. 이러한 예는 특이적인 PAK 활성 저해제 개발이 어렵다는 것을 시사한다.

본 연구자는 PAK1에 대해 특이적인 활성 저해제를 개발하기 위해 PAK1의 N-말단 부위에 위치한 조절 도메인 중 활성형 Cdc42와 Rac이 결합하는 부위인 PBD 부분을 이용하였다. 즉, PBD 부위와 활성화된 Cdc42의 결합을 억제시키는 물질을 ELISA방법으로 검색하였고, 두 단백질의 결합을 억제시키는 물질이 PAK1의 활성을 저해할 수 있는가를 다양한 방법으로 관찰하여 보고하였다[17]. PAK1의 PBD 부위에 활성화된 Cdc42의 결합이 일어나서 PAK1의 인산화효소 도메인의 구조가 변화되어야 PAK1이 정상적으로 활성화 될 수 있기 때문에 두 단백질 사이의 결합을 억제한다는 것은 PAK1의 활성을 저해할 가능성을 강하게 시사하는 것이다. 본 연구에서 사용한 4-benzene-1,2-NQ 화합물 5종은 Cdc42에 의한 PAK1의 활성화 및 활성화된 PAK1에 대해 효소활성을 억제하였다. 특히, NQ-5는 NIH3T3 세포에서 PDGF 자극에 의한 PAK1의 활성 및 PDGF 자극에 의해 유도되는 세포이동을 효과적으로 저해하였다. PDGF는 PAK1을 활성화시키고, PAK1의 조절 도메인의 NCK domain에 활성화를 일으켜 PAK1을 인산화시키고 Cdc42의 활성화에도 영향을 주어 세포의 운동성을 조절한다는 보고가 있다[22, 27]. NQ-5는 PDGF에 의해 증가하는 세포 운동성을 저해하기에 PDGF 자극에 의한 NCK와 Cdc42의 활성 억제에 영향을 미치는 것이라 유추해 볼 수 있다. NQ-5의 PAK1에 대한 저해효과를 보다 구체적으로 확인하기 위해서는 PAK의 6종 아이소자임에 대한 저해효과를 비교하거

나 기존의 다른 인산화효소들에 대한 저해효과를 알아본다면 PAK1에 대해 특이적으로 작용하는지를 구분할 수 있을 것이다. 본 연구는 NQ 화합물 5종이 유사하게 PAK1에 대한 저해효과를 나타내고, NQ-5가 NIH3T3 세포에서 PDGF 자극에 의해 PAK1의 인산화가 감소하여 활성이 억제됨을 확인하였고, 또한 PDGF 자극에 의한 세포이동을 억제함을 관찰할 수 있었다.

본 연구는 5 종의 NQ 화합물 유도체가 PAK1의 PBD 부위와 GTP-Cdc42 사이의 결합을 억제함으로써 *in vitro*에서 PAK1에 대한 인산화효소 저해효과가 있음을 확인하였다. 그 중에 NQ-5 화합물은 세포 내에서도 PAK1의 활성을 억제할 뿐만 아니라 PDGF 자극에 의한 PAK1의 활성화 억제 및 세포이동 억제에 효과적임을 확인하였다. 그러나 NQ-5를 PAK1에 대한 효과적인 저해제로 개발하기 위해서는 몇 가지 추가적으로 확인해야 할 연구가 남아있다. 즉, NQ-5의 PAK1 저해효과의 특이성을 관찰하기 위해 그룹 I의 PAK 아이소자임인 PAK1, PAK2 및 PAK3에 대한 저해효과를 비교 관찰해야 할 것이다. 또한 NQ-5를 이용하여 기존의 다른 인산화효소들에 대한 저해효과를 알아보기 위하여 주요 인산화효소들에 대한 활성 저해 효과를 비교해야 할 것이다. 뿐만 아니라 본 연구결과에서는 NQ-5를 포함한 5개의 NQ 화합물이 PBD 부위에 결합하는 것이지, 혹은 Cdc42에 직접 결합하는 것인지 분명하게 확인하지 못했다. 단지 두 단백질 사이의 결합을 저해하고, 결합 저해가 PAK1의 효소 활성을 억제한다는 것을 확인한 것이다. 이를 PAK1에 대한 저해 약물로 개발하기 위해서는 NQ 화합물과 두 단백질간의 결합 특성에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각한다. 이상과 같은 아직 해결해야 할 문제들이 남아 있지만 현 단계에서는 NQ-5를 포함한 5 종의 NQ 화합물 유도체들은 PAK1의 활성 저해제로의 가능성을 강하게 가지고 있기 때문에 지속적인 연구 수행이 필요한 PAK1 활성 저해 후보물질로 분류할 수 있을 것이다.

