

Direct Interaction Between Akt1 and Gcn5 and its Plausible Function on *Hox* Gene Expression in Mouse Embryonic Fibroblast Cells

Ji Hoon Oh, Youra Lee, Kyoung-Ah Kong and Myoung Hee Kim[†]

Department of Anatomy, Embryology Laboratory, and Brain Korea 21 project for Medical Science,
Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

Hox genes encode transcription factors important for anterior-posterior body patterning at early stages of embryonic development. However, the precise mechanisms by which signal pathways are stimulated to regulate *Hox* gene expression are not clear. In the previous study, protein kinase B alpha (Akt1) has been identified as a putative upstream regulator of *Hox* genes, and Akt1 has shown to regulate Gcn5, a prototypical histone acetyltransferase (HAT), in a negative way in mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. Since the activity of HAT such as the CBP/p300, and PCAF (a Gcn5 homolog), was down-regulated by Akt through a phosphorylation at the Akt consensus substrate motif (RXRXXS/T), the amino acid sequence of Gcn5 protein was analyzed. Mouse Gcn5 contains an Akt consensus substrate motif as RQRSQS sequence while human Gcn5 does not have it. In order to see whether Akt1 directly binds to Gcn5, immunoprecipitation with anti-Akt1 antibody was carried out in wild-type (WT) mouse embryonic fibroblast (MEF) cells, and then western blot analysis was performed with anti-Akt1 and anti-Gcn5 antibodies. Gcn5 protein was detected in the Akt1 immunoprecipitated samples of MEFs. This result demonstrates that Akt1 directly binds to Gcn5, which might have contributed the down regulation of the 5' *Hoxc* gene expressions in wild type MEF cells.

Key word: *Hox* genes, Akt1, HAT, Gcn5

Hox 단백질은 세포내 반응을 조절하는 전사인자로 동물의 배아 형태형성 과정 중에서 매우 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다 (Favier and Dolle, 1997). 현재 포유류와 같은 고등동물에서는 39개의 *Hox* 유전자가 보고되어져 있으며 이들 유전자들은 서로 다른 네 개의 염색체 위에 집합체, 즉 cluster (*Hoxa*, *-b*, *-c*, *-d* cluster)를 이룬 형태로 존재하고 있다. 각각의 *Hox* cluster에는 13개의 paralogous group이 1번부터 13번까지 3'에서 5' 방향으로 위치하고 있으며, 각 paralogous 유전자들은 각각 독자적으로 진화를 거치면서 조금씩 변형되거나 없어지기도 하여 현재 각 cluster에는 약 10여 개의 *Hox* 유전자들 (*Hoxa*,

11개; *Hoxb*, 10개; *Hoxc*, 9개; *Hoxd*, 9개)로 구성되어져 있다 (Pearson et al., 2005). 흥미있는 점은 동물의 발생과정 중 *Hox* 유전자들이 시·공간특이적으로 collinear하게 발현을 한다는 점인데, 한 cluster 안에서 가장 3'쪽에 위치한 paralogous *Hox* 유전자들이 발생과정에서 더 머리쪽 (anterior)에서 그리고 더 먼저 발현하고 점점 더 5'쪽에 위치하는 paralogous gene들이 순서대로 점점 더 꼬리쪽에서 그리고 좀 더 나중에 발현하면서 배아의 전후축 (머리-꼬리축)을 따라 형태를 형성하는데 있어 매우 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다 (Deschamps and van Nes 2005; Lin et al., 2008).

Hox 유전자의 발현은 히스톤변형 (histone modification), DNA 메틸화, 그리고 small RNAs, chromatin structure 등과 같은 후성유전학적 변형 (epigenetic modification)에 의해 조절된다고 알려져 있다 (Barber and Rastegar, 2010; Min et al., 2012). 특히 히스톤변형 중에서도 히스톤아세틸화 (histone acetylation)는 유전자의 발현을 증진시키는 대표적인 기작으로 잘 알려져 있으며 (Lin

