

## Post-transcriptional Regulation of Gcn5, a Putative Regulator of Hox in Mouse Embryonic Fibroblast Cells

Youra Lee, Ji Hoon Oh, Kyoung-Ah Kong and Myoung Hee Kim<sup>†</sup>

Department of Anatomy, Embryology Lab., Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

Hox proteins containing DNA-binding homeodomain act as transcription factors important for anteroposterior body patterning during vertebrate embryogenesis. However, the precise mechanisms by which signal pathways are transduced to regulate the Hox gene expression are not clear. In the course of an attempt to isolate an upstream regulatory factor(s) controlling Hox genes, protein kinase B alpha (Akt1) has been identified as a putative regulator of Hox genes through *in silico* analysis (GEO profile). In the Gene Expression Omnibus (GEO) dataset GDS1784 at the NCBI (National Center for Biotechnology Information) site, Hox genes were differentially expressed depending on the presence or absence of Akt1. Since it was not well known how Akt1 regulates the specific Hox genes, whose transcription was reported to be regulated by epigenetic modifications such as histone acetylation, methylation etc., the expression of Gcn5, a histone acetyltransferase (HAT), was analyzed in wild type (WT) as well as in *Akt1*<sup>-/-</sup> mouse embryonic fibroblast (MEF) cells. RT-PCR analysis revealed that the amount of Gcn5 mRNA was similar in both WT and *Akt1*<sup>-/-</sup> MEFs. However, the protein level of Gcn5 was significantly increased in *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF cells. The half life of Gcn5 was 1 hour in wild type whereas 8 hours in *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF. These data all together, indicate that Gcn5 is post-transcriptionally down-regulated and the protein stability is negatively regulated by Akt1 in MEF cells.

**Key Words:** Hox genes, Epigenetic modification, Akt1, Gcn5, Protein stability

Hox는 발생 과정 동안 일어나는 여러 종류의 세포 내 반응을 조절하는 전사 조절인자 (transcription factor)로 알려져 있으며, 특히 동물 배아의 형태 형성 과정에서 매우 중요한 역할을 한다 (Favier and Dolle, 1997). 사람이나 생쥐와 같은 고등 동물에는, 서로 다른 4개의 염색체에 각각의 호메오티크 유전자 집합체 (*Hoxa*, *Hoxb*, *Hoxc*, *Hoxd* 집합체)가 위치하고 있으며 총 39개의 Hox 유전자들이 존재한다. 각각의 집합체에는 배아의 머리-꼬리축 (anteroposterior axis)을 따라 3'에서 5' 방향으로 1번에서 13번 paralogous Hox 유전자가 순서대로 위치하고 있다 (Pearson et al., 2005). 배아의 발생 과정 중, Hox 유전자들은 각각 특이적으로 특정 시기에 특정 장소에서만 발현된다 (Kim

et al., 2002). 즉 더 3' 쪽에 위치하고 있는 유전자들은 더 5' 쪽에 위치하고 있는 유전자들보다 더 머리쪽 (anterior)에서 발현되고 (spatial collinear expression pattern), 시기 상으로도 3' 쪽에 위치한 Hox 유전자들이 더 먼저 발현된다 (temporal collinear expression pattern). 따라서 이러한 Hox 유전자의 발생 시기와 위치 특이적인 발현은 배아의 형태 형성에 있어서 매우 중요한 역할을 하며, 이러한 발현 특징은 매우 정교하게 잘 조절되어야 한다 (Deschamps and van Nes, 2005; Lee et al., 2010)

Hox 유전자의 발현은 DNA 메틸화와 히스톤 변형과 같은 복합적인 후성 유전학적 변형을 통해 조절된다고 보고되어져 있다 (Barber and Rastegar, 2010; He et al., 2011). 이중 히스톤 변형은 분화 과정 동안에 매우 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, 히스톤의 특정 아미노산 잔기의 아세틸화, 메틸화, 인산화 등을 통해 Hox의 발현 정도가 증가되거나 감소된다고 보고된 바 있다 (Lee et al., 2007). 히스톤 변형 중 Histone 3 (H3)의 아세틸화는 일반적으로 발생 및 분화 과정 동안에 특정 유전자의 발현을

\*Received: 7 May, 2012 / Revised: 5 June, 2012

Accepted: 8 June, 2012

<sup>†</sup>Corresponding author: Myoung Hee Kim, Department of Anatomy, Embryology Lab., 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.

