



## 저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

석사학위논문

# PPAR gamma 결합단백질에 의한 지방세포의 분화조절연구

The effects of PPAR gamma interacting proteins on regulation of  
adipogenesis

제 출 자 : 장 민 준

지도교수 : 김 은 주

2015

분자생물학과

분자생물학전공

단국대학교 대학원

# PPAR gamma 결합단백질에 의한 지방세포의 분화조절연구

The effects of PPAR gamma interacting proteins on regulation of  
adipogenesis

이 논문을 석사학위논문으로 제출함.

2015년 12월

단국대학교 대학원  
분자생물학과  
분자생물학전공

장 민 준

장민준의 석사학위 논문을  
합격으로 판정함

심 사 일 : 2015. 12. 10.

심사위원장                      정 선 주                      인

심 사 위 원                      박 현 용                      인

심 사 위 원                      김 은 주                      인

단국대학교 대학원

(국문초록)

## PPAR gamma 결합단백질에 의한 지방세포의 분화조절연구

단국대학교 대학원 분자생물학과

분자생물학전공

장 민 준

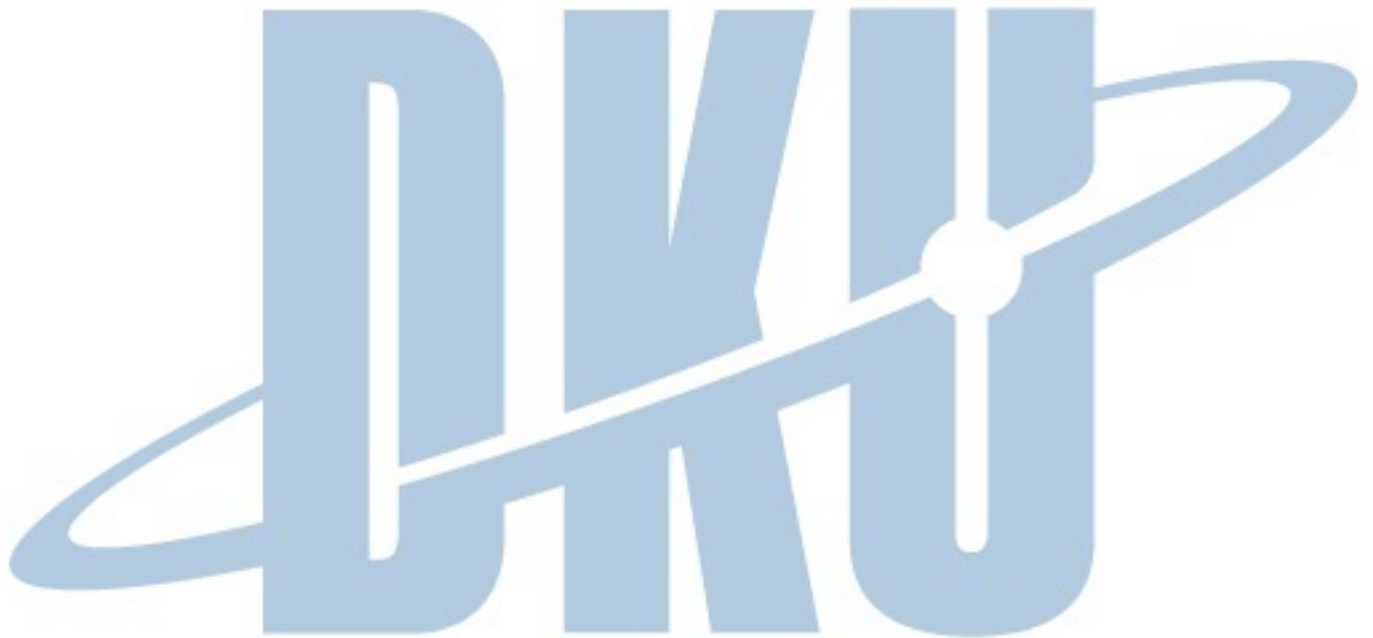
지도교수 : 김 은 주

비만(obesity)은 전 세계적으로 대두되고 있는 문제로, 서구화 된 식습관과 운동부족 등으로 인해 고혈압, 당뇨병 등을 야기하며, 최근에는 대사 증후군이라는 질병으로 분류가 되어 있을 정도로 그 위험성이 많은 연구를 통해 알려져 있다. 오래전부터 비만에 대한 원인과 해결책을 찾고, 치료제의 개발을 위해 전문학적 자본과 연구 인력이 투입 되면서 많은 연구가 수행 되어왔다. 이에, 핵 호르몬 수용체 중 하나로 지방세포에서 주로 발현을 하며 지방대사 및 당대사 작용을 조절하는 핵심 전사인자로 알려진 PPAR $\gamma$ 에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며 이를 조절하는 여러 세포내 인자들에 대해서도 많이 연구되고 있다.

최근, NAD<sup>+</sup> 의존적인 탈 아세틸화 효소인 SIRT1이 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제 및 지방분화 억제에 중요한 역할을 한다는 보고가 알려지며 비만억제에서의 SIRT1의 기능이 크게 주목받고 있다. 본 석사학위논문에서는 SIRT1의 결합 단백질로 새롭게 발굴된 SIP3가 SIRT1과 상호협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제함을 확인하였고, SIP3가 지방전구세포인 3T3-L1의 분화를 억제하는 것을 확인하였다. 특히, SIP3의 CoNR box2가 PPAR $\gamma$ 와의 결합 및 전사활성 억제에 필요함을 확인하여 PPAR $\gamma$ 의 새로운 보조억제자로서의 SIP3의 기능에 대한 강력한 근거를 제시하였다. 또한, SIP3에 의한 PPAR $\gamma$  전사활성 억제의 구체적인 조절 기작을 확인하기 위하여 complex purification을 수행하였고 전사활성 조절인자로 알려진 SAP1을 새롭게 발굴하였다. SAP1이 SIP3과 결합함을 *in vivo*, *in vitro*에서 확인하였고, SIP3, SIRT1과 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제함을 확인하였고, SAP1에 의한 3T3-L1 지방세포 분화 억제를 증명하였다.

이러한 연구 결과를 통해, 본 석사학위논문은 SAP1이 SIP3과의 결합을 통하여 SIRT1과 상

호 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제함을 증명하였고, 상호 협력적으로 지방세포 분화를 억제함에 대한 강력한 근거를 제시하였다. 이를 통하여, 기존에 전혀 알려지지 않은 SAP1의 새로운 기능을 밝혔으며 SIRT1에 의한 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 및 지방세포로의 분화 조절의 분자적 기전에 대한 새로운 모델을 제시하였다. 따라서, 본 석사학위논문에서 확인한 결과들은 비만 치료제 개발에 중요한 학문적 자료를 뒷받침할 수 있을 것이다.



## 목 차

국문 초록 .....	i
목 차 .....	iii
그림 목차 .....	v
 I. 서 론 .....	 1
II. 실험 재료 및 방법 .....	3
1. Cell culture 및 stable cell line 제작	
2. Transient transfection	
3. Western Blotting (WB)	
4. Immunoprecipitation (IP)	
5. Glutathione S-Transferase (GST)-pull down assays	
6. Luciferase reporter assays	
7. Realtime-PCR	
8. 3T3-L1 adipogenesis	
9. Oil-red-O staining	
III. 결 과 .....	8
IV. 그 림 .....	14
V. 고 찰 .....	25
VI. 참고 문헌 .....	27
VII. 영문 초록 .....	30

## 그림 목차

- <Figure 1> SIP3 interacts with PPAR $\gamma$  *in vivo*
- <Figure 2> SIP3 represses PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity by cooperating with SIRT
- <Figure 3> SIP3 suppresses PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis in 3T3-L1 cells
- <Figure 4> CoRNR box2 is important for repressive activity of SIP3 on PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis
- <Figure 5> Identification of SAP1 as a new interacting protein of SIP3
- <Figure 6> SAP1 represses PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity by cooperating with SIP3
- <Figure 7> SAP1 represses PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity by cooperating with SIRT1
- <Figure 8> SIRT1 suppresses PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity through cooperating with SAP1
- <Figure 9> SAP1 suppresses PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis in 3T3-L1 cells
- <Figure 10> Knock down of SAP1 promotes PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis in 3T3-L1 cells
- <Figure 11> The schematic models for the epigenetic regulation of PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity by SIP3, SIRT1 and SAP1 complex



## I. 서 론

비만(obesity)은 전 세계적으로 점점 관심이 높아지는 의료적, 사회적 문제로 대두되고 있으며, 음식물의 과 섭취, 체내 에너지 사용 부족 등으로 일어나는 질병으로서 대사증후군(metabolic syndrome)의 하나로 분류되어 있다. 비만은 체내에서 동맥경화증, 고혈압, 고지혈증 및 제 2형 당뇨병 등 심각한 질병을 동반 할 수 있다고 알려져 있다(1). 인류는 비만을 극복하기 위해서 오래 전부터 전 세계적으로 천문학적인 연구비를 투입하여 지방세포에 대한 연구를 수행해왔다. 지방세포는 인체 내에서 대사에 중요한 세포로서, 에너지 저장 기능뿐만 아니라 여러 가지 호르몬, cytokine등을 분비하는 내분비기관으로서 역할을 수행한다.

지방전구 세포가 지방세포로 분화하는 과정인 지방세포 분화(adipogenesis)는 비만 조절 연구의 목표 중 하나로서 오랫동안 많은 연구가 수행되어 왔다. 그 중 지방세포 분화의 핵심 전사인자(transcription factor)로 연구되고 있는 PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma)는 생체 내 다양한 핵 수용체(nuclear receptor)중 하나로 주로 지방조직, 결장조직(colon), 대식세포(macrophages)에서 많이 발현되고 있으며, 지방세포 분화뿐만 아니라 지방산 저장(fatty acid storage)과 당 대사 작용(glucose metabolism), insulin에 대한 민감성, 지방대사 등을 조절하는 것으로 알려져 있다(2). PPAR $\gamma$ 는 대사질환, 비만, 당뇨병 등의 질병 치료에 있어서 중요한 유전적 타겟으로 많은 연구가 수행되고 있으며(3), PPAR $\gamma$ 의 ligand인 TZD (Thiazolidinedione)를 통한 임상적 치료의 시도가 이루어지고 있다.

최근, NAD<sup>+</sup> 의존적인 탈 아세틸화 효소(deacetylase)로서 세포의 노화, 생존, 사멸 및 세포 내 신호전달에 중요한 기능을 하는 단백질인 SIRT1이 지방전구세포인 3T3-L1에서 co-repressor인 NCoR (Nuclear receptor co-repressor 1)과 SMRT (Silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptors)를 유도하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 및 지방세포 분화를 억제하는 것으로 보고된 바 있으며(4), 지방조직 내에서 SIRT1이 유전적으로 제거될 경우 지방과다증(adiposity) 및 인슐린 저항성(insulin resistance)이 유도되었다(5). 또한 고지방식이(high-fat diet)를 유도한 쥐에 SIRT1을 활성화 시키는 resveratrol을 함께 처리할 경우 고지방 식이에 의해 유도되는 비만과 물질대사교란(metabolic derangements)을 예방하는 것으로 보고되었다(6-8). 최근에는 비만을 극복하기 위한 새로운 시도로서 백색지방 세포(White adipose tissue, WAT)를 갈색지방 세포(Brown adipose tissue, BAT)로 전환하는 갈색지방화(brown remodeling)에 SIRT1이 중요하다는 보고가 있다(9).

SIP3 (SIRT1 Interacting Protein 3)는 yeast two-hybrid screening을 통해 발굴한 SIRT1의 새로운 결합 단백질로서, 2개의 CoRNR box (LMNVI 와 LQSIVPLFI)와 1개의 NR box (LMPLL)를 가지고 있고, 이 부위들은 다른 co-repressor와 co-activator에서 핵 수용체와 결합하는데 중요하다 보고된 바 있다(10-12). 이를 토대로 SIP3가 CoRNR box를 통해 핵 수용체의

co-repressor로서 RAR $\alpha$ , ER $\alpha$ 와 결합하여 전사활성을 조절한다는 것을 선행 논문을 통해 확인 한 바 있다(10,13).

