

## Membrane-associated Guanylate Kinase Inverted-3 Modulates Enterovirus Replication through AKT Signaling Activation

Jin-Ho Park, Ye-Na Namgung and Byung-Kwan Lim\*

Department of Biomedical Science, Jungwon University, Goesan-gun, Chungbuk 367-700, Korea

Received April 28, 2016 / Revised June 21, 2016 / Accepted July 4, 2016

Membrane-associated guanylate kinase inverted-3 (MAGI-3) is a member of the family of membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs). MAGI-3 modulates the kinase activity of protein kinase B (PKB)/AKT through interactions with phosphatase and tensin homolog (PTEN)/MMAC. Coxsackievirus B3 (CVB3) is a common causative agent of acute myocarditis and chronic dilated cardiomyopathy. Activation of AKT and extracellular signal - regulated kinases 1/2 (ERK1/2) is essential for CVB3 replication, but the relation between MAGI-3 signaling and CVB3 replication is not well understood. This study investigated the role of MAGI-3 in CVB3 infection and replication. MAGI-3 was overexpressed in HeLa cells by polyethylenimine (PEI) transfection. To optimize the transfection conditions, different ratios of plasmid DNA to PEI concentrations were used. MAGI-3 and empty plasmid DNA were transfected into the HeLa cells. MAGI-3 overexpression alone was not sufficient to efficiently activate AKT. However, expression of the CVB3 capsid protein VP1 dramatically increased in the HeLa cells overexpressing MAGI-3 24 h after CVB3 infection. In addition, the activities of AKT and ERK were significantly induced in the CVB3-infected MAGI-3 cells overexpressing HeLa. These results demonstrate that MAGI-3 expression upregulates CVB3 replication through AKT and ERK signaling activation. MAGI-3 may be an important target to control CVB3 replication.

**Key words** : CAR, coxsackievirus, MAGI-3, replication

### 서 론

Membrane-associated guanylate kinase Inverted-3 (MAGI-3)는 전문적으로 세포-세포 연결의 형성에 관여하는 말초 막 단백질을 포함하는 membrane-associated guanylate kinases (MAGUKs)의 한 종류로 140 kDa 이다. MAGI-3는 크게 세 가지 단백질-단백질 상호작용 모듈로 구성되어 있는데, 첫 번째는 5가지의 PDZ 도메인들이며, 두 번째는 N-terminal guanylate kinase (GK) 도메인 그리고 마지막 세 번째는 WW 도메인이다. 두 개의 보존된 트립토판 잔류의 이름을 딴 WW 도메인은 짧은 프롤린이 많은 서열에 결합을 통해 단백질-단백질 상호 작용을 매개한다. Membrane-Associated Guanylate Kinases (MAGUKs)는 다중 PDZ 도메인인 Src homology3 (SH3)도메인, guanylate kinase (GUK) 도메인을 포함하는 단백질의 종류이다[29]. MAGUKs는 몇몇의 수용체들과 다양한 신호전달 물질들을 포함한 단백질 복합체들을 위해 세포 막에서 중요한 scaffolds처럼 작용하고 cell adhesion과 tight

junction에서 중요한 역할을 한다[10]. MAGI-3는 세포-세포 연결에서 골격 단백질처럼 행동하며 다양한 세포 및 신호 전달 과정을 조절하는 역할을 한다[9]. PTEN과의 협동으로 AKT kinase 활성을 조절하고[33], ERK와 RhoA 신호전달 경로를 활성화 시키는 능력을 조절할 수 있다[13]. 또한 분극화된 상피 세포에서 세포 표면으로 TGF- $\alpha$ 의 효율적인 수송에 관여하며[9], JNK 신호전달 연쇄반응에도 관여한다[26].

Coxsackievirus (CV)는 엔테로바이러스 속에 picornavirus 과로 어린이와 어른에서 심근염과 심부전의 주요 원인 바이러스로 잘 알려져 있다. Coxsackievirus type B (CVB)의 혈청형은 6개가 있으며(CVB1 - 6) 바이러스 게놈은 일반적으로 단일 가닥 (single-stranded) positive RNA이며 약 7,400 bp이다 [19]. 심근염 및 확장성 심근증 환자의 약 5~50% 정도에서 바이러스 게놈이 확인되어 CVB3가 심근에 존재함이 밝혀졌다. 또한 CVB3가 사람 및 생쥐를 감염 하면 급성기에는 심근염을 유발하고 만성화되면 확장성 심근증이 유발 되는 것이 실험적으로 증명 되어 CVB3가 심장 특이적 질환을 유발하는 것으로 확인되었다. 현재 인구 10만 명당 5~8명이 CVB3 감염에 의해 확장성 심근증에 걸릴 위험이 있으며 특히 유아기 때 감염되면 사망률이 8%에 이르는 것으로 보고되었다[15, 27].

