

2006년 2월

박사학위 논문

Sox4 단백질에 의한  $\beta$ -catenin의 분해  
유도 기전

조선대학교 대학원

치 의 학 과

임 경 수

Sox4 단백질에 의한  $\beta$ -catenin의 분해  
유도 기전

Sox4 induces degradation of  $\beta$ -catenin by promoting  
ubiquitination

2006년 2월 일

조선대학교 대학원

치의학과

임경수

Sox4 단백질에 의한  $\beta$ -catenin의 분해  
유도 기전

지도교수 윤 정 훈

이 논문을 치의학 박사학위신청 논문으로  
제출함

2005년 10월 일

조선대학교 대학원

치 의 학 과

임 경 수

# 임경수의 박사학위 논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	<u>이상호</u>	인
위원	원광대학교	교수	<u>김은철</u>	인
위원	조선대학교	교수	<u>김수아</u>	인
위원	조선대학교	교수	<u>안상건</u>	인
위원	조선대학교	교수	<u>윤정훈</u>	인

2005년 12월 일(박사)

조선대학교 대학원

# 목 차

표목차

도목차

## ABSTRACT

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	3
1. 세포배양과 transfection	3
2. Total RNA 추출과 RT-PCR	3
3. Plasmids	4
4. Immunoprecipitation과 Immunoblotting	4
5. Luciferase 리포터 유전자분석	5
III. 결과 및 고찰	6
1. Sox4에 의한 정상 $\beta$ -catenin의 저해	6
2. Sox4에 의한 $\beta$ -catenin/TCF 전사활성의 저해	6
3. $\beta$ -catenin 활성의 억제에서 Sox4 N-말단 부위의 역할	7
4. Sox4에 의한 $\beta$ -catenin의 저해에서 GSK3 $\beta$ 와 proteasome system의 역할	8
IV. 결 론	18
참고문헌	19

## 표 목 차

Table 1. Primers used for semiquantitative RT-PCR .....	4
---	---

## 도목차

Fig. 1. Expression level of $\beta$ -catenin and Sox4 in oral cancer cell lines	10
Fig. 2. Sox4 down-regulates the levels of wild-type $\beta$ -catenin	11
Fig. 3. Sox4 represses Wnt/ $\beta$ -catenin stimulated transcription	12
Fig. 4. The N-terminal region of Sox4 is essential for repression of Wnt signaling	13
Fig. 5. Blocking of proteasomal degradation and GSK3 $\beta$ activity inhibit the effect of Sox4 on $\beta$ -catenin	16

# ABSTRACT

## Sox4 induces degradation of $\beta$ -catenin by promoting ubiquitination

Kyung-Soo Lim

Advisor : Prof. Jung-Hoon Yoon

Department of Dentistry,

Graduate School of Chosun University

$\beta$ -catenin is a cytoplasmic protein that participates in the assembly of cell-cell adherens junctions by binding cadherins to the cytoskeleton. In addition, it is a key component of the Wnt signaling pathway. Activation of this pathway triggers the accumulation of  $\beta$ -catenin in the nucleus, where it activates the transcription of target genes. Abnormal accumulation of  $\beta$ -catenin is characteristic of polyposis coli (APC) or Axin tumor suppressor proteins, which regulates  $\beta$ -catenin degradation, or activating mutations in  $\beta$ -catenin molecule itself. Here we show that overexpression of Sox4 down-regulates wild type  $\beta$ -catenin in HEK 293 cells. The inhibitory effect of Sox4 on wild type  $\beta$ -catenin is apparently mediated by the ubiquitin-proteasome system and requires an active glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Mutations in the N-terminus of  $\beta$ -catenin (S33Y) which compromise its degradation by the proteasomes or inhibition of GSK3 $\beta$  activity rendered  $\beta$ -catenin resistant to down-regulation by Sox4. In light of recent evidence that Sox4 expression is activated in colon and other tumors with  $\beta$

-catenin dysregulation, our findings suggest that Sox4 is part of a feedback inhibitory pathway for Wnt signaling in normal cells. Moreover, the mutations in APC, Axin or  $\beta$ -catenin in cancer cells appear to render  $\beta$ -catenin resistant to the effects of Sox4 inhibition.

# I. 서론

$\beta$ -catenin은 세포와 세포간 결합에 있어서 중요한 구조적 성분으로 작용하며 Wnt signal transduction에서 중추적 역할을 수행한다. Wnt signal은 세포의 증식, 분화, 발생을 조절하는데 중요한 역할을 수행하며  $\beta$ -catenin의 안정화를 조절한다 (1-3). Wnt ligand는 frizzles과 저밀도 단백질 (LRP)로 구성되어 있는 transmembrane receptor 복합체에 결합하는데 이 receptor 복합체에 결합된 Wnt는 아직까지 밝혀지지 않은 기전을 통해 glycogen synthesis kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )의 활성을 억제한다. GSK3 $\beta$ 는 APC, Axin1 또는 Axin2 (Axil이나 conductin이라고도 불림)로 구성된 단백질 복합체에 결합하여  $\beta$ -catenin의 N-말단부위에 위치하는 특정 serine과/또는 threonine기를 인산화 시킨다 (3-5). 인산화된  $\beta$ -catenin은 SCF-type E3 ubiquitin ligase를 구성하는 F box 단백질인  $\beta$ -TrCP와 결합하여 ubiquitination되고 proteasome에 의해 분해된다 (2,3,6). Wnt ligand에 의해 GSK3 $\beta$ 가 불활성화되면  $\beta$ -catenin는 전사 인자인 TCF (T cell factor)와 LEF (lymphoid enhancer family)에 결합하여 핵과 세포질에 축적된다 (7,8). 핵에서 TCFs는  $\beta$ -catenin과 결합하여 특정 DNA 부위에 결합하고 target 유전자의 전사를 활성화시킨다 (1,9,10).

