

Scribble 调控 β -catenin 的入核

李苏瑞 牛晓峰 陈 铭*

(中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

摘要 Scribble (Scrib)是富含亮氨酸重复序列及 PDZ 结构域蛋白(LAP)家族的一员,以脚手架蛋白的方式与多种分子相结合并整合多种信号通路协同发挥作用。 β -catenin 是一种多功能蛋白质,在介导细胞粘附及信号转导中起中心分子作用。为研究 Scrib 与 β -catenin 间是否存在联系及何种联系,我们做了一系列实验。研究发现,如果 HEK293/HEK293T 细胞中过表达 Scrib, β -catenin 的转录活性报告基因 LEF-1-luciferase 的活性则显著减弱;而如果 HEK293/HEK293T 细胞中稳定下调 Scrib, LEF-1-luciferase 的活性则显著增强。表明 Scrib 可抑制 β -catenin 的转录活性。我们同时利用免疫共沉淀(Co-IP)实验发现 Scrib 与 β -catenin 存在特异结合作用。另外,细胞组分分离实验表明 HEK293/HEK293T 细胞中稳定下调 Scrib, 细胞中 β -catenin 蛋白总量不变,而胞浆及胞核内 β -catenin 量增多即表明 Scrib 可抑制 β -catenin 的入核。本研究在分子机制上表明 Scrib 可通过与 β -catenin 的结合,抑制 β -catenin 入核,从而影响 β -catenin 的下游调控基因。

关键词 Scribble; β -catenin; LEF-1-luciferase; 入核

*Scribble (scrib)*是重要的细胞极性基因及抑癌基因,参与细胞极性的建立及细胞迁移^[1]。Scrib 是富含亮氨酸重复序列及 PDZ (Postsynaptic density protein 95, Discs-large and ZO-1, PDZ)结构域蛋白(leucinerich repeat and PDZ containing protein, LAP)家族的一员,LAP蛋白具有亮氨酸富集重复区(leucine-rich repeats, LRRs)及多 PDZ 结构域^[2,3]。Scrib 蛋白通过其 LRRs 结构域与细胞膜相连,以脚手架蛋白的方式与多种分子相结合介导并整合多种信号通路协同发挥作用^[4,5]。

hScrib (人 Scrib 同源物)最初是在筛选人乳头瘤病毒 E6 癌蛋白的靶蛋白时被发现的^[6]。在哺乳动物上皮细胞中, Scrib 和 Dlg 家族蛋白共定位,同时和粘着连接处的 E-cadherin 分布有重叠^[7]。乳腺表皮细胞中 Scrib 缺失可破坏细胞极性,抑制细胞凋亡,引起细胞三维形态消失。*Scrib* 的缺失与原癌基因 *c-myc* 协同作用使表皮细胞发生转化进而引发肿瘤的形成^[6]。在人类及小鼠许多迁移性乳腺癌及结肠直肠癌(colorectal cancer, CRC)中也发现 Scrib 的下调、缺失或者定位变化^[8]。

β -catenin 是一种多功能蛋白质,在介导细胞粘附及信号转导中起中心分子作用,对肿瘤形成、分化、侵袭及转移起重要作用。细胞膜、细胞质和细胞核均存在 β -catenin^[9,10]。正常成熟细胞中,细胞膜上的 β -catenin 与 E-cadherin、 β -catenin、actin 等

构成连接复合体,介导同型细胞相互黏附^[11]。 β -catenin 的磷酸化决定其在该复合体中的存留: β -catenin 的丝/苏氨酸磷酸化,促进 E-cadherin 和 β -catenin 的结合;而表皮生长因子、血小板衍生生长因子、肝细胞生长因子等生长因子及其受体使 β -catenin 的酪氨酸磷酸化,促使 β -catenin 从复合体中解离,进入细胞质^[12-14]。细胞质中的 β -catenin 与 Axin、APC、GSK-3 β 等形成“破坏复合体”,经蛋白酶体水解作用而降解,未被降解的 β -catenin 进入细胞核,调节相关靶基因的转录^[9,10]。而肿瘤细胞中存在异常的信号传导通路,APC 或 β -catenin 基因突变或蛋白结构、功能异常导致 β -catenin 在胞浆内集聚,并进入细胞核内与 Tcf/Lef 结合激活相关靶癌基因的转录,导致细胞癌变^[15]。

