

功能蛋白O-GlcNAc糖基化修饰调控 绒毛膜癌细胞的转移

屈茹楠 琚娜娜 吴明军 赵德璋 王应雄 杨 竹 于 超*

(重庆医科大学生命科学研究院, 重庆 400016)

摘要 为研究氧连接N-乙酰葡萄糖胺(O-linked N-acetylglucosamine, O-GlcNAc)糖基化修饰调控人绒毛膜癌细胞(JAR)迁移的分子机制, 首先采用siRNA和酶特异性抑制剂作用细胞, 构建O-GlcNAc修饰总蛋白低表达和高表达的细胞模型; 利用Transwell方法及黏附实验比较细胞迁移及与血管内皮细胞黏附能力的变化; 并通过免疫共沉淀技术检测重要的功能蛋白 β -catenin的O-GlcNAc程度, 从而分析蛋白转录翻译后调控对肿瘤细胞迁移影响的分子机制。结果表明, 增加JAR细胞中O-GlcNAc修饰水平可促进细胞迁移及与血管内皮细胞的黏附活性, 且O-GlcNAc修饰作用的靶蛋白 β -catenin的糖基化水平也显著增加。当下调细胞中O-GlcNAc蛋白修饰水平, 其迁移及黏附能力随之下降。表明O-GlcNAc修饰参与了绒毛膜癌细胞转移的调控。

关键词 O-GlcNAc; 绒毛膜癌; 细胞迁移; 黏附; β -catenin

O-GlcNAcylation of Functional Protein Regulates Human Choriocarcinoma Cells Migration

Qu Runan, Ju Nana, Wu Mingjun, Zhao Dezhang, Wang Yingxiong, Yang Zhu, Yu Chao*

(Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract To investigate the molecular mechanisms involved in human choriocarcinoma cells (JAR) migration regulated by O-GlcNAc glycosylation, cell models expressing different O-GlcNAcylation levels were established by siRNA interference or OGA inhibitor. Transwell assay and adhesion assay were used to examine JAR cell migration ability and adhesion to EA.hy926 cells. Meanwhile, the O-GlcNAcylation level of β -catenin was detected by immunoprecipitation. The results indicated O-GlcNAcylation enhances the JAR cell migration and adhesion to endothelial cells *in vitro*. Moreover, the O-GlcNAcylation of β -catenin but not the protein level increased apparently. The migration and adhesion ability were obviously declined in JAR cells with O-GlcNAcylation down-regulation. These findings suggest that O-GlcNAcylation is involved in the regulation of tumor cell migration.

Key words O-GlcNAc; choriocarcinoma cells; cell migration; cell adhesion; β -catenin

肿瘤转移是一个复杂的多因素、多步骤过程, 一直是恶性肿瘤患者致死的关键因素之一, 影响肿瘤转移的分子机制尚没有阐明。研究表明, 当细胞

癌变时, 其表面蛋白的糖基化会发生一系列的改变; 而临床证据也显示, 一些蛋白糖基化修饰与肿瘤的不良预后密切相关, 并且蛋白质糖基化程度及糖链

收稿日期: 2013-01-14 接受日期: 2013-04-11

国家自然科学基金(批准号: 81070222)和重庆市自然科学基金(批准号: CSTC2009BA5083)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-68485589, E-mail: yuchaom@163.com

Received: January 14, 2013 Accepted: April 11, 2013

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81070222) and the Natural Science Foundation of Chongqing (Grant No.CSTC2009BA5083)

*Corresponding author. Tel: +86-23-68485589, E-mail: yuchaom@163.com

网络出版时间: 2013-06-21 14:34

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20130621.1434.004.html>

结构的异常变化常常是癌症发生的重要标志^[1-2]。因此, 探究肿瘤细胞中功能蛋白的糖基化修饰与细胞迁移能力之间的关系, 对于揭示肿瘤转移的分子机制、制定新的肿瘤治疗策略有着非常重要的意义。