바이러스 감염 중 mitogen-activated kinases (MAPKs)와 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)를 포함한 신호전달경로의 역할은 최근 들어 많은 관심을 끌고 있다. Bruce M. McManus에 의하면, coxsackievirus B3 (CVB3) 감염 중에,

#### \*Corresponding author

Tel : +82-43-830-8605, Fax : +82-43-830-8579

E-mail : bklim@jwu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

MAPKs의 subfamily members인 extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2)의 활성화는 CVB3 복제와 숙주세포에서 바이러스 매개 변화에 중요한 역할을 한다[12]. 또한 protein kinase B (PKB)는 일반적으로 PI3K cascade를 통한 생존 신호의 downstream 매개자로 CVB3 복제를 조절하거나 바이러스성 apoptosis를 유도한다. CVB3 감염은 PI3K 의존적인 기작을 통해 PKB/AKT의 인산화를 유도한다.

본 연구에서는 MAGI-3 발현으로 PTEN과 협력하는 AKT 신호와 MAPKs 신호전달경로의 ERK의 활성을 유도하고 바이러스 감염 시 HeLa 세포에서의 바이러스 증식을 MAGI-3가 증가시키는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 CVB3 증식과 MAGI-3의 상관관계 규명과 더불어 아직 잘 밝혀지지 않은 MAGI-3의 역할 연구에 대한 단서를 제공해 줄 것으로 기대된다.

## 재료 및 방법

### 세포 배양

본 실험에서 바이러스 배양 및 역가 확인은 인체 유래의 자궁경부암 세포인 HeLa cell을 사용하였다. Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, WELGENE, KOR)에 불활성화 시킨 fetal bovine serum (FBS, RMBIO, US) 5%와 penicillin-streptomycin 10%를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 monolayer로 배양하였다. 세포는 3일에 한번씩 계대 배양하며 유지하여 실험에 사용하였다.

### 바이러스 감염

세포 감염에 사용한 바이러스는 CVB3의 변이 형태인 H3주를 삼성서울병원 전은석 교수님 연구실에서 분양 받아 사용하였다. 12-Well plate에 10<sup>5</sup>의 HeLa 세포를 배양하고 plasmid DNA를 transfection하여 전달하고 48시간 후에 10<sup>5</sup> PFU/ml로 CVB3-H3를 감염 시켜 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양했다. MAGI-3가 발현된 세포는 바이러스의 감염 후 1, 4, 8, 16시간에 각각 세포를 phosphate buffer saline lysis buffer (1X PBS, 0.1% Triton X-100)로 lysis하여 단백질을 분리하고 western blot analysis에 사용하였으며 세포배양액을 모아 증식한 바이러스의 역가 측정을 위해 -20°C에 보관하였다.

### MAGI-3 plasmid DNA

MAGI-3를 동물 세포인 HeLa 세포에 transfection 하기 위하여 MAGI-3 유전자를 p3xFlag-CMV10 (P3FC, Sigma, CA) plasmid의 제한효소 HindIII-BamHI에 삽입 하였다. plasmid DNA는 midi-prep kit (iNtRON co, Korea)으로 증폭하여 농도를 확보하고 1 µg/µl 농도로 희석하여 보관하고 세포 전달 후 발현 실험에 사용하였다.

### HeLa cell transfection

Transfection reagent는 양이온성 고분자 화합물 poly-ethylenimine (PEI) 1 µg/ml stock을 사용하였다. 24-well plate의 HeLa 세포에서 reagent와 DNA의 최적의 비율을 설정하기 위하여 GFP plasmid를 PEI reagent와 여러 비율로 사용해 예비실험을 수행하였다. GFP가 잘 발현된 조건인 DNA:PEI = 1:30 비율로 FBS free DMEM 100 µl에 혼합하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 HeLa 세포가 배양된 24-well plate에 넣어주고 48시간 동안 배양하여 유전자를 발현 시켰다. 이후에 transfection된 세포에서 단백질을 추출하였다.

### Western blot analysis

MAGI-3의 발현과 바이러스의 감염으로 인한 세포 내 단백질 발현 변화를 관찰하기 위해서 실험한 HeLa 세포에서 세포 lysate를 얻어 PBS lysis buffer (1X PBS, 5 mM EDTA, 0.5% triton X-100)로 세포를 분해하여 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 6X SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCL(pH 6.8), 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.1% w/v bromophenol blue)를 섞은 후 10% acrylamide gel에 loading 하여 120 Volt로 120분 전기영동 후 poly-vinyl difluoride (PVDF) membrane에 250 mA로 상온에서 1시간 동안 transfer 하였다. Transfer 후 5% non-fat milk blocking buffer에 1시간 동안 반응하여 비특이적인 항체 반응을 제거하였다. 1차 항체 (pERK1/2, pAKT(S473), ERK, AKT, GAPDH (Cell signal, CA) and MAGI-3 (Thermo scientific, CA)를 사용하여 4°C에서 over night 배양하고 2차 항체로 horse radish peroxidase (HRP)가 tagging된 항체를 사용하여 ECL (Intron Biotech, Seoul, Korea) 방법으로 각각의 단백질 발현 변화를 관찰하였다.