有文献报道 CRC 胞浆中 hScrib 有高表达及 β -catenin 积累,在 CRC 细胞系中有 hScrib 的缺失及 β -catenin 的胞浆转移^[16]。但 hScrib 与 β -catenin 间是否存在联系及何种联系仍不清楚。本研究利用 HEK293/HEK293T 及下调 Scrib 表达的 HEK293/HEK293T 稳定细胞株进行了一系列生化与细胞生物学的实验,初步探讨 Scrib 与 β -catenin 在细胞及分子

收稿日期: 2010-01-05 接受日期: 2010-05-21

国家自然科学基金委(No.30771960)资助项目

* 通讯作者。Tel: 021-54921337, E-mail: chenm@sibs.ac.cn

水平的相互关系及可能的调控机制,为临床研究预防治疗癌症如CRC的新方法提供一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

实验中所用的HEK293、HEK293T用添加10%灭活胎牛血清(Fetal Bovine Serum, FBS)、4 mmol/L L-谷氨酰胺、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的DMEM培养液(10% FBS DMEM)于37 °C/5% CO₂的条件进行培养。HEK293、HEK293T的Scrib下调稳定表达细胞株(由本实验室牛晓峰博士构建)分别用添加5 μg/ml硫酸博来霉素(Zeocin)、10 μg/ml Zeocin的10% FBS DMEM于37 °C/5% CO₂的条件进行培养。

1.2 抗体与试剂

Zeocin 购自Invitrogen。LEF-1-luciferase 报告基因质粒由本所李林实验室赠送。hScrib 质粒由本实验室牛晓峰博士构建。兔源多克隆抗体 Scrib 由本实验室自己制备。抗β-catenin的抗体购自BD Biosciences。抗α-Tubulin的抗体购自Sigma。辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗(抗鼠、抗兔)购自EMD Calbiochem。

1.3 荧光素酶报告基因检测(Luciferase Reporter Assay)实验

转染前一天将细胞接入24孔板,24 h之内用Lipofectamine(Invitrogen)转染。48 h后裂解细胞;裂解液与Luciferase的底物(Promega)室温反应15~30 min后立即在Luciferase活性实验检测仪(Promega)上读出反应产物的荧光信号,即为细胞裂解液中的Luciferase活性值。各组细胞转染的效率以细胞内表达的β-D-半乳糖苷酶(β-galactosidase)活性作为内参进行衡量,细胞裂解液和β-Gal KitII(BD,Clontech)中的β-galactosidase底物于室温避光反应1 h后,于Luciferase活性实验检测仪(Promega)检测荧光信号并记录,最后分析数据。

1.4 细胞组分离实验

全部于冰上操作。单层培养细胞(35 cm dish)放置冰上,加1 ml PBS,用细胞刮悬浮细胞,将细胞转入Eppendorf管。2 500 r/min, 4 °C, 10 min,将细胞离心下去。去净上清,加入300 μl buffer A(低渗溶液,10 mmol/L HEPES-KOH(pH7.9),10 mmol/L KCl)悬浮细胞,冰上10 min。胰岛素针(1 ml)抽拉低渗处理的细胞10~15次,破坏细胞膜,释放细胞质内容物。2 500 r/min, 4 °C, 10 min,收集细胞核。上清超速离

心,4 °C,100 000 g,1 h,上清制备细胞质样品,沉淀制备细胞膜样品。细胞核组分的上清去净,加入50 μl buffer C(高渗溶液,20 mmol/L HEPES-KOH(pH 7.9),25% glycerol,420 mmol/L NaCl)悬浮细胞核,冰上30 min。超速离心,4 °C,100 000 g,1 h,上清制备细胞核样品。细胞膜、质、核样品经SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳之后,并电转至PVDF膜上,最后免疫印迹分析。

注: Buffer A, Buffer C使用前补加蛋白酶抑制剂I(1 ml buffer加23 μl I)

1.5 免疫沉淀实验

细胞去培养上清,用预冷的PBS洗一次,加入800 μl裂解液(50 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4;150 mmol/L NaCl;0.5 mmol/L EGTA;1% Triton X-100;10% glycerol),用细胞刮将细胞刮下来,移至干净的1.5 ml EP管中。冰上裂解1 h,12 000 r/min,4 °C,15 min后,收集上清与1 μg抗体及20 μl protein A beads于4 °C rotator上孵育过夜。用细胞裂解液洗3次,免疫沉淀产物及裂解液用还原性上样缓冲液煮沸10 min,经SDS-PAGE电泳之后,电转至PVDF膜上,最后免疫印迹分析。

