Korean J. Microbiol. Biotechnol. (2014), 42(1), 89–92
http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1402.02001
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

KJMB
Korean Journal of Microbiology and Biotechnology

# Bryostatin-1에 의한 Wnt/β-Catenin 신호전달체계 저해효과

박서영, 오상택*
국민대학교 자연대 바이오발효융합학과

Received: February 3, 2014 / Revised: February 17, 2014 / Accepted: February 18, 2014

**Suppression of the Wnt/β-catenin Pathway by Bryostatin-1**

Seoyoung Park and Sangtaek Oh*
*Department of Bio and Fermentation Convergence Technology, Kookmin University, Seoul 136-702, Republic of Korea*

The Wnt/β-catenin pathway plays important roles in a variety of biological processes, such as cell proliferation, differentiation, and organ development. Here, we used a cell-based reporter assay to identify bryostatin-1, a natural macrocyclic lactone, as an inhibitor of the Wnt/β-catenin pathway. Bryostatin-1 suppressed β-catenin response transcription (CRT), which was activated by a Wnt3a-conditioned medium (Wnt3a-CM), through a decrease in the intracellular β-catenin protein levels, without affecting its mRNA level. In addition, pharmacological inhibition of proteasome abrogated bryostatin-1-mediated down-regulation of the β-catenin protein level. Our findings suggest that bryostatin-1 attenuates the Wnt/β-catenin pathway through the promotion of proteasomal degradation of β-catenin.

**Keywords:** Wnt/β-catenin pathway, bryostatin-1, protein degradation

Wnt/β-catenin 신호전달체계는 세포의 분화, 발생, 증식 및 암의 형성에 중요한 역할을 하며[9, 10, 14] Wnt/β-catenin 신호전달체계의 조절은 세포 내의 β-catenin 단백질 양에 의해 결정된다. Wnt 리간드 단백질이 없을 시에는 세포 내에 존재하는 β-catenin 단백질이 분해 복합체에 의해 인산화 된다[3, 4, 12, 13, 15]. 이 인산화된 단백질에 유비퀴틴 표지가 일어나고 이는 프로테아좀에 의해 인식 및 분해된다[1, 17]. Wnt 리간드가 있을 경우에는 분해 복합체에 의한 인산화가 일어나지 않아 β-catenin이 프로테아좀에 의해 분해되는 경로가 저해됨으로써 β-catenin의 세포 내 농도가 증가된다[11, 19]. 증가된 β-catenin은 핵으로 이동하여 전사인자인 T 세포인자-4 (TCF-4)와 결합하여 β-catenin의 표적 유전자인 *c-myc, cyclin D1,* MMP7, PPAR-γ 등의 발현을 활성화 시킨다[6, 7, 22, 23]. 이 표적 유전자들의 발현 증가는 세포 증식 및 암 등의 질병과 밀접한 관계가 있음이 보고되었다[3, 11, 16]. 그러므로 Wnt/β-catenin 신호전달체계의 효과적인 억제는 암 예방과 치료를 위한 중요한 표적이 된다.

***Corresponding author**
Tel: +82-2-910-5732, Fax: +82-2-910-5739
E-mail: ohsa@kookmin.ac.kr
© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Bryostatin-1은 해양 이끼벌레류(marin bryozoans)의 *Bugula neritina*의 추출물로부터 분리 되었으며[18] apoptosis 유도[5], 다중약물내성의 변화[5], 면역성의 자극[20], 일반 조혈작용의 자극[8], 동물 모델에서의 기억과 인식의 향상[21] 등의 생물학적 활성을 가진다. 또한 현재 난소암, 자궁암 흑색종, 백혈병, 림프종, 대장암 등에 대한 치료제 개발을 위한 임상 실험이 진행 중에 있다[8]. 그러나 임상 전 연구결과를 토대로 진행된 전립선 암을 포함한 여러 암들에 대한 임상연구에서 bryostatin-1의 효과가 최소한이거나 효과를 보이지 않기도 하였다. 따라서 bryostatin-1의 임상학적 결과를 개선시키기 위해 bryostatin-1의 작용 기전에 대한 더 많은 연구가 필요하다.

