

## SF-1을 매개한 *CYP19*의 전사활성에 미치는 FOXL2 야생형과 돌연변이형의 차별적 영향

박미라<sup>1,§</sup> · 김아영<sup>1,§</sup> · 나순영<sup>1</sup> · 김홍만<sup>2</sup> · 이강석<sup>2</sup> · 배지현<sup>1,†</sup> · 고정재<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>CHA 의과대학 의생명대학 의생명과학과

<sup>2</sup>중앙대학교 자연과학대학 생명과학과

## Differential Activities of FOXL2 and Its Mutants on SF-1-Induced *CYP19* Transcriptional Activation

Mira Park<sup>1,§</sup>, Ahyoung Kim<sup>1,§</sup>, Soon-Young Na<sup>1</sup>, Hong-Man Kim<sup>2</sup>, Kangseok Lee<sup>2</sup>,  
Jehyeon Bae<sup>1,†</sup> and Jeong-Jae Ko<sup>1,†</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Biomedical Science, College of Life Science, CHA University, Seongnam 463-836, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Life Science, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

**ABSTRACT** : FOXL2 is a winged-helix/forkhead (FH) domain transcription factor, and mutations in FOXL2 gene are responsible for blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome (BPES). BPES is an autosomal dominant genetic disease. BPES type I patients exhibit both premature ovarian failure (POF) and eyelid malformation, while only the eyelid defect is observed in BPES type II. FOXL2-null ovaries showed a blockage of granulosa cell differentiation, suggesting that FOXL2 plays an essential role for proper ovarian folliculogenesis. Previously, we screened for FOXL2-interacting proteins and identified steroidogenic factor-1 (SF-1) which is known to be required for gonad development and transactivates steroidogenic enzymes including *CYP19*. In the present study, we demonstrated that FOXL2 transactivates *CYP19* and stimulated the transcriptional activation of *CYP19* induced by SF-1. In contrast, FOXL2 mutants found in BPES type I and II exhibited compromised abilities to enhance *CYP19* induction mediated by SF-1. Thus, this study provides a functional difference between wild-type FOXL2 and its mutants which may aid to understand pathophysiology of BPES elicited by FOXL2 mutations.

**Key words** : FOXL2, SF-1, POF, BPES, *CYP19*, Ovary.

**요 약** : FOXL2는 winged-helix/forkhead(FH) 도메인 전사인자로서 FOXL2 유전자에 돌연변이가 발생할 경우 blepharophimosis-ptosis-epicanthus inversus syndrome이라 불리는 BPES 질병이 유발되게 된다. BPES는 상염색체 우성인 유전적 질환이다. BPES type I의 환자는 조기난소부전증(POF)과 안검하수 증상이 함께 나타나는 반면, BPES type II의 경우 안검하수 및 소안검 등 안면기형만이 유발된다. FOXL2 단백질이 결여된 난소에서 granulosa 세포의 분화가 멈추는 것으로 보아 FOXL2가 정상적인 난소의 folliculogenesis에 필수적인 역할을 하고 있음을 시사한다. 이전의 연구 결과에서, 본 연구진은 FOXL2와 상호작용하는 단백질에 대한 스크리닝을 통해 스테로이드 합성효소인 *CYP19* 전사활성에 영향을 미치는 steroidogenic factor-1(SF-1)을 동정하였다. 이번 연구를 통해 FOXL2가 *CYP19*의 전사를 향상시키고, SF-1에 의한 *CYP19*의

전사를 더욱 촉진시킨다는 것을 증명하였다. 이와 반대로, BPES 타입 I과 II에서 발견된 FOXL2의 돌연변이형들은 SF-1에 의해 증가된 *CYP19*의 전사활성을 향상시키는 능력이 감소함을 보여주었다. 본 실험을 통해 FOXL2 돌연변이에 의해 유발되어지는 BPES 질환의 병리생리학적 이해에 대해 도움을 줄 수 있는 FOXL2의 야생형과 돌연변이형 사이의 서로 다른 기능적인 차이점을 규명하였다.

§ 본 연구에 동일한 기여를 하였음.