1.6 免疫印迹实验

电泳样品经SDS-PAGE电泳后电转至PVDF膜后,PVDF膜经含有10%脱脂奶粉的TBST(20 mmol/L Tris,150 mmol/L NaCl,0.1% Tween-20)室温封闭1 h后,用TBST稀释的一抗于室温孵育1 h,经TBST充分洗涤后,用TBST稀释的二抗于室温孵育1 h,TBST充分洗涤后以luminal显色。

1.7 统计方法

采用SPSS15.0,Origin7.5软件进行数据分析及图象处理。实验数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,Dunnett *t*检验进行比较,以 $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 下调Scrib表达的HEK293/HEK293T稳定细胞株的检测

Scrib是细胞膜蛋白,在多数细胞株中高表达。为研究Scrib的功能,分别在HEK293和HEK293T细胞中用其siRNA质粒构建了下调Scrib表达的稳定细胞株及其对照空质粒稳定细胞株。并检测了稳定细胞株的Scrib表达水平(图1)。结果表明两种下调Scrib表达的稳定细胞株中Scrib表达水平与对照相比有显著的下降。

2.2 上调 Scrib 表达水平会抑制 β -catenin 的转录活性

为研究 Scrib 对 β -catenin 的转录活性是否有影响,我们用 Luciferase Reporter Assay 实验来检测 Scrib 表达水平是否可以影响 β -catenin 的转录活性。我们发现如果在稳定表达 control siRNA 的 HEK293/HEK293T 的细胞(HEK293/sihScrib V、HEK293T/sihScrib V2)中瞬转 Scrib, β -catenin 的转录活性报告基因 LEF-1-luciferase 与瞬转空载体的细胞相比有显著的减弱($P < 0.05$)。瞬转 β -catenin 为实验的阳性对照。该实验表明 Scrib 可以抑制 β -catenin 的转录活性(图 2)。

2.3 下调 Scrib 的表达可以增强 β -catenin 的转录活性

为了进一步研究 Scrib 对 β -catenin 的转录活性的影响,我们在稳定下调 Scrib 表达的 HEK293 和 HEK293T 细胞株(HEK293/sihScrib C5~C7、

HEK293T/sihScrib C4)中通过 Luciferase Reporter Assay 实验来检测下调 Scrib 的表达是否可以增强 β -catenin 的转录活性。我们发现 Scrib 表达水平下调后, β -catenin 的转录活性与对照细胞株(HEK293/sihScrib V、HEK293T/sihScrib V2)相比有显著的增强($P < 0.05$, 图 3),瞬转 β -catenin 为实验的阳性对照。该实验同样表明 Scrib 可抑制 β -catenin 的转录活性。

2.4 Scrib 表达量的变化并不影响 β -catenin 的表达总量

前面的实验表明可知 Scrib 可以抑制 β -catenin 的转录活性。为了研究 Scrib 是否影响了 β -catenin 的表达总量,我们分别在稳定下调 Scrib 表达的 HEK293 和 HEK293T 细胞株中检测了 β -catenin 的蛋白表达水平。结果表明 Scrib 表达水平的下调并没有影响 β -catenin 的表达总量(图 4)。

2.5 Scrib 信号稳定下调后导致 β -catenin 膜定位减少,质核定位增加

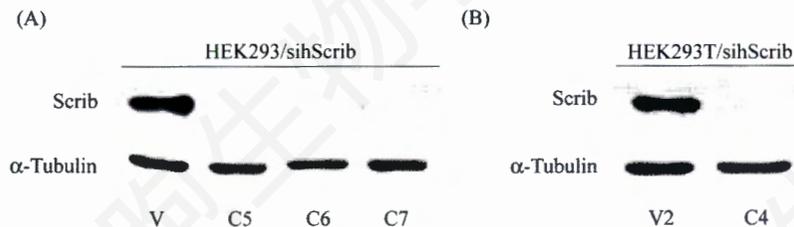


Fig.1 Scrib expression levels in HEK293/sihScrib cells and HEK293T/sihScrib cells

A, B: Scrib protein levels were assessed by Western blot analysis in stable populations of HEK293 cells (A) and HEK293T cells (B) expressing control or independent Scrib siRNAs. α -Tubulin was used as loading control.