Wnt/β-catenin 신호전달체계를 조절하는 생리활성 물질을 탐색하기 위하여 β-catenin에 의해 반딧불 발광효소의 발현이 조절되는 TOPflash 표지 플라즈미드와 인간 Frizzled-1 (hFz-1)를 발현하는 플라즈미드가 안정적으로 발현되는 인간배아 신장 세포인 HEK293 세포주를 확립하였다(HEK293 표지세포). 이 세포주를 96 well plate에 $2.6 \times 10^5$ cells/ml로 분주하여 24시간 배양하였다. 각 well에 Wnt3a 배지와 화합물을 첨가하고 15시간 후에 반딧불 발광효소 활성과 세포 생존율을 Victor-5 microplate reader를 이용하여 분석하였다.

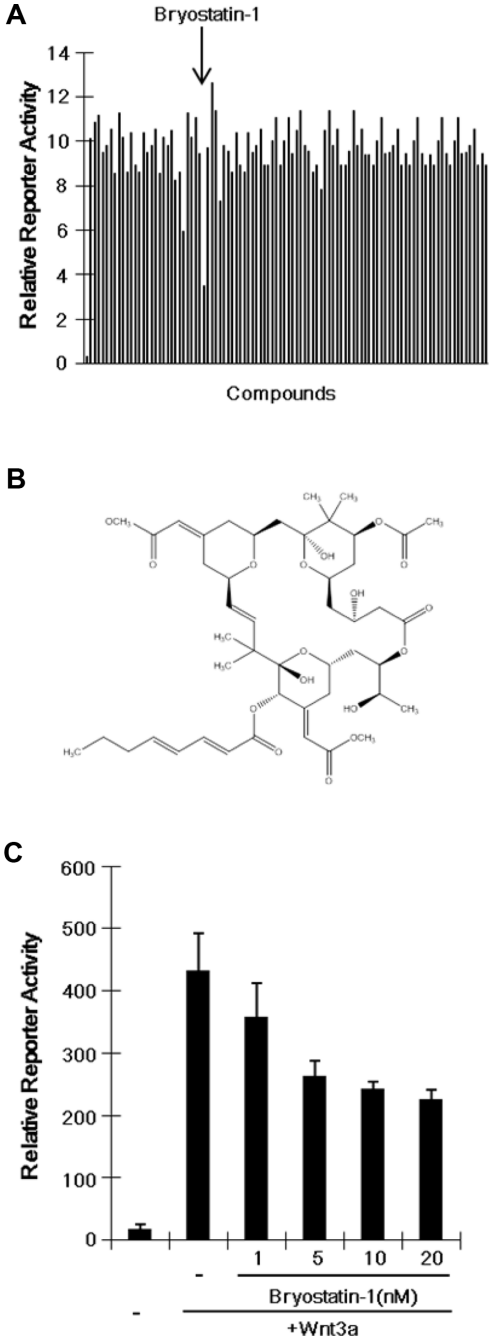


**Fig. 1. Identification of bryostatin-1 as an inhibitor of Wnt/β-catenin signaling.** (A) Screening of compounds that inhibit Wnt/β-catenin signaling. Compounds modulating TOPflash reporter activity were screened using the HEK296 reporter cells. The controls were assayed in the presence or absence of Wnt3a CM. TOPflash activities were normalized with Cell titer-Glo (Promega) activity. (B) Structure of bryostatin-1. (C) HEK293 reporter cells were incubated with increasing concentrations of bryostatin-1 (1, 5, 10, 20 nM) in presence of Wnt3a CM. After 15 h, luciferase activity was determined. The results are the average of three experiments, and the bars indicate standard deviations.