활성화 시킨다고 알려져 있다.

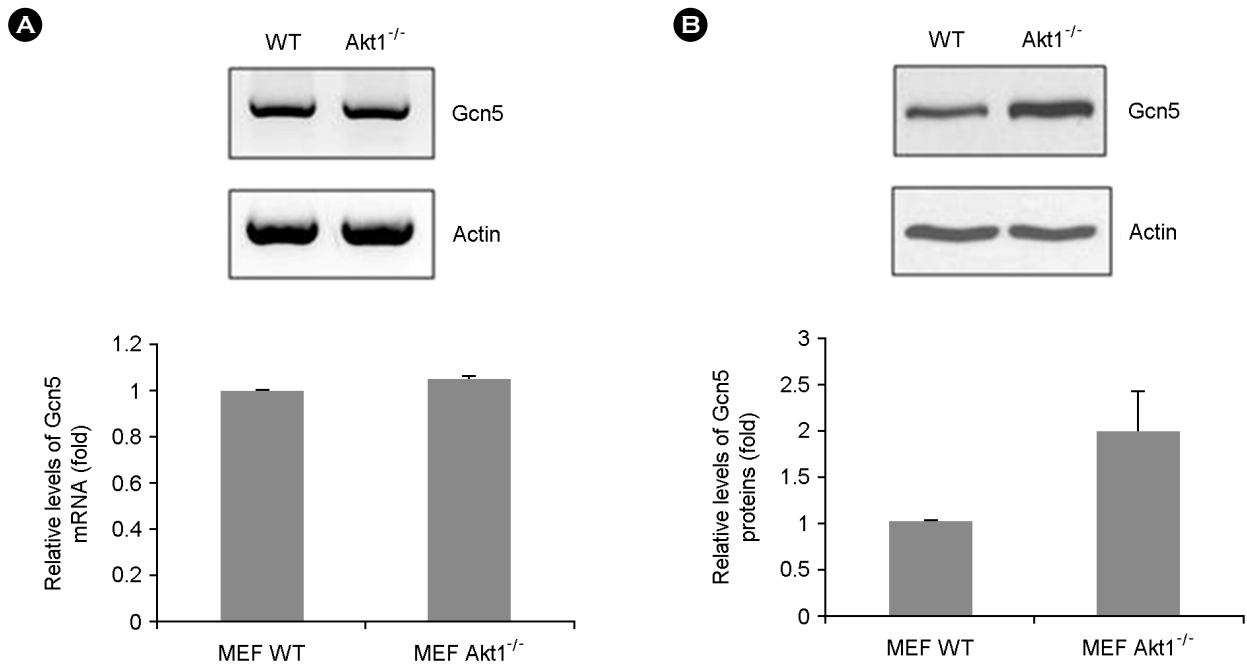
Gcn5 (General Control Non-derepressible 5)는 처음으로 동정된 histone acetyltransferase (HAT)로 transcription, DNA repair, telomere maintenance 그리고 nucleosome assembly 와 같은 여러 세포 내 과정에서 중요한 역할을 한다 (Brownell et al., 1996; Sterner and Berger, 2000). Lin 등은 생쥐의 발생 과정 동안 Gcn5의 기능을 밝히고자 여러 종류의 mutant *Gcn5* 생쥐를 만들어 실험한 결과, Gcn5가 발생 과정 동안 *Hox* 유전자의 발현을 조절하고, 생쥐의 정상적인 골격 형성에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 보고한 바 있다 (Lin et al., 2008).

*Hox* 유전자를 상위에서 조절하는 인자를 찾기 위한 일환으로 Bioinformatics를 통한 *in silico* 분석에서 NCBI (National Center for Biotechnology Information)의 Gene Expression Omnibus (GEO) dataset GDS1784의 경우 Akt1 (Protein kinase B alpha)이 존재하느냐 안 하느냐에 따라 mouse embryonic fibroblast (MEF)에서 *Hox* 유전자가 differential 하게 발현하는 것을 알 수 있었으며 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/GDSbrowser?acc=GDS1784>), 이는 Akt1이 *Hox* 유전자의 발현을 상위에서 조절하고 있을 가능성이 매우 높다는 것을 의미한다. 이전의 보고에서 *Hox*의 발현이 히스톤 변형과 같은 후성 유전학적 변형을 통해 (Barber and Rastegar, 2010; He et al., 2011), 그리고 특히 히스톤 아세틸화 효소인 Gcn5에 의해 (Lin et al., 2008) 조절된다는 보고가 있으므로 본 연구에서는 Akt1이 정상인 wild type MEF와 Akt1이 knock-out된 MEF (*Akt1*<sup>-/-</sup> MEF) cell을 이용하여 *Hox*의 발현에 영향을 주는 Gcn5 양의 분석을 시도하였다.

