



# 말에서 Krüppel-like Factor Gene Family의 진화적 분석 및 분자생물학적 검증

김경환<sup>1,2</sup>, 박정웅<sup>3</sup>, 조병욱<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 생명자원과학대학 동물생명자원과학과, <sup>2</sup>부산대학교 생명산업융합연구원, <sup>3</sup>전북대학교 동물분자유전육종사업단

## Molecular Characterization and Phylogenetic Analysis of Krüppel-like Factor Gene Family in Horses (*Equus caballus*)

Kyoung Hwan Kim<sup>1,2</sup>, Jeong-Woong Park<sup>3</sup>, Byung-Wook Cho<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, College of Natural Resources and Life Sciences, Pusan National University, Miryang 50463, Korea

<sup>2</sup>Life and Industry Convergence Research Institute, Pusan National University

<sup>3</sup>The Animal Molecular Genetics and Breeding Center, Jeonbuk National University, Republic of Korea

### ABSTRACT

Thoroughbred is a breed of horse mainly used in racing horse industry. Thoroughbred is also used as an important model in the field of exercise and physiology because of their physical characteristics such as tenacity and speediness. Although many studies were focused on physical and physiological adaptations, the regulatory pathways and mechanisms of targeted genes are still remained to be uncovered in race horse. The purpose of this study is to analyze the molecular and phylogenetic characteristics of the Krüppel-like factor (KLF) family genes of *Equus caballus*. As results, Zinc finger domain and coding sequence (CDS) of Thoroughbred KLF family protein are highly conserved among species. Also, quantitative real time polymerase chain reaction (qRT-PCR) was conducted to investigate the mRNA expression levels of horse KLF3, 5, 7, 10, 12 and 16 in different horse tissues. As a result, six KLF genes showed high expression in the cecum and high expression in lung tissue, indicating tissue-specific expression. In conclusion, these results indicate that horse KLF family genes are highly conserved during evolution and will be used as a valuable information for further study of horse KLF genes.

**Key words:** Expression pattern, Krüppel-like factor, Phylogenetics, qRT-PCR, Thoroughbred

### Introduction

Krüppel-like factor (KLF)는 세포 내에서 세포의 분열과 분화, 세포 사멸을 조절하는 전사인자이다. KLF 유전자는 심혈관 질환과 신체 대사적 장애, 암과 같은 인간 질병과 밀접한 관계가 있다. 포유류에 존재하는 KLF gene family는 총 17개로 알려져 있으며, 세포 내에서 주로 세포 분열과 분화, 세포사멸에 관한 기능을 수행한다(Fan et al., 2017).

\*Corresponding author: Byung-Wook Cho

Department of Animal Science, College of Natural Resources and Life Sciences, Pusan National University, Miryang 50463, Korea  
Tel: +82-55-350-5515, Fax: +82-55-350-5519, E-mail: bwcho@pusan.ac.kr

Received: 05 August, 2020, Revised: 18 September, 2020, Accepted: 20 September, 2020



© Journal of Animal Breeding and Genomics 2020. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