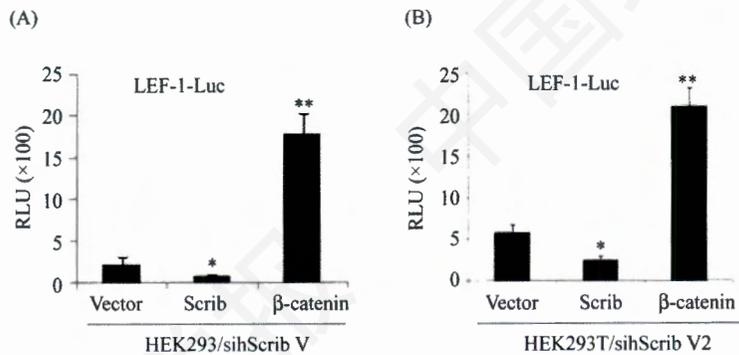


Fig.2 Overexpression of Scrib specifically suppresses β -catenin /LEF transcriptional activity

A, B: stable populations of HEK293 cells (A) and HEK293T cells (B) expressing control siRNAs were transiently co-transfected with either 400 ng of Scrib or pCMV3Tag control plasmid or β -catenin together with 200 ng of the LEF-1-luciferase reporter construct. Cells were incubated for 2 d prior to Luciferase Reporter Assay. The Y-axis is relatively normalized luciferase activity by β -galactosidase, data are represented as mean \pm S.D., $n=3$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control.

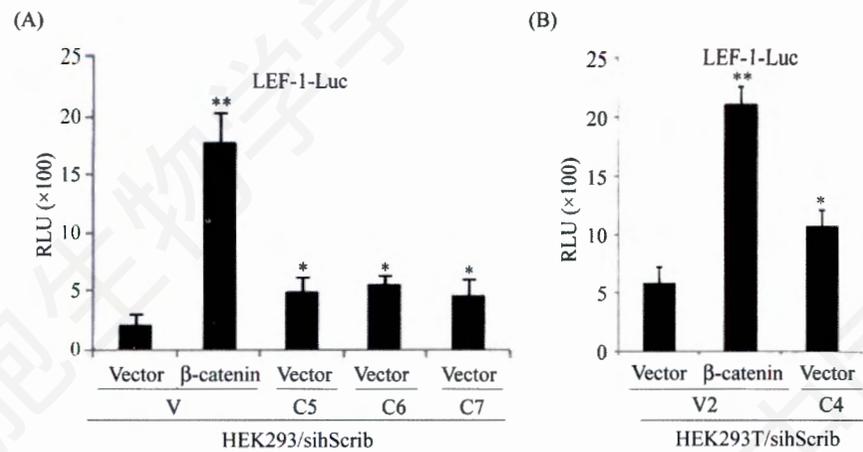


Fig.3 Downregulation of Scrib specifically increases β -catenin /LEF transcriptional activity

A, B: stable populations of HEK293 cells (A) and HEK293T cells (B) expressing control siRNAs or independent Scrib siRNAs were transiently co-transfected with either 400 ng of pCMV3Tag control plasmid or β -catenin together with 200 ng of the LEF-1-luciferase reporter construct. Cells were incubated for 2 d prior to Luciferase Reporter Assay. The Y-axis is relatively normalized luciferase activity by β -galactosidase, data are represented as mean \pm S.D., $n=3$. HEK293/sihScrib V or HEK293T/ sihScrib V2 was used as control. * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control.

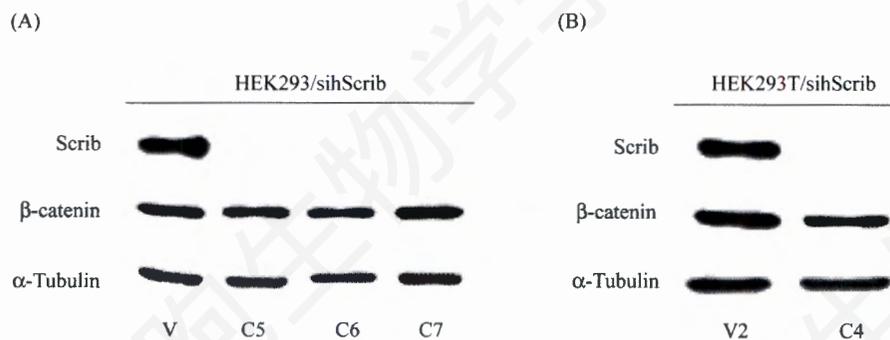


Fig.4 Downregulation of Scrib didn't regulate the gross protein levels of β -catenin

A, B: β -catenin protein levels were assessed by Western blot analysis in stable populations of HEK293 cells (A) and HEK293T cells (B) expressing control siRNAs or independent Scrib siRNAs. α -Tubulin was used for loading control.