SAP1 (SIP3-associated protein 1)은 단백질의 아르기닌을 메틸화하는 메틸화효소 군(family) 중 하나로(14), 전사기능 억제자(transcription repressor)로서 그 생물학적 기능이 최초로 확인 되었다(15). SAP1은 후성유전학적(epigenetic)으로 프로모터(promoter)의 히스톤 메틸화나 단백질의 번역 후 변환(post-translational modification)를 유도하여 세포의 성장이나 증식에 영향을 미친다(16). 대표적으로 SAP1이 세포주기 조절(cell cycle regulatory) 유전자와 종양 억제(tumor suppressor) 유전자의 프로모터에서 히스톤 메틸화를 유도하여 전사를 억제시킨다는 보고가 있다(17-19). 또한 SAP1이 E-cadherin의 전사 억제를 유도하여 종양 세포 증식(proliferation)과 전이(metastasis)에 영향을 주는 것으로 알려져 있고(20), 많은 암세포 중에서 SAP1의 발현이 특이적으로 높아진 것이 보고되어있다(16). 이 외에도 SAP1은 p53, RAD9, HOXA9, E2F1 등 다양한 전사인자 및 염색질 관련 단백질(chromatin-association protein)을 메틸화하여 그 기능을 조절한다는 보고가 있다(19,21-25). 최근 활발한 연구를 통해 SAP1이 생화학, 생리적으로 세포 성장과 분화, 발달에 중요한 기능을 가지는 것이 점차 확인되고 있다(16).

PPAR $\gamma$ 의 연구에 있어서 SIRT1이 핵심적인 조절자로 알려져 있는 가운데, 선행 연구를 통해 새로운 SIRT1 결합단백질인 SIP3가 CoRNR box를 통해 PPAR $\gamma$ 와 결합하여 SIRT1과 함께 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하였고, SIP3의 발현은 지방전구세포인 3T3-L1의 분화를 억제하는 것을 증명하였다. 그러나, SIP3와 PPAR $\gamma$ , SIRT1의 결합에 있어서 SIP3내 2개의 CoRNR box 중 어떤 위치에 정확히 결합하는지, CoRNR box가 SIP3의 기능적인 면에 어떤 영향을 미치는지 확인되지 않았다.

본 석사학위논문에서는 SIP3와 PPAR $\gamma$ 가 직접적인 결합을 하는데 있어서, SIP3의 CoRNR box2가 PPAR $\gamma$ 와의 결합에 중요하다는 것을 확인함과 동시에 CoRNR box2 결손 시 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제 및 지방세포 분화 억제 기능이 없어지는 것을 확인하여 SIP3의 co-repressor 기능에 CoRNR box2가 핵심적인 역할을 한다는 것을 증명하였다. 또한 SIP3의 complex purification을 통해서 새로운 SIP3 결합단백질인 SAP1을 발굴하였고, SAP1이 SIP3, SIRT1과 함께 상호 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하고, SAP1의 발현이 지방세포 분화를 억제함을 확인하였다.

이러한 연구 결과를 통해, SAP1과 SIP3, SIRT1의 지방 세포내 대사조절의 가능성을 제시하여, 전 세계적으로 문제가 되고 있는 비만을 조절하고 억제할 수 있는 방법 연구에 중요한 가능성을 제시하고자 한다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. Cell culture 및 stable cell line 제작

#### 1.1 Cell culture

실험에 사용한 HEK293세포, 3T3-L1세포들은 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 계대 및 배양을 수행하였다. HEK293세포는 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotic-antimycotic mix (Gibco)를 포함한 DMEM 배지로 계대 및 배양을 하였고, 3T3-L1세포는 10% bovine serum (BS)와 1% antibiotic-antimycotic mix를 포함한 DMEM 배지로 계대 및 배양을 하였다.

#### 1.2 Stable cell line 제작

3T3-L1세포에 Flag-SIP3, Flag-SIP3  $\Delta$ CoRNR box2, Flag-SAP1, pSilencer-mouse SAP1 plasmid DNA를 transient transfection하여 G418 800 $\mu$ g/ml, Hygromycin B (Invitrogen) 100mg/ml 으로 selection을 수행하였다. pSilencer-mouse SAP1에 사용된 타겟 sequence는 기존에 확인된 sequence로 primer를 제작 후 합성, cloning 및 stable cell 제작을 수행하였으며 사용된 primer의 sequence는 아래와 같다.

pSilencer-sh mouse SAP1-1

Forward : 5'- GAT CCG AGG GAG TTC ATT CAG GAA TTC AAG AGA  
TTC CTG AAT GAA CTC CCT CTT TTT TGG AAA - 3'

Backward : 5'- AGC TTT TCC AAA AAA GAG GGA GTT CAT TCA GGA  
ATC TCT TGA ATT CCT GAA TGA ACT CCC TCG - 3'

pSilencer-sh mouse SAP1-2

Forward : 5'- GAT CCG GTC TTC CAG CTT TCG TAT TTC AAG AGA ATA  
GGA AAG CTG GAA GAC CTT TTT TGG AAA - 3'

Backward : 5'- AGC TTT TCC AAA AAA GGT CTT CCA GCT TTC CTA TTC  
TCT TGA AAT AGG AAA GCT GGA AGA CCG - 3'

## 2. Transient transfection

Transfection reagent로서 Lipofectamin 와 Plus reagent (Invitrogen), Poly-ethylenimine (PEI, Cat# 23966, Polysciences Inc.)를 사용하여 실험조건에 맞게 준비된 DNA constructs를 세포 내로 transfection하였다. Lipofectamin을 이용한 transfection의 경우, 준비된 DNA를 serum-free DMEM 배지와 plus reagent 와 섞어 상온에서 15분간 반응 시킨 후, Lipofectamin과 반응시킨 serum-free media와 섞어 상온에서 15분간 다시 반응 시킨다. 전날 분주해 놓은 세포에 overlay해준 뒤, 4시간 뒤 10% FBS 혹은 BS 와 1% antibiotic-antimycotic 이 포함된 DMEM배지로 교체해 주었다. PEI를 이용한 transfection의 경우 실험조건에 맞게 준비된 DNA constructs와 함께 serum-free DMEM배지에서 15min간 반응 시킨 후, 전날 분주해 놓은 세포에 overlay해준 뒤, 8~10시간 후 10% FBS 혹은 BS 와 1% antibiotic- antimycotic 이 포함된 DMEM배지로 교체해 주었다.

## 3. Western blotting (WB)

실험을 통해 얻은 세포를 RIPA buffer (0.05M pH7.5 Tris-HCl, 0.15M NaCl, 1mM NaF, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1% NP-40, 1 Tablet Protease inhibitor cocktail)로 lysis하였다. Cell lysis를 통해 얻은 단백질을 추출물은 Bradford assay로 정량하여 sample을 만든 후, 6~10% SDS-PAGE로 전기 영동하여 PVDF membrane (0.45 $\mu\text{m}$ , Millipore)에 transfer하였다. Membrane을 blocking buffer (5% skim milk in TBS/T buffer)에 1시간 동안 상온에서 incubation혹은 4 $^{\circ}\text{C}$  chamber에서 over-night incubation이후 blocking buffer에 1차 항체를 1:1000 비율로 희석하여 1시간 동안 상온에서 incubation 하였다. 항체처리를 마친 membrane을 TBS/T buffer (0.05M pH8.0 Tris-HCl, 0.15M NaCl, 0.2% Tween 20)로 10분씩 3회 세척한 후 2차 항체를 1:5000으로 희석하여 1차 항체 처리방법과 동일한 방법으로 처리하였다. 이후 TBS/T buffer로 다시 3회 세척 후, ECL solution system (Westzol, Intron)을 사용하여 단백질 발현을 X-ray film상에 현상하였다.

실험에 사용된 1차 항체는 mouse monoclonal antibody인 anti-Flag (Sigma, F1804), anti-Myc (Millipore, 05-724MG), anti-GFP (Santa Cruz Biotechnology, sc-9996), anti- $\beta$  actin (Santa Cruz Biotechnology, sc-47778), rabbit polyclonal antibody인 anti-SAP1 (Millipore, 07-405), anti-SIRT1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-15404), anti-SIP3 (rabbit) 를 사용하였고, 2차 항체는 anti-mouse, anti-rabbit을 사용하였다.



#### 4. Immunoprecipitation (IP)

IP실험을 하기 위해, 각각의 실험조건에 필요한 DNA constructs를 transfection하거나 조건에 맞는 시약을 처리하여 세포를 얻은 뒤, RIPA buffer로 lysis하여 단백질을 추출물을 얻었다. Bradford assay를 통해 정량 후, 1차 항체를 1:200으로 희석하여 4°C chamber에서 over-night rotating incubation하였다. 이후 protein A/G-agarose beads 와 protein A-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology)를 넣어 다시 4시간 동안 4°C chamber rotating incubation하였다. 형성된 complex를 RIPA buffer로 3~5회 세척하여 2X sample buffer를 첨가하여 5분간 100°C에서 끓여서 분리하여 WB를 통해 확인하였다.

#### 5. Glutathione S-Transferase (GST)-pull down assays

실험을 수행하기 위해, GST fusion DNA constructs들을 E.coli에서 발현시킨 후, glutathione-sepharose beads (GE life science)를 이용하여 GST가 결합한 SIP3를 정제하였다. Flag-SAP1 단백질을 합성하기 위해서 TnT rabbit reticulocyte system kit (Promega)를 사용하였다. *In vitro* 상에서 합성한 단백질과 GST fusion 단백질을 A100 buffer (0.2M NaCl, 0.02M pH7.5 Tris-HCl, 0.2% NP40, 1mM EDTA)에 함께 섞어 반응시키고, glutathione-sepharose beads를 사용하여 분리하였다. 분리한 sample들은 A100 buffer로 3~5회 세척 후, 2X sample buffer를 첨가하여 WB를 통해 결과를 확인하였다.

#### 6. Luciferase reporter assays

HEK293 세포를 6 well culture plate에 seeding하여 Charcoal이 처리된 10% FBS와 antibiotic-antimycotic이 첨가된 DMEM 배지로 교체 후, 다음날 실험 조건에 맞는 DNA constructs를 transfection후 다시 Charcoal이 처리된 10% FBS와 antibiotic-antimycotic이 첨가된 DMEM 배지와 함께 5μM rosiglitazone (Sigma, R2408)를 처리하였다. Internal control로 사용하기 위하여 CMV-driven-galactosidase (β-gal) expression vector를 co-transfection하였다. Cell lysate를 추출하기 위해, TEN buffer (0.25M pH8.0 Tris-HCl, 0.1M PMSF)로 lysis후 analytical luminescence luminometer를 이용하여 lysate와 luciferin (Promega)을 반응시켜 분석하였다. Transient transfection control로 β-gal activity를 측정하기 위해, Lac Z buffer (60mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10mM KCl, 50mM β-mercaptoethanol, 1mM MgSO<sub>4</sub>, 40mM Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)와 O-Nitrophenyl-β-d-Galactoside (ONPG) solution와 lysate를 섞어 반응시켜 변색이 확인되면

1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 넣었다. 이후 microplate reader를 이용하여 405nm 파장으로 측정하였다. Luciferase activity는 측정된 β-gal 값으로 보정하였다.

## 7. Realtime-PCR

3T3-L1 세포로부터 Easy-Blue reagent (Intron)을 사용하여 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 M-MLV RTase (Promega)와 Random oligo-dT primer (Promega)와 함께 섞어 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 SYBR Green Real time PCR Master Mix (Roche)를 사용하여 Light cycler real time PCR detection system (Roche)로 real time PCR를 수행하였다. 모든 유전자 발현 값은 GAPDH로 보정하였다. 실험에 사용된 primer는 기존에 확인된 sequence로 합성 및 실험을 수행하였으며 사용된 primer의 sequence는 아래와 같다.