KLF 유전자에 따라 조직 발현 양상이 다르다. KLF 6, 10, 11은 모든 조직에서 발현하며, KLF1은 적혈구에서 KLF2는 폐에서, KLF4와 5는 위장관에서 주로 발현한다(Pearson et al., 2008). 조직 특이 발현 양상은 전사인자의 역할을 담당하는 KLF 단백질 내 카르복시 말단에 위치하는 Zn finger domain의 서열 상동성과 관련이 있다(Jiang et al., 2008). KLF 단백질들은 공통적으로 Zn finger domain을 이용하여 타겟 유전자의 promoter 또는 enhancer 내 GC-rich 부위에 결합하여 전사를 조절한다(Miller et al., 1993). 따라서 domain의 구조적 유사성은 조직 특이적 발현 뿐만 아니라 타겟 유전자를 공유하기도 한다. 그러나 KLF 단백질들의 아미노 말단 서열의 차이가 특정 단백질과의 상호작용을 결정하기 때문에 KLF family gene 내의 다양성 및 복잡성이 증가된다. KLF의 진화적인 측면을 연구하기 위한 중간 서열 상동성 분석 뿐만 아니라, 한 종 내의 서열 상동성 분석 또한 중요한 정보로 활용된다. KLF 단백질들을 기능적 특징에 따라 분류하면 크게 3종류로 분류한다. 그룹 1에는 KLF3과 8, 12번이 속하며 carboxy-terminal binding protein (CtBP)과 상호작용하여 전사 억제자로서 기능을 한다. 그룹 2에는 KLF 1과 2, 4, 5, 6, 7번이 속하며 대부분 전사 활성화자 역할을 담당하고 있다. KLF 9와 10, 11, 14, 16번은 그룹 3에 속하며 전사 억제자인 Sin3A 단백질과 상호작용하여 전사를 억제하는 기능을 가지고 있다. 그러나 KLF 15번과 17번은 앞서 언급한 그룹 내 KLF들과 계통학적으로 떨어져 있으며, 뚜렷한 단백질 상호작용 motif를 지니고 있지 않다.

Zn finger domain은 전사 인자들의 DNA 결합 motif로서 작용한다. C2H2 type은 Zn finger domain 중 가장 흔한 일반적인 형태로 아연 이온이 Zn finger domain 내 2개의 cysteine과 2개의 histidine 잔기와 결합하여  $\beta\beta\alpha$  구조를 형성한다(Brayer et al., 2008). 모든 KLF family 내 단백질들은 카르복시 말단 부위에 3개의 서열적으로 보존이 잘 된 Zn finger motif를 지니고 있다. 각각의 Zn finger motif들은 DNA 내 3개의 뉴클레오타이드를 인지하여, 총 9개의 뉴클레오타이드와 상호작용한다(Nagai et al., 2009). KLF1 단백질과  $\beta$ -globin 유전자의 promoter 연구결과에 따르면, KLF1은 해당 유전자의 promoter 내 5'-CACCC-3' 서열을 포함하고 있는 GC-rich 서열에 결합한다(Miller et al., 1993). 이와 마찬가지로 다른 KLF 단백질들도 해당 서열에 결합한다는 사실이 확인되었다(Van Vliet, 2006; Wu, J. and Lingrel et al., 2004).

Zn finger domain은 DNA 결합능 뿐만 아니라, 핵 내 수송에도 중요한 역할을 담당한다. 핵 내로의 수송에 관련된 nuclear localization signal (NL) 서열이 KLF 1과 4, 8, 11번의 Zn finger domain 내에서 발견되어 이를 뒷받침하고 있으며, 해당 서열과 Zn finger domain의 KLF 단백질들의 핵 내 수송에 중요한 역할을 한다(Mehta, 2009; Pandya, 2002; Shields 1997, Spittau et al., 2007).

KLF family 내 단백질의 아미노 말단 부위 서열은 매우 다르며, 이러한 서열 특징은 특정 전사 조절 단백질과의 결합을 결정한다(Schuijter, 2001; Turner and Crossley, 1998; Van Vliet et al., 2000). 이러한 서열의 다양성은 KLF 단백질들이 어떤 전사 활성 또는 억제 인자와 상호작용하는지에 따라 기능적 다양성 및 특이성이 결정된다. KLF 단백질들과 상호작용하는 몇몇 전사 조절 단백질들이 발견되었고, 이를 활용하여 KLF 단백질의 계통수적 그룹화가 이루어져 왔다. 대표적으로 CtBP와 Sin3A 단백질이 특정 KLF 단백질들과 상호작용 한다고 알려져 있으며, 상호작용을 담당하는 KLF 단백질의 구조적 특징은 다음과 같다.

KLF3 단백질은 아미노 말단에 위치하는 74개의 아미노산 서열 때문에 강한 전사억제자 기능을 가진다(Turner and Crossley et al., 1998). 해당 부위는 공동 전사 억제자인 CtBP와 결합함이 확인되었고, KLF3과 8, 12번 단백질 연구를 통해 공통된 서열인 PXDLS를 통해 CtBP와 상호작용함이 밝혀졌다(Schuijter, 2001; Turner, 1998; Van Vliet et al., 2006). 따라서, KLF 3과 8, 12번 단백질은 CtBP와 결합하여 하위 유전자의 발현을 억제하고 그룹 1에 속한다.