† 교신저자: 고정재, 경기도 성남시 분당구 야탑동 222번지 CHA 의과대학 의생명대학 의생명과학과. (우) 463-836, (전) 031-725-8375, (팩) 031-725-8350, E-mail: highko@cha.ac.kr

† 교신저자: 배지현, 경기도 성남시 분당구 야탑동 222번지 CHA 의과대학 의생명대학 의생명과학과. (우) 463-836, (전) 031-725-8377, (팩) 031-725-8350, E-mail: jehyeon@cha.ac.kr

## 서 론

FOXL2는 1998년에 최초로 확인된 forkhead(FH) 도메인 전사인자이다. FOX(Forkheadbox) family는 110개의 아미노산으로 이루어진 helix-turn-helix 구조의 DNA 결합 도메인을 가진다(Uhlenhaut & Treier, 2006). 또한 FOXL2는 2.7 kb의 단일 엑손으로 구성된 유전자이다. 인간과 쥐의 FOXL2 DNA 서열은 95% 이상의 상동성을 가진다(Beysen et al., 2004). 인간의 경우, 39개의 FH family가 보고되어 있으며, 이것은 생식선으로부터의 발달 과정, 세포주기 조절뿐 아니라 대사과정 등 생물학적인 과정에서 다양한 영향을 미친다.

조기 난소 부전증(premature ovarian failure: POF)은 1967년 40세 이전의 여성에게서 조기 폐경 현상을 보이는 질환으로서 Moraes-Ruehsen와 Jones에 의해 정의되어졌다(de Moraes-Ruehsen M & Jones, 1967). 또한 조기 난소 부전증 환자는 여성호르몬의 저하 현상을 보이며(김정옥 등, 2000), 약 1%의 빈도로 나타난다(HOEK A. et al., 1997). Blepharophimosis-epicanthus inversus syndrome(BPES)은 FOXL2 단백질의 heterozygous한 돌연변이에 의해 유발되어지는 질병으로 type I과 type II로 분류된다. BPES type I의 경우, 소안검, 안검하수 및 조기 난소 부전증이 유발되어진다. BPES type II의 경우, 조기 난소 부전증은 유발되지 않으며, 안면 이상 증후만 보인다(Beysen et al., 2004). FOXL2 단백질이 결여된 마우스 모델 실험을 통해, FOXL2가 결여된 난소에서는 granulosa 세포가 정상적으로 분화하지 못하여 난포 성숙 과정의 멈춤과 난자의 폐쇄증(atresia)을 유발하여(Uda et al., 2004; Pannetier et al., 2006) 결국엔 불임에 이른다는 것이 보고되어 있다. 또한 본 연구진의 이전 실험을 통해 FOXL2가 rat의 granulosa 세포에서 생식선의 발달에 중요한 역할을 하는 SF-1에 의한 CYP17의 전사활성을 억제시키는 것을 발견하였다(Park et al., 2010). 하지만 현재까지 난소의 발달 과정에서의 FOXL2에 대한 연구와 이해가 부족한 실상이다.

본 연구진은 FOXL2의 신호전달체계를 연구하기 위해 rat ovarian cDNA 라이브러리 스크리닝을 수행하여 FOXL2와 상호작용하는 단백질 중에서 SF-1을 발견하였다. SF-1의 knockout mice는 생식선과 부신이 없고 뇌하수체에 gonadotrope이 발현하지 않음을 볼 때 생식기의 형성에 필수적인 단백질이다(Luo et al., 1994). SF-1은 CYP11A, CYP17,

CYP19 그리고 StAR 등을 포함하는 대부분의 steroidogenic enzyme의 promoter에 결합하는 전사인자로서 이들의 발현을 조절한다(Paker et al., 2002). SF-1은 성숙 또는 미성숙된 rodent 난소의 theca, interstitial, granulosa 세포의 핵에서 발현하며, 특히 atretic한 세포보다 건강한 세포에서 발현이 증가하며, 난소에서 estrogen, PMSG, FSH 등의 호르몬에 의해 up-regulation 되는 단백질이다(Falender et al., 2003). SF-1이 conditionally knockout된 쥐 암컷은 sterile하며, 이들의 난소는 estrogen receptor와 aromatase knockout 쥐에서 관찰된 phenotype과 동일하게 corpus lutea가 없으며 hemorrhagic cyst가 발견되었으므로, 난소에서의 SF-1의 필수적인 역할을 증명하였다(Jeyasuria et al., 2004).