$\beta$ -catenin 조절과정의 결함이 다양한 인체의 암에서 보고되었다.  $\beta$ -catenin의 N-말단 부위에서 GSK3 $\beta$ 에 의해 인산화되는 부위의 돌연변이가 많은 다양한 암에서 발견되었다 (10). 직장암의 80% 이상에서 APC 종양 억제 유전자의 돌연변이에 의한  $\beta$ -catenin의 비정상적인 활성화가 보고되었다 (12-15).  $\beta$ -catenin 조절기전에서의 돌연변이는 c-MYC과 Cyclin D1 같은 종양형성과 세포성장에 중요한 영향을 미치는 유전자의 전사를 유도한다 (16-18).

Sox (SRY-like HMG box) 유전자는 배아 발달에 중요한 역할을 수행하는 유전자의 전사를 유도하는 전사유도 인자이다. Sox 단백질 family는 적어도 30개는 member들로 구성되어 있는데 발달단계 중에 다양한 세포와 조직에서 발현이 유도된다 (19,20). Sox 단백질은 다양한 세포의 운명을 결정하고 배아 성장 조절에 중요한 역

할을 수행한다. Sox 단백질의 주기능은 아직 알려져 있지 않지만 모든 Sox 단백질이 HMG-like DNA binding domain을 공유하고 있기 때문에 HMG domain superfamily의 member이다. Sox 단백질은 HMG domain의 유사성에 따라 A에서 H 그룹으로 나눌 수 있다 (21).

Sox 단백질의 C군 중 하나인 Sox4는 처음 B 림프구와 P 림프구의 분화에 필요한 전사인자로 알려졌다 (22). Sox4는 심내의 완충물과 정상 B세포의 성숙 및 발달에 관여한다는 사실도 보고되었으나 아직 그 정확한 기능에 대해서는 알려진 바가 없다. Sox4는 배아 발달에 중요한 역할을 수행하지만 배아기 이외의 과정에서도 중요한 기능을 수행한다. 최근 연구에서는 유방암, 간세포 암종, 직장암, 선양 낭성 암종, 수아세포종을 포함한 다양한 종양에서 Sox4의 발현이 증가된다는 사실이 보고되어 Sox4가 종양 형성에도 중요한 역할을 수행하는 것으로 생각된다 (23-29).

흥미롭게도, 몇몇 연구에서는 Sox7, XSox17a/ $\beta$ , XSox3와 같은 Sox 단백질들이 Wnt signaling을 조절한다는 사실을 보임으로서 Sox 단백질과  $\beta$ -catenin과의 상호조절 가능성을 제시하였다 (30,31). 그러나, Sox 단백질에 의한  $\beta$ -catenin 조절 기전에 대해서는 아직까지 알려진 바가 없다 (30-34). 이 논문에서는  $\beta$ -catenin의 단백질 level과 전사활성도에 대한 Sox4의 역할을 조사하였으며 Sox4가 Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway의 feedback inhibitory loop를 조절하는 중요한 성분이라는 사실을 밝혔다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포배양과 *transfection*

HEK 293 세포는 10% fetal bovine serum과 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 50 units/ml penicillin이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에 배양하였다. 정상 구강 상피세포 (normal oral epithelial cell)는 10% fetal bovine serum과 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 50 units/ml penicillin이 포함된 F12 medium과 Dulbecco's modified Eagle's medium이 1:1로 섞인 medium을 사용하였다. Immortalized normal oral keratinocyte인 INOK는 KGM medium에서 배양하였다. Hep2 세포는 5% fetal bovine serum과 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycin, 50 units/ml penicillin이 포함된 MEM medium를 사용하였고 FaDu 세포는 Hep2와 동일 medium에 1% Non-Essential Amino Acid가 더 포함된 medium에서 배양하였다. Transfection은 FuGENE6 (Roche Molecular biochemicals)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 수행하였다. Ubiquitination 분석을 위해서는 proteasome 억제제인 ALLN (Calbiochem)을 12.5  $\mu\text{M}$ 의 농도로 세포에 가하였다.

### 2. Total RNA 추출과 RT-PCR

Total RNA는 TRIzol reagent (Invitrogen)를 이용하여 분리하고 RNA의 상태를 agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다. RT-PCR은 Super Script One-step RT-PCR Systems (Invitrogen)을 이용하여 다음의 조건으로 수행하였는데 이때 사용한 primer는 Table 1과 같다. 역전사 반응을 위해서는 50°C에서 30분, 변성반응으로 94°C에서 2분을 수행하고 PCR을 위해서는 변성반응을 94°C에서 15초, 결합반응을 55°C에서 30초, 중합반응을 72°C에서 30초간 29주기를 반복한 후 마지막 중합반응으로 72°C에서 10분간 연장하여 반응시켰다. GAPDH를 위해서는 25주기를 반복하였다. RT-PCR 반응 산물은 1.5% agarose gel에서 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 확인하였다.

**Table 1. Primers used for semiquantitative RT-PCR**

<i>Gene</i>	<i>Primers</i>	<i>Sequence (5'-3')</i>	<i>Size (bp)</i>
$\beta$ -catenin	Forward	CACAGCTCCTCTGACAGAGTTACTTCACTC	556
	Reverse	CTCAGCTTGGTTAGTGTGTCAGGCA	
Sox4	Forward	GTTCGAAGACGACCTGCTCGAC	228
	Reverse	CTTCAGTAGGTGAAAACCAGGTTGGAG	
GAPDH	Forward	CCAAGGTCATCCATGACAACCTTTG	464
	Reverse	GTCATACCAGGAAATGAGCTTGACA	

### 3. Plasmids

C-말단에 FLAG가 붙은 정상과 돌연변이 (serine이 tyrosine으로 대체된 S33Y)  $\beta$ -catenin의 발현 vector는 이전에 보고되었다 (35). GenBank<sup>TM</sup> 번호 NM\_003107인 Sox4의 open reading frame (1425개의 nucleotide)는 사람 skeletal muscle cDNA (CLONTECH)를 주형으로 하여 PCR 방법에 의해 증폭시켰다. N-말단에 FLAG가 붙은 전체 길이나 (아미노산 1-474), C-말단이 제거되거나 (아미노산 1-159), N-말단이 제거된 (아미노산 131-474) Sox4 단백질은 pCDNA3.1-FLAG vector의 5' HindIII 와 3' EcoRI 부위에 cloning 함으로서 얻었다. 모든 cloning된 vector는 DNA 염기서열 방법에 의하여 확인하였다. 리포터 vector인 pTOPFLASH는 TCF 결합부위 (CCTTTGATC)를 3개 가지고 있으며 pFOPFLASH는 돌연변이된 TCF 결합부위 (CCTTTGGCC)를 3개 가지고 있다 (36). Plasmid pCH110 (Pharmacia Biosciences)는 *LacZ* 유전자의 발현을 확인하기 위해 사용하였다.