### GAPDH

Forward : 5' - CTG CAC CAC CAA CTG CTT AGC - 3'

Backward : 5' - GGG CCA TCC ACA GTC TTC TGG - 3'

### AP2 (adipocyte protein 2)

Forward : 5' - AAA GAC AGC TCC TCC TCG AAG GTT - 3'

Backward : 5' - TGA CCA AAT CCC CAT TTA CGC - 3'

### LPL (lipoprotein lipase)

Forward : 5' - ATC CAT GGA TGG ACG GTA ACG - 3'

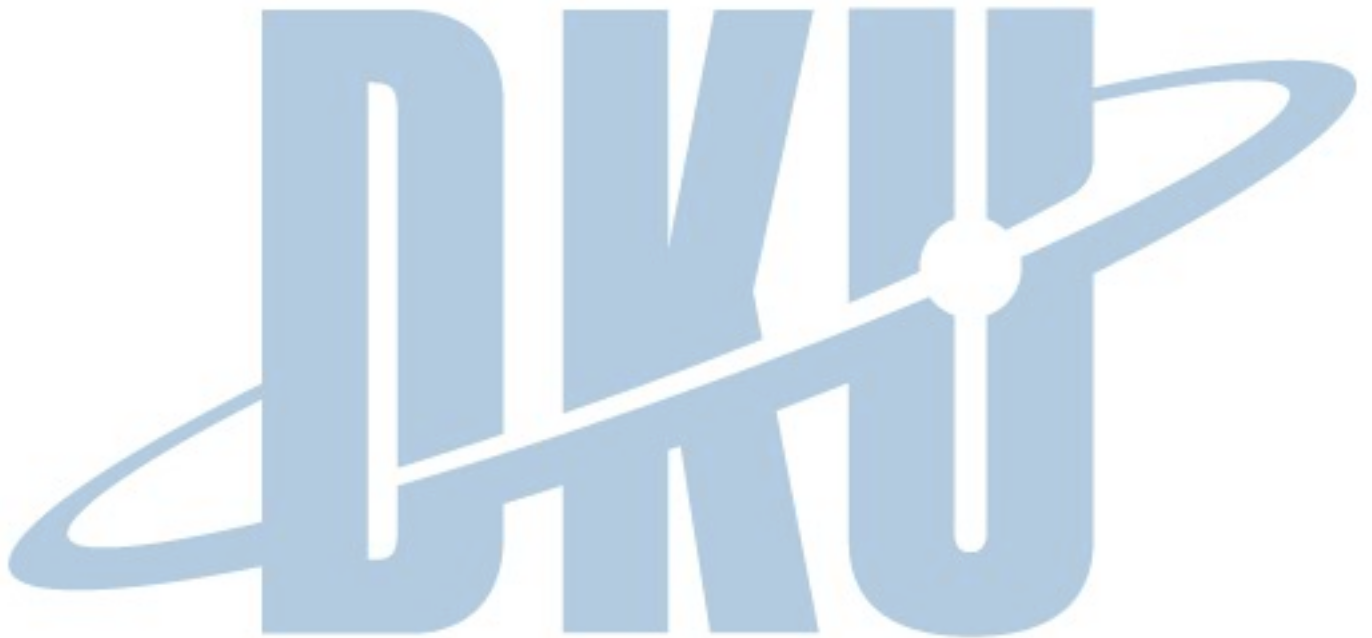
Backward : 5' - CTG GAT CCC AAT ACT TCG ACC A - 3'

## 8. 3T3-L1 adipogenesis

3T3-L1 세포를 6 well culture plate에 cell counting이후 같은 수의 세포를 seeding 한 뒤, 세포의 confluency가 90%이상일 되면 adipogenesis initiation 배지 (0.5mM IBMX, 5μg/ml Insulin, 5μM Rosiglitazone, 1μM Dexamethasone in 10% FBS DMEM)을 처리하고, 처리 이후 2일 간격으로 8일째까지 5μg/ml Insulin을 포함한 10% FBS DMEM배지로 교체해 주었다.

## 9. Oil-red-O staining

3T3-L1의 지방분화 종료 이후, 70% 에탄올로 세포를 상온에서 10분간 고정을 시켜주었다. 이후 D.W로 세척 후, Oil-red-O (Sigma) solution으로 상온에서 4시간동안 incubation시켰다. 염색약을 제거 후, 70% 에탄올로 2회 세척을 해준 뒤, 1X PBS로 두 번 세척한 뒤, 현미경으로 세포를 관찰하였다.



### III. 결 과

#### 1. SIP3와 PPAR $\gamma$ 의 결합 확인

선행연구에서 SIRT1과 결합하는 단백질로 SIP3를 발굴하였고, 두 단백질간의 결합을 확인하였다. 또한 ligand존재 여부와 상관없이 SIRT1, SIP3가 PPAR $\gamma$ 와 결합함을 *in vitro*에서 확인하였다. SIP3에 의한 PPAR $\gamma$ 의 기능조절에 대한 분자생물학적 기작을 확인하는 후속 연구를 수행하기 위하여, 먼저 SIP3와 PPAR $\gamma$ 의 결합이 *in vivo*상에서 실제로 있는지 확인하였다. HEK293 세포에 Myc-PPAR $\gamma$ 와 Flag-SIP3를 transfection 하고 rosiglitazone을 처리한 뒤, anti-Myc 항체로 IP하고 anti-Flag항체로 western blot을 수행하였다. Figure 1A에서 보이는 바와 같이, *in vivo*상에서도 ligand인 rosiglitazone의 존재여부와 관계없이, SIP3와 PPAR $\gamma$ 의 결합을 확인하였다. SIP3는 Figure 1B에서 보이는 바와 같이, CoRNR box로 추정되는 두 개의 motif와 NR box로 추정되는 1개의 motif를 가지는 것을 확인할 수 있었다. 선행연구에서 PPAR $\gamma$ 는 SIP3의 CoRNR box가 제거된 mutant와 결합하지 못하고 CoRNR box를 포함하는 NR box가 제거된 mutant와 결합하는 것을 확인하였다.

SIP3의 2개의 CoRNR box가 실제로 PPAR $\gamma$ 와의 결합에 영향을 미치는 지를 확인하기 위해, 각각의 CoRNR box가 결손된  $\Delta$ CoRNR box1,  $\Delta$ CoRNR box2 mutant와 PPAR $\gamma$ 와의 IP실험을 수행하였다. HEK293 세포에 Myc-PPAR $\gamma$ 와 GFP-Empty나 GFP-SIP3 full length, GFP- $\Delta$ CoRNR box1,  $\Delta$ CoRNR box2 mutant, GFP-NR을 co-transfection하여 anti-Myc항체로 IP를 하고 anti-GFP항체로 western blot을 수행하였다. Figure 1C에서 보이는 바와 같이, PPAR $\gamma$ 는 SIP3의 full length,  $\Delta$ CoRNR box1 mutant와 결합하지만,  $\Delta$ CoRNR box2 mutant와는 결합을 하지 못하는 것을 확인하였다. 이를 통해 SIP3의  $\Delta$ CoRNR box2가 PPAR $\gamma$ 와의 결합에 중요하다는 것을 확인하였다.



## 2. SIP3에 의한 PPAR $\gamma$ 의 전사 활성 억제

선행연구를 통해 SIP3가 SIRT1과 결합하는 것을 확인하였다. SIP3가 SIRT1과 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 활성을 억제하는지 분석하기 위해, luciferase reporter assay를 수행하였다. HEK293 세포에 PPAR $\gamma$ , SIRT1, SIP3와 PPRE response reporter gene를 co-transfection하고 rosiglitazone을 처리하여 assay를 수행하였다. Figure 2A를 통해 SIRT1에 의한 PPAR $\gamma$  전사 활성 억제를 SIP3가 농도 의존적으로 더욱 촉진 시키는 것을 확인하였다. 다음으로, SIP3의 CoRNR box가 전사활성 조절에 영향을 주는지를 확인하기 위해 실험을 수행한 결과, Figure 2B와 같이 SIP3와 CoRNR box1이 결손된 mutant는 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제를 하였지만, CoRNR box2가 결손된 mutant는 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제를 하지 못하는 것을 확인 하였다. 이를 통해 SIP3의 CoRNR box2가 PPAR $\gamma$  전사활성 억제 기능에 중요함을 확인 하였고, 이는 앞에서 확인된 PPAR $\gamma$ 와 SIP3의 결합분석 결과와도 일치함을 확인하였다.

SIP3를 knock down하고 전사활성을 확인하였을 때, rosiglitazone이 없을 때도 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 약간 증가시켰고, rosiglitazone을 처리하였을 때도 전사활성을 활성화 하였다 (Figure 2C). 이를 통해 SIP3는 SIRT1과 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 조절을 억제하며, 이때 SIP3의 CoRNR box2가 중요하다는 것을 확인할 수 있다.

SIP3 knock down에 의한 전사활성 증가 시, western blot을 통해서 SIP3의 단백질 발현 또한 transfection 조건에 맞게 감소한 것을 확인 하였다(Figure 2D).

## 3. SIP3에 의한 PPAR $\gamma$ 에 의해 유도되는 3T3-L1 지방세포 분화 억제

SIP3에 의한 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제가 PPAR $\gamma$ 의 주된 기능인 지방세포 분화 조절에도 영향을 미치는 지 확인하기 위하여, SIP3 stable cell line을 제작 및 western blot으로 발현을 확인하였다(Figure 3A). Rosiglitazone을 처리하여 8일간 지방세포 분화를 유도한 뒤, Oil-red-O staining을 통하여 지방분화를 확인하였을 때, SIP3가 발현된 세포에서는 지방세포 분화가 거의 유도되지 않은 것을 확인 할 수 있었고(Figure 3B), 지방세포 분화억제가 SIP3에 의한 PPAR $\gamma$  target gene 발현을 조절한 결과임을 확인하기 위해 PPAR $\gamma$ 의 target gene인 AP2와 LPL의 발현을 real time PCR을 통하여 확인하였다. Figure 3C에서 보이는 바와 같이 SIP3가 발현 된 세포에서 PPAR $\gamma$ 의 전사활성이 억제되어 target gene인 AP2와 LPL의 mRNA 발현이 현저히 감소되었음을 확인하였다. 이를 통해 SIP3가 SIRT1과 함께 상호 협력적으로 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하고, SIP3의 발현이 지방전구 세포인 3T3-L1의 지방분화를 억제 함을 확인할 수 있었다.

#### 4. 3T3-L1의 지방세포 분화 억제에서 SIP3의 CoRNR box2의 중요성

앞서 SIP3가 3T3-L1의 지방세포 분화를 억제함을 확인하였고, PPAR $\gamma$ 와 SIP3의 결합 및 전사활성 조절에 CoRNR box2가 중요하다는 것을 확인하였다. SIP3의 CoRNR box2가 3T3-L1의 지방세포 분화조절 및 PPAR $\gamma$  target gene 조절에 중요한 위치인지를 확인하기 위해, Flag-SIP3  $\Delta$ CoRNR box2를 발현시킨 3T3-L1 stable cell line을 제작 및 western blot으로 발현을 확인하였다(Figure 4A). Rosiglitazone을 처리하여 8일간 지방 세포 분화를 유도한 후 Oil-red-O staining을 수행하였을 때, SIP3가 발현된 세포는 대조군(3T3-L1 Mock cells, 3T3-L1 Flag-Empty cells)에 비해 지방분화가 거의 일어나지 않는 반면, CoRNR box2가 결손된 SIP3 ( $\Delta$ CoRNR2 SIP3) 발현 세포는 지방세포 분화가 대조군과 비슷하게 일어났다(Figure 4B). 이를 통해 SIP3의 3T3-L1 세포의 지방분화 억제에 있어서 CoRNR box2가 중요하다는 것을 확인할 수 있었다. SIP3의 CoRNR box2의 결손이 PPAR $\gamma$  target gene의 전사에도 영향을 미치는지 확인하기 위해 stable cell을 분화 시킨 후, PPAR $\gamma$  target gene의 발현을 real time PCR을 통해 확인한 결과, CoRNR box2가 결손된 SIP3가 발현된 세포의 경우 PPAR $\gamma$ 의 target gene의 mRNA발현 또한 감소하지 않았다(Figure 4C). 이를 통해 SIP3에서 CoRNR box2가 SIP3의 3T3-L1의 지방분화 억제 및 PPAR $\gamma$  전사활성 억제에 핵심적인 기능을 하는 위치임을 확인할 수 있었다.