FOXL2는 태아 및 성인의 난소 및 눈꺼풀에서 발현한다고 보고되어져 있으며, 세포의 핵 속에서 발현하는 전사조절 인자이다. 또한 여성의 생식선의 발달에 있어 초기단계에서 발현하며, follicular, stromal 세포의 핵에서 발현한다는 것이 보고되어 있다(Cocquet et al., 2002). 지금까지의 연구결과를 통해 FOXL2는 난소 발달 정도에 대한 마커로 인식되어져 오고 있고, FOXL2의 표적 단백질에 대한 연구는 난소의 발달과 기능 연구에 적합하다고 알려져 있다. FOXL2가 granulosa 세포의 분화 마커인 StAR의 전사활성을 억제한다고 보고되었다(Pisarska et al., 2004). FOXL2 단백질에 돌연변이가 생길 경우, StAR에 대한 전사억제 능력은 낮아지며, granulosa 세포의 분화가 급격히 증가되어 난포의 조기 소진을 유도하고, 결국 조기 난소 부전증이 유발됨을 예측할 수 있다. FOXL2는 granulosa 세포의 조기 성숙 분화를 억제함으로써, 원시난포의 개수를 조절하고 조기 고갈을 방지한다(Pisarska et al., 2004). 또한 본 연구진은 지난 연구를 통해 FOXL2의 SF-1에 의해 매개된 CYP17의 증가된 전사활성에 대한 억제작용을 밝혔다(Park et al., 2010). 이는 FOXL2가 steroidogenesis의 조절에 중요한 역할을 한다는 사실을 뒷받침하고 있다.

이번 연구를 통하여 우리는 steroidogenesis 과정 중 C<sub>19</sub> steroids로부터 estrogens의 형성을 촉매하는 cytochrome P<sub>450</sub>(aromatase)을 coding하는 CYP19 유전자의 전사가 SF-1에 의해 up-regulation된다는 것을 규명하였고, FOXL2와 SF-1 단백질이 아마도 결합 파트너로 작용해 더욱더 CYP19 유전자의 전사를 증가시키며, BPES 환자로부터 발견된 FOXL2 돌연변이형은 CYP19 전사를 증가시키는 능력이 FOXL2 야생형에 비해 감소시키는 것을 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 프라이머 제작 및 클로닝

FOXL2 야생형 및 돌연변이 형(1-52 a.a과 1-218 a.a) 플라스미드 DNA의 제작방법은 앞서 발표된 논문에서 언급하였다(Park et al., 2010). 돌연변이 G269R과 N109K형은 FOXL2 F, G269R F-(5'-CCCCGGCGTAGTGAATC-GT), G269R R-(5'-ACTACGCCGGGGGGCAGCGCCAT), FOXL2 R, N109K F-(5'-CCTCAAAGAGTGCTTCATCA-AGGT)과 N109K R-(5'-AAGCACTCTTTGAGGCTGAG-GTTG) primer를 사용하여 recombinant PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR산물을 EcoRI과 XhoI(Enzymomics, Korea) 제한 효소를 사용하여 pCMV Myc-tagged vector(Clontech, USA)와 ligation을 하였다. 그리고 human genomic DNA를 주형으로 하고 F-(5'-CCGACGCGTACTGAAATGCATT-AATGATGAC), R-(5'-CCGCTCGAGAGTACAGATTCA-CTTACTGTT)의 primer를 이용하여 CYP19 promoter cloning을 하기 위해 PCR을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 MluI and XhoI(Enzymomics) 제한 효소를 사용하여 pGL3 basic vector(Promega)와 ligation 과정을 거쳐 DH5  $\alpha$ 의 competent cell에 형질전환을 하였다. 클로닝된 constructs는 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 시퀀싱 반응을 진행하였다.

### 2. 세포 배양

Human granulosa 세포(KGN)를 10% fetal bovine serum (FBS)(Welgene, Korea)와 1% penicillin-streptomycin(Welgene)이 함유된 DMEM/F12 medium(Welgene)에 배양하였다. KGN 세포를 Yoshihiro Nishi와 Toshihiko Yanase(Kyushu University, Japan)에서 제공해 주었다.