KLF 단백질 10과 11번 또한 KLF3과 유사하게 전사 억제자 기능을 가진다(Cook et al., 1999). Sin3A 단백질과의 결합 서열은 Sp1-like 단백질의 연구 결과로부터 나왔으며, Sp1-like 단백질은 hydrophobic-rich motif로 인한  $\alpha$ -helix 구조를 가지고 있는 Sin3-interacting domain (SID)를 통해 Sin3 단백질과 결합한다(Zhang et al., 2001). Sp1-like 단백질의 Sin3 단백질과의 결합은 histone deacetylase 단백질과의 상호작용을 유도하여 전사 억제 인자로서 역할을 한다. 마찬가지로 KLF 9와 10, 11, 16번 또한 AA/VXXL을 포함하는  $\alpha$ -helix 구조를 아미노 말단에 지니고 있으며 이를 통해 전사 억제 인자로서 작용한다(Zhang et al., 2001). KLF14 또한 SID 부위를 지니고 있지만, 아직까지 KLF14와 Sin3A의 상호작용에 대한 연구결과는 존재하지 않는다. 흥미로운 점은 KLF1은 SID 부위를 지니고 있지 않지만, 카르복시 말단의 Zn finger domain을 통해 Sin3 단백질과 상호작용하여 전사 억제자로서 역할하고 있다는 것이다(Chen et al., 2001). 그러나 KLF 9와 10, 11, 14, 16번 모두 Sin3A와 상호작용 할 수 있는 SID 서열의 존재 때문에 그룹 3으로 분류되고 있다.

KLF family 유전자들은 초파리(*Drosophila melanogaster*)에서 최초로 진화적으로 보존된 유전자 군으로써 동정되었다. 그 후 인간, 쥐, 돼지, 닭 등 다양한 종에서 동정 및 연구되어 왔다(Basu, 2004; Chen, 2010; Ravasi, 2003; Suske et al., 2005). 말은 가장 운동에 잘 적응되어 온 가축이며 특히 Thoroughbred 품종은 속도가 빠르고 신체가 튼튼하기 때문에 경마산업에 주로 활용되며 운동생리 분야에서도 중요한 동물모델로서 활용되고 있다(Te Moller and Van Weeren., 2017). 이러한 중요성에도 불구하고 현재까지 말의 KLF family 유전자에 대한 연구는 보고되어 있지 않다. 본 연구는 Thoroughbred 품종의 KLF family 유전자 및 단백질에 대한 구조적 특성에 대한 정보를 제공하기 위해 수행되었다. 또한, 말의 KLF family 유전자들의 조직별 발현을 통해 해당 KLF 유전자들의 조직별 기여가 유사한지 확인해 보고자 수행되었다.

## Materials and Methods

### 유전자 및 단백질 서열 정보

Thoroughbred와 인간, 쥐의 KLF family 유전자 및 단백질 서열정보는 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)의 Genbank DB로부터 추출하였다(Table 1). Coding sequence (CDS)는 5'-untranslated region (UTR)부터 3'-UTR 까지 설정 후 비교 및 분석하였다.

**Table 1.** Sequences of horse KLFs

KLFs	CDS (bp)	Protein (aa)	Chromosome	Accession number
KLF1	1,083	360	7	XM_023645301.1
KLF2	1,074	357	21	XM_023625367.1
KLF3	1,038	345	3	XM_023638230.1
KLF4	1,548	515	25	XM_023629843.1
KLF5	1,101	366	17	XM_023621686.1
KLF6	852	283	29	XM_005606962.3
KLF7	909	302	18	XM_003363309.4
KLF8	1,071	358	X	XM_014728902.2
KLF9	735	244	23	XM_001916945.4
KLF10	1,443	480	9	XM_001493901.6
KLF11	1,557	518	15	XM_023619547.1
KLF12	1,209	402	17	XM_001496646.5
KLF14	984	327	4	XM_023638783.1
KLF15	1,101	366	16	XM_023619835.1
KLF16	750	249	7	XM_023644332.1
KLF17	1,188	395	2	XM_023631495.1