### Plaque Forming Unit (PFU) assay

36시간 동안 transfection하여 MAGI-3를 과발현한 HeLa 세포에 감염된 바이러스의 증식을 세포배양 상등액에서 PFU assay로 검증하였다. 감염 세포 상등액으로 6-well plate에 배양된 HeLa 세포에 30분간 감염시킨 후 media를 제거하고 3% Difco agar/DMEM을 3 mm로 덮고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 이틀간 배양하였다. Methanol과 acetic acid를 3:1로 혼합하여 plate에 넣어 세포를 고정시키고 agarose를 제거한다. 2% 크리스탈 바이올렛으로 염색하여 plaque의 숫자를 세어 바이러스 역가를 측정하였다.

### 통계 분석

모든 결과는 mean ± SEM으로 나타냈으며 Control과 MAGI-3 발현 그룹 간의 결과 분석은 Student t-test (GraphPad Prism 3.0 for Windows; GraphPad Software, La Jolla, USA)를 이용하였다. 통계적 유의성은 p<0.05로 정하였다.

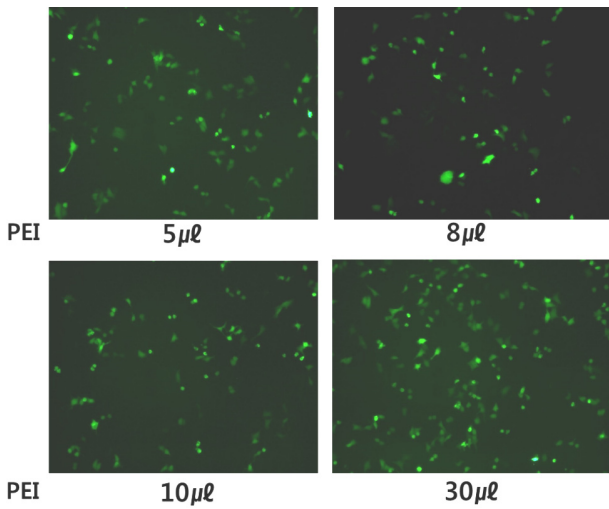


Fig. 1. Optimization of transfection conditions. HeLa cells were cultured in a 12-well plate ( $5 \times 10^4$  cells/well). Medium (100  $\mu$ l serum-free DMEM + 5, 8, 10, or 30  $\mu$ l PEI + 1  $\mu$ g GFP plasmid DNA) was added into each well. Cells were incubated at 5% CO<sub>2</sub> and 37°C for 48 hr. The transfection efficiency was determined by GFP expression under a fluorescence microscope.

## 결 과

### Transfection 조건 설정

MAGI-3 발현으로 인한 세포 신호 변화를 관찰하기 위해서 MAGI-3 유전자를 P3FC plasmid에 삽입하였다. 최적의 transfection 조건 결정을 위해 serum free DMEM에 GFP plasmid와 transfection reagent인 polyethylenimine (PEI, 1 mg/ml)을 DNA 1  $\mu$ g에 3, 5, 8, 10, 20, 30  $\mu$ l의 비율로 혼합해서 48시간 배양하였다. 발현된 GFP의 양과 배양 시의 세포 독성을 관찰

하였다. Transfection의 최적 조건은 DNA 1  $\mu$ g당 PEI (1 mg/ml) 30  $\mu$ l의 비율을 결정하였다(Fig. 1).

### MAGI-3의 발현으로 유도된 AKT의 활성화

MAGI-3를 transfection하여 세포에 전달하여 48시간 배양하였다. Transfection 한 세포를 protease inhibitor가 첨가된 PBS lysis buffer로 분해하여 세포 단백질을 추출해 western blot analysis를 수행하였다. mouse anti-Flag-M2 항체를 사용하여 MAGI-3에 표지 된 Flag를 검출하여 MAGI-3의 발현을 확인하였다(Fig. 2A). Empty vector를 transfection한 control과 비교하여 AKT 활성의(Ser473 phosphorylation) 유의한 증가는 확인되지 않았다(Fig. 2B).

### MAGI-3 발현 세포에 coxsackievirus B3 감염

HeLa 세포에 P3FC empty plasmid와 MAGI-3/P3FC를 transfection하여 48시간 동안 배양하고  $5 \times 10^4$  PFU의 coxsackievirus B3 (CVB3)를 8시간동안 감염하였다. 바이러스의 증식을 확인하기 위해 숙주세포 내부에서 CVB3가 자신을 복제하면서 만드는 바이러스 막단백질 VP1을 mouse anti-VP1 항체를 사용해 발현을 확인하였다(Fig. 3A). 이전의 연구에서 CVB3의 감염 후 세포에서의 복제를 위해서는 세포 신호 물질 AKT의 활성화는 필수적이었다[22]. 결과에서 8시간 바이러스를 감염한 후 MAGI-3가 발현된 세포에서 AKT의 유의한 활성이 관찰되었다. 그러나 empty plasmid control과 비교하여 MAGI-3 발현세포에서 바이러스 증식에 의한 유의한 VP1의 증가는 확인되지 않았다(Fig. 3). 이 결과는 AKT의 활성화가 CVB3의 복제과정에서 필수적이지 않을 수도 있음을 시사한다. AKT의 활성화는 단순히 MAGI-3의 발현으로 유도된 것이고 CVB3의 증식에 크게 영향을 끼치지 않은 것으로 관찰되었다.