O-GlcNAc糖基化是一种广泛存在于细胞质和细胞核中蛋白结构丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)侧链羟基上的蛋白质翻译后修饰, 其中, O-GlcNAc修饰基团的添加和移除分别受糖基转移酶(O-GlcNAc transferase, OGT)和糖苷酶(O-GlcNAcase, OGA)的调节, 是一种动态、可逆的过程^[3]。研究表明, 许多癌基因、抑癌基因及与肿瘤发生和转移相关的蛋白及转录因子, 如c-Myc^[4]、NF- κ B^[5]、FoxM1^[6]、SP1^[7]等均会发生O-GlcNAc修饰。在乳腺癌的研究中发现, 乳腺癌组织中OGT及O-GlcNAc修饰水平显著高于癌旁组织, 而OGA表达无差异^[8]; 在前列腺癌侵袭和血管生成中, O-GlcNAc修饰也起了重要的调节作用^[9]; 在结肠癌中, O-GlcNAc修饰直接参与了肿瘤的增殖及转移过程调控, 表现为在转移性结肠癌中O-GlcNAc修饰高于原发性结肠癌^[10]。因此, 哪些功能蛋白能够经O-GlcNAc修饰, 在肿瘤转移过程中起着重要调节作用值得我们特别的关注。 β -catenin是一种在细胞黏着连接处发挥作用的多功能蛋白, 也是Wnt信号通路中重要的因子, 主要介导细胞黏附, 参与基因表达, 调控细胞增殖、分化和凋亡^[11]。其表达增加或结构上的修饰, 可以促进肿瘤细胞的浸润和转移^[12]。然而, 由于O-GlcNAc修饰与磷酸化修饰均为同一个氨基酸位点, 那么其在高侵袭特性的人子宫绒毛膜癌的转移过程中是否存在调控作用还未见报道。本文以绒毛膜癌细胞株JAR为研究对象, 分别采用siRNA干扰技术和OGA抑制剂处理, 分别建立OGT基因部分沉默及O-GlcNAc修饰升高的两种细胞模型, 通过分析细胞迁移能力及其与血管内皮细胞黏附能力的变化, 以期阐明蛋白O-GlcNAc修饰对绒毛膜癌转移能力的调控作用; 采用免疫共沉淀技术检测JAR细胞中靶蛋白 β -catenin的O-GlcNAc水平, 初步探讨O-GlcNAc调控肿瘤转移的分子机制, 旨在揭示O-GlcNAc修饰在肿瘤转移中的重要调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料

RPML-1640培养基(美国HyClone公司, SH30809);

胎牛血清(杭州四季清公司、美国Gibco公司); 内皮细胞生长因子HAT(美国Sigma公司); PUGNAc(美国Sigma公司); Thiamet-G(美国Cayman公司); 鼠源抗O-GlcNAc抗体(RL2, 单抗, 英国Abcam公司); 兔源抗OGT抗体(多抗, 英国Abcam公司); 兔源抗 β -catenin抗体(多抗, 美国CST公司); 兔源抗 β -actin抗体(单抗, 美国CST公司); ECL化学发光液(美国Millipore公司); Trizol裂解液(大连宝生物工程有 限 公 司); 逆 转 录 试 剂 盒(Fermentas 公 司); SYBR Green(美国Bio-Rad公司); 化学合成siRNA(上海吉玛制药技术有限公司); Effectene转染试剂(德国QIAGEN公司); BCECF-AM染液(碧云天生物有限公司); 二抗均购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人绒毛膜癌细胞JAR(中国科学院动物研究所王雁玲老师惠赠)以含10%灭活胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RMPI-1640培养基培养。人脐静脉内皮细胞EA.hy926(四川大学华西医院刘小菁老师惠赠)用含10%灭活胎牛血清、30 U/mL HAT生长因子、100 U/mL青霉素、100 U/mL链霉素的RMPI-1640培养基培养。两者均在37 °C、5% CO₂的饱和湿度培养箱内培养。0.125%胰酶消化、传代, 取对数生长期细胞进行实验。为增加JAR细胞O-GlcNAc水平, 细胞用两种OGA的抑制剂PUGNAc(50 μ mol/L)、Thiamet-G(5 μ mol/L)分别处理24 h后, 用于建立O-GlcNAc修饰过表达的细胞模型。