CDS, coding sequence; bp, base pair; aa, amino acid

### 상동성 및 계통수 분석

상동성 및 계통수 분석은 Geneious 6.0.6 프로그램을 사용하였다. 상동성 분석은 Geneious alignment를 사용하였으며, 다음과 같은 조건 하에 수행되었다: cost matrix=65%, Gap open penalty=12, Gap extension penalty=3, Global alignment with free gaps. 계통수 분석은 Thoroughbred 종의 단백질 서열을 사용하여 alignment 후 Geneious Tree Builder를 사용하여 분석하였다. 조건은 다음과 같이 설정하여 수행되었다: cost matrix=Blosum62, Genetic distance model=Jukes-cantor, Tree builder method=Neighbor-Joining.

## 공시재료

Thoroughbred 품종의 8가지 조직(골격근과 간, 폐, 갑상선, 신장, 척수, 대뇌, 맹장) 및 혈액 세포(peripheral blood mononuclear cells와 polymorphonuclear cells)를 사용하였다. 본 연구에서 포함된 동물실험계획서는 부산대학교 동물실험 윤리위원회(PNU-IACUC)에 의해 동물실험의 윤리성과 과학성에 대한 검토를 받아 적합한 것으로 승인(승인번호: PNU-2015-0864)을 획득하여 수행되었다.

## gDNA 추출

gDNA를 추출하기 1 g의 근육조직을 떼어 cell lysis solution (BIOFACT, Korea) 300 ul와 proteinase K (Qiagen, Germany) 1.5 ul에 섞어 60°C에서 3시간 동안 incubation 하였다. 그 후, 100 ul의 7M ammonium acetate (Biosesang, Korea)를 첨가하여 단백질을 침전시켰다. 상층액을 500 ul의 isopropanol (Merk Millipore, USA)에 옮겨 DNA를 응축시켰다. 13,000 rpm으로 원심분리하여 gDNA를 pellet화 하였으며, 75% ethanol (Merk Millipore, USA) 300 ul를 분주하여 다시 원심분리하였다. 상층액을 모두 제거한 후 상온에서 5분간 정치시키고, 최종적으로 3차 증류수를 사용하여 gDNA를 얻어내었다.

## RNA 추출 및 cDNA합성

말의 혈액은 경정맥으로부터 얻었으며, PBMC와 PMN을 분리하기 위해 Polymorphprep (Axis-Shield, Oslo, Norway) 시약을 사용하였다. EDTA tube를 이용하여 획득한 혈액과 Polymorphprep 시약을 1:1로 섞은 후 500 g의 속도로 35분간 원심분리 하였다. 분리된 PBMC와 PMN 층을 각각 회수하였으며 1 x PBS에 세척 후 14,000 g의 속도로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 획득한 PBMC와 PMN은 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 넣은 후 RNA 추출을 위해 -80°C에 보관 하였다. 말의 조직별 시료는 막자사발을 이용하여 조직을 분쇄하고 1.5 ml Tube에 조직을 넣고 1 ml의 Trizol reagent를 넣고 RNA 추출을 위해 -80°C에 보관하였다.

RNA 추출은 Trizol reagent를 넣고 상온에 잠시 방치한 다음 200 ul의 chloroform을 넣고 ice에서 2분정도 방치하였다. 그 다음 4°C에서 10분간 13,000 rpm으로 원심분리하여 상층액을 새 1.5 ml 튜브에 500 ul의 isopropanol을 넣고 원심분리 결과물의 상층액을 옮긴 다음 여러 번 흔들어 주었다. 그 후 다시 4°C에서 10분간 13,000 rpm으로 원심분리를 실시한 다음 상층액을 버린 다음 75%의 Diethyl pyrocarbonate-Ethanol(DEPC-Ethanol)을 300 ul를 넣고 다시 4°C에서 10분간 13,000 rpm으로 원심분리를 하였다. 마지막 원심분리 후, 상층액을 버리고 pellet을 상온에서 잠시 건조시켰다. 추출한 RNA는 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA)를 사용하여 농도와 순도를 확인한 다음 RNase free water 20 ul를 넣어서 -80°C에 보관하였다.