### 4. Immunoprecipitation과 Immunoblotting

Immunoprecipitation을 위해 vector를 HEK 293 세포에 FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemical)를 이용하여 transfection 시켰다. Transfection 30시간 후 세포

를 PBS로 두 번 세척하고 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin과 1 mM sodium orthovanadate가 포함된 RIPA buffer로 세포를 용해하였다. 세포 용해물은 30분동안 4°C에서 incubation하고 10,000 $\times$ g에서 10분간 원심분리 하였다. 상청액에 protein G-Sepharose 가하여 1시간 동안 incubation한 후 anti- $\beta$ -catenin 항체 (BD Bioscience)를 가하여 3시간 동안 더 incubation 하였다. 이 후 resin은 0.05% SDS가 포함된 RIPA buffer로 네 번 세척하고 SDS-PAGE sample buffer를 가하여 100°C에서 5분간 끓여주었다. Immunoblotting을 위해서는 단백질을 SDS-poly acrylamide gel에서 전기영동하고 PVDF membrane으로 옮긴 후 anti-FLAG antibody (Sigma), anti- $\beta$ -catenin antibody(BD Bioscience), anti-ubiquitin antibody (Santa Cruz Biotechnology), anti-lamin B antibody (Santa Cruz Biotechnology)과 anti-actin antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 immunoblotting 하였다.

##### 5. *Luciferase* 리포터 유전자 분석

HEK 293 세포를 6-well plate에 well당  $5 \times 10^5$  씩 분주한다. 세포는 overnight 배양 후 FuGENE 6 (Roche Molecular Biochemical)를 이용하여 transfection 시켰다. 정상과 돌연변이  $\beta$ -catenin에 의해 유도되는 TCF 활성화에 대한 Sox4의 효과를 평가하기 위하여 세포를 pTOPFLASH 또는 pFOPFLASH 0.3  $\mu\text{g}$ , 정상 또는 S33Y 돌연변이  $\beta$ -catenin 발현 vector, pCDNA3.1-FLAG-Sox4 각 1  $\mu\text{g}$  과 pCH110 0.2  $\mu\text{g}$ 으로 transfection 시킨다. 각 well에 transfection 시킨 DNA의 총 양은 필요시 empty vector를 첨가함으로써 일정하게 유지시켰다. Transfection 30시간 후 세포를 PBS로 2 번 세척하고 Reporter Lysis Buffer (Promega)로 용해하였다. Luciferase 활성화는 Luciferase Activity Assay Kit (Roche Molecular Biochemical)를 이용하여 측정하였다. 모든 실험은 3번씩 수행하여 mean $\pm$ S.D.의 수치를 구하였다. Transfection의 효율을 확인하기 위하여  $\beta$ -galactosidase의 활성을 측정하였다.

### Ⅲ. 결과 및 고찰

#### 1. Sox4에 의한 정상 $\beta$ -catenin의 저해

최근 Sox 단백질 중에서 Sox4가 사람에서 나타나는 여러 가지 종류의 종양 형성에 밀접한 관계가 있다는 증거들이 보고되고 있다 (23-29). 또한 본 연구자들은 정상 구강세포와 구강암 세포에서 Sox4와  $\beta$ -catenin의 발현 정도를 RT-PCR 방법으로 확인해본 결과 이들 두 단백질의 발현에 역상관관계가 있다는 사실을 확인하였다 (Fig. 1).

Sox4와  $\beta$ -catenin 간에 상호조절작용이 가능한가를 조사하기 위하여 HEK 293 세포에 FLAG-tagged Sox4와 정상  $\beta$ -catenin을 발현시키는 vector를 transfection 시켰다. Transfection 30시간 후 세포를 용해한 후 anti- $\beta$ -catenin과 anti-FLAG antibody를 사용하여 Western blot을 수행한 결과 흥미롭게도 일정한 양의 정상  $\beta$ -catenin 발현 vector를 증가된 양의 Sox4 발현 vector와 함께 transfection 시키면  $\beta$ -catenin 발현이 감소됨을 확인하였다 (Fig. 2A). 그러나, 세포에 Sox4와 함께 돌연변이  $\beta$ -catenin (S33Y)의 발현 vector를 transfection 시키면 Sox4는 돌연변이  $\beta$ -catenin (S33Y)의 발현에 영향을 미치지 않았다 (Fig. 2B). 이러한 결과는 Sox4가 정상  $\beta$ -catenin의 발현은 저하시킬 수 있지만 GSK3 $\beta$ 에 의한 인산화 부위가 돌연변이 되어 있는  $\beta$ -catenin의 발현에는 영향을 미치지 못한다는 사실을 제시해 준다.

#### 2. Sox4에 의한 $\beta$ -catenin/TCF 전사활성의 저해

Sox4가  $\beta$ -catenin의 신호 활성화에도 영향을 미치는지 조사하기 위하여 pTOPFLASH luciferase reporter vector를 이용하여 TCF의 전사활성을 조사하였다. pTOPFLASH는 세 개의 TCF 결합 부위를 가지고 있고 Wnt signal transduction의 활성화에 의해 강하게 전사가 유도 된다 (36). Fig. 3에서 보이는 바와 같이 정상  $\beta$ -catenin을 HEK 293 세포에 transfection시키면 pTOPFLASH vector의 전사가 활성화 된다. Sox4 발현 vector의 transfection은 pTOPFLASH의 전사에 영향을 미치지 않았

다. 하지만 Sox4와 함께 정상  $\beta$ -catenin을 transfection시키면 Sox4가 정상  $\beta$ -catenin의 전사활성을 저해하여 pTOPFLASH vector의 전사활성이 억제된다 (Fig. 3). 세포에 돌연변이  $\beta$ -catenin (S33Y) 을 transfection 시킬 경우에는 Sox4에 의한 전사억제 효과가 나타나지 않았다.