*Received: September 16, 2013 / Revised: September 27, 2013

Accepted: September 27, 2013

[†]Corresponding author: Myoung Hee Kim. Department of Anatomy, Embryology Laboratory, and Brain Korea 21 project for Medical Science, Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea. Tel: +82-2-2228-1647, Fax: +82-2-365-0700

e-mail: mhkim1@yuhs.ac

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

et al., 2007), 가장 대표적인 히스톤아세틸화효소 (histone acetyltransferase, HAT)인 Gcn5의 경우 H3K9 (histone 3 단백질의 9번째 아미노산인 lysine), H3K14, H3K18, H3K23 등을 아세틸화시키며, 유전자의 전사를 증진시키는 역할을 한다고 보고되어 있다 (Jin et al., 2011). 또한 돌연변이 생쥐를 이용한 실험 결과에 의하면 Gcn5가 생쥐의 발생 과정 중 *Hox* 유전자의 발현을 조절함으로써 생쥐의 골격 형성에 중요한 역할, 즉 전후측 상에서 서로 다른 골격의 형태를 만드는 데 중요한 기능을 수행한다고 보고된 바 있다 (Lin et al., 2008). 최근 보고에 의하면 human에서 또 다른 히스톤아세틸화효소인 CBP, p300등이 Akt에 의해 인산화되어 그 활성상태가 조절된다고 보고되어 있다. 이러한 아세틸화효소들은 공통적으로 Akt에 의해 인식되는 RXXRXXS/T 서열 (R, arginine; X, 불특정 아미노산; S/T, serine 또는 threonine)을 갖고 있다고 알려져 있으며 Akt에 의해 인산화되면 그 활성이 감소되어 히스톤아세틸화효소로서의 activity가 저하되고, 인산화되지 않으면 활성상태가 그대로 유지되는 것으로 알려져 있다 (Drendall et al., 2010). 그러나 human GCN5의 경우 RXXRXXS/T 서열을 갖고 있지 않으며 (Liu et al., 2013), Akt에 의해 인산화되어 활성상태가 조절된다는 보고는 아직 없는 상황이다.

최근 본 연구실에서는 *Hox* 유전자 발현조절에 관여하는 Gcn5의 protein stability가 *Hox* 유전자의 상위조절인자로 알려진 Akt1 (Kong et al., 2013)에 의해서 mouse embryonic fibroblast (MEF)에서 네거티브하게 조절된다고 보고한 바 있다 (Lee et al., 2012). 이것은 Akt1에 의해서 mouse Gcn5의 활성이 조절될 수도 있다는 가능성을 제시하여 주므로 본 연구에서는 이를 증명하고자 MEF에서 Akt1과 Gcn5 사이의 상호작용관계를 규명하고자 하였다.

앞서 언급한 것처럼 human GCN5에는 Akt에 의해 특이적으로 인식되어 인산화되는 모티프인 RXXRXXS/T 서열이 존재하지 않는다. 그러나 mouse Gcn5의 경우 이러한 서열이 존재하는지 아직 알려져 있지 않다. 따라서 먼저 mouse Gcn5에 Akt에 의해서 인산화될 수 있는 특정모티프가 존재하는지를 분석하고자 human과 mouse에 존재하는 Gcn5 단백질의 1차 아미노산 서열 (ExpPASy, <http://www.expasy.org/>)을 이용하여 비교 분석 하였다. 그 결과 human Gcn5에는 존재하지 않던 RXXRXXS/T 서열이 생쥐의 단백질에서는 아미노산서열 272번째에서 277번째에 걸쳐 RQRSQS의 형태로 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1). 그리고 더욱 흥미로운 것은 human과 mouse Gcn5의 sequence identity가 약 97%로 그 서열이 때

우 유사함에도 불구하고 이런 특정 모티프의 유무가 존재한다는 점이며, 이러한 결과로부터 사람에서와는 달리 생쥐의 경우 Gcn5 단백질이 Akt에 의해서 인산화될 수도 있을 것이라는 것을 유추해 볼 수 있다.