cDNA는 SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA)를 사용하였으며 제조 프로토콜을 따라 합성을 진행하였다. 먼저 RNA의 농도를 1 ul에 맞게 넣은 후 oligo dT primer 1 ul, dNTP 1 ul 그리고 나머지는 DEPC treated water를 사용하여 total 10 ul를 만들었다. (Mixture 1 - Total 10 µl) Mixture 1를 65°C에서 5분간 정치 후 ice에 옮겨 두었다. 그 다음 10 × Buffer 2 ul, MgCl<sub>2</sub> 4 ul, 0.1 M DDT 2 ul, RNase out 1 ul, RT III 1 ul를 넣어주었다. (Mixture 2 - Total 20 ul) Incubating은 50°C에서 50분을 실시한 다음 85°C에서 5분을 실시한 후 ice에 잠시 정치 하였다. 마지막으로 RNase H 1 ul을 넣은 다음 (Mixture3 - Total 21 ul) 37°C에서 20분간 정치 후, D.W를 80 ul를 넣어서 1.5 ml tube에 cDNA를 희석하였다.

## PCR 및 전기 영동

PCR 반응액은 각 조직별 cDNA 1 ul, primer (F+R) 2 ul, 10 x Buffer 2 ul, dNTP 0.4 ul, Taq 0.1 ul 그리고 D.W 13.5 ul로 총 20 ul를 사용하여 RT-PCR을 진행하였다. PCR condition은 94°C에서 10분간 denaturation하고 94°C에서 30초, 각 annealing 온도(61°C, 63°C)에서 30초 그리고 72°C에서 30초간의 35 cycle을 반복하였고 최종적으로 72°C에서 5분간 elongation을 하여 완료하였다. PCR 결과물들은 1% agarose gel에서 90V에서 50분간 전기영동을 실시하였으며 UV transilluminator를 통해서 각 샘플들의 유전자 발현차이를 조사하였다.

## qRT-PCR

유전자들의 상대적 발현량을 확인하기 위해서 BioRad CFX-96 (BioRad, Hercules, CA, Country)를 사용하여 Real-time PCR을 수행하였다. PCR 반응물은 각 시료의 cDNA 1 ul, primer (F+R) 2 ul, 10 x Buffer 2 ul, dNTP 0.4 ul, Taq 0.1 ul, 20 × EvaGreen (BioFACT™) 1 ul D.W 13.5 ul로 총 20 ul를 사용하였다. Real-time PCR condition은 94°C에서 10분간 denaturation 하고 94°C에서 30초, 각 annealing 온도(61°C, 63°C)에서 30초 그리고 72°C에서 30초간의 40 cycle을 반복하고 마지막으로 65°C에서 95°C까지 5초당 0.5°C씩 총 5분간 melting curve를 확인하였다. 모든 측정은 시료 당 3회 반복하였고, 분석방법은  $\Delta C_t$  method를 사용하였다. 유전자들의 상대적 발현은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*)를 이용하여 계산하였다.