### 3. $\beta$ -catenin 활성의 억제에서 Sox4 N-말단 부위의 역할

Sox4 단백질은 다음의 3가지 domain으로 이루어져 있다 (Fig. 4A). : N-말단 HMG-box domain (아미노산 58-128), GRR (glycine rich region) domain (아미노산 152-227), SRR (serine-rich region) domain (아미노산 333-397)

Sox4가  $\beta$ -catenin의 발현과 신호활성을 억제하는 기전을 이해하기 위하여 Sox4의 일부가 결여된 돌연변이를 이용하여 pTOPFLASH 리포터 vector의  $\beta$ -catenin 활성을 억제하는 부위를 조사하였다. Fig. 4B는 Sox4의 일부를 결여시킨 돌연변이 단백질들의 세포내 발현 정도를 보여준다.

정상  $\beta$ -catenin과 함께 전체 길이의 Sox4 발현 vector를 함께 transfection 시키면  $\beta$ -catenin에 의해 증가된 pTOPFLASH의 활성이 억제된다. 유사하게, Sox4와 GRR domain과 SRR domain이 함께 결여되어 있는 Sox4 (1-159)나 SRR domain만 결여되어 있는 Sox4 (1-261)는  $\beta$ -catenin의 활성을 억제하였다. 하지만 HMG-box domain 부위가 결여되어 있는 Sox4 (131-474)는  $\beta$ -catenin에 의한 pTOPFLASH 리포터의 활성을 더 이상 억제하지 못하였다. 이러한 결과는 Sox4의 HMG-box domain 부위를 포함하는 N-말단 부위가  $\beta$ -catenin의 발현과 전사활성을 조절하는데 중요한 역할을 한다는 사실을 보여준다.

다음 단계로 Sox4에 의한  $\beta$ -catenin의 저해작용이 Sox4와  $\beta$ -catenin의 상호결합을 통해 유도되는지를 조사하였다. Immunoprecipitation을 위해 HEK 293 세포에 FLAG-tagged Sox4와 Myc-tagged  $\beta$ -catenin 발현 vector를 함께 transfection 시켰다. 세포용해 후 anti- $\beta$ -catenin antibody를 이용하여 immunoprecipitation하고 anti-FLAG antibody를 이용하여 Western blotting 함으로서  $\beta$ -catenin과 Sox4가 서로 결합하는가를 조사하였는데 이 두 단백질간의 상호 결합은 발견할 수 없었다.

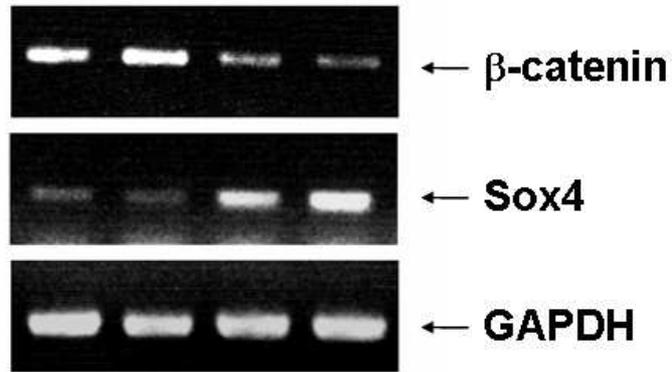
#### 4. Sox4에 의한 $\beta$ -catenin의 저해에서 GSK3 $\beta$ 와 proteasome system의 역할

GSK3 $\beta$ 에 의해 인산화된  $\beta$ -catenin은 E3 ubiquitin ligase system의 구성성분인  $\beta$ -TrCP에 의해 인식되어 proteasome으로 보내진다 (5,6). 본 연구에서는 Sox4가 S33Y 돌연변이  $\beta$ -catenin에는 영향을 미치지 않고 정상  $\beta$ -catenin의 발현만을 감소시킴을 보였는데 이러한 Sox4의 효과는  $\beta$ -catenin의 발현 저해가 GSK3 $\beta$ 에 의한 인산화와  $\beta$ -TrCP에 의한 ubiquitination에 의해 매개된다는 사실을 제시해 준다. Sox4에 의한  $\beta$ -catenin의 저해가 ubiquitination에 의해 유도되는가를 확인하기 위하여 정상  $\beta$ -catenin과 Sox4를 발현시키는 vector를 transfection 시킨 HEK 293 세포에 proteasome 억제제인 ALLN을 처리하였다. Fig. 5A에서 보이는 바와 같이 정상  $\beta$ -catenin에 대한 Sox4의 분해 효과는 proteasome system의 억제제인 ALLN을 처리하면 완전히 억제되었다. 이러한 결과를 확인하기 위하여 이번에는 HEK 293 세포에 Fig. 5B에서 보이는 바와 같이 정상  $\beta$ -catenin 발현 vector를 단독, 또는 Sox4 발현 vector와 함께 transfection 시키고 ALLN으로 처리하였다.  $\beta$ -catenin의 ubiquitination을 조사하기 위하여 세포를 용해시킨 후 anti- $\beta$ -catenin antibody를 이용하여 immunoprecipitation시키고 anti-ubiquitin antibody로 Western blotting을 수행한 결과 Fig. 5B에서 보이는 바와 같이 Sox4와 함께 발현될 때 ALLN 처리에 의하여 ubiquitination된  $\beta$ -catenin을 확인할 수 있었다.