다음으로 mouse Gcn5의 RQRSQS 서열이 실제로 Akt1에 의해서 인산화되는지 알아보기 위하여 우선 Gcn5와 Akt1 사이에 물리적인 결합이 존재하는지를 확인하였다. 먼저 발생 13.5일 (E13.5) 배자로부터 분리해서 얻은 MEF cell을 10% FBS (Fetal bovine serum; WelGENE Inc., Korea)와 1X penicillin-streptomycin (WelGENE Inc., Korea)이 포함되어 있는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium; WelGENE Inc., Korea) 배지로 150 × 25 mm cell culture vessel에 담아 37°C, 5% CO₂ 환경의 인큐베이터에서 배양하였다. MEF cell이 culture vessel의 약 90% 정도까지 찼을 때, 1X PBS로 두 번 세척하고 세포를 수확하였다. NP-40 Lysis Buffer (50 mM Tris-Cl, pH8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40 and 1X Protease Inhibitor Cocktail)를 사용하여 세포를 lysis 한 다음 BCA Protein Assay Kit (Thermo, Waltham, MA, USA)를 이용하여 단백질을 정량하였다. MEF cell lysate 5 mg을 최종 부피 10 ml가 되도록 15 ml tube에 넣어준 다음, Akt1 antibody (2967L, Cell signaling, Danvers, MA, USA)와 control로 normal rabbit IgG (SC-2027, Santa Cruz Biotechnology)를 각각 첨가하고 4°C에서 한 시간 동안 반응시킨 후 Protein A/G PLUS-Agarose beads를 넣고 하룻밤 반응시켰다. 4°C, 2500 rpm (1000xg)으로 5분간 원심분리한 다음 NP-40 Lysis Buffer를 사용하여 5분씩 5회 세척하고, 3X SDS gel-loading buffer (150 mM Tris-Cl, pH 6.8, 300 mM dithiothreitol, 6% SDS, 0.3% bromophenol blue, 30% glycerol)를 첨가한 다음 95°C에서 10분간 끓여주었다. 각각의 샘플들과 MEF cell lysate (Input)를 8% SDS-PAGE gel 상에서 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, PVDF membrane으로 transfer하였다. PVDF membrane을 5% BSA solution (1X PBST)으로 상온에서 한 시간 동안 blocking한 다음 Akt1과 Gcn5를 검출할 수 있는 primary antibody (Akt1 antibody, 2938S; Gcn5 antibody, 3305S, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)를 사용하여 4°C에서 하룻밤 반응시키고 1X PBST로 5분씩 5회에 걸쳐 세척한 다음 secondary antibody인 Goat anti-rabbit IgG (ab6721, abcam)를 첨가하여 한 시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 1X PBST로 5분씩 5회에 걸쳐 세척한 다음 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate