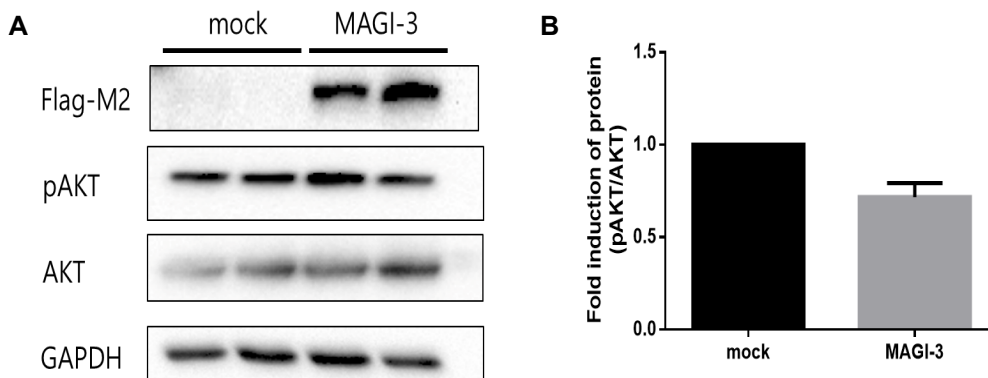


Fig. 2. MAGI-3 overexpression. HeLa cells were transfected with the empty or MAGI-3-Flag plasmid, and AKT activity was assessed by western blot analysis. (A) HeLa cells were cultured and transfected for 48 hr. Western blotting was probed with anti-Flag, phospho-AKT, total AKT, and GAPDH antibodies. AKT activity was not different between MAGI-3 and empty plasmid control (mock). (B) Western blots were quantified by using Image J software. Data are presented as the mean plus or minus the standard error of the mean from 3 independent experiments (Mean  $\pm$  S.E.M,  $**p < 0.01$ ,  $*p < 0.05$ , each data point is represented on graphs).

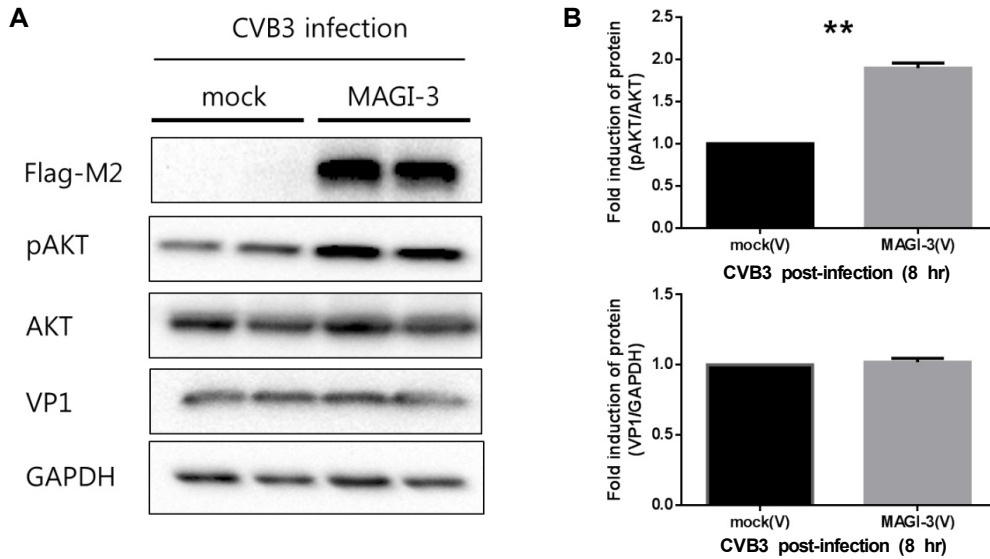


Fig. 3. MAGI-3 overexpression activates AKT in CVB3 infected HeLa cells. (A) MAGI-3 plasmid was transfected for 48hr and then infected by CVB3 ( $1.5 \times 10^5$  PFU/ml). For 24 hr CVB3 infection, CVB3 replication and AKT signal activation were performed by western blotting. CVB3 infection significantly increased AKT phosphorylation in MAGI-3 overexpressing cells (MAGI-3) compare to empty plasmid control (mock). (B) Western blots were quantified by using Image J software. Mean  $\pm$  S.E.M,  $**p < 0.01$ , each data point is represented on graphs.

**Coxsackievirus 감염 시간에 따른 세포 신호 변화**

CVB3는 숙주세포 내부로 침투하여 복제하고 성숙 및 방출 과정까지 6시간 이상 걸린다[3]. 바이러스 감염 시간에 따라 세포 신호 변화를 관찰하기 위해 바이러스 감염 후 각각 1, 4, 8, 24시간에 세포를 분해하여 단백질을 추출하였다. 바이러스 감염 후 8시간에서부터 VP1의 발현이 관찰되었으며 감염 8시간 이후부터 계속 증가하였다. 바이러스 감염 시간이 늘어날수록 AKT와 ERK의 활성화에 변화가 있었지만 MAGI-3의 발현이 유도된 세포에서 empty plasmid가 transfection 된 control군과 비교하여 VP1의 발현은 유의한 증가를 보였다. 본 결과를 통해 MAGI-3의 세포 신호 조절과 바이러스 증식과의 관계를 확인 할 수 있었다(Fig. 4B).