1.2.2 siRNA干扰 取对数生长期JAR细胞接种于六孔板, 待长满至60%~70%时加入80 nmol/L的siRNA(NC siRNA序列Sense: 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3', Anti-sense: 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'; OGT siRNA序列sense: 5'-GCC AUC GUA UAC UGU AAC UTT-3', Anti-sense: 5'-AGU UAC AGU AUA CGA UGG CTT-3')。72 h后收集细胞, 提取总蛋白质, 进行Western blot分析; 或将相同处理的细胞消化、重悬进行Transwell及黏附实验。

1.2.3 Real-time PCR检测OGT mRNA的表达 采用Trizol法提取总RNA; 用Fermentas试剂盒按说明书操作反转录成cDNA。荧光定量PCR检测OGT(181 bp)基因产物, 以 β -actin(155 bp)做内参。反应体系: SYBR

green mix 5 μ L、上下游引物各0.3 μ L、cDNA 1 μ L、RNase-free水3.4 μ L; 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 3 min; 95 $^{\circ}$ C 10 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40次循环, 于65 $^{\circ}$ C~95 $^{\circ}$ C条件下检测溶解曲线。*OGT*序列上游引物: 5'-GAA CAG GGA AAC ATT GAA GAG G-3', 下游引物: 5'-AGT AGG CAT CAG CAA AGG TAG G-3'; β -actin引物序列上游: 5'-ACG GCA TCG TCA CCA ACT G-3', 下游引物: 5'-GAG CCA CAC GCA GCT CAT T-3'。

1.2.4 细胞迁移实验 收集处理后的JAR细胞, 用无血清培养基调整细胞浓度为 5.0×10^5 /mL, 按100 μ L/孔细胞量接种于Transwell小室的上室(聚碳酸酯膜, 膜孔径8 μ m), 下室加入600 μ L完全培养基, 37 $^{\circ}$ C、5% CO_2 条件下培养24 h。取上室用棉签擦掉滤膜上层的细胞, 置于4%多聚甲醛中固定20 min, PBS洗3遍, 用苏木精染色40 min, PBS洗净背景色后于荧光倒置相差显微镜(日本Nikon公司)10 $\times$ 10倍下观察, 每孔随机选取6个视野照相, 统计每张照片中的细胞数。

1.2.5 肿瘤细胞与人脐静脉内皮细胞黏附实验 取对数生长期EA.hy926细胞接种于96孔板, 待细胞长满后, 加入已用BCECF-AM(10 μ mol/L终浓度)探针孵育1 h的JAR细胞, 2×10^4 /孔共培养30 min, PBS洗去未黏附的JAR细胞后, 于荧光倒置相差显微镜4 $\times$ 10倍下观察并采集图像, 用Image pro plus 6.0软件对其荧光强度进行分析。

1.2.6 Western blot分析 收集JAR细胞, 加入CST裂解液(含10% Tyr抑制剂、10% Thr/Ser抑制剂、10% PMSF)裂解细胞提取总蛋白。BCA法测定蛋白浓度后, 加入5 $\times$ 蛋白上样缓冲液, 沸水煮10 min。经8% SDS-PAGE电泳分离后, 电转至0.45 μ m PVDF膜, 5%脱脂牛奶封闭1 h, 4 $^{\circ}$ C分别与抗O-GlcNAc(1:1 000)、OGT(1:1 000)、 β -catenin(1:1 000)及 β -actin(1:1 000)抗体孵育过夜, 用TBST漂洗3次后与辣根过氧化物酶偶联的二抗(1:3 000)孵育1 h, 漂洗后, 用ECL化学发光试剂显色, 在ChemGel Doc成像仪(Bio-Rad, 美国)分析结果。

1.2.7 免疫共沉淀实验 收集JAR细胞提取蛋白, BCA法蛋白定量后, 取1 mg总蛋白上清, 加入1 μ g抗 β -catenin抗体, 4 $^{\circ}$ C旋转摇床低速旋转过夜, 每管加入25 μ L Protein A-Sepharose, 4 $^{\circ}$ C低速旋转孵育4 h。4 $^{\circ}$ C下5 000 r/min离心5 min沉淀Protein A-Sepharose颗粒, 细胞裂解液洗涤3次后加入蛋白质上样缓冲液煮沸10 min, 4 $^{\circ}$ C以5 000 r/min离心5 min, 取上清液