MAEPSQAPTP	APAAQPRFLQ	SPAPAPTPTP	APSPASAPIP	TPTPAPAPAP	50
*****	*****	*****	*****	*****	
MAEPSQAPNP	VPAAQPRPLH	SPAPAPTSTP	APSPASASTP	APTAPAPAPAP	50
AAAPAGSTGT	GGPGVGSGBA	GSGGDPARPG	LSQQORASQR	KAQVRGLPRA	100
*****	*****	*****	*****	*****	
AAAPAGSTGS	GGAGVSGG-	---DPARPG	LSQQORASQR	KAQVRGLPRA	95
KKLEKLGVFS	ACKANETCKC	NGWKNPKPPT	APRMDLQOPA	ANLSELCRSC	150
*****	*****	*****	*****	*****	
KKLEKLGVFS	ACKANETCKC	NGWKNPKPPT	APRMDLQOPA	ANLSELCRSC	145
EHPLADHVSH	LENVSEDEIN	RLLGMVVDVE	NLFMSVHKEE	DTDTKQVIFY	200
*****	*****	*****	*****	*****	
EHPLADHVSH	LENVSEDEIN	RLLGMVVDVE	NLFMSVHKEE	DTDTKQVIFY	195
LFKLLRKCIL	QMTRPVVEGS	LGSPPFEKPN	IEQGVLFVQ	YKFSHLAPRE	250
*****	*****	*****	*****	*****	
LFKLLRKCIL	QMTRPVVEGS	LGSPPFEKPN	IEQGVLFVQ	YKFSHLAPRE	245
RQTMFELS KM	FLLCLNYWKL	ETPAQFRQRS	QAEDVATYKV	NYTRWLCYCH	300
*****	*****	*****	*****	*****	
RQTMFELS KM	FLLCLNYWKL	ETPAQFRQRS	QSEDVATYKV	NYTRWLCYCH	295
VPOS CDSLPR	YETTHVFGRS	LLRSIFTVTR	RQLEKFRVE	KDKLVPEKRT	350
*****	*****	*****	*****	*****	
VPOS CDSLPR	YETTHVFGRS	LLRSIFTVTR	RQLEKFRVE	KDKLVPEKRT	345
LILTHFPKFL	SMLEEEIYGA	NSPIWESGFT	MPPSEGTQLV	PRPASVSAAV	400
*****	*****	*****	*****	*****	
LILTHFPKFL	SMLEEEIYGA	NSPIWESGFT	MPPSEGTQLV	PRPATVSATV	395
VPSTPIFSPS	MGGGSNSLS	LDSAGAEFMP	GEKRTL PENL	TLEDAKRLRV	450
****	*****	*****	*****	*****	
VPS--FSPS	MGGGSNSLS	LDSAGTEFMP	AGEKRKLPENL	TLEDAKRLRV	443
MGDIPMELVN	EVMLTITDPA	AMLGPETSL	SANAARDETA	RLEERRGIE	500
*****	*****	*****	*****	*****	
MGDIPMELVN	EVMLTITDPA	AMLGPETSL	SANAARDETA	RLEERRGIE	493
FHVI GNSLTP	KANRRVLLWL	VGLQNVFSHQ	LPRMPKEYIA	RLVFDPKHKT	550
*****	*****	*****	*****	*****	
FHVI GNSLTP	KANRRVLLWL	VGLQNVFSHQ	LPRMPKEYIA	RLVFDPKHKT	543
LALIKDGRVI	GGICFRMFPT	QGFTEIVFCA	VTSNEQVKGY	GTHLMNHLKE	600
*****	*****	*****	*****	*****	
LALIKDGRVI	GGICFRMFPT	QGFTEIVFCA	VTSNEQVKGY	GTHLMNHLKE	593
YHIKHNILYF	LTYADEYAIG	YFKKQGFSGD	IKVPKSRVYG	YIKDYEGATL	650
*****	*****	*****	*****	*****	
YHIKHSILYF	LTYADEYAIG	YFKKQGFSGD	IKVPKSRVYG	YIKDYEGATL	643
MECELNPRIP	YTELSHIKK	QKEI IKK LIE	RKQAQIRK VY	PGLSCFKEGV	700
*****	*****	*****	*****	*****	
MECELNPRIP	YTELSHIKK	QKEI IKK LIE	RKQAQIRK VY	PGLSCFKEGV	693
RQIPVESVPG	IRETGWKPLG	KEKGKELKDP	DQLYTTLKNL	LAQIKSHPSA	750
*****	*****	*****	*****	*****	
RQIPVESVPG	IRETGWKPLG	KEKGKELKDP	DQLYTTLKNL	LAQIKSHPSA	743
WPFMEPVKKS	EADPYEVIR	FPIDLKTMTE	RLRSRYVTR	KLFVADLQRV	800
*****	*****	*****	*****	*****	
WPFMEPVKKS	EADPYEVIR	FPIDLKTMTE	RLRSRYVTR	KLFVADLQRV	793
IANCREYNPP	DSEYCR CASA	LEKFFYFKLK	EGGLIDK		837
*****	*****	*****	*****		
IANCREYNPP	DSEYCR CASA	LEKFFYFKLK	EGGLIDK		830

Fig. 1. Amino acid sequence of human (total 837 amino acids, upper sequence) and mouse (total 830 amino acids, lower sequence) Gcn5 protein. The same amino acid between human and mouse sequence is marked as * and the missing amino acid is indicated as -. Mouse Gcn5 contains an Akt consensus substrate motif, RQRSQS (the amino acid residue 272 to 277, shaded) while human Gcn5 does not have the consensus motif.

(Thermo, Waltham, MA, USA)를 첨가하여 발색반응을 유도하고 x-ray 필름에 감광시켰다. IgG control에서는 Akt1 size (60 kDa)에서 밴드가 검출되지 않은 반면에 Akt1으로 면역 침전한 샘플에서는 Akt1 밴드가 강하게 존재하는 것으로 보아 Akt1으로 면역침전이 잘된 것을 확인할 수 있었으며, Gcn5 (94 kDa) 또한 IgG control에서는 밴드가 확인되지 않았지만 Akt1으로 면역침전한 샘플에서는 밴드가 존재하는 것으로 보아 Akt1과 Gcn5사이에는 직접적인 물리적 결합 (direct interaction)이 존재한다는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 2).