**고 찰**

Coxsackievirus는 뉴욕주 coxsackie의 허드슨강 근처 마을에서 열병을 앓고 있는 어린이로부터 최초로 분리되었으며, coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR)를 통해서 세포 내로 감염되는 약 7,400 bp 단일 가닥 positive RNA 유전자 바이러스이다[15]. CVB3 감염 중에 숙주세포에서의 AKT와 ERK 활성화는 바이러스로 매개된 세포 변화를 이끌며 바이러스의 복제 과정을 위해 필수적이다. MAGI-3는 cell-cell junctions에서 AKT와 ERK의 활성화에 관여하는 단백질로써 CVB3 감염 이후 바이러스 증식에서 세포 신호 변화와 관련해 공통점이 있기에 MAGI-3와 coxsackievirus B3의 상관관계를 조사하고자 했다. 최근 바이러스 감염 중 세포 내 신호전달

경로의 역할은 많은 연구가 진행 중에 있다.

대부분의 바이러스는 바이러스 복제 및 숙주 유전자 반응을 조절하는 숙주 신호 시스템을 조작하는 것으로 알려져 있다. 이러한 경로는 다양한 세포 외 자극에 반응하고 핵 세포막에서 신호를 형성 도입하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs)를 포함한다. MAPK 경로는 일반적으로 3개의 모듈로 구성되어 있는데 ERK1/2모듈은 세포 증식, 형질 전환, 분화 그리고 특히 세포 생존 및 apoptosis를 포함한 세포 기능의 넓은 범위를 규제하는 Raf, MEK1/2, ERK1/2를 포함한다. 최근 ERK 경로는 바이러스 유전자 발현 및 인간 cytomegalovirus, simian virus 40, human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)과 influenza virus의 조절에 관여한다고 알려졌다. 그러나 현재까지 CVB3로 매개된 심근염과 관련된 숙주 신호 전달 메커니즘은 여전히 대부분 불분명하다[12].

Protein kinase는 세포의 삶의 거의 모든 기능을 제어하는 단백질의 인산화에 의해 다양한 세포 내 신호 전달 경로에서 second messengers 등의 중요한 조절 역할을 한다. 이러한 하나의 단백질 kinase인 protein kinase B (PKB)는 활발히 연구되어왔는데, AKT라고도 불리는 PKB는 세포 과정의 다양한 단백질에 대한 중요한 매개자로서의 아미노 말단에 작용하는 pleckstrin homology 도메인을 함유하는 세포질 serine/threonine kinase이다. AKT는 인산화 되면 세포의 생존, 증식, 분화, 이동 및 apoptosis와 관련된 다양한 downstream 신호 전달 경로를 조절한다[22]. 특히 수용체로 받은 신호를 세포막 바로 아래에서 처음으로 신호를 받아 전달하는 signal cascade의 시작점이기 때문에 세포 생존에 있어 가장 중요하게 여기