### 3. Luciferase Assay

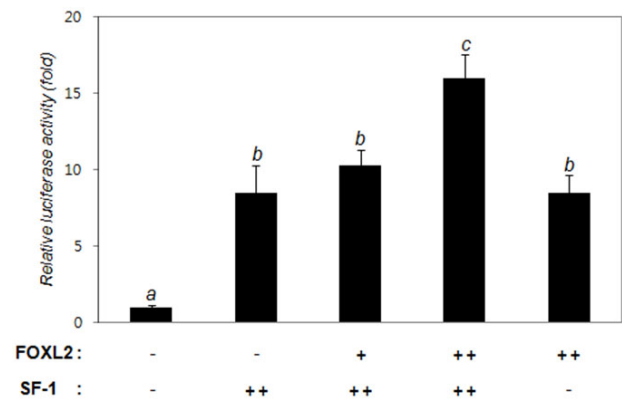
KGN을 12 well plate를 사용하여 well 당  $4 \times 10^5$ 의 세포에 170 ng의 pCMV-galactosidase 플라스미드 DNA(Clontech), 300 ng의 CYP19 luciferase reporter DNA와 FOXL2 또는 SF-1 coding DNA를 MicroPorator MP-100(Invitrogen, USA)을 이용하여 transfection한 뒤, DMEM/F12 medium에 36시간 동안 배양하였다. PBS로 washing 과정을 거친 후 100  $\mu$ l

well의 Cell Lysis Buffer(Promega, USA)에 lysis시켰다. Luciferase 활성은 Luciferase Assay System kit(Promega)를 사용하여 측정하였으며,  $\beta$ -galactosidase 활성에 대해 표준화시켰다. 흡광도 측정은 PerkinElmer 1420 Multilabel Counter (PerkinElmer, USA)를 이용하였다.

## 결 과

### 1. Luciferase Assay를 통한 FOXL2의 SF-1에 의해 매개된 CYP19 Promoter 전사활성에 미치는 영향 확인

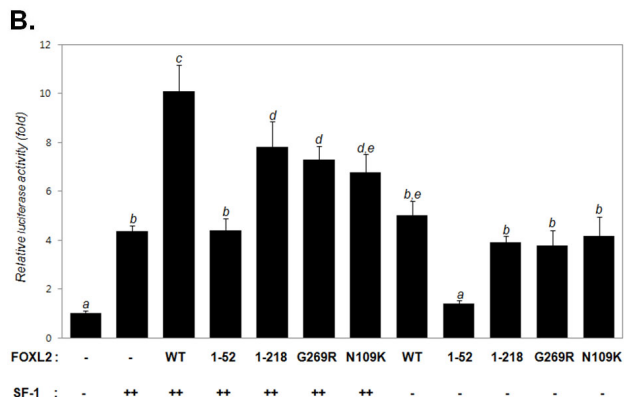
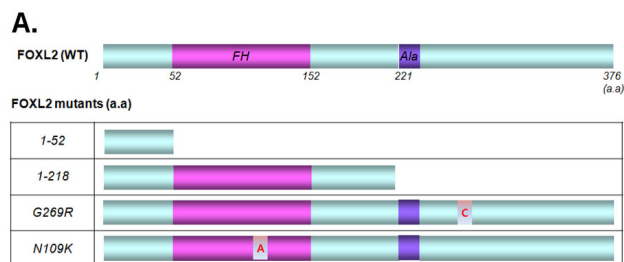
KGN에 SF-1과 CYP19 promoter를 과발현하였다. 또한 FOXL2 야생형을 dose-dependent하게 과발현시켜 CYP19의 전사활성 정도를 알아보았다. 과발현시킨 KGN 세포를 36시간 배양 뒤 promoter의 전사활성을 측정하였다. 그 결과, 단독으로 과발현시킨 SF-1과 FOXL2가 CYP19의 전사활성을 증가시킨다는 것을 알 수 있었고, SF-1과 FOXL2를 dose-dependent하게 과발현시켰을 때 FOXL2에 의해서 SF-1에 의한 CYP19의 전사활성이 더욱 더 증가됨을 확인하였다. 이로써 인간의 granulosa 세포인 KGN에서 CYP19 promoter에 SF-1과 FOXL2 단백질이 promoter 부위에 결합하여 CYP19의 전사활성을 증가시킨다는 것을 알게 되었다 (Fig. 1).



**Fig. 1. Stimulatory role of FOXL2 on SF-1-induced CYP19 promoter activation.** Overexpression of FOXL2 augmented the transcriptional activity of SF-1-induced CYP19 promoter in a dose-dependent manner in KGN cells as determined by luciferase activity. Three independent experiments were performed in duplicate, and the data were expressed as the mean $\pm$ SEM. Statistically significant differences between groups are denoted by different letters( $p < 0.05$ ).