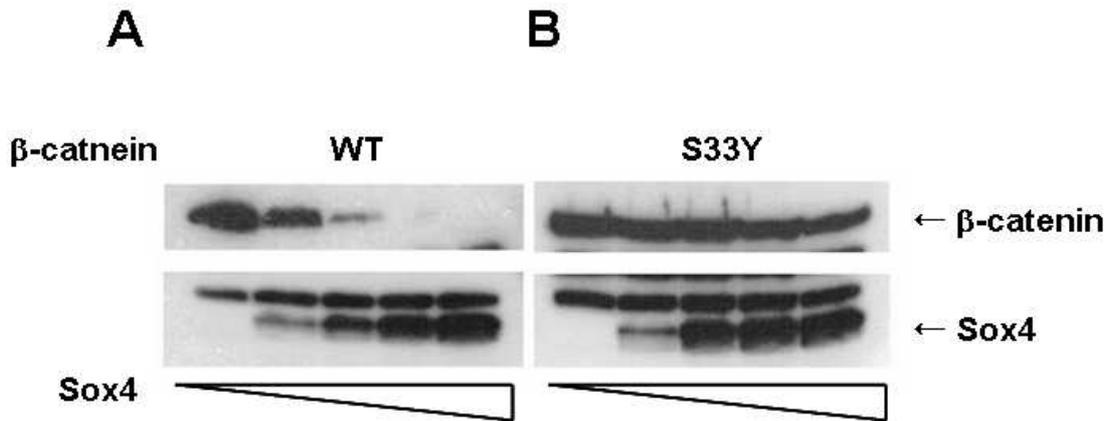
다음으로 Sox4에 의한 정상  $\beta$ -catenin의 감소가 GSK3 $\beta$ 의 활성을 필요로 하는가를 조사하였다. Fig. 5C에서 보이는 바와 같이 HEK 293 세포에 정상  $\beta$ -catenin 발현 vector를 단독, 또는 Sox4 발현 vector와 함께 transfection 시킨 후 GSK3 $\beta$ 의 활성을 억제하는 LiCl를 처리하였다. 실험 결과, LiCl을 처리하였을 경우 더 이상 Sox4가 정상  $\beta$ -catenin의 억제를 유도하지 못하여 Sox4의 정상적인 기능을 위해서는 GSK3 $\beta$ 의 활성이 필요하다는 사실을 확인하였다. 이러한 결과는 Sox4가 proteasome system을 통하여 정상  $\beta$ -catenin의 분해를 유도하기 때문에 종양에서 나타나는 S33Y 같은 돌연변이  $\beta$ -catenin은 Sox4에 의해 영향을 받지 않는다는 사실을 제시해 준다.

본 연구에서는 Sox4가 정상  $\beta$ -catenin의 세포내 양과 전사 활성을 감소시킨다는

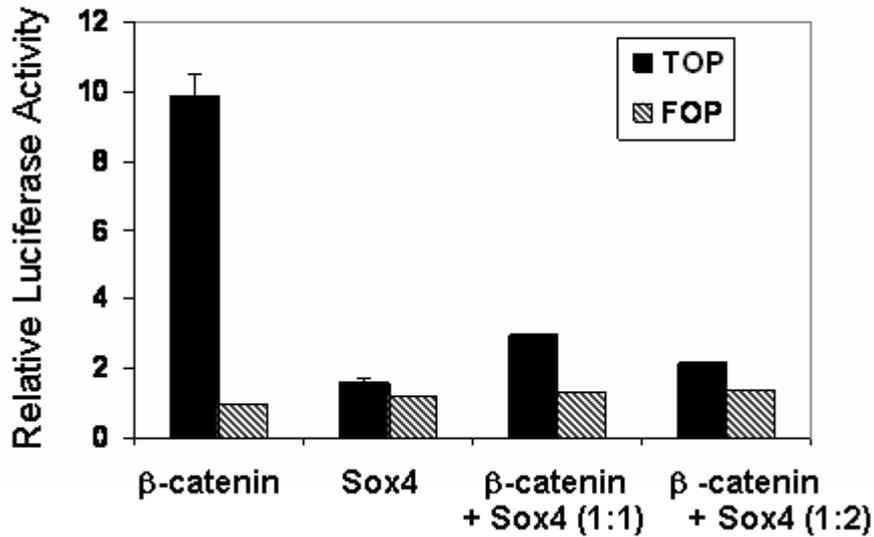
사실을 처음으로 보였다. 이러한 효과는 GSK3 $\beta$ 나 proteasome system과 같이  $\beta$ -catenin의 분해를 조절하는 물질의 활성을 저해함으로써 제거할 수 있었다. 따라서 Sox4는 proteasome system을 통하여  $\beta$ -catenin의 분해 과정을 촉진하는 것으로 보인다. Sox4는 정상  $\beta$ -catenin의 분해는 유도할 수 있지만 APC-GSK3 $\beta$ -Axin복합체에 의한 분해에 저항성이 있는 돌연변이  $\beta$ -catenin (예, S33Y)에는 영향을 미치지 못했다. 앞으로 Sox4에 의한  $\beta$ -catenin 조절의 정확한 분자 기전이 밝혀져야 할 것이다. 본 연구에서는 Sox4가 세포내  $\beta$ -catenin의 level을 감소시키는 역할을 하는데 있어 Sox4와  $\beta$ -catenin간의 상호작용, 즉 단백질과 단백질간의 직접적인 상호결합을 확인할 수 없었다. Sox4는 특정한 염기서열에 대해 전사를 조절하는 전사조절 인자이다. Sox4에 의한  $\beta$ -catenin의 감소가 Sox4의 전사활성이나 Sox4 표적 유전자의 작용에 의해 유도될 수도 있다. 또한, Sox4가  $\beta$ -catenin의 인산화나 ubiquitination을 유도하는 GSK3 $\beta$ 나  $\beta$ -TrCP 같은 단백질의 발현을 유도할 수 있는가를 조사하였으나 어떠한 발현 유도도 확인되지 않았다. 앞으로 Sox4의 표적 유전자에 대한 연구가 Sox4에 의한  $\beta$ -catenin의 분해 유도 기전을 이해하는 실마리를 제공할 것이라 기대된다.



*Fig. 1. Expression level of  $\beta$ -catenin and Sox4 in oral cancer cell lines.* RT-PCR was performed to examine the expression level of  $\beta$ -catenin and Sox4 in oral normal and cancer cell lines. Lane 1: normal oral epithelial cells, lane 2: INOK (immortalized normal oral keratinocyte), lane 3: FaDu, lane 4: Hep2, respectively.