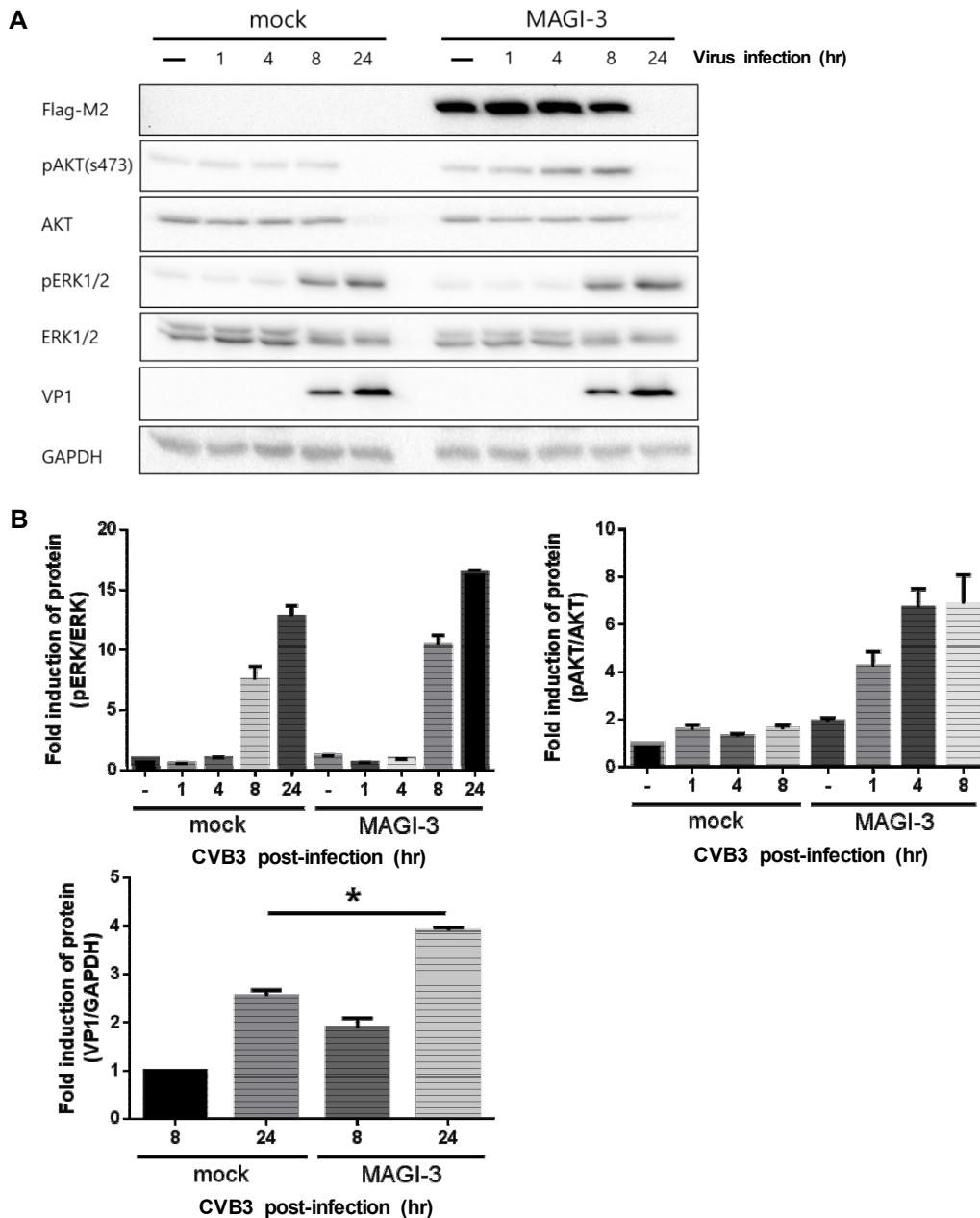


Fig. 4. Overexpression of MAGI-3 stimulates CVB3 replication through activation of AKT and EKR1/2 signaling. (A) HeLa cells were transfected by MAGI-3 and then infected with CVB3 for 24 hr. CVB3-infected cells were harvested at 1, 4, 8, or 24 hr after infection and analyzed by western blotting. GAPDH was used as an internal control. (B) Western blots were quantified by using Image J software. Mean  $\pm$  S.E.M, \* $p$ <0.05, each data point is represented on graphs.

는 단백질 중에 하나이다.

막단백질로 존재하며 cell-cell junctions에서 외부의 신호에 반응하여 다양한 세포 내 신호전달 과정을 조절하는 CAR와 상호작용하는 MAGI-3의 기능을 보고자 했다. MAGI-3의 발현으로 AKT와 ERK의 인산화를 유도하였는데 이것은 coxsackievirus B3가 숙주세포 내에서의 복제와 증식 단계에서 필수적인 과정이다. 이미 Mitra Esfandiari [22]과 Honglin Luo [12] 등의 연구에서, HeLa cell에서 CVB3에 감염 6시간

이후로 AKT와 ERK의 활성이 급격히 증가한다고 발표되어 있다. 마찬가지로 우리의 실험에서도 CVB3 감염 8시간에서 AKT와 ERK의 활성이 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

본 연구에서 HeLa 세포에 MAGI-3 유전자의 발현을 유도하여 AKT와 ERK의 인산화가 증가하는 것을 밝혔다. Coxsackievirus B3는 CAR를 통해 숙주세포 내로 침투하게 되는데 CAR는 MAGI-3와 상호작용을 하므로 둘의 상관관계는 매우 흥미롭다. 또한 Coxsackievirus B3 증식에 있어서 AKT와 ERK

의 활성화는 필수적인 요소이기 때문에 MAGI-3의 발현으로 AKT와 ERK가 인산화 된 상태에서는 바이러스의 증식은 더욱 이른 시간에 시작될 것으로 생각된다. 그러나 MAGI-3 발현으로 유도된 AKT의 활성화 증가와 동시에 바이러스 감염은 바이러스의 증식을 유도함을 확인할 수 있었다. 결론적으로 MAGI-3의 발현과 CVB3의 감염으로 인한 각각의 세포 신호 변화를 포착하였고 이들의 결과를 통해 MAGI-3와 CVB3의 상관관계를 규명하였고 enterovirus 증식에 있어서 MAGI-3의 상호작용이 있는 것을 검증하였다. 이 결과는 enterovirus에 대한 anti-viral drug 개발에 새로운 단서를 줄 수 있다고 사료된다.

### 감사의 글

이 논문은 2014년도 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업(No. NRF-2014R1A1A1002824)의 지원을 받아 수행되었다.