#### 5. 새로운 SIP3 결합 단백질인 SAP1의 동정 및 결합 확인

SIP3가 SIRT1과 결합하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하는 분자적 기전을 구체적으로 분석하기 위해서 SIP3와 결합하는 새로운 세포 내 결합 단백질을 찾고자, HEK293 세포에 Flag-SIP3를 발현하는 stable cell을 만든 뒤 western blot으로 확인하였고(Figure 5A, upper panel), anti-Flag항체를 이용하여 complex purification을 수행하였다. Mass spectrometry 분석을 통해 Flag-SIP3와 complex를 이루는 다양한 단백질을 확인을 하였다(Figure 5A, lower panel). Stable cell내 complex purification에 대한 검증을 하기 위한 IP실험을 수행한 결과, HSP70 및 SAP1가 SIP3과 결합함을 확인 하였고, 이를 통해 SAP1과 SIP3의 complex형성 가능성을 확인하였다(Figure 5B). SAP1은 전사조절 인자로서 단백질의 번역 후 변환(post-translational modification)을 유도하여 세포에 영향을 주거나, 프로모터상의 히스톤의 메틸화를 유도하여 전사활성조절에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(14-16). SAP1이 SIP3와 결합하는지 다시 확인하기 위해, HEK293 세포에서 Myc-SAP1과 Flag-SIP3를 transfection 하여 IP를 수행하였다. Figure 5C에서 보이는 바와 같이, SIP3와 SAP1이 결합함을 다시 한 번

증명하였다. SAP1이 SIP3와 *in vivo* 상에서 complex를 이루는 것 뿐 만 아니라, 직접적으로 결합하는지를 확인하기 위해서 *in vitro* 상에서 합성한 Flag-SAP1 단백질과 GST-SIP3단백질을 사용하여 GST-pull down assay를 수행하였다. Figure 5D에서 보이는 바와 같이 SAP1이 SIP3와 직접적인 결합이 있음을 확인 할 수 있었다. 이를 통해 SAP1이 SIP3와 결합하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 조절 할 가능성이 제시되었다.

## 6. SIP3협력을 통한 SAP1의 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제

SAP1과 SIP3의 결합이 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 조절에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해 PPRE-responsive reporter를 이용하여 luciferase reporter assay를 수행하였다. 이를 통해 SIP3에 의해 PPAR $\gamma$ 의 전사활성이 억제되고, SAP1 발현 시 SIP3와 함께 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 더 억제하는 것을 확인하였다(Figure 6A, upper panel). 이 때 단백질 발현 또한 transfection조건에 맞춰 발현함을 western blot을 통해 확인하였다(Figure 6A, lower panel). 반면 HEK293 세포에서 SAP1을 농도 의존적으로 knock down할 경우 PPAR $\gamma$ 의 전사활성이 점점 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 6B, upper panel). SAP1의 단백질 발현 또한 농도 의존적으로 감소함을 확인 할 수 있었다(Figure 6B, lower panel). 결과적으로 SAP1이 SIP3와 함께 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제 한다는 것을 알 수 있었다.

## 7. SIRT1 협력을 통한 SAP1의 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제

SAP1이 SIP3뿐만 아니라, SIRT1과 함께 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 조절할 수 있는지 확인하기 위해 luciferase reporter assay를 수행하였다. 이를 통해 SIRT1에 의해 PPAR $\gamma$ 의 전사활성이 억제되고, SAP1 발현 시 SIRT1과 함께 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 더 억제하는 것을 확인하였다(Figure 7A, upper panel). 이때 단백질 발현 또한 transfection조건에 맞춰 발현함을 western blot을 통해 확인하였다(Figure 7A, lower panel). 반면 HEK293 세포에서 SIRT1을 발현시켰을 때, SAP1을 농도 의존적으로 knock down할 경우 PPAR $\gamma$ 의 전사활성이 점점 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 7B, upper panel). SAP1의 단백질 발현 또한 농도 의존적으로 감소함을 확인 할 수 있었다(Figure 7B, lower panel). 이를 통해 SAP1이 SIRT1과 함께 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제 한다는 것을 알 수 있었다.

## 8. SAP1 협력을 통한 SIRT1의 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제

앞선 실험을 통해 SAP1이 SIP3, SIRT1과 상호 협력적으로 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하는 것을 확인하였다. 이번에는 SAP1 발현 조건에서 SIRT1이 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제에 영향을 주는지 확인하기 위해, luciferase reporter assay를 수행하였다. 이를 통해 SIRT1 또한 SAP1과 상호 협력적으로 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 조절한다는 것을 증명하였다(Figure 8A, upper panel). 단백질 발현 또한 transfection조건에 맞춰 발현함을 western blot을 통해 확인하였다(Figure 8A, lower panel). SIRT1을 농도 의존적으로 knock down할 경우 PPAR $\gamma$ 의 전사활성이 점점 증가하는 것을 확인 할 수 있었다(Figure 8B, upper panel). SIRT1의 단백질 발현 또한 농도 의존적으로 감소함을 확인 할 수 있었다(Figure 8B, lower panel). 이를 통해 SAP1이 SIRT1과 함께 상호적으로 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제 한다는 것을 다시 한 번 확인 할 수 있었다.

## 9. SAP1에 의한 PPAR $\gamma$ 매개 3T3-L1의 지방세포 분화 억제

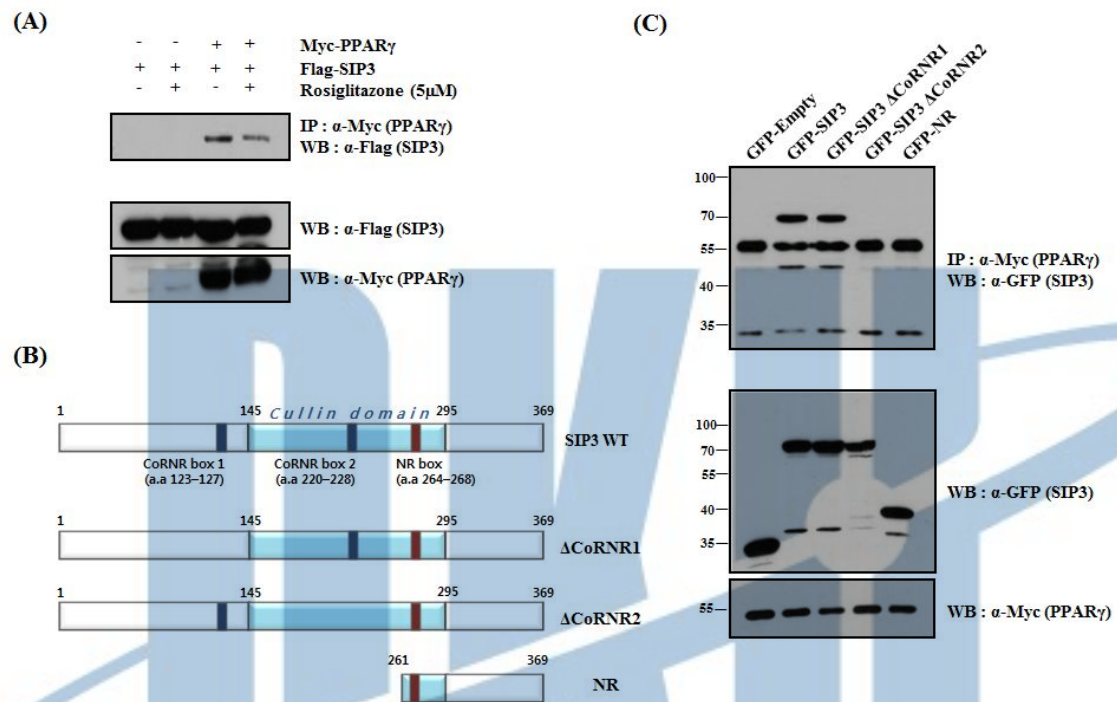
앞선 luciferase reporter assay결과를 통해, SAP1이 SIP3, SIRT1과 함께 상호 협력적으로 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제함을 확인하였다. 지방전구 세포인 3T3-L1에서도 SAP1이 지방세포 분화 억제에도 영향을 주는지 확인하기 위해, 3T3-L1에 Flag-Empty, Flag-SAP1을 transfection하여 selection을 거쳐 stable cell을 제작 및 western blot으로 확인하였다(Figure 9A). Rosiglitazone을 처리하여 8일간 지방세포 분화를 유도한 뒤, Oil-red-O staining을 통하여 지방분화를 확인하였다. SAP1이 발현 된 세포에서는 지방세포 분화가 거의 유도되지 않은 것을 확인 할 수 있었다(Figure 9B). 지방세포 분화억제가 SAP1에 의한 PPAR $\gamma$  전사활성 억제에 의한 결과임을 확인하기 위해 PPAR $\gamma$  target gene인 AP2와 LPL의 발현을 real time PCR을 통해 확인하였다. Figure 9C에서 보이는 바와 같이 SAP1이 발현 된 세포에서 PPAR $\gamma$ 의 target gene인 AP2와 LPL의 mRNA발현이 감소되었음을 확인하였다. 이를 통해 SAP1이 SIP3, SIRT1과 마찬가지로 PPAR $\gamma$ 의 target gene 발현을 억제하여 3T3-L1의 지방분화를 억제함을 증명하였다.



## 10. SAP1 억제에 의한 PPAR $\gamma$ 에 의해 유도되는 3T3-L1의 지방세포 분화 촉진

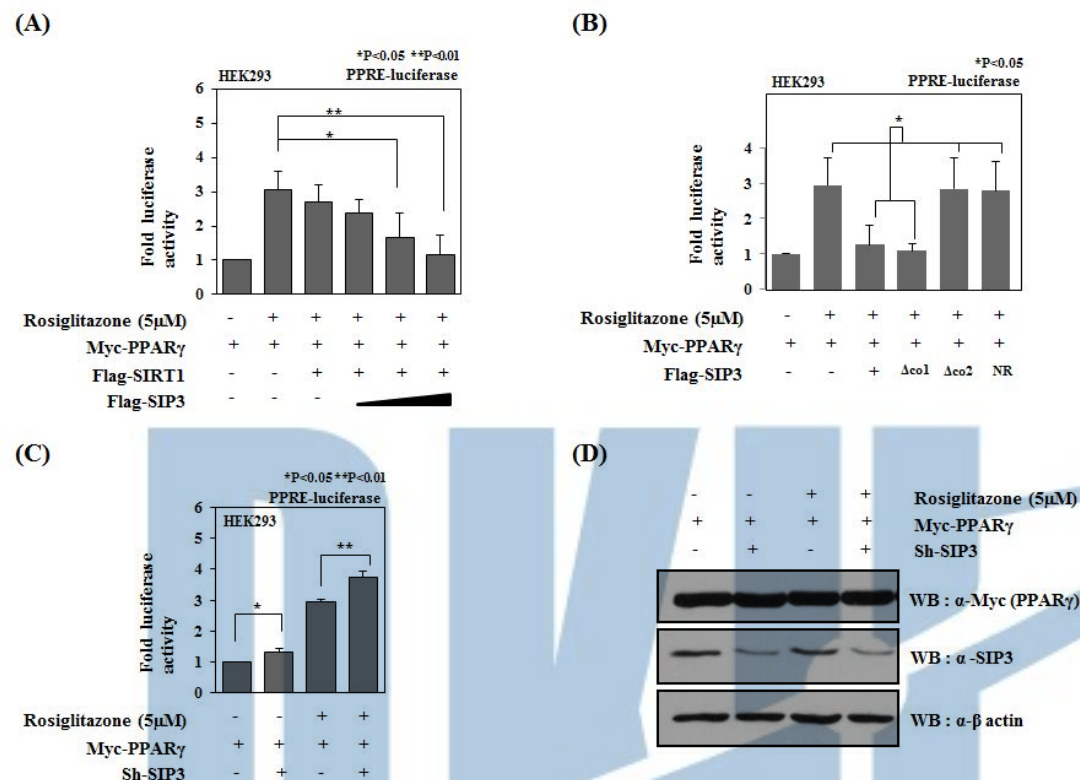
지방전구세포인 3T3-L1 세포에서 SAP1을 knock down시켰을 때 지방세포 분화 및 PPAR $\gamma$ 의 전사활성의 조절을 확인하기 위해, stable cell을 제작 및 western blot으로 발현 확인을 하였다(Figure 10A). 제작한 stable cell을 rosiglitazone을 처리하여 8일간 지방세포 분화를 유도한 뒤, Oil-red-O staining을 통하여 지방분화를 확인하였다. SAP1이 knock down 된 세포에서는 지방세포 분화가 대조군에 비해 더 많이 일어난 것을 확인 할 수 있었다(Figure 10B). 지방세포 분화증가가 SAP1의 knock down에 의한 PPAR $\gamma$  전사활성 증가에 의한 결과임을 확인하기 위해 PPAR $\gamma$  target gene인 AP2와 LPL의 발현을 real time PCR을 통해 확인하였다. Figure 10C 에서 보이는 바와 같이 SAP1이 knock down 된 세포에서 PPAR $\gamma$ 의 target gene인 AP2와 LPL의 mRNA발현이 증가되었음을 확인하였다. 이를 통해 SAP1 이 지방 전구 세포인 3T3-L1에서 지방분화를 억제하고, PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하는 전사인자라는 것을 확인하였다.