β -catenin 的定位与其功能密切相关, 活化的 β -catenin 会在细胞核内聚集, 行使其转录功能。前面的实验证明 Scrib 影响了 β -catenin 的转录活性但并没有影响其表达总量, 我们推测 Scrib 可能影响了 β -catenin 的胞内定位。我们通过分离细胞组分的实验来分析 Scrib 的下调表达是否影响了 β -catenin 在不同的细胞组分(细胞膜、细胞质、细胞核)中的分布比例。我们发现 HEK293/sihScrib V、HEK293T/sihScrib V2 细胞株中 β -catenin 基本分布于细胞膜上, 而在细胞质和细胞核中几乎没有。而在 HEK293/sihScrib C5~C7、HEK293T/sihScrib C4 细胞株中, 细胞膜上 β -catenin 的量减少, 而细胞质和细胞核中的 β -catenin 的蛋白量增加(图 5)。该实验表明, Scrib 表达水平的下调可以引起部分 β -catenin 从细胞膜解离,

并向细胞质及细胞核内聚集, 从而提高 β -catenin 的转录活性。

2.6 Scrib 与 β -catenin 的结合特异性

为了研究 Scrib 是否是通过与 β -catenin 特异性的结合而影响了其功能, 我们利用免疫共沉淀(Co-IP)的方法在 HEK293 细胞中检测 Scrib 是否与 β -catenin 特异性结合。我们发现与偶联在 Protein A 凝胶颗粒上的 Rabbit IgG 相比, Scrib 多克隆抗体可以免疫共沉淀该细胞裂解液中的 β -catenin。该实验表明内源表达的 Scrib 可以与 β -catenin 特异性结合(图 6)。

3 讨论

本研究利用 HEK293/HEK293T 及下调 Scrib 表达的 HEK293/HEK293T 稳定细胞株进行了一系列生化

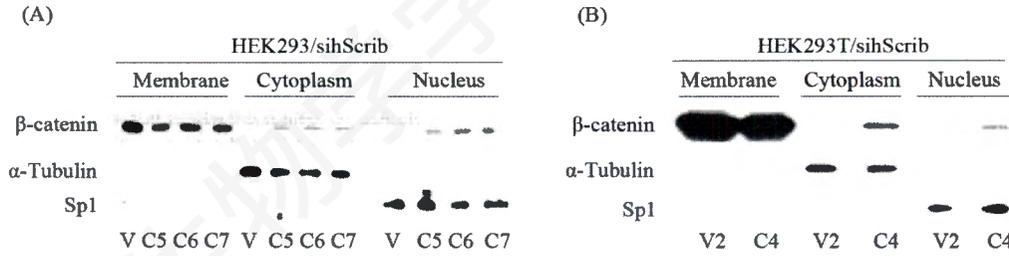


Fig.5 Scrib could inhibit the nucleus entry of β -catenin

A, B: β -catenin protein levels were assessed by Western blot analysis in membrane, cytoplasmic and nuclear fractions of stable populations of HEK293 cells (A) and HEK293T cells (B) expressing control siRNAs or independent Scrib siRNAs. The nuclear protein Sp1 and the cytoplasmic protein α -Tubulin was respectively used to assess the purity of the nuclear and cytoplasmic fractions. Sp1 and α -Tubulin were respectively used for loading control.

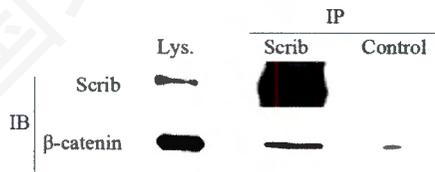


Fig.6 Scrib specifically interacts with β -catenin

Lysates from HEK293 cells were immunoprecipitated (IP) with anti-Scrib (control, irrelevant antibody) and immunoblotted (IB). Lys: lysate.