## Results

### 말 KLF 유전자의 상동성 분석

NCBI database로부터 인간과 쥐, 말의 KLF coding sequence (CDS) 및 단백질 서열을 획득했으며(Table 1), DNA binding domain인 Zn finger domain과 전체 CDS로 구분하여 상동성 분석을 실시하였다. 그 결과, Zn finger domain은 인간과 말에서 KLF17 (84.0%)을 제외하고 90% 이상의 상동성을 보였다(Table 3). 쥐와 말에서는 인간의 결과와 유사하게 KLF17을 제외하고 Zn finger domain에서 90% 이상의 상동성을 보였으며, KLF17은 77.8%의 상동성으로 낮게 나타났다. CDS의 상동성 분석 결과 인간과 말에서는 KLF2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 12, 16에서 90% 이상의 상동성을 나타냈으며, KLF17 (63.6%)을 제외하고 모두 80% 이상의 상동성을 보여주었다. 쥐와 말의 경우 KLF3, 5, 6, 7, 9, 12에서만 90% 이상의 상동성을 보여주었고, KLF1(70.7%), KLF11(73.2%), KLF14(66.5%), KLF17(47.0%)를 제외하고 모두 80% 이상의 상동성을 나타내었다. 본 연구 결과는 KLF family 유전자가 진화적으로 매우 잘 보존되어 있음을 보여주며, 특히 Zn finger domain의 경우 매우 잘 보존되어 있음을 알 수 있다. 또한, 말의 KLF family 유전자들은 진화적으로 쥐보다 인간과 더 가까움을 보여준다.

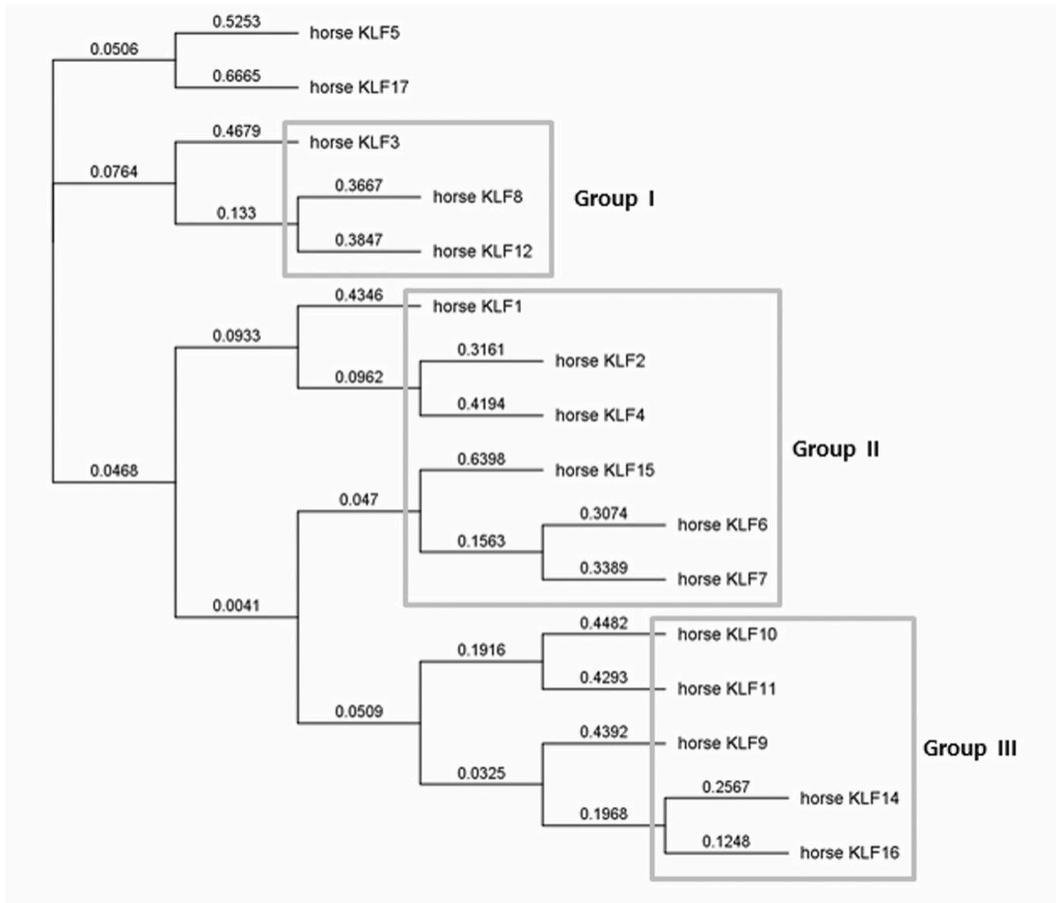
**Table 2.** Primer sets used in this study.