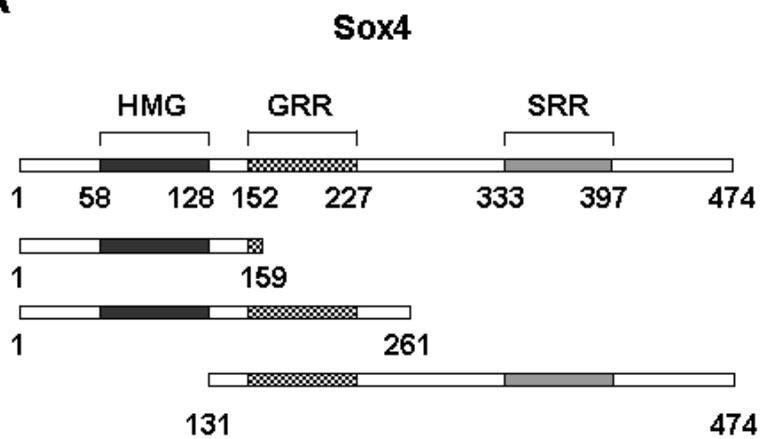


*Fig. 2. Sox4 down-regulates the levels of wild-type-catenin.* HEK 293 cells were cotransfected with increasing amounts of FLAG-tagged Sox4 expression vectors (0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1  $\mu$ g, respectively) and a constant amount of wild type  $\beta$ -catenin (A, 0.5  $\mu$ g) or S33Y mutant  $\beta$ -catenin (B, 0.5  $\mu$ g) expression vector. Thirty hours after transfection, the levels of Sox4 and  $\beta$ -catenin were determined by Western blot analysis by using anti-FLAG and anti- $\beta$ -catenin antibody.

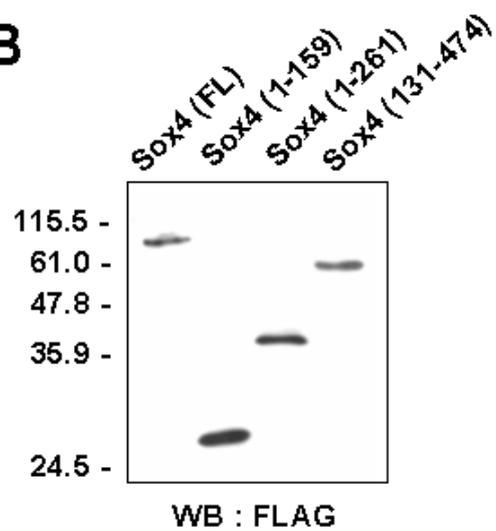


*Fig. 3. Sox4 represses Wnt/ $\beta$ -catenin stimulated transcription.* HEK 293 cells were cotransfected with the pTOPFLASH or pFOPFLASH reporter vector (0.3  $\mu$ g) and expression vectors encoding wild type  $\beta$ -catenin (0.5  $\mu$ g) and/or Sox4 (0.5  $\mu$ g) as indicated. pTOPFLASH contains three TCF binding sites upstream of a luciferase reporter and pFOPFLASH plasmid has mutated TCF binding motifs. Thirty hours after transfection, cell extracts were subjected to luciferase assay. Luciferase activities were normalized for transfection efficiency by cotransfection with a  $\beta$ -galactosidase-expressing vector, pCH110 (0.2  $\mu$ g). The data represent mean values from triplicate experiments.