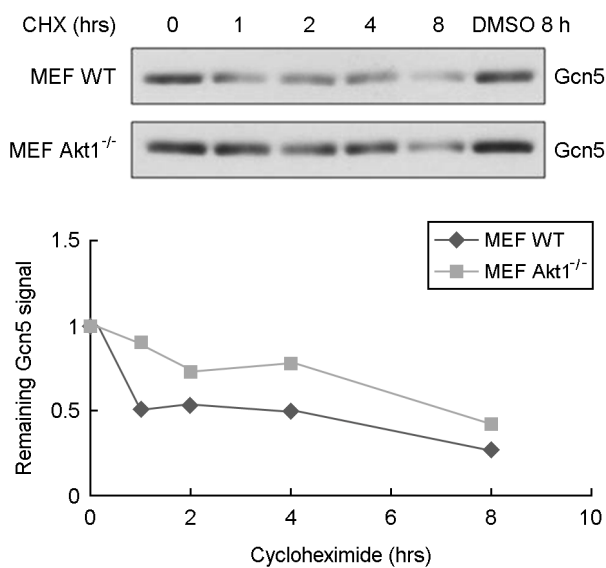
먼저 E13.5 (발생 13.5일 배자)에 분리해서 얻은 wild type (WT) MEF와 exon 3과 8 사이에 neomycin 유전자가 삽입된 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF 세포 (Cho et al., 2001)를 이용하여 *Gcn5* mRNA의 양에 차이가 있는지 알아보하고자 RT-PCR을 수행하였다. WT과 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF cells은 10% FBS (Fetal bovine serum; WelGENE Inc., Korea)와 1X penicillin-streptomycin (WelGENE Inc., Korea)을 포함하고 있는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagles Medium; WelGENE Inc., Korea) 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 인큐베이터에서 배양하였다. Cell confluence가 80~90% 정도 됐을 때 세포를 회수하였고, TRIZOL Reagent (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 사용하여 total RNA를 분리하였으며, ImProm-II™ reverse transcriptase (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. *Gcn5*를 detection 하기 위해

primer를 디자인 하였고 (Gcn5 F: 5'-cca cat caa aca cag cat cc-3', Gcn5 R: 5'-agc tga gtc cag ggt aga cc-3', product size: 281 bps), PCR 반응은 94°C에서 5분간 반응한 후, 94°C에서 30초, 50°C에서 30초, 72°C에서 30초로 30 cycle 진행하였으며, β-actin을 internal control로 사용하였다. 각 MEF에서 발현하는 *Gcn5* 유전자의 상대적인 발현 양은 아가로즈 겔 상에서 band intensity를 Image J software를 사용하여 정량적으로 분석하였다. Fig. 1A는 MEF WT과 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF에서 발현하는 *Gcn5*의 mRNA 양을 아가로즈 겔 상에서 (upper panel), 그리고 이를 정량적으로 분석하여 그래프로 나타낸 결과 (lower panel)로 WT과 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF에서 *Gcn5*의 mRNA 양에는 별 차이를 보이지 않았다.