用于Western blot, 步骤与前文所述相同。

1.2.8 统计学分析 每个实验至少重复3次, 数据采用SPSS16.0软件进行统计学分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验分析。以 $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 O-GlcNAc修饰的绒毛膜癌细胞模型的构建

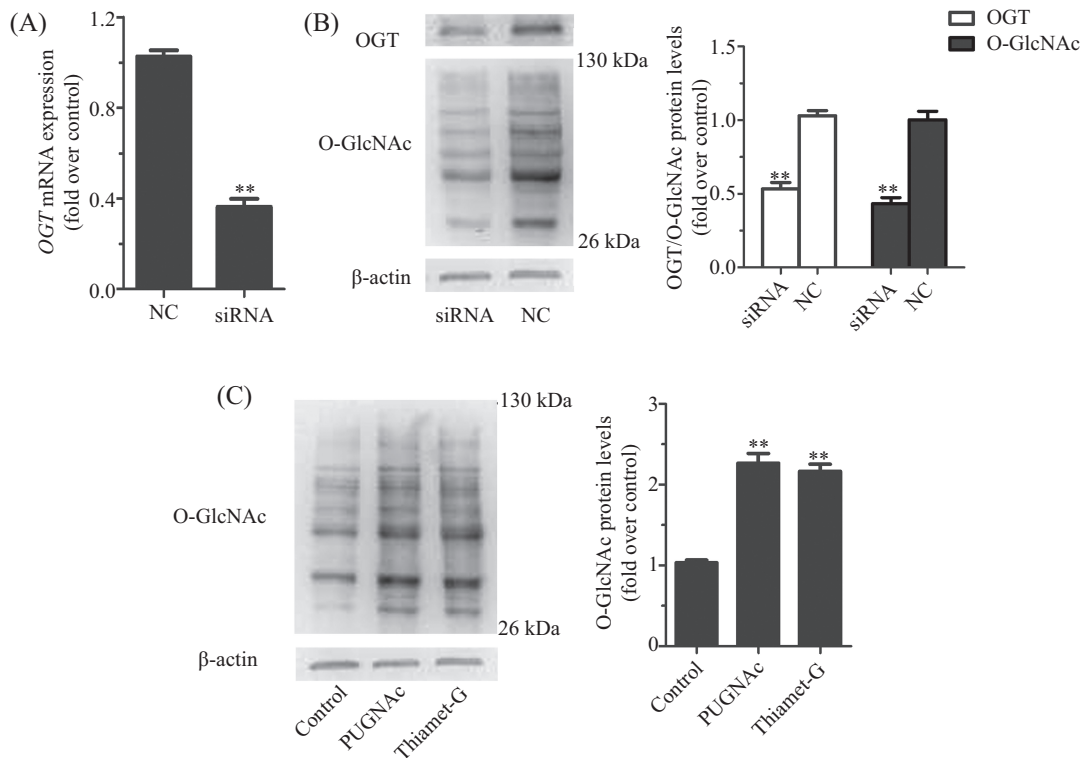
为了研究O-GlcNAc修饰对绒毛膜癌细胞转移的影响, 首先构建siRNA干扰细胞模型, 通过siRNA干扰JAR细胞中*OGT*基因的表达建立基因沉默细胞模型。采用Real-time PCR检测细胞中*OGT* mRNA水平, Western blot方法检测OGT及O-GlcNAc修饰总蛋白的表达水平以验证沉默效果。结果显示, 与空载组(NC)比较, siRNA组中OGT的mRNA和蛋白表达水平下调(图1A和1B), 同时O-GlcNAc修饰的总蛋白水平也相应降低(图1B), 表明OGT干扰细胞模型成功建立。接着, 为了得到O-GlcNAc过表达的细胞株, 用两种OGA特异性抑制剂PUGNAc和Thiamet-G分别处理JAR细胞, 24 h后采用特异性O-GlcNAc糖基化抗体检测。结果显示, 与对照组相比, 加药处理组细胞O-GlcNAc修饰的总蛋白水平均有显著增加(图1C), 表明O-GlcNAc修饰蛋白过表达的细胞模型成功建立。