## 2. FOXL2 야생형과 돌연변이형의 SF-1에 의해 매개된 CYP19 Promoter의 전사활성에 대해 미치는 서로 다른 영향 확인

KGN에 SF-1과 FOXL2 야생형, BPES type I의 환자에서 발견된 돌연변이인 FH 도메인 또는 alanine rich 지역이 없는 짧은 형태의 1-52 a.a, 1-218 a.a 돌연변이, 그리고 BPES type II의 환자에서 발견된 단일의 nucleotide가 바뀐 돌연변이형인 G269R과 N109K(Fig. 2A)을 과발현시킨 후 CYP19 promoter의 전사활성에 어떤 영향을 미치는지 알



**Fig. 2. Generation of FOXL2 mutants, and comparison of their transcriptional activities.** (A) Schematic presentation of wild-type and mutant FOXL2 proteins. The mutants 1-52 a.a and 1-218 a.a type are found from BPES type I patients, while the G269R and N109K mutants are found from BPES type II patients. (B) Differential activities of FOXL2 wild-type and its mutants on the activation of SF-1-induced CYP19 transcription. KGN cells were over-expressed with the same amount of plasmids, and luciferase activities in fold were shown. The activities of FOXL2 constructs on SF-1-mediated CYP19 transactivation in KGN cells were measured. FOXL2 WT and mutants from BPES type I (1-52 a.a, 1-218 a.a) and II (G269R, N109K) were tested. Two independent experiments were performed in triplicate, and the data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Statistically significant differences between groups are denoted by different letters ( $p < 0.05$ ).

아보았다. 우선, 단독으로 과발현시킨 야생형 및 돌연변이형 FOXL2에 의한 CYP19의 전사 정도는 1-52 a.a의 짧은 돌연변이형을 제외한 나머지 FOXL2 단백질은 CYP19의 전사를 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 그러나 돌연변이형 모두 야생형에 비교하여 전사 증가 정도가 낮음을 확인하였다(Fig. 2B). 또한 DNA binding 도메인이라 알려진 FH 도메인이 없는 1-52 a.a형의 돌연변이의 경우, CYP19의 전사활성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(Fig. 2B). 이것으로 보아 FOXL2의 FH 도메인이 다른 단백질과의 상호작용에 역할을 한다는 사실을 다시 한 번 확인하였다. FOXL2를 SF-1과 같이 과발현시켰을 경우, 예상대로 FOXL2 야생형에 의한 SF-1에 매개된 CYP19의 전사가 더욱 증가되는 시너지 효과를 확인하였고, 나머지 돌연변이형의 경우에서도 야생형의 활성보다는 낮지만 SF-1에 의한 CYP19의 전사를 증가시킨다는 것을 확인하였다(Fig. 2B).

## 고찰

FOXL2 돌연변이가 2001년 POF 환자에서 발견이 되었지만(Crisponi et al., 2001), FOXL2의 타겟 유전자와 신호 전달 체계에 대한 이해는 현재까지 부족한 실상이다. 이 실험을 통하여 인간의 FOXL2 단백질과 SF-1은 상호작용하며, steroidogenic enzyme인 CYP19의 SF-1에 의한 전사 활성을 조절함을 확인하였으며, 반면에 환자에서 보고된 FOXL2 돌연변이는 야생형의 FOXL2에 비하여 ovarian 세포에서 SF-1에 의한 CYP19의 전사활성을 촉진하지 못함을 규명하였다.

Nuclear receptor superfamily 중 하나인 SF-1은 steroidogenic organs의 steroid 합성 pathway에서 다양한 효소들을 조절한다. CYP19A1, P450AROM 또는 aromatase라고도 알려진 steroidogenic enzyme CYP19은 cytochrome P450 superfamily 중 하나인 효소로 testosterone을 estradiol로 전환시키는 성분화에 있어서 중요한 역할을 하는 효소이다. 이전 연구를 통해 SF-1 단백질이 생식선에서 steroidogenesis를 조절하는 중요한 매카니즘인 gonadotropin에 대한 steroidogenic 유전자의 promoter에 대한 결합 능력을 가지고 있다고 알려져 있다. 또한 인간의 granulosa 세포에서 SF-1이 CYP19 promoter에 결합한다는 것이 보고되었고(Gurates et al., 2003), CYP19를 비롯하여 StAR, CYP11A, 3 $\beta$ -HSD type 2 그리고 CYP17