### References

- Asher, D. R., Cerny, A. M., Weiler, S. R., Horner, J. W., Keeler, M. L., Neptune, M. A., Jones, S. N., Bronson, R. T., Depinho, R. A. and Finberg, R. W. 2005. Coxsackievirus and adenovirus receptor is essential for cardiomyocyte development. *Genesis* **42**, 77-85.
- Baboonian, C., Davies, M. J., Booth, J. C. and McKenna, W. J. 1997. Coxsackie B viruses and human heart disease. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **223**, 31-52.
- Bergelson, J. M., Cunningham, J. A., Droguett, G., Kurt-Jones, E. A., Krithivas, A., Hong, J. S., Horwitz, M. S., Crowell, R. L. and Finberg, R. W. 1997. Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* **275**, 1320-1323.
- Bladt, F., Tafuri, A., Gelkop, S., Langille, L. and Pawson, T. 2002. Epidermolysis bullosa and embryonic lethality in mice lacking the multi-PDZ domain protein GRIP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 6816-6821.
- Lim, B. K., Jo, S. Y. and Kim, J. H. 2014. OR12 is a strong inhibitor of coxsackievirus B4 replication. *Kor. J. Pharmacogn.* **45**, 282-287.
- Cohen, C. J., Shieh, J. T., Pickles, R. J., Okegawa, T., Hsieh, J. T. and Bergelson, J. M. 2001. The coxsackievirus and adenovirus receptor is a transmembrane component of the tight junction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 15191-15196.
- de Mendoza, A., Suga, H. and Ruiz-Trillo, I. 2010. Evolution of the MAGUK protein gene family in premetazoan lineages. *BMC Evol. Biol.* **10**, 93.
- Dorner, A. A., Wegmann, F., Butz, S., Wolburg-Buchholz, K., Wolburg, H., Mack, A., Nasdala, I., August, B., Westermann, J., Rathjen, F. G. and Vestweber, D. 2005. Coxsackievirus-adenovirus receptor (CAR) is essential for early embryonic cardiac development. *J. Cell. Sci.* **118**, 3509-3521.
- Franklin, J. L., Yoshiura, K., Dempsey, P. J., Bogatcheva, G., Jeyakumar, L., Meise, K. S., Pearsall, R. S., Threadgill, D. and Coffey, R. J. 2005. Identification of MAGI-3 as a transforming growth factor- $\alpha$  tail binding protein. *Exp. Cell Res.* **303**, 457-470.
- Funke, L., Dakoji, S. and Bredt, D. S. 2005. Membrane-associated guanylate kinases regulate adhesion and plasticity at cell junctions. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 219-245.
- Dunn, H. A. and Ferguson, S. S. 2015. PDZ protein regulation of GPCR trafficking and signaling pathways. *Mol. Pharmacol.* **115**, 624-639.
- Luo, H., Yanagawa, B., Zhang, J., Luo, Z., Zhang, M., Esfandiari, M., Carthy, C., Wilson, J. E., Yang, D. and McManus, B. M. 2004. Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J. Virol.* **78**, 4289-4298.
- Zhang, H., Wang, D., Sun, H., Hall, R. A. and Yun, C. C. 2007. MAGI-3 regulates LPA-induced activation of Erk and RhoA. *Cell. Signal.* **19**, 261-268.
- Ide, N., Hata, Y., Nishioka, H., Hirao, K., Yao, I., Deguchi, M., Mizoguchi, A., Nishimori, H., Tokino, T., Nakamura, Y. and Takai, Y. 1999. Localization of membrane-associated guanylate kinase (MAGI)-1/BAL-associated protein (BAP) 1 at tight junctions of epithelial cells. *Oncogene* **18**, 7810-7815.
- Nam, H. H., Lim, B. K., Cho, Y. J., Kim, D. S., Kim, Y. J., Chung, S. Y., Jee, Y. M. and Jeon, E. S. 2006. Host gene profiling of coxsackievirus B3 H3 and 10A1-infected mouse heart. *J. Bacteriol. Virol.* **36**, 89-98.
- Jaulin-Bastard, F., Saito, H., Le Bivic, A., Ollendorff, V., Marchetto, S., Birnbaum, D. and Borg, J. P. 2001. The ERBB2/HER2 receptor differentially interacts with ERBIN and PICK1 PSD-95/DLG/ZO-1 domain proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 15256-15263.
- Kim, J. H., Seok, H. and Lim, B. K. 2013. Cardiac-specific coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) deletion inhibit enterovirus infection in murine heart. *J. Bacteriol. Virol.* **43**, 210-216.
- Excoffon, K. J., Hruska-Hageman, A., Klotz, M., Traver, G. L. and Zabner, J. 2004. A role for the PDZ-binding domain of the coxsackie B virus and adenovirus receptor (CAR) in cell adhesion and growth. *J. Cell Sci.* **117**, 4401-4409.
- Knowlton, K. U., Jeon, E. S., Berkley, N., Wessely, R. and Huber, S. 1996. A mutation in the puff region of VP2 attenuates the myocarditic phenotype of an infectious cDNA of the Woodruff variant of coxsackievirus B3. *J. Virol.* **70**, 7811-7818.
- Adamsk, K., Arnold, K., Sabanay, H. and Peles, E. 2003. Junctional protein MAGI-3 interacts with receptor tyrosine phosphatase b (RPTPb) and tyrosinephosphorylated proteins. *J. Cell Sci.* **116**, 1279-1289.
- Lim, B. K., Xiong, D., Dorner, A., Youn, T. J., Yung, A., Liu, T. I., Gu, Y., Dalton, N. D., Wright, A. T., Evans, S. M., Chen, J., Peterson, K. L., McCulloch, A. D., Yajima, T. and Knowlton, K. U. 2008. Coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) mediates atrioventricular-node function and connexin 45 localization in the murine heart. *J. Clin. Invest.*