与细胞生物学的实验,在分子机制上初步阐明了Scrib与 β -catenin间的联系及相互间的调控关系。结果表明如果HEK293/HEK293T细胞中过表达Scrib, β -catenin的转录活性报告基因LEF-1-luciferase的活性则显著减弱;而如果HEK293/HEK293T细胞中稳定下调Scrib,LEF-1-luciferase的活性则显著增强。表明Scrib可以抑制 β -catenin的转录活性。我们通过细胞组分分离实验表明如果HEK293/HEK293T细胞中稳定下调Scrib后,细胞中 β -catenin表达总量不变,而膜上 β -catenin蛋白量减少,胞浆及胞核内 β -catenin量增多即表明Scrib可以抑制 β -catenin的入核从而抑制 β -catenin的转录活性。我们同时利用Co-IP实验发现Scrib与 β -catenin存在特异性结合作用。本研究在分子机制上表明Scrib可以通过与 β -catenin结合,抑制 β -catenin入核,从而抑制 β -catenin的下游相关靶基因的转录。

MCC(mutated in colorectal cancer)最初是在研究家族腺瘤状息肉病的候选基因时被发现,于1991年确定的与结直肠癌(colorectal cancer, CRC)早期发生密切相关的抑癌基因,位于染色体的5q21位置^[17,18]。MCC基因编码产生98 kDa的蛋白质,通过与G蛋白结合参与和调节细胞内正常的信息传递,在膜质核组

分中都有分布。在许多物种中都具有保守性,但很少有同源蛋白^[19]。有文献报道MCC在核内可与 β -catenin特异性结合,阻止 β -catenin/TCF/LEF的DNA结合性,促进 β -catenin重新进入胞质,影响内源 β -catenin的定位及水平^[20]。另外也有研究发现MCC通过其PDZ结合结构域与Scrib的PDZ3结构域结合,MCC与Scrib于细胞膜上有共定位^[21]。最近有研究发现结直肠癌中样品切片中胞浆中hScrib有高表达及 β -catenin积累,在结肠癌细胞系中也发现有hScrib的缺失及 β -catenin的胞浆转移^[16]。但Scrib与 β -catenin是否有机理上的关联不清楚。本研究在机制上初步阐明了这一问题。但仍有一些问题值得我们进一步研究,我们已发现Scrib与 β -catenin存在特异性结合,但两者结合的具体位点及在细胞的何区域结合仍不清楚。Scrib与 β -catenin的特异性结合如何参与抑制 β -catenin的入核,是否通过其他蛋白如MCC参与也还需要我们进一步研究。

参考文献(References)

- 1 Dow LE, Brumby AM, Muratore R, Coombe ML, Sedelies KA, Trapani JA, *et al*. Hscrib is a functional homologue of the *Drosophila* tumour suppressor Scribble. *Oncogene* 2003; 22 (58): 9225-30.
- 2 Bryant PJ, Huwe A. LAP proteins: what's up with epithelia? *Nat Cell Biol* 2000; 2(8): E141-3.
- 3 Santoni MJ, Pontarotti P, Birnbaum D, Borg JP. The LAP family: a phylogenetic point of view. *Trends Genet* 2002; 18 (10): 494-7.
- 4 Albertson R, Chabu C, Sheehan A, Doe CQ. Scribble protein domain mapping reveals a multistep localization mechanism and domains necessary for establishing cortical polarity. *J Cell Sci* 2004; 117(25): 6061-70.
- 5 Zeitler J, Hsu CP, Dionne H, Bilder D. Domains controlling cell polarity and proliferation in the *Drosophila* tumor suppressor Scribble. *J Cell Biol* 2004; 167(6): 1137-46.
- 6 Zhan L, Rosenberg A, Bergami KC, Yu M, Xuan Z, Jaffe AB, *et al*. Deregulation of Scribble promotes mammary tumorigenesis