를 포함한 인간의 steroidogenic 유전자의 활성을 조절한다고 알려져 있다(Michael et al., 1995; Sugawara et al., 1996; Leers-Sucheta et al., 1997; Hanley et al., 2001). 이것으로 미루어 보아, SF-1의 활성은 난소에서 성분화 및 발달에 대한 조절에 있어서 필수적이라고 말할 수 있다. 그러나 현재까지 난소에서 SF-1의 작용은 많이 알려져 있지 않다. 이번 연구에서, 우리는 인간의 granulosa 세포에서의 SF-1에 의한 CYP19의 전사활성을 증명하였다.

Granulosa 세포 특이적인 SF-1이 knock out된 mice는 불임이고, 적은 수의 follicles을 가지며, 황체가 결여되어 있으며, 출혈된 피낭을 가진다(Jeyasuria et al., 2004). 이것은 SF-1이 난소에서 estrogen의 생산물에 대해 가능하게 하는 필수적인 역할을 한다는 것을 의미한다. SF-1은 설치류의 pre-ovulatory follicles에서 발현하며, gonadotropins에 의해 조절된다(Falender et al., 2003). 그러므로, SF-1은 steroidogenesis에 연관된 효소들의 발현 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 본 연구진은 선행 연구를 통해 인간의 granulosa 세포에서 FOXL2 단백질과 SF-1 단백질이 상호 작용한다는 사실을 밝혔으며, 이러한 결합 작용에 FOXL2의 FH 도메인이 관여한다는 사실을 알았다. 또한 electrophoretic mobility shift assays(EMSA)를 수행하여 FOXL2에 의해 SF-1과 CYP19 promoter의 결합이 더욱 증가한다는 것을 알았다(Park et al., 2010). 본 연구를 통해 FOXL2가 SF-1이 매개된 CYP19 전사의 활성을 증가시킨다는 것을 확인하였다. 그러나 BPES 환자에게서 발견되는 돌연변이형의 FOXL2는 SF-1이 매개된 CYP19의 전사활성에 대해 야생형보다 약한 결합 파트너로서의 낮은 전사활성 정도를 보이거나 별 차이를 보이지 않았다. 이것으로 보아 FOXL2는 SF-1과 결합 파트너로서 CYP19의 전사를 더욱 더 증가시키는 역할을 한다고 추측할 수 있다. 또한 FOXL2가 CYP19 유전자의 직접적인 활성인자라는 것을 제시해 주는 연구도 보고되었다(Pannetier et al., 2006). 최근, Nagahama 그룹에서는 tilapia라는 어류의 sf-1과 foxl2 단백질이 in vitro 상에서 연관이 있음을 발표하였는데, foxl2가 Cyp19a1, 즉 aromatase를 촉진시키고, 나아가 mouse testicular cell line인 TM3에서 sf-1-유도 Cyp19a1 전사활성을 향상시킨다는 것을 발견하였다. 또한 HEK 293 세포에서 medaka P450c17s에서 sf-1의 전사활성은 medaka foxl2에 의해 향상됨이 보고되었다(Zhou et al., 2007).

현재, CYP19 promoter에 대한 SF-1의 결합을 FOXL2가 어떻게 증가시키지는 명확하지 않다. 그러나 이전 연구를 통해 FOXL2의 DNA binding 도메인이 SF-1과 상호작용하기 위해 필수적임을 발견하였고, SF-1과 FOXL2의 결합은 아마도 CYP19과 SF-1의 연관에 영향을 미친다. 동시에, FOXL2와 SF-1 단백질의 결합은 SF-1의 고유한 전사적인 활성에 대해 필수적일지도 모르는 SF-1과 다른 유전자 사이의 연관에 또한 영향을 미칠 것이다.