## IV. 그 림

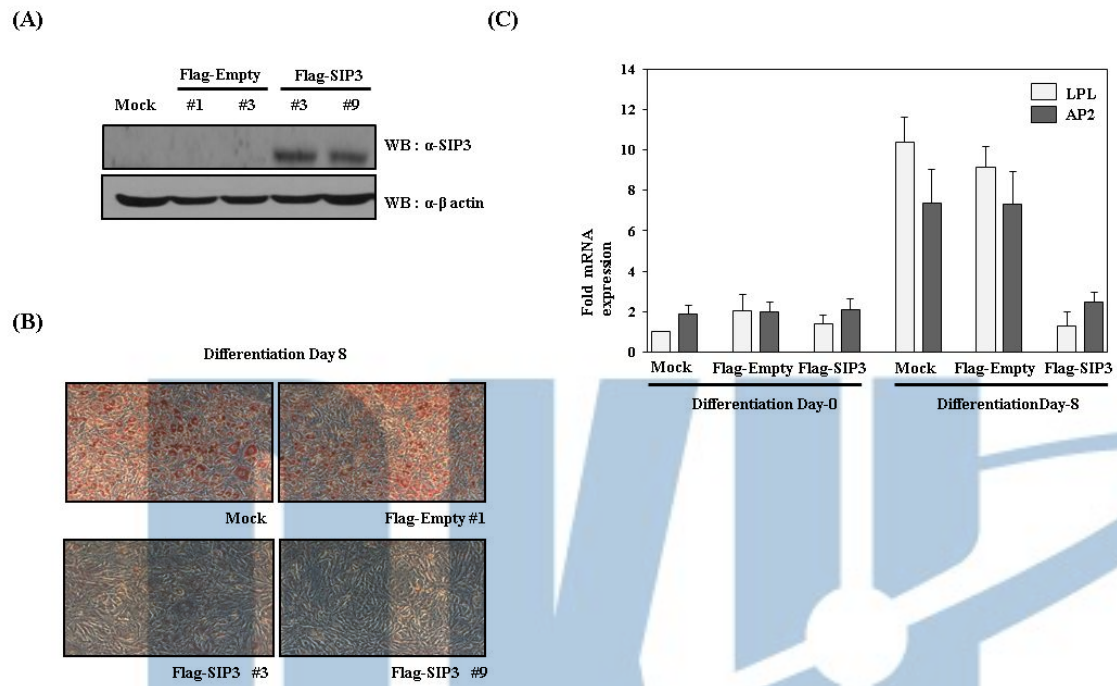


**Figure 1. SIP3 interacts with PPARγ *in vivo***

(A) Interactions between SIP3 and PPARγ *in vivo*. HEK293 cells were transfected with either Myc-Empty or Myc-PPARγ and Flag-SIP3. After then, cells were incubated in the absence or presence of 5μM Rosiglitazone. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Myc and Flag-SIP3 was observed by western blot with anti-Flag. (B) SIP3 and deletion mutants of SIP3 schematic structure. (C) Domain mapping IP between PPARγ and SIP3 deletion mutants. CoRNR box2 of SIP3 is required for interaction of SIP3 and PPARγ *in vivo*. HEK293 cells were transfected with Myc-PPARγ and GFP-SIP3 or GFP tagged SIP3 deletion mutants. IP was carried out with anti-Myc. Both of SIP3 full length and SIP3 ΔCoRNR1 deletion mutant were observed with anti-GFP by western blot.



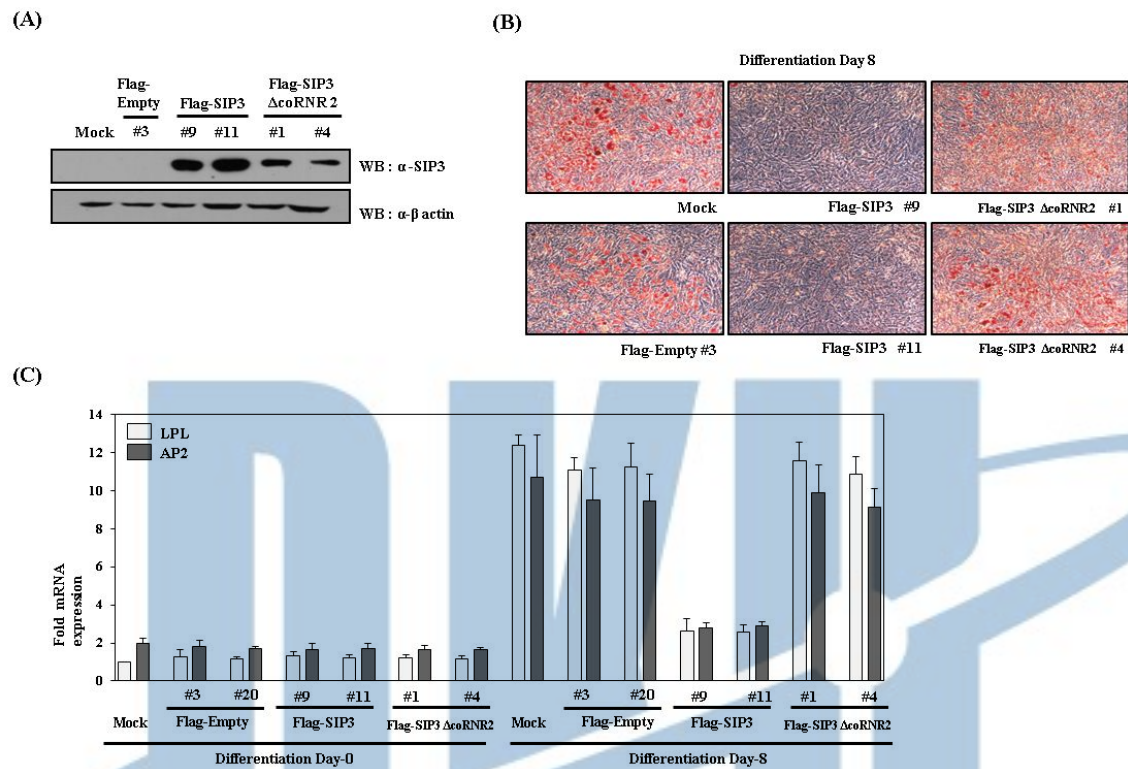
**Figure 2. SIP3 represses PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity by cooperating with SIRT1** (A) SIP3 repressed PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity on PPRE (PPAR response element) cooperating with SIRT1 in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SIRT1 and Flag-SIP3 in absence or presence of 5μM rosiglitazone. Relative luciferase activity is normalized with the observed  $\beta$ -galactosidase activity. (B) CoRNR box2 of SIP3 is required for the repression of the PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity. HEK293 cells were transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SIP3 full length and deletion mutants of SIP3. (C) Knock-down of SIP3 increases PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity. HEK293 cells were transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , pSilencer-SIP3 in absence or presence of 5μM rosiglitazone. (D) Expression of Myc-PPAR $\gamma$  and SIP3 in HEK293 cell from Figure 2C. The  $\beta$  actin was shown as internal control.



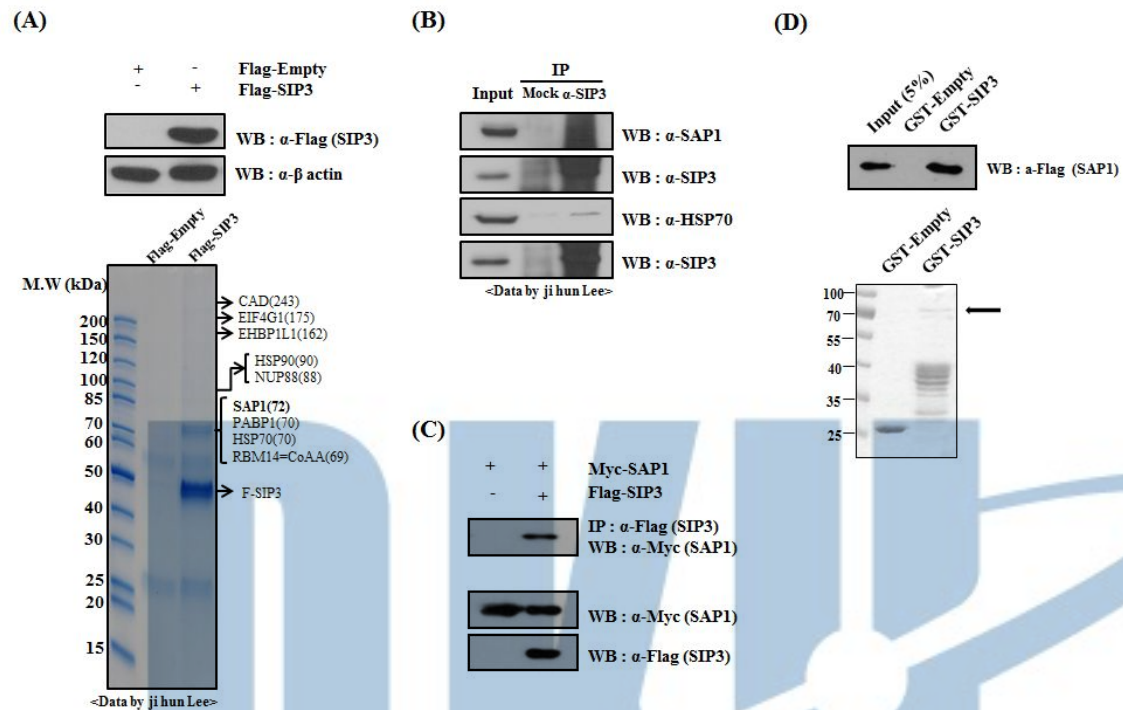
**Figure 3. SIP3 suppresses PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis in 3T3-L1 cells**

(A) Expression of stably expressed Flag-Empty and Flag-SIP3 in 3T3-L1 stable cells by western blot. (B) Stable over-expression of SIP3 in 3T3-L1 suppressed PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis. Lipid vacuoles were stained by Oil-red-O staining after differentiation of 3T3-L1 cells for 8 days. (C) Repression effects of Flag-SIP3 over-expression on the mRNA expression level of PPAR $\gamma$  target genes, AP2 (adipocyte protein2) and LPL (lipoprotein lipase) in 3T3-L1 Flag-SIP3 stable cell line. Total RNA samples were extracted from both differentiated and non-differentiated 3T3-L1 stable cell lines.