2.2 上调O-GlcNAc蛋白修饰促进绒毛膜癌细胞迁移及与人内皮细胞黏附能力

为了验证O-GlcNAc糖基化蛋白是否影响绒毛膜癌细胞的迁移及与人血管内皮细胞的黏附能力, 分别通过Transwell及黏附实验检测OGA抑制剂处理和siRNA干扰后JAR细胞迁移及黏附能力的差异。结果显示, 与对照组相比, PUGNAc及Thiamet-G处理组JAR细胞迁移能力显著增加(图2A); JAR细胞与人血管内皮细胞EA.hy926的黏附能力也明显增强(图2B)。而siRNA干扰组的JAR细胞迁移能力及与EA.hy926细胞的黏附能力与NC组比较显著降低(图2C和2D)。结果表明, 细胞内O-GlcNAc蛋白修饰增强时能够促进绒毛膜癌细胞的迁移及癌细胞与血管内皮细胞的黏附能力。而抑制*OGT*基因表达, 减少O-GlcNAc蛋白修饰后可以抑制绒毛膜癌细胞的迁移能力, 说明O-GlcNAc蛋白修饰参与了肿瘤细胞转移的调控, 其表达上调可能是肿瘤转移的关键因素之一。

2.3 β -catenin是JAR细胞中OGT的靶蛋白之一

有文献报道, β -catenin是O-GlcNAc修饰的底



A: siRNA干扰后JAR细胞OGT mRNA水平; B: siRNA干扰后JAR细胞OGT及总O-GlcNAc修饰蛋白的表达水平; C: OGA抑制剂(PUGNAc、Thiamet-G)处理24 h后, JAR细胞O-GlcNAc修饰水平的变化。 ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

A: quantity analysis of OGT mRNA expression in JAR cells after siRNA interference; B: the protein levels of OGT and O-GlcNAcylation after siRNA interference; C: the levels of O-GlcNAcylation after treated with OGA inhibitor(PUGNAc, Thiamet-G) for 24 h in JAR cells. ** $P < 0.01$ vs control group.

图1 siRNA干扰及OGA抑制剂对JAR细胞O-GlcNAc修饰的影响

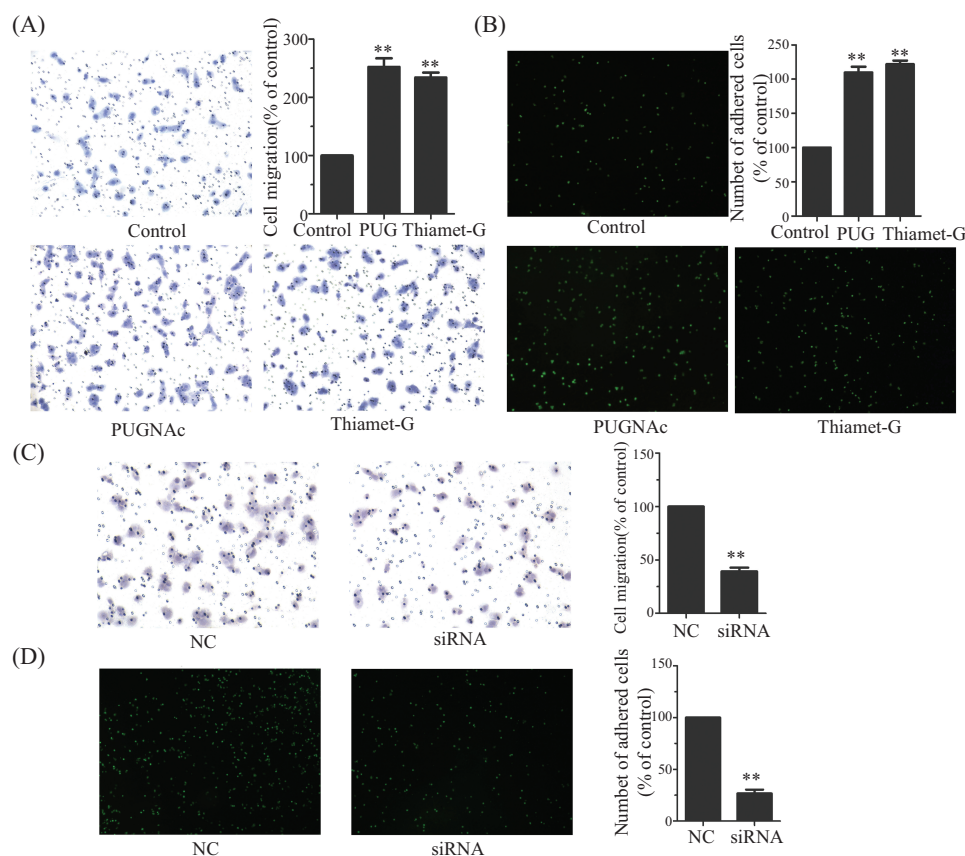
Fig.1 O-GlcNAcylation level in JAR cells after OGT siRNA interference or OGA inhibitor treatment