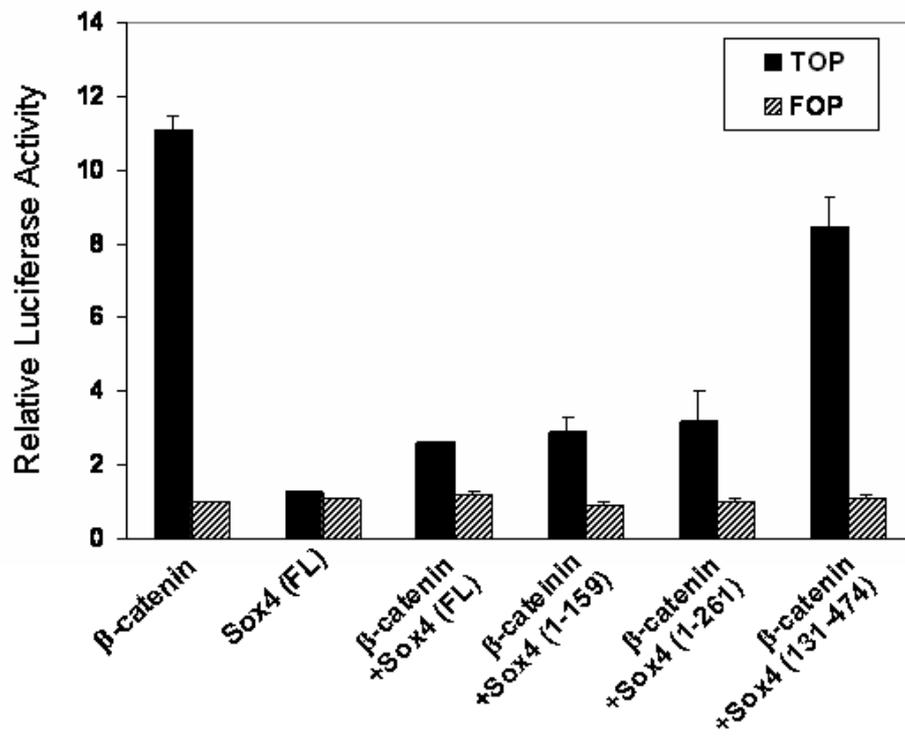
**A**



**B**

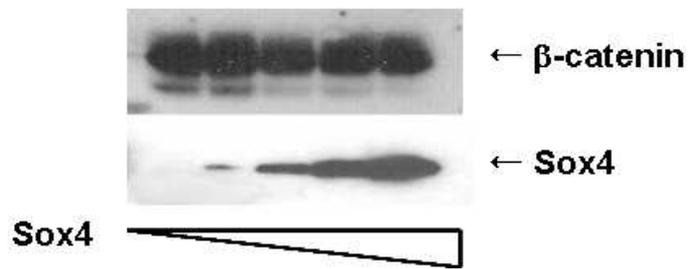


C

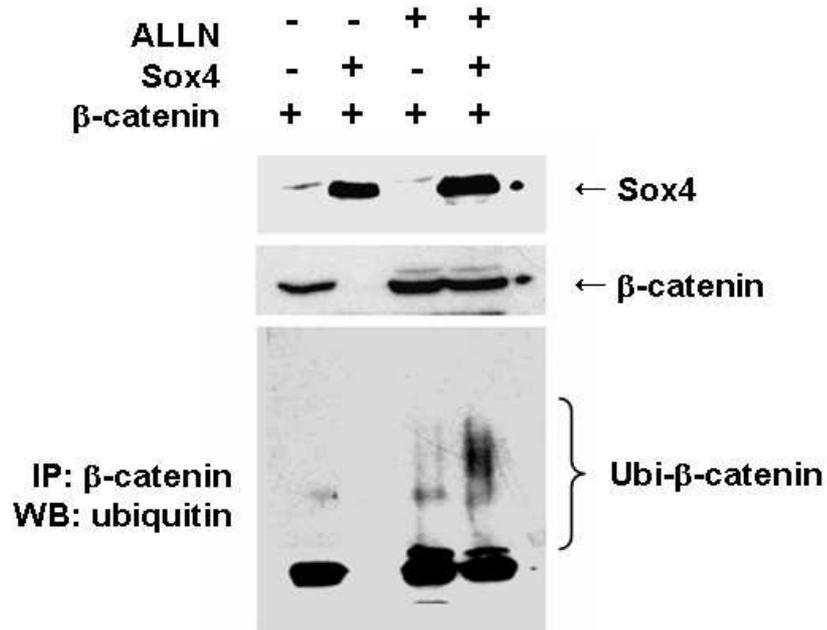


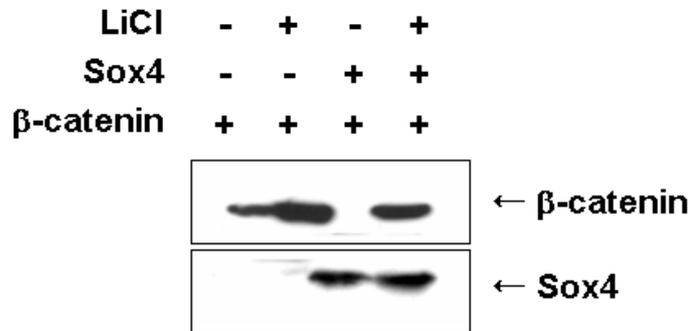
**Fig. 4. The N-terminal region of Sox4 is essential for repression of Wnt signaling.** *A*, Schematic representations of the Sox4 deletion constructs. Sox4 contains HMG-box, glycine-rich region (GRR) and serine-rich region (SRR) as indicated. Domain boundaries were obtained from SMART (37). *B*, HEK 293 cells were transfected with indicated FLAG-tagged Sox4 expression vectors. Thirty hours after transfection, total cell extracts were prepared and the expression levels of Sox4 constructs were monitored by Western blot analysis using anti-FLAG antibody. *C*, HEK 293 cells were cotransfected with the pTOPFLASH or pFOPFLASH reporter vector (0.3  $\mu$ g) and expression vectors encoding wild type  $\beta$ -catenin (0.5  $\mu$ g), full length Sox4 (FL, 0.5  $\mu$ g) or Sox4 deletion constructs (0.5  $\mu$ g) as indicated. Thirty hours after transfection, cell extracts were subjected to luciferase assay. Luciferase activities were normalized for transfection efficiency by cotransfection with a  $\beta$ -galactosidase-expressing vector, pCH110 (0.2  $\mu$ g). The data represent mean values from triplicate experiments.

**A**



**B**



**C**

*Fig. 5. Blocking of proteasomal degradation and GSK3 activity inhibit the effect of Sox4 on  $\beta$ -catenin.* *A*, HEK 293 cells were cotransfected with increasing amounts of expression vectors for FLAG-tagged Sox4 (0, 0.25, 0.5, 0.75, and 1  $\mu$ g, respectively) and a expression vector for wild type of  $\beta$ -catenin (0.5  $\mu$ g). Twenty four hours after transfection, cells were treated with ALLN (12.5  $\mu$ M) for 8 h. The cells were harvested and subjected to Western blot analysis by using anti-FLAG and anti- $\beta$ -catenin antibody. *B*, HEK 293 cells were transfected with  $\beta$ -catenin expression vector alone or combined with Sox4 expression vector as indicated. Twenty four hours after transfection, half of the cells were treated with ALLN (12.5  $\mu$ M) for 8 h. The cells were harvested and subjected to immunoprecipitation by using anti- $\beta$ -catenin antibody followed by Western blot analysis by using anti-ubiquitin antibody (lower panel). The level of proteins in the cells were monitored by Western blot analysis with anti-FLAG or anti- $\beta$ -catenin antibody (upper and middle panels). *C*, HEK 293 cells were transfected with  $\beta$ -catenin expression vector alone or combined with Sox4 expression vector as indicated. Six hours after transfection, half of the cells were treated with LiCl (30 mM) and incubated further 24 h. The cells were harvested and determined the levels of  $\beta$ -catenin and Sox4 by Western blot analysis.