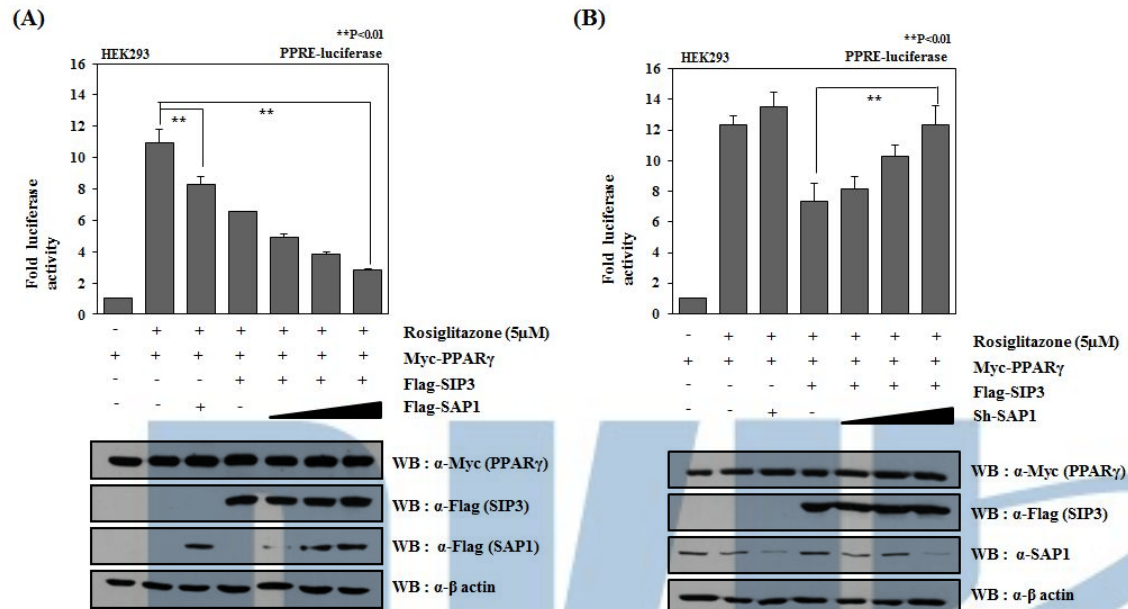


**Figure 4. CoRNR box2 is important for repressive activity of SIP3 on PPAR $\gamma$ - mediated adipogenesis** (A) Expression of stably expressed Flag-Empty, Flag-SIP3 and Flag-SIP3  $\Delta$  CoRNR2 (CoRNR box2 deletion mutant) in 3T3-L1 stable cells by western blot. (B) CoRNR box2 of SIP3 repressed PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis in 3T3-L1. Lipid vacuoles were stained by Oil-red-O staining after differentiation of 3T3-L1 cells for 8 days. (C)  $\Delta$  CoRNR box2 mutant didn't repress PPAR $\gamma$  target gene (AP2, LPL) in 3T3-L1 stable cell line.



**Figure 5. Identification of SAP1 as a new interacting protein of SIP3**

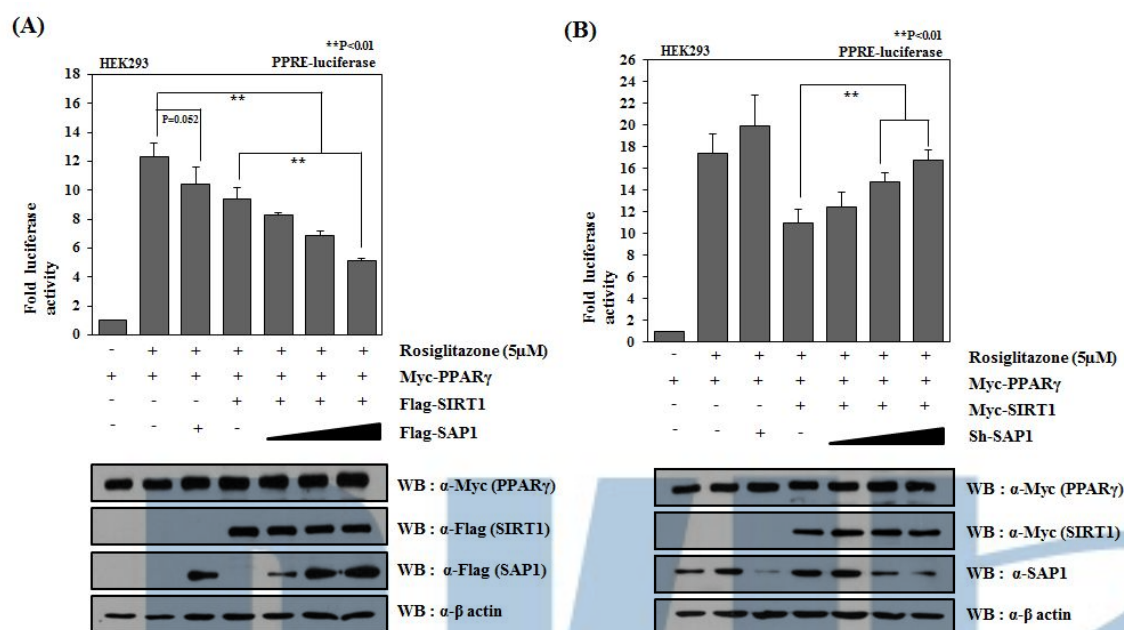
(A) Complex purification of Flag-SIP3 in HEK293 cells. HEK293 cells were transfected with Flag-Empty or Flag-SIP3. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag. A mass spectrometric analysis of the Flag-SIP3 complex identified SAP1 and other proteins. Results from JH LEE. (B) To confirm the interaction of SIP3 and proteins from complex purification *in vivo*, IP were carried out with anti-SIP3 in HEK293 cells. SIP3 interacted with SAP1 in HEK293 cells. The HSP70 was shown as IP control from Figure 5A complex purification. Figure A and B were carried out from Jihun, L. (C) Interactions between SIP3 and SAP1 *in vivo*. HEK293 cells were transfected with Myc-SAP1 and either Flag-Empty or Flag-SIP3. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Flag and Myc-SIP3 was observed by western blot with anti-Myc. (D) Direct interaction between SIP3 and SAP1 *in vitro*. For GST-pull down assay, GST-Empty and GST-SIP3 were incubated with *in vitro* translated Flag-SAP1.



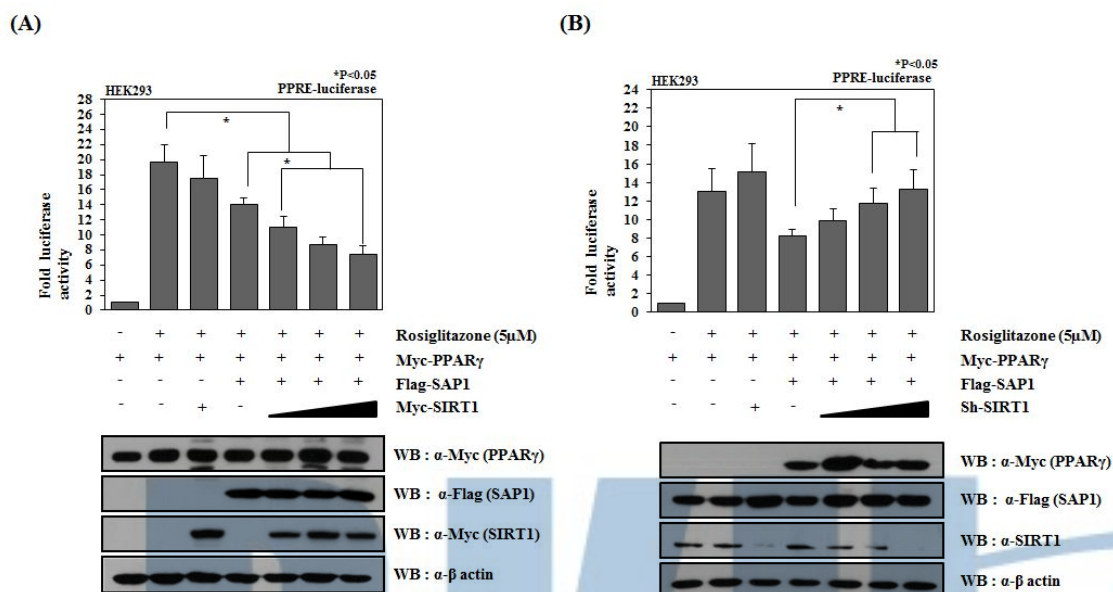
**Figure 6. SAP1 represses PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity by cooperating with SIP3**

(A) SAP1 cooperating with SIP3 repressed PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity on PPRE in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SIP3 and Flag-SAP1 in absence or presence of 5 $\mu$ M rosiglitazone. Relative luciferase activity is normalized with the observed  $\beta$ -galactosidase activity. Western blot data indicated the expression of Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SIP3 and Flag-SAP1 in HEK293 cell from the luciferase reporter assay represented above. The  $\beta$  actin was shown as internal control.

(B) Knock down of SAP1 increased PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity on PPRE in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SIP3 and pSilencer-SAP1 in absence or presence of 5 $\mu$ M rosiglitazone. Relative luciferase activity is normalized with the observed  $\beta$ -galactosidase activity. WB indicated the expression of Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SIP3 and knock down of SAP1 in HEK293 cell from above relative luciferase assay. The  $\beta$  actin was shown as internal control.

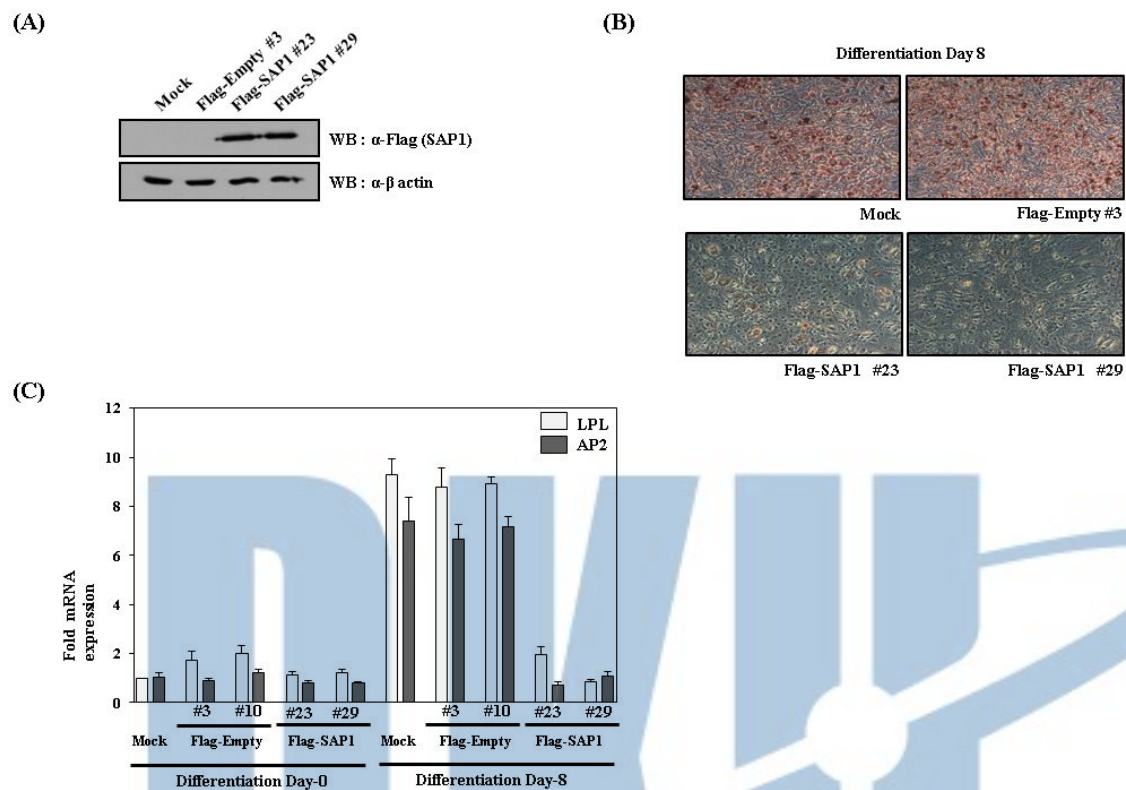


**Figure 7. SAP1 represses PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity through cooperating with SIRT1** (A) SAP1 cooperating with SIRT1 repressed PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity on PPRE in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SIRT1 and Flag-SAP1 in absence or presence of 5 $\mu$ M rosiglitazone. Relative luciferase activity is normalized with the observed  $\beta$ -galactosidase activity. Western blot data indicated the expression of Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SIRT1 and Flag-SAP1 in HEK293 cell from above relative luciferase assay. The  $\beta$  actin was shown as internal control. (B) Knock down of SAP1 increased PPAR $\gamma$  -mediated transcriptional activity on PPRE in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , Myc-SIRT1 and pSilencer-SAP1 in absence or presence of 5 $\mu$ M rosiglitazone. Relative luciferase activity is normalized with the observed  $\beta$ -galactosidase activity. WB indicated the expression of Myc-PPAR $\gamma$ , Myc-SIRT1 and knock down of SAP1 in HEK293 cell from above relative luciferase assay. The  $\beta$  actin was shown as internal control.