Wnt3a 배지를 첨가한 경우 TOPflash 표지의 활성이 증가되는 것을 관찰할 수 있었고 100여종의 천연물 및 유도체를 스크리닝 한 결과 Wnt3a 배지에 의해 활성화된 TOPflash 표지의 활성을 저해하는 bryostatin-1을 발굴하였다(Fig. 1A). 이 화합물의 구조는 Fig. 1B에서 보는 바와 같다. 또한 HEK293 표지세포를 다양한 농도의 bryostatin-1과 함께 배양한 후 반딧불 발광효소 활성을 측정한 결과 Wnt3a 배지에 의해 활성화된 β-catenin 의존적 전사가 bryostatin-1의 농도에 의존적으로 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 1C).

Wnt/β-catenin 신호전달체계에서 β-catenin 의존적 전사는 유비퀴틴 의존적 분해에 의해 조절되는 세포 내 β-catenin 단백질의 수준과 밀접한 관련이 있다. 따라서 bryostatin-1이 세포 내 β-catenin 단백질 수준에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 HEK293 표지세포에 다양한 농도의 bryostatin-1을 처리한 후 세포질을 Dignam 등[2]이 기술한 방법으로 분획하고 세포질 분획내의 β-catenin 단백질의 양은 β-catenin에 특이적인 항체를 이용한 western blot 방법으로 측정하였다. 세포질 분획은 4-12% gradient SDS-PAGE (Invitrogen)을 이용하여 분리하고 nitrocellulose membrane (Amersham Bioscience)에 옮겼다. Membrane을 5% 탈지분유로 blocking 시킨 후 일차 항체인 anti-β-catenin (BD Transduction Laboratories)와 anti-actin (Sigma-Aldrich, USA)을 처리하였다. 일차 항체 처리 후 TBS-T로 5회 씻어내고, 이차 항체인 anti-mouse IgG-HRP (Santa Cruz Biotechnology)를 처리하였다. 밴드는 ECL detection system (Santa Cruz Biotechnology, USA)을 사용하여 확인하였다. β-catenin 의존적 전사로부터 얻은 결과와 동일하게 Wnt3a 배지를 첨가한 경우 HEK293 표지 세포내의 β-catenin 단백질 수준이 증가되었다(Fig. 2A). 또한, Wnt3a 배지에 의해 증가된 세포 내 β-catenin 단백질의 수준이 bryostatin-1의 처리에 의해 농도의존적으로 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A).

Bryostatin-1의 처리에 의한 세포 내 β-catenin 단백질 수준의 감소가 mRNA 양의 감소에 의한 것인지를 확인하기 위하여 반정량적 역전사 중합효소 연쇄반응을 수행하였다. HEK293 표지세포를 60 mm 배양접시에 배양한 후 Wnt3a 배지와 다양한 농도의 bryostatin-1을 처리하였다. TRIzol 용액(Invitrogen)을 이용하여 RNA를 추출하고 M-MLV (Invitrogen)를 이용하여 cDNA를 합성한 후 β-catenin 특이적 프라이머(Forword: 5'-GGG ATG TTC ACA ACC GAA TTG TTA TC-3', Reverse: 5'-ACC AGA GTG AAA AGA ACG ATA GCT AGG A-3')를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 β-catenin 단백질 수준에서 얻은 결과와는 상반되게 β-catenin mRNA의 양은 다양한 농도의 bryostain-1에 의해 변하지 않았다(Fig. 2B).