物^[13], 而 β -catenin又与细胞的迁移活性密切相关, 为了验证 β -catenin的O-GlcNAc修饰是否参与了绒毛膜癌细胞迁移及与内皮细胞黏附的调控, 首先采用Western blot法分别检测OGT siRNA干扰及PUGNAc处理后JAR细胞中 β -catenin的蛋白表达水平。其次, 用免疫共沉淀技术检测PUGNAc处理后 β -catenin的O-GlcNAc修饰水平。结果显示, siRNA干扰和PUGNAc处理对 β -catenin的蛋白表达没有显著影响(图3A和3B)。但免疫共沉淀技术检测结果显示, PUGNAc处理后JAR细胞中 β -catenin的O-GlcNAc修饰水平明显增加(图3C)。表明 β -catenin的O-GlcNAc糖基化修饰水平的上调, 可能参与了绒癌转移活性的调控。

3 讨论

人绒毛膜癌具有高侵袭、高转移能力, 并且易通过血液循环转移至全身^[14], 恶性程度极高, 是患者中死亡率较高的一种肿瘤。因此, 探讨绒毛膜癌转

移机制有助于肿瘤的防治。O-GlcNAc修饰是最常见的一种蛋白翻译后修饰, 与其他复杂的糖基化修饰不同, O-GlcNAc糖基化是通过糖基转移酶的催化仅将一个单糖添加到蛋白质丝/苏氨酸残基上, 且不能被进一步修饰。在细胞内蛋白糖基化程度的调节是通过两个酶(OGT和OGA)协调完成的。研究证明, 蛋白糖基化修饰在糖尿病、神经系统疾病及心血管疾病的发生、发展中起着重要的作用^[15]。本研究首先采用RNA干扰和OGA抑制剂方法建立正反两个方面糖基化修饰的细胞模型, 通过Transwell方法及黏附实验分别检测细胞迁移及与人血管内皮细胞的黏附能力, 发现OGA抑制剂(O-GlcNAc修饰增加)作用于JAR细胞后, 细胞迁移能力显著增加, 且与人血管内皮细胞的黏附也相应升高, 说明癌细胞经血液进行远处转移可能性增强; 而通过干扰OGT基因下调O-GlcNAc蛋白修饰水平后, JAR细胞迁移及与人血管内皮细胞的黏附能力随之下调。表明O-GlcNAc修饰参与了绒癌细胞转移的调控。为了