- and reveals a role for cell polarity in carcinoma. *Cell* 2008; 135(5): 865-78.
- 7 Nakagawa S, Huibregtse JM. Human Scribble (Vartul) is targeted for ubiquitin-mediated degradation by the high-risk papillomavirus E6 proteins and the E6AP ubiquitin-protein ligase. *Mol Cell Biol* 2000; 20(21): 8244-53.
 - 8 Navarro C, Nola S, Audebert S, Santoni MJ, Arsanto JP, Ginestier C, *et al.* Junctional recruitment of mammalian Scribble relies on E-cadherin engagement. *Oncogene* 2005; 24(27): 4330-9.
 - 9 Morin PJ. Beta-catenin signaling and cancer. *Bioessays* 1999; 21(12): 1021-30.
 - 10 Kikuchi A. Regulation of beta-catenin signaling in the Wnt pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268(2): 243-8.
 - 11 Kemler R, Ozawa M. Uvomorulin-catenin complex: cytoplasmic anchorage of a Ca²⁺-dependent cell adhesion molecule. *Bioessays* 1989; 11(4): 88-91.
 - 12 Müller T, Choidas A, Reichmann E, Ullrich A. Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J Biol Chem* 1999; 274(15): 10173-83.
 - 13 Hazan RB, Norton L. The epidermal growth factor receptor modulates the interaction of E-cadherin with the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 1998; 273(15): 9078-84.
 - 14 Hiscox S, Jiang WG. Hepatocyte growth factor/scatter factor disrupts epithelial tumour cell-cell adhesion: involvement of beta-catenin. *Anticancer Res* 1999; 19(1A): 509-17.
 - 15 Giles RH, van Es JH, Clevers H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1653(1): 1-24.
 - 16 Kamei Y, Kito K, Takeuchi T, Imai Y, Murase R, Ueda N, *et al.* Human scribble accumulates in colorectal neoplasia in association with an altered distribution of β -catenin. *Human Pathology* 2007; 38(8): 1273-81.
 - 17 Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, *et al.* Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253(5020): 661-5.
 - 18 Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, *et al.* Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991; 251(4999): 1366-70.
 - 19 Bouwmeester T, Bauch A, Ruffner H, Angrand PO, Bergamini G, Croughton K, *et al.* A physical and functional map of the human TNF-alpha/NF-kappa B signal transduction pathway. *Nat Cell Biol* 2004; 6(2): 97-105.
 - 20 Fukuyama R, Nicolaita R, Ng KP, Obusez E, Sanchez J, Kalady M, *et al.* Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses β -catenin-dependent transcription. *Oncogene* 2008; 27(46): 6044-55.
 - 21 Arnaud C, Sebbagh M, Nola S, Audebert S, Bidaut G, Hermant A, *et al.* MCC, a new interacting protein for Scrib, is required for cell migration in epithelial cells. *FEBS Letters* 2009; 583(14): 2326-32.

Scribble Regulates the Nucleus Entry of β -catenin

Su-Rui Li, Xiao-Feng Niu, Ming Chen*

(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract Scribble (Scrib) is a member of the leucinerich repeat and PDZ containing protein (LAP) family, connected to the membrane. Scrib plays a variety of roles by combining with many protein molecules and integrating multiple signaling pathways in scaffolding protein ways. β -catenin a multifunctional protein, plays central roles in mediating cell adhesion and signal transduction. To study what relationship and regulative mechanism between Scrib and β -catenin, we have done a series of experiments. We found that after Scrib was overexpressed in HEK293/HEK293T, the transcriptional activity of β -catenin, the LEF-1-luciferase activity of the reporter gene was significantly reduced; while after Scrib was stably reduced in the HEK293/HEK293T, the LEF-1-luciferase activity of the reporter gene was significantly increased. So we can conclude that Scrib can inhibit the transcriptional activity of β -catenin. We also found that Scrib could specially interact with β -catenin by endogenous Co-IP. Furthermore, in cellular separation experiments of HEK293/293T, we found after Scrib was stably reduced, total cellular β -catenin wasn't affected, while the cytoplasmic and nucleus β -catenin was increased. We showed Scrib could inhibit the nucleus entry of β -catenin. We herein demonstrate that the molecular mechanism between hScrib and β -catenin: Scrib could interact with β -catenin and inhibit the nucleus entry of β -catenin, thus inhibiting the downstream gene regulation of β -catenin.

Key words Scribble; β -catenin; LEF-1-luciferase; the nucleus entry

Received: January 5, 2010 Accepted: May 21, 2010

This work was supported by the Foundation of Science of China (No.30771960)

*Corresponding author. Tel: 86-21-54921337, E-mail: chenm@sibs.ac.cn