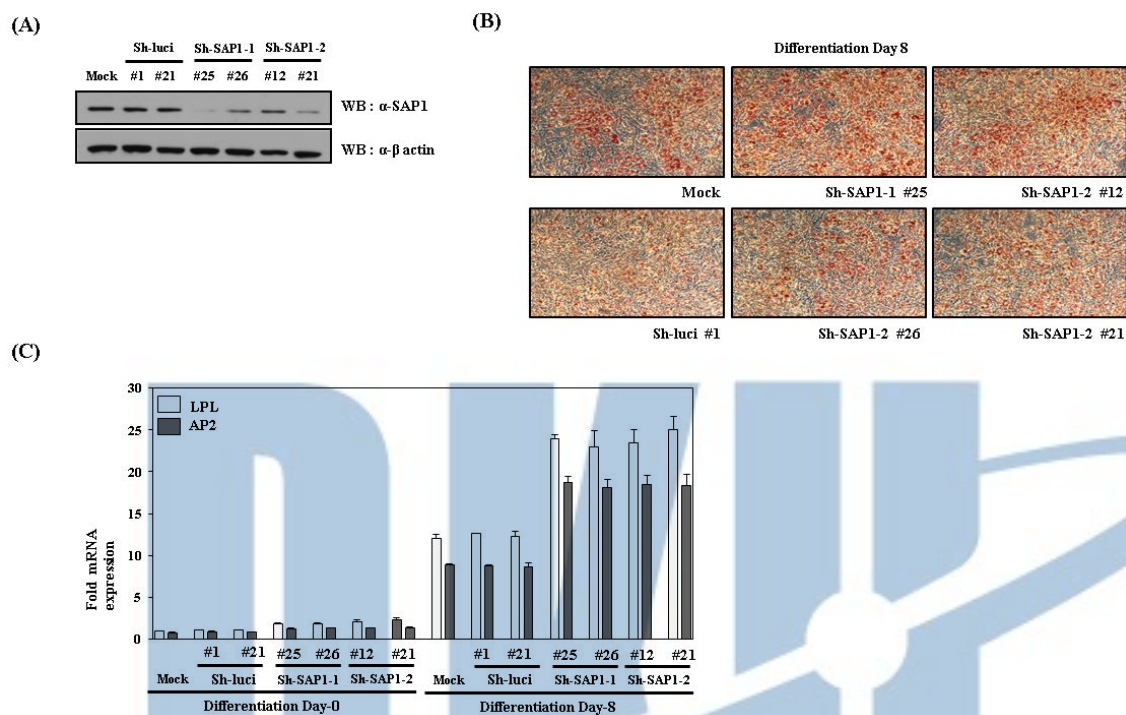
**Figure 8. SIRT1 suppresses PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity by cooperating with SAP1** (A) Increasing amounts of SIRT1 coopting with SAP1 suppressed PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity on PPRE in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , Myc-SIRT1 and Flag-SAP1 in absence or presence of 5 $\mu$ M rosiglitazone. Relative luciferase activity is normalized with the observed  $\beta$ -galactosidase activity. Western blot data indicated the expression of Myc-PPAR $\gamma$ , Myc-SIRT1 and Flag-SAP1 in HEK293 cell from above relative luciferase assay. The  $\beta$  actin was shown as internal control. (B) Knock down of SIRT1 increased PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity on PPRE in HEK293 cells. HEK293 cells were transiently transfected with Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SAP1 and pSilencer-SIRT1 in absence or presence of 5 $\mu$ M rosiglitazone. Relative luciferase activity is normalized with the observed  $\beta$ -galactosidase activity. WB indicated the expression of Myc-PPAR $\gamma$ , Flag-SAP1 and knock down of SIRT1 in HEK293 cell from above relative luciferase assay. The  $\beta$  actin was shown as internal control.





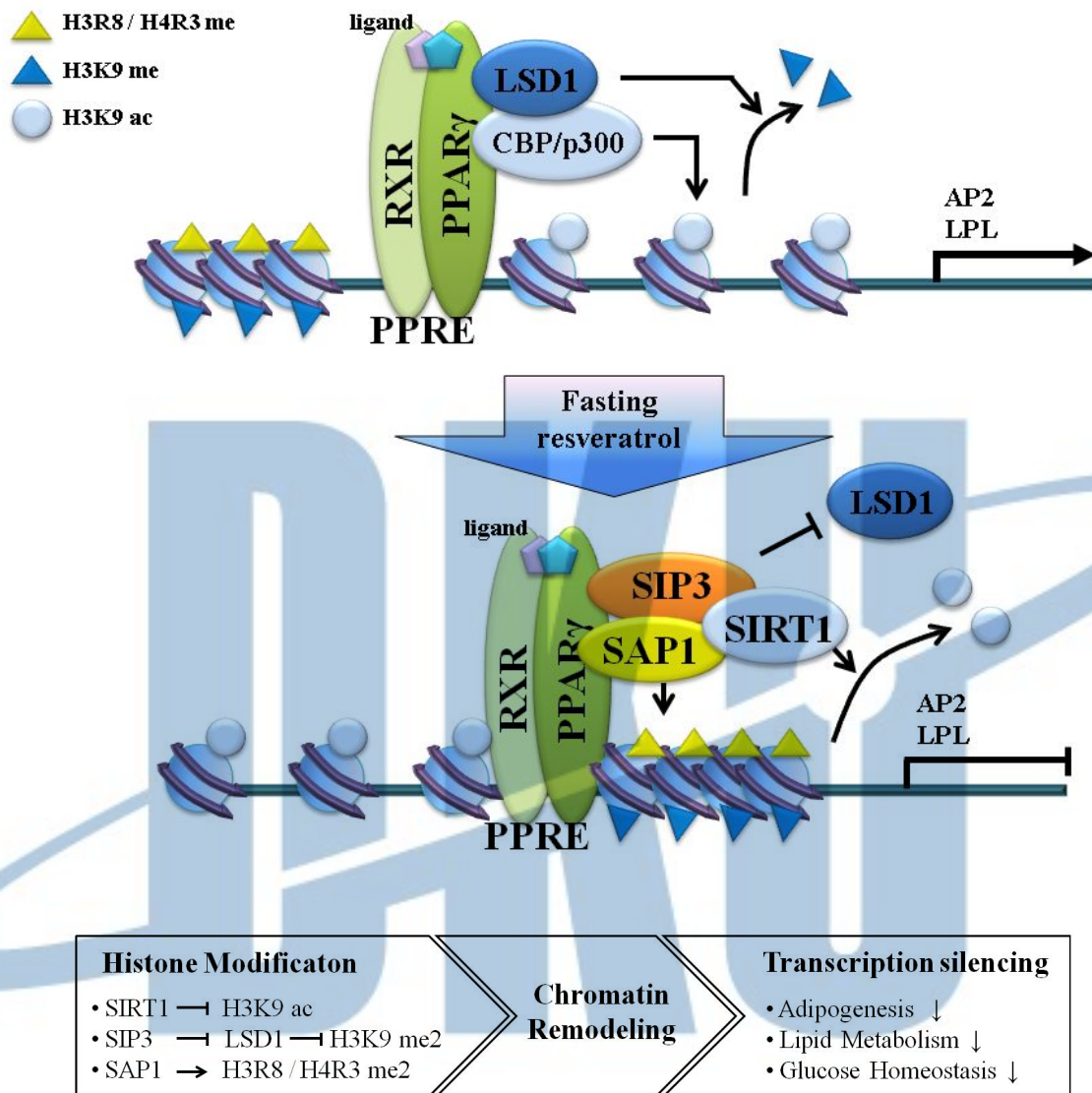
**Figure 9. SAP1 suppresses PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis in 3T3-L1 cells**

(A) Expression of stably expressed Flag-Empty and Flag-SAP1 in 3T3-L1 stable cells by western blot. (B) Stable over-expression of SAP1 in 3T3-L1 suppressed PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis. Lipid vacuoles were stained by Oil-red-O staining after differentiation for 8 days. (C) Suppression effects of Flag-SAP1 over-expression on the mRNA expression level of PPAR $\gamma$  target gene (AP2 and LPL) in 3T3-L1 Flag-SAP1 stable cell line. Total RNA samples were extracted from both differentiated and non-differentiated 3T3-L1 stable cell lines.



**Figure 10. Knock down of SAP1 promotes PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis in 3T3-L1 cells**

(A) Stably expressed shRNA of Sh-Luci, Sh-SAP1 in 3T3-L1 stable cells by western blot.  
 (B) Stably expression shRNA of sh-SAP1 repressed PPAR $\gamma$ -mediated adipogenesis in 3T3-L1. Lipid vacuoles were stained by Oil-red-O staining after differentiation for 8 days.  
 (C) Knock down of SAP1 increased mRNA expression level of PPAR $\gamma$  target gene (AP2 and LPL) in 3T3-L1 Flag-SAP1 stable cell lines.



**Figure 11.** The schematic models for the epigenetic regulation of PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity by SIP3, SIRT1 and SAP1 complex. The schematic models for the epigenetic regulation of PPAR $\gamma$ -mediated transcriptional activity by SIP3, SIRT1 and SAP1 complex.



## V. 고 찰

서구화 되는 식습관과 운동부족 등으로 야기되는 비만은 전 세계적으로 대두되는 심각한 문제이다. 비만은 체내에서 고혈압, 고지혈증, 제 2형 당뇨병 등 심각한 대사질환 및 근 골격계 질환 등 만성질환을 야기하는 요인으로 많은 연구를 통해 그 위험성이 알려져 있다(1). 이에 대한 사회적, 의료적 문제는 점점 관심이 높아져, 비만을 정복하기 위한 천문학적 자본의 투자 및 많은 연구가 수행되고 있다. 여러 선진국을 또한 비만해결의 원천기술 및 치료제 특허 선점에 많은 노력을 기울이고 있지만, 여전히 비만의 분자생물학적 신호 전달 규명 및 치료제 개발에 많은 연구가 필요하고, 그 해답을 찾는 기초연구 및 기술 개발에 노력을 기울여야 할 때이다. SIRT1은 비만의 해결에 있어서 중요한 타겟으로 많은 연구를 통해 그 중요성이 입증된 핵심 조절자이다. 특히, co-repressor를 유도하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하고(4), 비만을 억제하는 갈색 지방세포(BAT) 관련 유전자를 활성화하는 기능이 최근에 알려짐으로 비만 조절에서의 그 중요성이 부각되고 있다(9).

본 논문은 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하는 SIRT1의 새로운 결합 단백질인 SIP3가 co-repressor로서 SIRT1과 함께 상호 협력하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제함을 확인하였고, SIP3의 발현이 지방전구세포인 3T3-L1의 지방세포 분화를 억제함을 증명하였다. 특히 SIP3의 CoRNR box2가 SIP3와 PPAR $\gamma$ 의 결합 및 전사활성 억제 뿐만 아니라 지방세포 분화에도 핵심적인 역할을 하는 것을 증명하였다. 또한 선행 논문을 통해 SIP3가 CoRNR box를 통하여 RAR $\alpha$ , ER $\alpha$ 등과 결합하여 co-repressor로서 전사활성을 억제할 수 있다는 것을 증명하였고(10,13), 이를 바탕으로 본 논문을 통해 SIP3는 SIRT1의 핵심적인 complex로서 SIRT1과 함께 다른 핵 수용체의 기능조절을 할 수 있다는 가능성을 제시하였다. 이를 뒷받침할 분자적 기작연구를 수행하기 위해, SIP3와의 complex purification을 수행하여 전사활성 조절자로 알려진 SAP1을 동정하였다. SAP1은 메틸화 효소로서 히스톤이나 단백질의 메틸화를 통해 전사활성 억제, 세포 성장 및 분화 조절 등 세포 내 신호조절에 중요한 기능을 가지고 있다고 알려져 있다(15-25). 하지만 여전히 그 기능이 많이 알려져 있지 않은 전사 조절자로서 지방세포 내 그 기능은 알려져 있지 않다.

본 논문에서는 SAP1이 SIP3, SIRT1과 함께 협력하여 지방전구 세포인 3T3-L1 내 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제함을 확인하였고, SAP1과 SIP3가 지방세포 분화를 억제함을 증명하였다. 앞선 선행 논문들과 본 논문의 연구 결과를 바탕으로, SAP1이 SIP3와 함께 결합하여 SIRT1과 상호 협력적으로 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 억제하는 전사조절 모델을 제시할 수 있었다.