그 다음 *Gcn5*의 단백질 양을 비교해 보기 위해 Western Blot을 수행하였다. WT MEF와 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF를 배양한 후 cell confluence가 80~90% 정도 됐을 때 세포를 수확하였다. NP-40 Lysis Buffer (50 mM Tris-Cl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 1% NP-40 and 1X Protease Inhibitor Cocktail)를 사용하여 cell을 lysis한 후, BCA Protein Assay Kit (Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 단백질을 정량하였다. 각 세포에 존재하는 *Gcn5* (95 kDa)와 β-actin (42 kDa, internal control)의 단백질을 분리하기 위해서 각 cell lysate (10 μg)에 존재하는 단백질들을 전기영동 기법으로 크기에 따라 겔 상에서 분리한 다음, PVDF membrane으로 단백질을 transfer 하였다. 5% BSA (in 1X PBST)를 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking한 후, *Gcn5*를 검출할 수 있는 1<sup>st</sup> antibody (*Gcn5*: Cell Signaling, Danvers, MA, USA, β-actin: abcam, cat. # ab6276)를 사용하여 4°C에서 하룻 밤 반응시켰다. 1X PBST를 사용하여 5분씩 5회 wash 하고, secondary antibody (*Gcn5*: Goat anti-rabbit IgG, β-actin: Goat anti-mouse IgG)를 사용하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 1X PBST를 사용하여 5분씩 5회 wash 하고, Super-Signal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo, Waltham, MA, USA)를 사용하여 발색반응을 시킨 후, x-ray 필름에 감광시켰다. Band intensity는 Image J software를 사용하여 정량적으로 분석하였다. Fig. 1B는 WT과 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF cell에 존재하는 *Gcn5*의 단백질 양을 Western Blot으로 (upper panel) 그리고 정량적으로 (lower panel) 분석한 결과로, WT MEF와 비교하여 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF에서 *Gcn5* 단백질 발현 양이 약 2배 정도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 위의 두 결과로부터 Akt1이 없을 때 *Gcn5*의 mRNA 양은 영향을 받지 않지만, 단백질 양은 증가한다는 것을 알 수 있었고, 이를 통해 WT과 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF cell



**Fig. 1. Detection of Gcn5 mRNA and protein expression levels in WT and *Akt1*<sup>-/-</sup> MEFs.** (A) RT-PCR analysis for detection of *Gcn5* transcripts expressed in WT and *Akt1*<sup>-/-</sup> MEFs (upper panel). Density analysis of *Gcn5* mRNA band (lower panel). The band intensity of *Gcn5* was normalized to that of beta-actin (Actin). (B) Western blot analysis of Gcn5 protein in WT and *Akt1*<sup>-/-</sup> MEFs (upper panel). Density analysis of Gcn5 protein band (lower panel). The band intensity of Gcn5 was normalized to that of beta-actin (Actin).



**Fig. 2. Stability of Gcn5 protein in WT and *Akt1*<sup>-/-</sup> MEFs.** WT and *Akt1*<sup>-/-</sup> MEFs were treated with 10  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) and lysed at the indicated times following incubation. Gcn5 protein expression was evaluated by western blotting (upper panel) and the quantitation of western data is shown in lower panel.

에서 Gcn5가 mRNA로 전사된 후 post-transcriptional하게 단백질 수준에서 서로 다르게 조절된다는 것을 유추할

수 있었다.

WT MEF와 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF에서의 Gcn5 단백질 양 차이가 단백질의 stability에 기인하는 것인지를 분석하기 위해 두 세포에서 Gcn5의 반감기 정도 (turnover rate)를 측정해 보았다. 우선 WT MEF와 *Akt1*<sup>-/-</sup> MEF를 배양한 다음 cell confluence가 80~90% 정도 됐을 때 단백질 생합성을 저해하는 inhibitor인 Cycloheximide (CHX, 10  $\mu$ g/ml)를 0, 1, 2, 4, 8시간 처리하였고, 정해진 시간에 세포를 수확하였다. Negative control로 DMSO를 8시간 처리한 세포를 사용하였다. NP-40 Lysis Buffer를 사용하여 세포를 lysis한 후, BCA Protein Assay Kit (Thermo)를 사용하여 단백질을 정량하였다. Cell lysates를 각각 10  $\mu$ g씩 사용하여 전기영동 기법으로 크기에 따라 단백질을 겔 상에 분리한 후 Western Blot을 실시하였다. Band intensity를 Image J software를 사용하여 정량적으로 분석한 결과 WT MEF에서는 CHX를 처리하고 1시간이 지나면 Gcn5의 양이 50% 정도 감소한 반면, *Akt1*<sup>-/-</sup>에서는 약 8시간 정도 후에야 그 양이 반으로 감소함을 알 수 있었다 (Fig. 2).