Acknowledgements

이 논문은 2015년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(NRF-2015R1A2A2A04004251)과 2015년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

ORCID

Eun-Young Shin, <http://orcid.org/0000-0002-9527-4535>

References

1. Manser E, Leung T, Salihuddin H, Zhao ZS, Lim L. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* 1994;367:40-46.
2. Jaffer ZM, Chernoff J. p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell B* 2002;34:713-717.
3. Beeser A, Jaffer ZM, Hofmann C, Chernoff J. Role of group A p21-activated kinases in activation of extracellular-regulated kinase by growth factors. *J Biol Chem*

- 2005;280:36609-36615.
4. Bokoch GM. Biology of the p21-activated kinases. *Ann Rev Biochem* 2003;72:743-781.
 5. Lei M, Lu W, Meng W, Parrini MC, Eck MJ, Mayer BJ, Harrison SC: Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 2000;102:387-397.
 6. Parrini MC, Lei M, Harrison SC, Mayer BJ. Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol Cell* 2002;9:73-83.
 7. Yu JS, Chen WJ, Ni MH, Chan WH, Yang SD. Identification of the regulatory autophosphorylation site of autophosphorylation-dependent protein kinase (auto-kinase). Evidence that auto-kinase belongs to a member of the p21-activated kinase family. *Biochem J* 1998;334:121-131.
 8. Zenke FT, King CC, Bohl BP, Bokoch GM. Identification of a central phosphorylation site in p21-activated kinase regulating autoinhibition and kinase activity. *J Biol Chem* 1999;274:32565-32573.
 9. MKumar R, Gururaj AE, Barnes CJ. p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6:459-471.
 10. Kumar R, Li DQ. PAKs in Human Cancer Progression: From Inception to Cancer Therapeutic to Future Oncobiology. *Adv Cancer Res* 2016;130:137-209.
 11. Siu MK, Wong ES, Chan HY, Kong DS, Woo NW, Tam KF, Ngan HY, Chan QK, Chan DC, Chan KY et al: Differential expression and phosphorylation of Pak1 and Pak2 in ovarian cancer: effects on prognosis and cell invasion. *Int J Cancer* 2010;127:21-31.
 12. Thaimattam R, Banerjee R, Miglani R, Iqbal J. Protein kinase inhibitors: structural insights into selectivity. *Cur Pharm Design* 2007;13:2751-2765.
 13. Deacon SW, Beeser A, Fukui JA, Rennefahrt UE, Myers C, Chernoff J, Peterson JR. An isoform-selective, small-molecule inhibitor targets the autoregulatory mechanism of p21-activated kinase. *Chem Biol* 2008;15:322-331.
 14. Viaud J, Peterson JR. An allosteric kinase inhibitor binds the p21-activated kinase autoregulatory domain covalently. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2559-2565.
 15. Flaiz C, Chernoff J, Ammoun S, Peterson JR, Haneemann CO. PAK kinase regulates Rac GTPase and is a potential target in human schwannomas. *Exp Neurol* 2009;218:137-144.
 16. He H, Hirokawa Y, Manser E, Lim L, Levitzki A, Maruta H. Signal therapy for RAS-induced cancers in combination of AG 879 and PP1, specific inhibitors for ErbB2 and Src family kinases, that block PAK activation. *Cancer J* 2001;7:191-202.
 17. Kim DJ, Choi CK, Lee CS, Park MH, Tian X, Kim ND, Lee KI, Choi JK, Ahn JH, Shin EY, Shin I, Kim EG. Small molecules that allosterically inhibit p21-activated kinase activity by binding to the regulatory p21-binding domain. *Exp Mol Med* 2016;48:e229.
 18. Thirumurugan RS, Kavimani S, Srivastava R S. (2000). Antitumour activity of rhinacanthone against Dalton's ascitic lymphoma. *Biol Pharm Bull* 2000;23:1438-1440.
 19. Frydman B, Marton LJ, Sun JS, Neder K, Witiak DT, Liu AA, Wang HM, Mao Y, Wu HY, Sanders MM, Liu LF. Induction of DNA topoisomerase II-mediated DNA cleavage by beta-lapachone and related naphthoquinones. *Cancer Res* 1997;57:620-627.
 20. Wang D, Xia M, Cui Z, Tashiro S, Onodera S, Ilkejiima T. Cytotoxic effects of mansonone E and F isolated from *Ulmus pumila*. *Biol Pharm Bull* 2004;27:1025-1030.
 21. Shukla S, Srivastava RS, Shrivastava SK, Sodhi A, Kumar P. Synthesis, characterization and antiproliferative activity of 1,2-Naphthoquinone and its derivatives. *Appl Biochem Biotechnol* 2012;167:1430-1445.
 22. Weber DS, Taniyama Y, Rocic P, Seshiah PN, Dechert MA, Gerthoffer WT, Griendling KK. Phosphoinositide-dependent kinase 1 and p21-activated protein kinase mediate reactive oxygen species-dependent regulation of platelet-derived growth factor-induced smooth muscle cell migration. *Cir Res* 2004;94:1219-1226.
 23. Vigneri P, Wang JY. Induction of apoptosis in chronic myelogenous leukemia cells through nuclear entrapment of BCR-ABL tyrosine kinase. *Nat Med* 2001;7:228-234.
 24. Dancy J, Sausville EA. Issues and progress with protein kinase inhibitors for cancer treatment. *Nat Rev Drug Disc* 2003;2:296-313.
 25. Habeck M. FDA licences imatinib mesylate for CML. *Lancet Oncol* 2002;3:6.
 26. Soo Ko J, Yoon HC, Yang H, Pyo HB, Hyo Chung K, Jin Kim S, Tae Kim Y. A polymer-based microfluidic device for immunosensing biochips. *Lab on a chip* 2003;3:106-113.
 27. Ruusala A, Pawson T, Heldin CH, Aspenstrom P. Nck adapters are involved in the formation of dorsal ruffles, cell migration, and Rho signaling downstream of the platelet-derived growth factor beta receptor. *J Biol Chem* 2008;283:30034-30044.