이상의 결과와 기존 보고를 통합하여 볼 때 *Hox* 유전자 발현조절에 관여하는 mouse Gcn5는 human Gcn5와는 달리 Akt에 의해 인산화되는 모티프 즉, RQRSQS 서열을 가지고 있었으며 wild type (Akt1^{+/+}) MEF에서는 Akt1과의 직접적인 결합을 통해 네거티브하게 protein stability, 혹은 histone acetylase activity가 조절되어 5' *Hoxc* 유전자들의 발현을 억제하고, Akt1이 없는 Akt1 null MEF에서는 5' *Hoxc* 유전자들의 upregulation (kong et al., 2013)이 유도되었을 것으로 생각된다. 그러나 mouse Gcn5의 RQRSQS 모티프에 존재하는 Serine 잔기가 실제

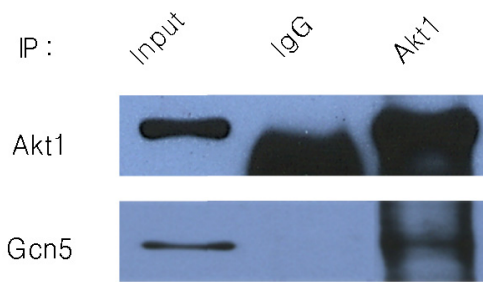


Fig. 2. Direct binding of Akt1 to Gcn5 in mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. Total proteins isolated from the MEF were immunoprecipitated (IP) with anti-Akt1 antibody or IgG as control, and then western blot analysis was performed with anti-Akt1 (top) and anti-Gcn5 antibodies (bottom). To confirm the size of Akt1 and Gcn5 proteins, 10 μ g cell lysate was used as size control (Input).

로 Akt1에 의해서 인산화되어 Gcn5의 활성상태가 변화하는지에 대해서는 좀 더 심도 깊은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Acknowledgements

본 연구는 농진청 차세대 바이오그린 21사업 (PJ00905601) 연구비 및 연세대학교 의과대학 일반교수 연구비 (6-2013-0049)로 수행되었습니다.

REFERENCES

Barber BA, Rastegar M. Epigenetic control of Hox genes during neurogenesis, development, and disease. *Ann Anat.* 2010. 192: 261-274.

Deschamps J, van Nes J. Developmental regulation of the Hox genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development.* 2005. 132: 2931-2942.

Drendall CI, Pham QH, Dietze EC. Purification and characterization of recombinant CH3 domain fragment of the CREB-binding protein. *Protein Expr Purif.* 2010. 70: 196-205.

Favier B, Dolle P. Developmental functions of mammalian Hox genes. *Mol Hum Reprod.* 1997. 3: 115-131.

Jin Q, Yu LR, Wang L, Zhang Z, Kasper LH, Lee JE, Wang C, Brindle PK, Dent SY, Ge K. Distinct roles of GCN5/PCAF-mediated H3K9ac and CBP/p300-mediated H3K18/27ac in nuclear receptor transactivation. *EMBO J.* 2011. 30: 249-262.

Kong KA, Yoon H, Kim MH. Akt1 as a putative regulator of Hox genes. *Gene.* 2013. 513: 287-291.

Lee Y, Oh JH, Kong KA, Kim MH. Post-transcriptional regulation of Gcn5, a putative regulator of Hox in mouse embryonic fibroblast cells. *J Exp Biomed Sci.* 2012. 18: 165-168.

Lin W, Srajer G, Evrard YA, Phan HM, Furuta Y, Dent SY. Developmental potential of Gcn5(-/-) embryonic stem cells in vivo and in vitro. *Dev Dyn.* 2007. 236: 1547-1557.

Lin W, Zhang Z, Chen CH, Behringer RR, Dent SY. Proper Gcn5 histone acetyltransferase expression is required for normal anteroposterior patterning of the mouse skeleton. *Dev Growth Differ.* 2008. 50: 321-330.

Liu Y, Xing ZB, Zhang JH, Fang Y. Akt kinase targets the association of CBP with histone H3 to regulate the acetylation of lysine K18. *FEBS Lett.* 2013. 587: 847-853.

Min H, Lee JY, Kim MH. Structural dynamics and epigenetic modifications of Hoxc loci along the anteroposterior body axis in developing mouse embryos. *Int J Biol Sci.* 2012. 8: 802-810.

Pearson JC, Lemons D, McGinnis W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet.* 2005. 6: 893-904.