## IV. 결 론

본 논문에서는 Sox4가  $\beta$ -catenin의 분해를 유도한다는 사실을 보고하였다. 정상  $\beta$ -catenin에 대한 Sox4의 분해 유도 효과는 ubiquitin-proteasome system에 의해 조절되며 활성화된 glycogen synthase kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ )를 필요로 한다는 사실을 증명하였다. Proteasome이나 활성화된 GSK3 $\beta$ 에 의한 분해에 저항성을 갖는 돌연변이  $\beta$ -catenin (S33Y)은 Sox4에 의한 분해에도 저항성을 보였다. 본 논문에서는 이상과 같은 결과들로부터 Sox4에 의해 정상  $\beta$ -catenin의 분해가 조절되는 기전을 증명할 수 있었다. 최근 대장암을 비롯하여 몇종의 종양에서  $\beta$ -catenin의 조절 기전 이상과 함께 Sox4의 발현 증가가 보고되었다. 따라서 본 연구에서의 결과들을 고려하여 보면 Sox4는 정상세포에서 Wnt signaling을 조절하는 feedback inhibitory pathway의 일환으로서 기능을 수행한다고 사료된다.

## 참고문헌

1. Bienz, M., and Clevers, H. (2000) *Cell* **103**, 311-320
2. Polakis, P. (2001) *Cell* **105**, 563-566
3. Behrens, J., Jerchow, B. A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wddlich, D., and Birchmeier, W. (1998) *Science* **280**, 596-599
4. Yamamoto, H., Kishida, S., Uochi, T., Ikeda, S., Koyama, S., Asashima, M., and Kikuchi, A. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2867-2875
5. Hart, M., Concordet, J. P., Lassot, I., Albert, I., del los Santos, R., Durand, H., Perret, C., Rubinfeld, B., Margottin, F., Benarous, R., and Polakis, P. (1999) *Curr. Biol.* **9**, 207-210
6. Kitagawa, M., Hatakeyama, S., Shirane, M., Matsumoto, M., Ishida, N., Hattori, K., Nakamichi, I., Kikuchi, A., Nakayama, K-i., and Nakayama, K. (1999) *EMBO J.* **18**, 2401-2410
7. Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. (1996) *Nature* **382**, 638-642
8. Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. (1996) *Cell* **86**, 391-399
9. Peifer, M., and Polakis, P. (2000) *Science* **287**, 1606-1609
10. Polakis, P. (2000) *Genes Dev.* **14**, 1837-1851
11. Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1996) *Cell* **87**, 159-170
12. Satoh, S., Daigo, Y., Furukawa, Y., Kato, T., Miwa, N., Nishiwaki, T., Kawasoe, T., Ishiguro, H., Fujita, M., Tokino, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., Yamaoka, Y., and Nakamura, Y. (2000) *Nat. Genet.* **24**, 245-250
13. Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R. S., Taniguchi, K., Krishnadath, K. K.,

- Halling, K. C., Cunningham, J. M., Boardman, L. A., Qian, C., Christensen, E., Schmidt, S. S., Roche, P. C., Smith, D. I., and Thibodeau, S. N. (2000) *Nat. Genet.* **26**, 146-147
14. Dahmen, R. P., Koch, A., Denkhans, D., Tonn, J. C., Sorensen, N., Berthold, F., Behrens, J., Birchmeier, W., Wiestler, O. D., and Pietsch, T. (2001) *Cancer Res.* **61**, 7039-7043
15. Wu, R., Zhai, Y., Fearon, E. R., and Cho, K. R. (2001) *Cancer Res.* **61**, 8247-8255
16. He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., Da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1998) *Science* **281**, 1509-1512
17. Tetsu, O., and McCormick, F. (1999) *Nature* **398**, 422-426
18. Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5522-5527
19. Wegner, M. (1999) *Nucleic Acids Res.* **27**, 1409-1420
20. Soullier, S., Jay, P., Poulat, F., Vanacker, J. M., Berta, P., and Laudet, V. (1999) *J. Mol. Evol.* **48**, 517-527
21. Bowles, J., Schepers, G., and Koopman, P. (2000) *Dev. Biol.* **227**, 239-255
22. Schilham, M. W., and Clevers, H. (1998) *Semin. Immunol.* **10**, 127-132
23. Frierson Jr. H. F., El-Naggar, A. K., Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Cheng, J., Saku, T., Moskaluk, C. A., and Hampton, G. M. (2002) *Am. J. Pathol.* **161**, 1315-1323
24. Lee, C. J., Appleby, V. J., Orme, A. T., Chan, W. I., and Scotting, P. J. (2002) *J. Neurooncol.* **57**, 201-214
25. Ahn, S. G., Cho, G. H., Jeong, S. Y., Rhim, H., Choi, J. Y., and Kim, I. K. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**, 216-221
26. Dong, C., Wilhelm, D., and Koopman, P. (2004) *Cytogenet. Genome Res.* **105**, 442-447

27. McCracken, S., Kim C. S., Xu, Y., Minden, M., and Miyamoto N. G. (1997) *Oncogene* **15**, 2929-2937
28. McGowan, E. M., and Clarke, C. L. (1999) *Mol. Endocrinol.* **13**, 1657-1671
29. Reichling T., Goss, K.H., Carson, D.J., Holdcraft, R.W., Ley-Ebert, C., Witte, D., Aronow, B.J., and Groden, J. (2005) *Cancer Res.* **65**, 166-176
30. Zorn, A. M., Barish, G. D., Williams, B. O., Lavender, P., Klymkowsky, M. W., and Varmus, H. E. (1999) *Mol. Cell* **4**, 487-498
31. Takash, W., Canizares, J., Bonneaud, N., Poulat, F., Mattei, M.-G., Jay, P., and Berta, P. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 4274-4283
32. Zhang, C., Basta, T., Jensen, E. D., and Klymkowsky, M. W. (2003) *Development* **130**, 5609-5624
33. Sinner, D., Rankin, S., Lee, M., and Zorn, A. M. (2004) *Development* **131**, 3069-3080
34. Blache, P., van de Wetering, M., Duluc, I., Domon, C., Berta, P., Freund, J-N., Clevers, H., and Jay, P. (2004) *J. Cell Biol.* **166**, 37-47
35. Kolligs, F. T., Hu, G., Dang, C. V., and Fearon, E. R. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 5696-5706
36. Korinek, V., Barker, M., Morin, P. J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997) *Science* **275**, 1784-1787
37. Schultz, J., Milpetz, F., Bork, P., and Ponting, C. P. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 5857-5864