Poly-Ala tract 이전에 발생된 돌연변이가 frame-shift를 유발하여 truncate 된 FOXL2는 BPES typeI과 연관되어 있고, 반면에 주로 poly-Ala tract이 확장되어 elongate된 FOXL2는 BPES typeII와 관련되었다(De Baere et al., 2003). 이러한 예측은 현재 서로 다른 형태의 FOXL2로 수행한 luciferase reporter assay 결과와 일치한다. SF-1이 매개된 CYP19의 활성에서 FOXL2 야생형에 의해 전사의 증가를 수반하고 FH 도메인과 poly-Ala tract이 결여된 돌연변이(1-52 a.a)형은 CYP19 전사활성을 증가시키는데 실패하였다. 반면에 FH 도메인과 Ala 반복을 가지는 다른 FOXL2 돌연변이는 CYP19 전사활성을 증가시키는 능력을 가지고는 있지만 야생형보다 약화됨을 확인하였다. 결과에 근거하여, FOXL2의 FH 도메인은 FOXL2와 SF-1의 결합에 의한 CYP19의 전사를 더욱 증가시킴에 관련된 필수적인 도메인이라 말할 수 있다.

POF는 복합적인 질병이며, 대부분 POF의 원인은 개인 특유의 고유성을 가지고 매우 heterogeneous하기 때문에(Simpson, 2008), 병리생리학적인 측면을 이해하기는 부족한 실상이다. 최근, 다양하게 유전적으로 변형된 POF mouse 모델이 확립되어졌으며 여성의 ovarian failure를 이해하는데 도움을 줄 것이라 기대한다. 유전자가 결여된 mouse 모델이 ovarian failure 모습을 보임에도 불구하고, 난소의 정상적인 기능에 대해 영향을 미치는 근원적인 기작은 매우 heterogeneous하다(Matzuk & Lamb, 2002; Simpson, 2008; Jagarlamui et al., 2009). FOXL2 결핍 마우스의 경우, premature follicle의 활성을 이끄는 granulosa 세포 분화의 실패로 인해 POF를 유발하는 것으로 알려져 있다(Schmidt et al., 2004).

본 연구팀은 이전 연구에서 인간의 난소 세포에서 SF-1이 FOXL2의 내재적인 결합 파트너임을 규명하였다. 본 연구에서 FOXL2는 granulosa 세포에서 CYP19의 전사적 활성 증가를 이끄는 SF-1의 결합 파트너로서 기능하고, 반면에 POF

를 유발하는 BPES 환자에게서 발견되는 돌연변이화된 FOXL2는 FOXL2 야생형에 비해 SF-1에 의해 유도되는 *CYP19* 전사에 대한 증가 기능이 약화되는 사실을 확인할 수 있었다. 현재의 연구는 FOXL2가 SF-1의 타겟 유전자의 전사활성 조절 기능에 영향을 줄 수 있음을 제시해 주고 있으나, 동시에 상보적으로 SF-1이 FOXL2의 알려지지 않은 어떠한 타겟 유전자를 조절할 수 있는 가능성 또한 배제할 수 없으며, 따라서 추가적인 연구 수행이 요구된다.

### 감사의 글

This work was supported by the Korea Research Foundation Grants(KRF-2007-311-E00288) funded by the Korean Government(MOEHRD, Basic Research Promotion Fund).

### 인용문헌

- Beysen D, Vandesompele J, Messiaen L, De Paepe A, De Baere E (2004) The human FOXL2 mutation database. *Hum Mutat* 24:189-193.
- Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G (2001) The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27:159-166.
- Cocquet J, Pailhoux E, Jaubert F, Servel N, Xia X, Pannetier M, De Baere E, Messiaen L, Cotinot C, Fellous M, Veitia RA (2002) Evolution and expression of FOXL2. *J Med Genet* 39:916-922.
- De Baere E, Beysen D, Oley C, Lorenz B, Cocquet J, De Sutter P, Devriendt K, Dixon M, Fellous M, Fryns JP, Garza A, Jonsrud C, Koivisto PA, Krause A, Leroy BP, Meire F, Plomp A, Van Maldergem L, De Paepe A, Veitia R, Messiaen L (2003) FOXL2 and BPES: mutational hotspots, phenotypic variability, and revision of the genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 72:478-487.
- de Moraes-Ruehsen M, Jones GS (1967) Premature ovarian failure. *Fertil Steril* 18:440-461.
- Falender AE, Lanz R, Malenfant D, Belanger L, Richards JS (2003) Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary. *Endocrinology* 144:3598-3610.
- Gurates B, Amsterdam A, Tamura M, Yang S, Zhou J, Fang Z, Amin S, Sebastian S, Bulun SE (2003) WT1 and DAX-1 regulate SF-1-mediated human P450arom gene expression in gonadal cells. *Mol Cell Endocrinol* 208:61-75.
- Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL (2001) Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: Potential interactions in gene regulation. *Mol Endocrinol* 15:57-68.
- Hoek A, Schoemaker J, Drexhage HA (1997) Premature ovarian failure and ovarian autoimmunity. *Endocr Rev* 18:107-134.
- Jagarlamudi K, Liu L, Adhikari D, Reddy P, Idahl A, Ottander U, Lundin E, Liu K (2009) Oocyte-specific deletion of Pten in mice reveals a stage-specific function of PTEN/PI3K signaling in oocytes in controlling follicular activation. *PLoS One* 4:e6186.
- Jeyasuria P, Ikeda Y, Jamin SP, Zhao L, De Rooij DG, Themmen AP, Behringer RR, Parker KL (2004) Cell-specific knockout of steroidogenic factor 1 reveals its essential roles in gonadal function. *Mol Endocrinol* 18:1610-1619.
- Leers-Sucheta S, Morohashi K, Mason JI, Melner MH (1997) Synergistic activation of the human type II 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase promoter by the transcription factor steroidogenic factor-1/adrenal 4-binding protein and phorbol ester. *J Biol Chem* 272:7960-7967.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL (1994) A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481-490.