PPAR $\gamma$ 의 전사활성은 CBP/p300과 같은 아세틸화 효소들이 co-activator로서 유도되어 전사활성을 촉진하게 된다(26,27). 이때 SIRT1은 탈 아세틸화 효소로서 fasting이나 resveratrol 등에 의해 활성화 되면, 프로모터의 H3K9의 탈 아세틸화를 유도하여 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을

억제 할 수 있다는 가능성을 제시 할 수 있다. 이와 더불어 SIRT1과 직접적으로 결합하고, 상호 협력적으로 PPAR $\gamma$ 의 전사활성을 조절하는 것이 확인된 SIP3를 본 모델을 통해 전사억제의 가능성을 제시할 수 있다. 그 근거로서 SIP3가 ER $\alpha$ 와 탈메틸화 효소인 LSD1의 결합을 억제하여 히스톤 H3K9 me2제거를 통해 전사활성을 억제함이 보고되어 있어(13), 이를 통해 SIP3가 PPAR $\gamma$ 와 LSD1의 결합을 억제하여 전사활성을 조절할 수 있는 가능성을 제시할 수 있다. 마지막으로 SIRT1, SIP3와 함께 상호 협력적으로 PPAR $\gamma$ 의 전사를 억제하는 기능을 가지는 것으로 확인한 SAP1 또한 히스톤 H3R8/H4R3를 메틸화 하여 전사를 억제 한다는 것이 알려져 있다(15,17). 이를 근거로 SAP1 또한 PPAR $\gamma$ 에서 히스톤 메틸화를 통한 전사 억제에 대한 가능성을 제시 할 수 있다.

SIP3, SIRT1, SAP1이 상호 협력적으로 히스톤 변형을 통해 크로마틴의 응축을 유도하여 전사인자 등이 작용하지 못하게 막아, PPAR $\gamma$ 의 전사를 억제하는 후성유전학적 전사 억제 기전을 새롭게 제시 하였다. 이를 통해, 비만상태로 인한 지방산 증가 등 자연상태의 ligand가 증가된 상태나 TZD에 의한 치료적 시도로 인한 PPAR $\gamma$ 활성화 증가에 있어서, fasting이나 resveratrol을 통한 SIRT1의 활성화를 유도할 경우 ligand의 존재여부와 상관없이, 전사활성을 억제 할 수 있는 기전을 본 모델을 통해 제시 하였다. 현재 정확한 SIP3, SIRT1, SAP1 complex의 PPAR $\gamma$ 전사 활성 억제 기전을 확인하기 위해 fasting 및 resveratrol 처리 후 지방세포 분화 조절, Chromatin IP 등 다양한 실험을 추가적으로 수행 중 이다. 또한 SAP1의 메틸화 기능이 전사활성 조절 및 지방분화 억제에 있어 핵심기능인지를 확인하기 위해 SAP1의 메틸기 전달효소 부위를 mutation시킨 methyl-dead mutant를 제작하여 luciferase reporter assay를 통한 전사활성 조절확인 및 3T3-L1 stable cell 제작 및 분화를 통한 지방세포 분화 확인을 수행 중 이다.

본 논문을 통해, SIP3를 통하여 SAP1, SIRT1에 의한 지방전구세포인 3T3-L1내의 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제 및 지방분화 조절을 증명하였고, SIP3, SAP1과 SIRT1의 상호 협력적 PPAR $\gamma$ 의 전사활성 억제에 대한 새로운 후성 유전학적 분자 기전을 제시함으로써 전 세계적으로 문제가 되고 있는 비만을 조절하고 억제할 수 있는 방법 연구에 가능성을 제시하여 비만조절의 이해에 대한 학문적 기반을 넓히는데 이바지 할 수 있을 것이다.

## 참고문헌

- (1) Kopelman, PG. (2000) Obesity as a medical problem. *Nature*. 404(6778): 635-643.
- (2) Li, Y., Qi, Y., Huang, TH., Yamahara, J., and Roufogalis, BD. (2008) Promegranate flower : a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR  $\alpha/\gamma$  activator properties. *Diabetes Obes. Metab.* 10(1): 10-17.
- (3) Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., and Evans, RM. (2001) PPAR- $\gamma$  dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation. *Nat. Med.* 7(1): 48-52.
- (4) Picard, F., Kurtev, M., Chung, N., Topark-Ngarm, A., Senawong, T., Machado De Oliveira, R., Leid, M., McBurney, MW., and Guarente, L. (2004) Sirt1 promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature*. 429(6993): 771-776.
- (5) Chalkiadaki, A., and Guarente, L. (2012) High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab.* 16(2): 180-188.
- (6) Baur, JA., Pearson, KJ., Price, NL., Jamieson, HA., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, VV., Allard, JS., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, PJ., Poosala, S., Becker, KG., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, KW., Spencer, RG., Lakatta, EG., Le Couteur, D., Shaw, RJ., Navas, P., Puigserver, P., Ingram, DK., de Cabo, R., and Sinclair, DA. (2006) Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*. 444(7117): 337-342.
- (7) Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeg, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., Geny, B., Laakso, M., Puigserver, P., and Auwerx, J. (2006) Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1 $\alpha$ . *Cell*. 127(6): 1109-1122.
- (8) Milne, JC., Lambert, PD., Schenk, S., Carney, DP., Smith, JJ., Gagne, DJ., Jin, L., Boss, O., Perni, Rb., Vu, CB., Bemis, JE., Xie, R., Disch, JS., Ng, PY., Nunes, JJ., Lynch, AV., Yang, H., Galonek, H., Israelian, K., Choy, W., Iffland, A., Lavu, S., Medvedik, O., Sinclair, DA., Olefsky, JM., Jirousek, MR., Elliott, PJ., and Westphal, CH. (2007) Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature*. 450(7170): 712-716.
- (9) Qiang, L., Wang, L., Kon, N., Zhao, W., Lee, S., Zhang, Y., Rosenbaum, M., Zhao, Y., Gu, W., Farmer, SR., and Accili, D. (2012) Brown remodeling of white

- adipose tissue by SirT1-dependent deacetylation of Ppar $\gamma$ . *Cell*. 150(3): 620-632.
- (10) Moon, M., Um, S.J., and Kim, E.J. (2012) CAC1 negatively regulates RAR $\alpha$  activity through cooperation with HDAC. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 427(1): 41-46.
- (11) Hu, X., and Lazar, M.A. (1999) The coRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors. *Nature*. 402(6757): 93-96.
- (12) Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997) A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*. 387(6634): 733-736.
- (13) Kim, J., Park, U.H., Moon, M., Um, S.J., and Kim, E.J. (2013) Negative regulation of ER $\alpha$  by a novel protein CAC1 through association with histone demethylase LSD1. *FEBS letters*. 587(1): 17-22.
- (14) Branscomebe, T.L., Frankel, A., Lee, J.H., Cook, J.R., Yang, Z., Pestka, S., and Clarke, S. (2001) PRMT5 (janus kinase-binding protein 1) catalyzes the formation of symmetric dimethylarginine residues in proteins. *J. Biol. Chem.* 276(35): 32971-32976.
- (15) Fabbrizio, E., El Messaoudi, S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J.R., Lee, J.H., Negre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A., and Sardet, C. (2002) Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep.* 3(7): 641-645.
- (16) Karkhanis, V., Hu, Y.J., Baiocchi, R.A., Imbalzano, A.N., and Sif, S. (2011) Versatility of PRMT5-induced methylation in growth control and development. *Trends in Biochem. Sci.* 36(12): 633-641.
- (17) Pal, S., Vishwanath, S.N., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sif, S. (2004) Human SWI/SNF-associated PRMT5 methylates histone H3 arginine 8 and negatively regulates expression of ST7 and NM23 tumor suppressor genes. *Mol. Cell Biol.* 24(21): 9630-9645.
- (18) Feng, Y., Wang, J., Asher, S., Hoang, L., Guardiani, C., Ivanov, I., and Zheng, Y.G. (2011) Histone H4 acetylation differentially modulates arginine methylation by an in Cis mechanism. *J. Biol. Chem.* 286(23): 20323-20334.
- (19) Guo, Z., Zheng, L., Xu, H., Dai, H., Zhou, M., Pascua, M.R., Chen, Q.M., and Shen, B. (2010) Methylation of FEN1 suppresses nearby phosphorylation and facilitates PCNA binding. *Nat. Chem. Biol.* 6(10): 766-773.



- (20) Hou, Z., Peng, H., Avyanathan, K., Yan, KP., Langer, EM., Longmore, GD., and Rauscher, FJ. (2008) The LIM protein AJUBA recruits protein arginine methyltransferase5 to mediate SNAIL-dependent transcriptional repression. *Mol. Cell Biol.* 28(10): 3198-3207.
- (21) Bandyopadhyay, S., Harris, DP., Adams, GN., Lause, GE., McHugh, A., Tillmaand, EG., Money, A., Willard, B., Fox, PL., and Dicorleto, PE. (2012) HOXA9 methylation by PRMT5 is essential for endothelial cell expressionof leukocyte adhesion molecules. *Mol. Cell Biol.* 32(7): 1202-1213.
- (22) Powers, MA., Fay, MM., Factor, RE., Welm, AL., and Ullman, KS. (2011) Protein arginine methyltransferase5 accelerates tumor growth by arginine methylation of the tumor suppressor programmed cell death4. *Cancer Res.* 71(16): 5579-5587.
- (23) He, W., Ma, X., Yang, X., Zhao, y., Qiu, J., and Hang, H. (2011) A role for the arginine methylation of Rad9 in checkpoint control and cellular sensitivity to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 39(11): 4719-4727.
- (24) Cho, EC., Zheng, S., Munro, S., Liu, G., Carr, SM., Moehlenbrink, J., Lu, YC., Stimson, L., Khan, O., Konietzny, R., McGouran, J., Coutts, AS., Kessler, B., Kerr, DJ., and La Thangue, NB. (2012) Arginine methylation controls growth regulation by E2F-1. *EMBO J.* 31(7): 1785-1797.
- (25) Jansson, M., Durant, ST., Cho, EC., Sheahan, S., Edelman, M., Kessler, B., and La Thangue, NB. (2008) Arginine methylation regulates the p53 response. *Nat. Cell Biol.* 10(12): 1431-1439.
- (26) Chakrabarti, D., LaMorte, VJ., Nelson, MC., Nakajima, T., Schulman, IG., Juquilon, H., Montminy, M., and Evans, RM. (1996) Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature.* 383(6595): 99-103.
- (27) Puigserver, P., Adelmant, G., Wu, Z., Fan, M., Xu, J., O'Malley, B., and Spiegelman, BM. (1999) Activation of PPARgamma coactivator-1 through transcription factor docking. *Science.* 286(5443): 1368-1371.

(Abstract)

## The effects of PPAR gamma interacting proteins on regulation of adipogenesis

Jang Min Jun

Department of Molecular biology  
Graduate School

Advisor : Professor Kim Eun Joo

Obesity is a world-wide problem that is the cause of numerous metabolic diseases such as hypertension, type 2 diabetes, and arteriosclerosis. Many researchers and pharmaceutical companies have been devoting a lot of effort to unravel the secrets of obesity and develop therapeutics.

One of the most well-known transcription factor in regulating obesity is peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ). PPAR $\gamma$  is a nuclear hormone receptor, mainly expressed in adipocytes and regulates lipid and glucose metabolism. According to recent studies, SIRT1 NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase, inhibits obesity through the repression of PPAR $\gamma$  -mediated transcription activity and adipogenesis.

Here, we demonstrated that SIP3, a novel protein interacting with SIRT1, repressed PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity and adipogenesis through the cooperating with SIRT1 in 3T3-L1 cells. In addition, CoRNR box2 of SIP3 played a critical role in the interaction between SIP3 and PPAR $\gamma$ , and its function as a co-repressor of PPAR $\gamma$ .

Moreover, we identified SAP1 as a new interacting partner with SIP3 by complex

purification. SAP1 is known for one of the methyl-transferase enzymes that regulates transcription activity through di-methylation of histones or other substrates. we demonstrated that SAP1 repressed PPAR $\gamma$ -mediated transcription activity and differentiation by cooperating with SIP3 and SIRT1 in 3T3-L1 cells.

In this paper, we presented that SIRT1-mediated regulation of PPAR $\gamma$  activity though cooperating with SIP3 and SAP1. These results suggested that the SAP1-SIP3-SIRT1 complex has a new functional roles in regulation of not only obesity but also other nuclear receptors.