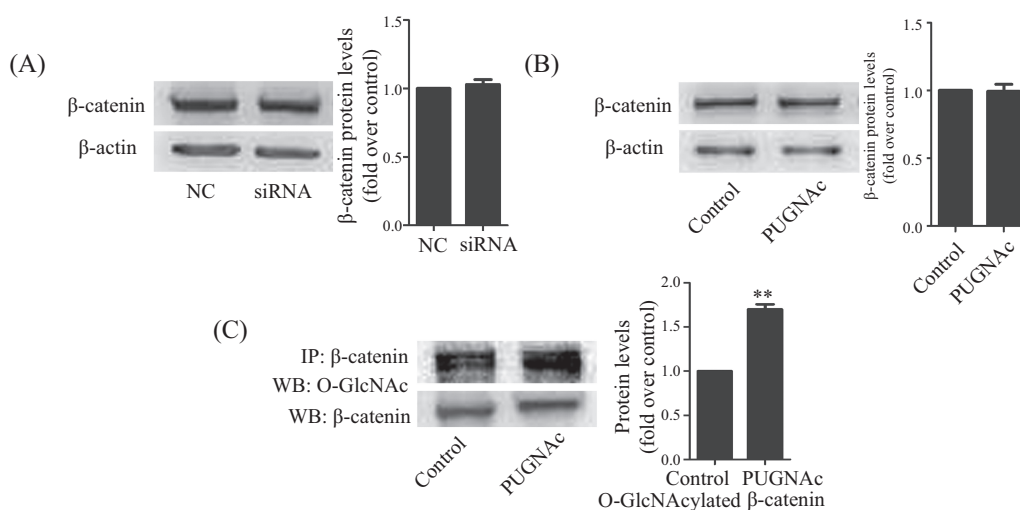


A: OGA抑制剂(PUGNac、Thiamet-G)作用于JAR细胞24 h后Transwell结果; B: OGA抑制剂(PUGNac、Thiamet-G)作用于JAR细胞24 h后其与内皮细胞黏附结果; C: OGT siRNA干扰后Transwell结果; D: OGT siRNA后JAR细胞与内皮细胞的黏附结果。 ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

A: JAR cells were treated with OGA inhibitor (PUGNac, Thiamet-G) for 24 h, and the Transwell assay was used to detect the change of cell mobility; B: effects of JAR cells adhesion to EA.hy926 cells after treated with OGA inhibitor (PUGNac, Thiamet-G) for 24 h; C: transwell assay was used to detect the change of cell mobility after siRNA interference; D: effects of JAR cells adhesion to EA.hy926 cells after siRNA interference. ** $P < 0.01$ vs control group.

图2 O-GlcNAc修饰对JAR细胞生物学效应的影响

Fig.2 Influence of O-GlcNAcylation on JAR cells biological effect



A: siRNA干扰后JAR细胞 β -catenin蛋白表达水平; B: OGA抑制剂PUGNac作用于JAR细胞24 h后 β -catenin蛋白表达水平; C: PUGNac作用于JAR细胞24 h后 β -catenin的O-GlcNAc修饰。 ** $P < 0.01$, 与对照组相比。

A: the total protein level of β -catenin was detected by Western blot in JAR cells after siRNA interference; B: the total protein level of β -catenin was detected by Western blot in JAR cells after treated with PUGNac for 24 h; C: JAR cells were treated with PUGNac for 24 h, followed by immunoprecipitation with β -catenin antibody and immunoblotting with RL2. ** $P < 0.01$ vs control group.

图3 O-GlcNAc对 β -catenin的修饰作用

Fig.3 β -catenin are O-GlcNAcylated in JAR cells

鉴定O-GlcNAc修饰的靶蛋白, 结合文献报道, 通过蛋白免疫印迹及免疫共沉淀的方法对 β -catenin的O-糖基化程度进行了检测, 发现功能蛋白 β -catenin在细胞内的蛋白表达水平虽不受O-GlcNAc修饰的调节, 但其本身糖基化水平却显著升高, 表明 β -catenin蛋白就是OGT酶的底物或者说是靶蛋白。 β -catenin是细胞质中一种重要的多功能蛋白, 最早作为一种黏附分子被发现, 它在细胞内有双重作用: 一是与细胞膜上钙依赖性黏附分子E-cadherin相互作用, 介导同型细胞间的黏附^[16]; 另一方面, 是Wnt/ β -catenin/TCF信号通路的中枢成分, 与Wnt蛋白、GSK-3 β 、APC、Axin等共同构成Wnt信号通路, 参与调控细胞生长、分化及凋亡等^[11]。在许多肿瘤中均有 β -catenin异常表达, 如小细胞肝癌、乳腺癌、结直肠癌^[17-19]等。有研究显示, 在乳腺癌、结肠癌中 β -catenin的O-糖基化修饰程度的高低, 能通过改变其核转运及转录功能, 从而调节胞内下游信号通路, 最终影响肿瘤细胞增殖^[19-20]。因此, 可以推测高转移活性的绒毛膜癌细胞的迁移能力可能是OGT通过增加 β -catenin糖基化水平从而影响了相关信号通路的级联反应来调控的, 至于影响了哪些信号通路? 如何调控? 且是否还有其他受O-糖修饰调控的蛋白参与其中, 这将是我们的课题组下一步研究的重点内容之一。

参考文献 (References)