- Matzuk MM, Lamb DJ (2002) Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat Cell Biol Suppl*:s41-49.
- Michael MD, Kilgore MW, Morohashi K, Simpson ER (1995) Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P<sub>450</sub> (*CYP19*) gene in the ovary. *J Biol Chem* 270:13561-13566.
- Pannetier M, Fabre S, Batista F, Kocer A, Renault L, Jolivet G, Mandon-Pépin B, Cotinot C, Veitia R, Pailhoux E (2006) FOXL2 activates P<sub>450</sub> aromatase gene transcription: towards a better characterization of the early steps of mammalian ovarian development. *J Mol Endocrinol* 36:399-413.
- Park M, Shin E, Won M, Kim JH, Go H, Kim HL, Ko JJ, Lee K, Bae J (2010) FOXL2 interacts with steroidogenic factor-1 (SF-1) and represses SF-1-induced *CYP17* transcription in granulosa cells. *Mol Endocrinol* 24:1024-1036.
- Parker KL, Rice DA, Lala DS, Ikeda Y, Luo X, Wong M, Bakke M, Zhao L, Frigeri C, Hanley NA, Stallings N, Schimmer BP (2002) Steroidogenic factor 1: An essential mediator of endocrine development. *Recent Prog Horm Res* 57:19-36.
- Pisarska MD, Bae J, Klein C, Hsueh AJ (2004) Forkhead 12 is expressed in the ovary and represses the promoter activity of the steroidogenic acute regulatory gene. *Endocrinology* 145:3424-3433.
- Schmidt D, Ovitt CE, Anlag K, Fehsenfeld S, Gredsted L, Treier AC, Treier M (2004) The murine winged-helix transcription factor Foxl2 is required for granulosa cell differentiation and ovary maintenance. *Development* 131:933-942.
- Shapiro DB, Pappalardo A, White BA, Peluso JJ (1996) Steroidogenic factor-1 as a positive regulator of rat granulosa cell differentiation and a negative regulator of mitosis. *Endocrinology* 137:1187-1195.
- Simpson JL (2008) Genetic and phenotypic heterogeneity in ovarian failure: Overview of selected candidate genes. *Ann N Y Acad Sci* 1135:146-154.
- Sugawara T, Holt JA, Kiriakidou M, Strauss JF 3rd (1996) Steroidogenic factor 1-dependent promoter activity of the human steroidogenic acute regulatory protein (StAR) gene. *Biochemistry* 35:9052-9059.
- Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G (2004) Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13:1171-1181.
- Uhlenhaut NH, Treier M (2006) Foxl2 function in ovarian development. *Mol Genet Metab* 88:225-234.
- Zhou LY, Wang DS, Shibata Y, Paul-Prasanth B, Suzuki A, Nagahama Y (2007) Characterization, expression and transcriptional regulation of P450c17-I and -II in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem Biophys Res Commun* 362:619-625.
- 김정옥, 엄혜원, 이형송, 송건지, 천강우, 박용석, 김계현 (2000) 조기 난소 부전증(Premature Ovarian Failure, POF) 환자에서 난포 자극 호르몬 수용체 유전자 변이 및 발현 양상에 대한 분석. *발생과 생식* 4:61-66.

---

(received 9 March 2010, received in revised form 28 April 2010, accepted 29 April 2010)