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1402.02001

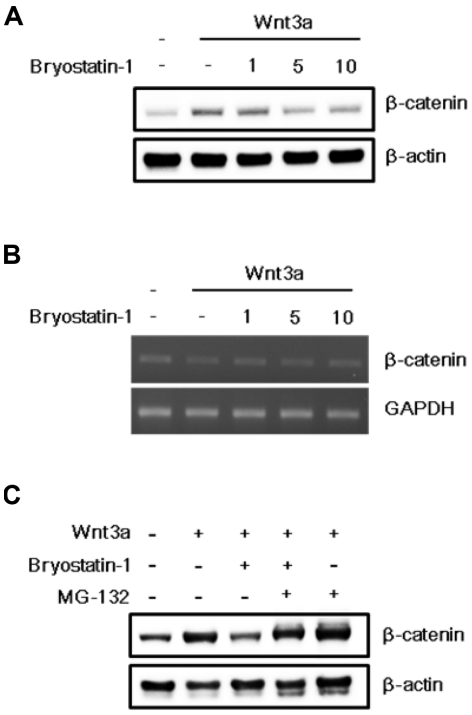


**Fig 2. Bryostatin-1 promoting the degradation of β-catenin via a proteasome.** (A) Cytosolic proteins were prepared from HEK293 reporter cells treated with either vehicle (DMSO) or indicated concentrations of bryostatin-1 in the presence of Wnt3a CM for 15 h and then subjected to Western blotting with anti-β-catenin antibody. (B) Semiquantitative RT-PCR for β-catenin and GAPDH was performed using total RNA prepared from HEK293 reporter cells treated with vehicle (DMSO) or the indicated concentrations of bryostatin-1 in the presence of Wnt3a CM for 15 h. (C) Cytosolic proteins prepared from HEK293 reporter cells, which were incubated with vehicle (DMSO) or bryostatin-1 (5 nM) in the presence of Wnt3a CM, exposed to MG-132 (10 μM) for 8 h, were subjected to western blotting with anti-β-catenin antibody. In (A) and (C), to confirm equal loading, the blot was reprobed with anti-actin antibody.

기존의 연구결과에 의하면 세포 내 β-catenin의 단백질 양은 프로테아좀 분해 경로에 의해 조절 된다고 알려져 있다[1]. Bryostatin-1에 의한 β-catenin 단백질 수준의 감소가 프로테아좀에 의존적인지를 확인하기 위하여 프로테아좀 저해제인 MG-132을 처리한 후 세포 내 β-catenin 단백질 수준을 western blot을 이용하여 확인하였다. 지속적으로 HEK293 표지 세포에 bryostatin-1을 처리하였을 경우 Wnt3a 배지에 의해 증가된 세포 내 β-catenin 단백질 수준이 감소됨을 관찰할 수 있었다. 이 조건에서 MG-132을 처리한 결과 bryostatin-1에 의한 β-catenin 감소 효과가 없어짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 2C). 이 결과로부터 bryostatin-1이 프로테아좀 의존적으로 세포 내 β-catenin 단백질의 수준을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

기존의 연구를 통하여 Wnt/β-catenin 신호전달체계의 비정상적인 활성화는 β-catenin 의존적 전사를 증가시킬 뿐 아니라 이를 통하여 대장암을 비롯한 다양한 암의 발생 및 진행을 촉진한다고 알려져 있다[11, 16]. 따라서 Wnt/β-catenin 신호전달체계는 암 예방 및 항암제에 대한 좋은 표적으로 인식되고 있다. 본 연구에서는 HEK293 표지 세포를 이용한 분석법을 이용하여 Wnt/β-catenin 신호를 저해하는 bryostatin-1을 발굴하였다. 분자기전을 연구한 결과 bryostatin-1이 세포 내 β-catenin 단백질의 프로테아좀 의존적 분해를 촉진한다는 사실을 밝혔다. 본 연구 결과로부터 bryostatin-1이 비정상적인 Wnt/β-catenin 신호전달체계 활성화로 인해 발생된 대장암을 비롯한 다양한 암에 대한 예방 및 치료제로 개발 될 수 있을 것이다.