이상의 결과는 Gcn5 단백질이 Akt1에 의해서 네거티브 하게 조절된다는 것을 의미하며 Akt1이 존재할 때에는 Gcn5 단백질의 degradation이 증가하고 Akt1이 존재

하지 않을 때는 Gcn5의 stability가 증가하여 상대적으로 더 오랜 시간 세포에서 머물면서 기능을 수행하는 것처럼 보인다. 최근 Li 등 (2012)은 Gcn5의 stability가 And-1 (acidic nucleoplasmic DNA-binding protein)에 의해서 증가한다는 것을 보고하였으며, And-1이 knockdown되면 Gcn5 단백질의 stability 또한 감소하였다. 이는 Cullin4-RING E3 ubiquitin ligase에 의해서 Gcn5가 ubiquitination되어 degradation 된다는 것을 의미한다 (Li et al., 2011). 본 연구에서도 WT MEF에 proteasome inhibitor인 MG132를 처리하여 Gcn5 단백질 양의 변화를 분석해 보면 Gcn5가 ubiquitination에 의해 degradation된 것인지를 확인할 수 있을 것이다. 그러나 본 실험에서 사용한 MEF에서도 Gcn5의 stability가 And-1과 Cullin4-RING E3 ubiquitin ligase에 의해서 조절되는지에 대해서는 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 생각되며, 실제로 이 단백질들이 Akt1과 어떠한 상관 관계에 있는지, 또 더 나아가 발생 중인 배자에서 Akt1, Gcn5, Hox 간의 cross-talk이 어떻게 이루어지는지에 대해서는 좀 더 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

#### Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단 (2010-0000155, 2010-0026759) 및 농촌진흥청 차세대 바오그린21사업 (20070401-034-030)의 일부로 수행되었으며, 이우라박사는 한국연구재단의 2011년도 학문후속세대양성 박사후국내연수 (기초과학) 사업 (NRF-2011-355-E00002)의 지원을 받았습니다.

#### REFERENCES

- Barber BA, Rastegar M. Epigenetic control of *Hox* genes during neurogenesis, development, and disease. *Ann Anat.* 2010. 192: 261-274.
- Brownell JE, Zhou J, Ranalli T, Kobayashi R, Edmondson DG, Roth SY, Allis CD. Tetrahymena histone acetyltransferase A: A homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell.* 1996. 84: 843-851.
- Cho H, Thorvaldsen JL, Chu Q, Feng F, Birnbaum MJ. Akt1/PKBalpha is required for normal growth but dispensable for maintenance of glucose homeostasis in mice. *J Biol Chem.* 2001. 276: 38349-38352.
- Deschamps J, van Nes J. Developmental regulation of the *Hox* genes during axial morphogenesis in the mouse. *Development.* 2005. 132: 2931-2942.
- Favier B, Dolle P. Developmental functions of mammalian *Hox* genes. *Mol Hum Reprod.* 1997. 3: 115-131.
- He H, Hua X, Yan J. Epigenetic regulations in hematopoietic *Hox* code. *Oncogene.* 2011. 30: 379-388.
- Kim MH, Shin JS, Park S, Hur M-W, Lee M-O, Park H, Lee C-S. Retinoic acid response element in HOXA7 regulatory region affects the rate, not the formation of anterior boundary expression. *Int J Dev Biol.* 2002. 46: 325-328.
- Lee ER, Murdoch FE, Fritsch MK. High histone acetylation and decreased polycomb repressive complex 2 member levels regulate gene specific transcriptional changes during early embryonic stem cell differentiation induced by retinoic acid. *Stem Cells.* 2007. 25: 2191-2199.
- Lee JY, Min H, Wang X, Khan AA, Kim MH. Chromatin organization and transcriptional activation of *Hox* genes. *Ana Cell Biol.* 2010. 43: 78-85.
- 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.
- Li Y, Jaramillo-Lambert A, Hao J, Yang Y, Zhu W. The stability of histone acetyltransferase General control non-derepressible (Gcn) 5 is regulated by Cullin4-RING E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 2011. 286: 41344-41352.
- Li Y, Jaramillo-Lambert AN, Yang Y, Williams R, Lee NH, Zhu W. And-1 is required for the stability of histone acetyltransferase Gcn5. *Oncogene.* 2012. 31: 643-652.
- Pearson JC, Lemons D, McGinnis W. Modulating *Hox* gene functions during animal body patterning. *Nat Rev Genet.* 2005. 6: 893-904.
- Stern DE, Berger SL. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000. 64: 435-459.