- 118, 2758-2770.
22. Esfandiarei, M., Luo, H., Yanagawa, B., Suarez, A., Dabiri, D., Zhang, J. and McManus, B. M. 2002. Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent. *J. Virol.* **78**, 4289-4298.
  23. Muller, B. M., Kistner, U., Veh, R. W., Cases-Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E. D. and Garner, C. C. 1995. Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein. *J. Neurosci.* **15**, 2354-2366.
  24. Neudauer, C. L., Joberty, G. and Macara, I. G. 2001. PIST: A novel PDZ/coiled-coil domain binding partner for the rho-family GTPase TC10. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 541-547.
  25. Perego, C., Vanoni, C., Villa, A., Longhi, R., Kaech, S. M., Frohli, E., Hajnal, A., Kim, S. K. and Pietrini, G. 1999. PDZ-mediated interactions retain the epithelial GABA transporter on the basolateral surface of polarized epithelial cells. *EMBO J.* **18**, 2384-2393.
  26. Yao, R., Natsume, Y. and Noda, T. 2004. MAGI-3 is involved in the regulation of the JNK signaling pathway as a scaffold protein for frizzled and Ltap. *Oncogene* **23**, 6023-6030.
  27. Ryu, W. S. 2013. Virology, pp. 149-160. 3th ed. Lifescience. KOR.
  28. Matsuda, S. and Kitagishi, Y. 2013. MAGI Scaffolding molecules involved in cancer cell signaling. *J. Carcinogene. Mutagene.* **10**, 2157-2518.
  29. Sheng, M. and Sala, C. 2001. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 1-29.
  30. Suzuki, K., Kostin, S., Person, V., Elsasser, A. and Schaper, J. 2001. Time course of the apoptotic cascade and effects of caspase inhibitors in adult rat ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **33**, 983-994.
  31. te Velthuis, A. J., Admiraal, J. F. and Bagowski, C. P. 2007. Molecular evolution of the MAGUK family in metazoan genomes. *BMC Evol. Biol.* **7**, 129.
  32. Walters, R. W., van't Hof, W., Yi, S. M., Schroth, M. K., Zabner, J., Crystal, R. G. and Welsh, M. J. Apical localization of the coxsackie-adenovirus receptor by glycosyl-phosphatidylinositol modification is sufficient for adenovirus-mediated gene transfer through the apical surface of human airway epithelia. *J. Virol.* **75**, 7703-7711.
  33. Wu, Y., Dowbenko, D., Spencer, S., Laura, R., Lee, J., Gu, Q. and Lasky, L. A. Interaction of the tumor suppressor PTEN/MMAC with a PDZ domain of MAGI3, a novel membrane-associated guanylate kinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 21477-21485.
  34. Zhu, J., Shang, Y., Xia, C., Wang, W., Wen, W. and Zhang, M. 2011. Guanylate kinase domains of the MAGUK family scaffold proteins as specific phospho-protein-binding modules. *EMBO J.* **30**, 4986-4997.

## 초록 : Membrane associated guanylate kinase inverted-3의 AKT signaling을 통한 enterovirus replication 조절

박진호 · 남궁예나 · 임병관\*  
(중원대학교 의생명과학과)

Membrane associated guanylate kinase inverted-3 (MAGI-3)는 세포-세포 연결의 형성을 유도하는 막단백질인 membrane associated guanylate kinases (MAGUKs)의 한 종류 단백질로 140 kDa 크기를 가진다. MAGI-3는 PTEN/MMAC와 함께 협력하여 AKT/PKB의 kinase 활성을 조절하거나 MAPKs 신호전달경로로 ERK 활성을 조절로 한다. Coxsackievirus B3 (CVB3)는 가장 일반적으로 감염된 심근 세포 사멸으로 인한 바이러스성 심근염을 일으키는 enterovirus에 속하는 인간 병원체이다. 이전 연구에서 protein kinase B (PKB, 또는 AKT)와 extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK1/2)의 활성은 HeLa 세포에서 CVB3 복제를 위해 필수적임이 밝혀졌다. 본 연구에서 enterovirus 복제와 AKT 신호 활성조절에서 MAGI-3의 역할을 검증하였다. MAGI-3-Flag의 발현은 CVB3 감염 후에 AKT 신호 활성과 viral capsid protein VP1의 발현을 유도하였으며 이는 MAGI-3에 의한 enterovirus 증식 조절을 보여주었다. AKT 신호는 MAGI-3 발현에 의해 enterovirus 감염과 함께 유의하게 증가하고 이것은 감염 바이러스의 증식을 활발하게 유도함을 확인하였다. 이 결과는 MAGI-3의 발현은 AKT와 ERK의 활성이 증가하고, 더 나아가 바이러스 증식과 연관이 있다는 것을 입증한다. MAGI-3는 아마도 AKT 신호 조절을 통해 enterovirus 증식 조절에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.