## 요 약

Wnt/β-catenin 신호전달체계는 세포 증식, 분화, 그리고 기관 발생과 같은 다양한 생명현상에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 세포기반 스크리닝 기법을 사용하여 Wnt/β-catenin 신호전달체계를 저해하는 bryostatin-1을 발굴하였다. Bryostain 1은 β-catenin의 mRNA 수준에는 영향을 미치지 않는 반면 세포 내 β-catenin 단백질 수준을 감소시킴으로 Wnt3a-CM에 의해 활성화 된 β-catenin response transcription (CRT)을 억제하였다. 또한 프로테아좀의 활성을 저해하였을 경우 bryostatin-1에 의한 β-catenin 수준 감소가 억제되었다. 본 연구의 결과들로부터 bryostatin-1이 프로테아좀에 의한 β-catenin 단백질 분해를 촉진함으로써 Wnt/β-catenin 신호전달체계를 저해함을 확인하였다.

## Acknowledgments

This work was supported by the Basic Science Research Program (2012R1A2A2A01002941) and the Fundamental Technology Program (2012M3A9B2028335) through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology.

## References

1. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. 1997. β-Catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* **16**: 3797-3804.
2. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. 1983. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res.* **11**: 1475-1489.
3. Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. 2001. The ABC of

APC. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 721-733.
4. Giles RH, van Es JH, Clevers H. 2003. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. **1653**: 1-24.
5. Hale KJ, Hummersone MG, Manaviazar S, Frigerio M. 2002. The chemistry and biology of the bryostatin antitumour macrolides. *Nat. Prod. Rep.* **19**: 413-453.
6. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW. 1999. PPARδ is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**: 335-345.
7. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. 1998. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* **281**: 1509-1512.
8. Jaggi M, Chauhan SC, Du C, Balaji KC. 2008. Bryostatin 1 modulates β-catenin subcellular localization and transcription activity through protein kinase D1 activation. *Mol. Cancer Ther.* **7**: 2703-271.
9. Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S. 2004. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology* **36**: 120-128.
10. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, *et al*. 1997. Constitutive transcriptional activation by a β-catenin-Tcf complex in APC -/- colon carcinoma. *Science* **275**: 1784-1787.
11. Lee E, Salic A, Kruger R, Heinrich R, Kirschner MW. 2003. The roles of APC and Axin derived from experimental and theoretical analysis of the Wnt pathway. *PLoS Biol.* **1**: 116-132.
12. Liu J, Stevens J, Rote CA, Yost HJ, Hu Y, Neufeld KL, *et al*. 2001. Siah-1 mediates a novel β-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. *Mol. Cell* **7**: 927-936.
13. Matsuzawa SI, Reed JC. 2001. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for β-catenin degradation linked to p53 responses. *Mol. Cell* **7**: 915-926.
14. Miller JR. 2002. The Wnts. *Genome Biol.* **3**: reviews3001.1-reviews3001.15.
15. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, *et al*. 1997. Activation of β-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β-catenin or APC. *Science* **275**: 1787-1790.
16. Morin PJ. 1999. β-catenin signaling and cancer. *Bioessays* **21**: 1021-1030.
17. Orford K, Crockett C, Jensen JP, Weissman AM, Byers SW. 1997. Serine phosphorylation-regulated ubquitination and degradation of β-catenin. *J. Biol. Chem.* **272**: 24735-24738.
18. Pettit GR, Herald CL, Doubek DL, Herald DL, Arnold E, Clardy J. 1982. Isolation and structure of bryostatin 1. *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 6846-6848.
19. Polakis P. 2002. Casein kinase 1: a Wnt'er of disconnect. *Curr. Biol.* **12**: R499-R501.
20. Shaha SP, Tomic J, Shi Y, Pham T, Mero P, White D, *et al.* 2009. Prolonging microtubule dysruption enhances the immunogenicity of chronic lymphocytic leukaemia cells. *Clin. Exp. Immunol.* **158**: 186-198.
21. Sun MK, Alkon DL. 2005. Dual effects of bryostatin-1 on spatial memory and depression. *Eur. J. Pharm.* **512**: 43-51.
22. Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y. 2002. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the β-catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers. *Oncogene* **21**: 5861-5867.
23. Tetsu O, McCormick F. 1999. β-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* **398**: 422-426.

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1402.02001