- Borzym-Kluczyk M, Radziejewska I, Darewicz B. Glycosylation of proteins in healthy and pathological human renal tissues. *Folia Histochem Cytobiol* 2012; 50(4): 599-604.
- Kyselova Z, Mechref Y, Kang P, Goetz JA, Dobrolecki LE, Sledge GW, *et al.* Breast cancer diagnosis/prognosis through quantitative measurements of serum glycan profiles. *Clin Chem* 2008; 54(7): 1166-75.
- Lubas WA, Hanover JA. Functional expression of O-linked GlcNAc transferase. Domain structure and substrate specificity. *J Biol Chem* 2000; 275(15): 10983-8.
- Ozcan S, Andrali SS, Cantrell JE. Modulation of transcription factor function by O-GlcNAc modification. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1799(5/6): 353-64.
- Allison DF, Wamsley JJ, Kumar M, Li D, Gray LG, Hart GW, *et al.* Modification of RelA by O-linked N-acetylglucosamine links glucose metabolism to NF- κ B acetylation and transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(42): 16888-93.
- Caldwell SA, Jackson SR, Shahriari KS, Lynch TP, Sethi G, Walker S, *et al.* Nutrient sensor O-GlcNAc transferase regulates breast cancer tumorigenesis through targeting of the oncogenic transcription factor FoxM1. *Oncogene* 2010; 29(19): 2831-42.
- Kudlow JE. Post-translational modification by O-GlcNAc: Another way to change protein function. *J Cell Biochem* 2006; 98(5): 1062-75.
- Gu Y, Mi W, Ge Y, Liu H, Fan Q, Han C, *et al.* GlcNAcylation plays an essential role in breast cancer metastasis. *Cancer Res* 2010; 70(15): 6344-51.
- Lynch TP, Ferrer CM, Jackson SR, Shahriari KS, Vosseller K, Reginato MJ. Critical role of O-Linked β -N-acetylglucosamine transferase in prostate cancer invasion, angiogenesis, and metastasis. *J Biol Chem* 2012; 287(14): 11070-81.
- Yehezkel G, Cohen L, Kliger A, Manor E, Khalaila I. O-linked β -N-acetylglucosaminylation (O-GlcNAcylation) in primary and metastatic colorectal cancer clones and effect of N-acetyl- β -D-glucosaminidase silencing on cell phenotype and transcriptome. *J Biol Chem* 2012; 287(34): 28755-69.
- Huiping C, Kristjansdottir S, Jonasson JG, Magnusson J, Egilsson V, Ingvarsson S. Alterations of E-cadherin and beta-catenin in gastric cancer. *BMC Cancer* 2001; 1: 16.
- Iwai S, Yonekawa A, Harada C, Hamada M, Katagiri W, Nakazawa M, *et al.* Involvement of the Wnt- β -catenin pathway in invasion and migration of oral squamous carcinoma cells. *Int J Oncol* 2010; 37(5): 1095-103.
- Zhu W, Leber B, Andrews DW. Cytoplasmic O-glycosylation prevents cell surface transport of E-cadherin during apoptosis. *EMBO J* 2001; 20(21): 5999-6007.
- Lurain JR. Causes of treatment failure in gestational trophoblastic disease. *J Reprod Med* 1987; 32(9): 675-9.
- Hart GW, Housley MP, Slawson C. Cycling of O-linked β -N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins. *Nature* 2007; 446(7139): 1017-22.
- Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 1998; 153(2): 333-9.
- Martensson A, Oberg A, Jung A, Cederquist K, Stenling R, Palmqvist R. Beta-catenin expression in relation to genetic instability and prognosis in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2007; 17(2): 447-52.
- Lee HS, Park MH, Yang SJ, Park KC, Kim NS, Kim YS, *et al.* Novel candidate targets of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Life Sci* 2007; 80(7): 690-8.
- Olivier-Van Stichelen S, Guinez C, Mir AM, Perez-Cervera Y, Liu C, Michalski JC, *et al.* The hexosamine biosynthetic pathway and O-GlcNAcylation drive the expression of β -catenin and cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2012; 302(4): E417-24.
- Sayat R, Leber B, Grubac V, Wiltshire L, Persad S. O-GlcNAc-glycosylation of beta-catenin regulates its nuclear localization and transcriptional activity. *Exp Cell Res* 2008; 314(15): 2774-87.