Primer name	Primer sequence (5' to 3')	T <sub>m</sub> (°C)	Product size (bp)
KLF3 F	ATTGGAAGACAGTGGGCAAC	60	153
KLF3 R	CCTCCCAGTGAAGGTTGTGT		
KLF5 F	CACATGAAGAGGCACCAGAA	60	235
KLF5 R	CTGCCTGTTCGTGAGATGAAA		
KLF7 F	GAAGAGAGTCCACCGCTGTC	60	227
KLF7 R	ACCTGGAAAAACACCTGTCG		
KLF10 F	GAGGAGGAGAAGAGCCCAGT	60	214
KLF10 R	GTGACACAGCTGCACAAGGT		
KLF12 F	CACACGGGAGTAAAGCCATT	60	229
KLF12 R	TGCTCTGGTTTCAGACATCG		
KLF16 F	GGAGGGTCTCCATGAACTGA	60	210
KLF16 R	ACAGACGGAGGAGAGACGAA		
GAPDH F	GGTGAAGGTCGGAGTAAACG	60	106
GAPDH R	AATGAAGGGGTCATTGATGG		

T<sub>m</sub>, annealing temperature; bp, base pair

## 말 KLF 유전자의 계통수 분석

말의 15개 KLF family 유전자 간의 상동성 분석 후 계통수 분석을 실시하였다. 그 결과, 인간과 쥐와 유사하게 크게 3개의 그룹으로 나타났다(Fig. 1). 그룹 1은 인간의 결과와 같이 KLF3, 8, 12번이 속했고, 그룹 2 또한 인간과 유사하게 KLF1, 2, 4, 6, 7, 15번이 속했다. 그룹 3의 경우도 인간과 마찬가지로 KLF 9, 10, 11, 13, 14, 16번이 속하였다. 그러나 KLF13이 확인되지 않았기 때문에 포함되지 않았다. KLF family 유전자들의 이러한 그룹화는 기능적인 특징을 반영한다는 점을 고려해 볼 때, 기능적으로도 진화적으로 보존이 잘 되어있음을 시사한다.



**Figure 1.** Phylogenetic tree of human KLFs. Multiple sequence alignment and phylogenetic analysis were performed using Geneious alignment. Analysis was conducted on full-length protein sequences of the 16 horse KLF proteins. Branch labels indicate substitutions per site and gray boxes show the division of horse KLFs into distinct groups.

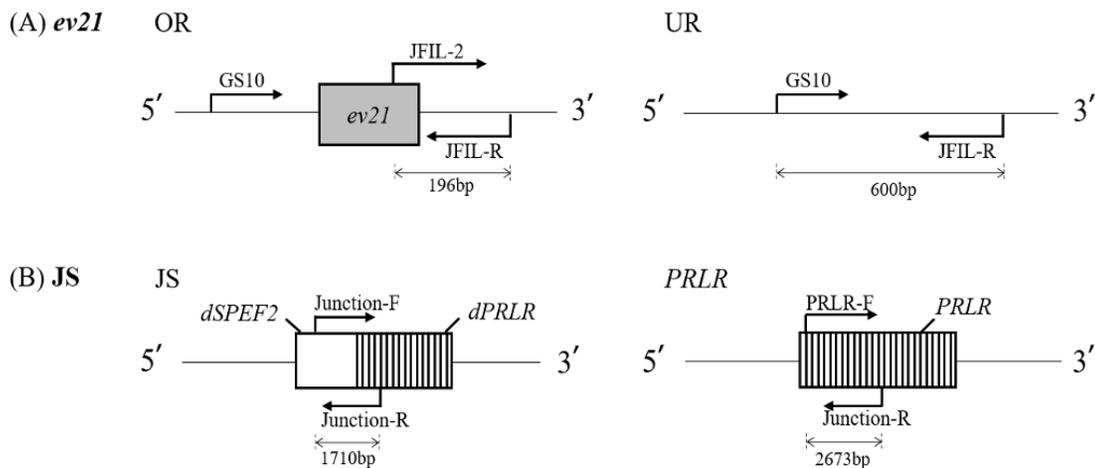
## 말 KLF 단백질들의 Zn finger domain의 특징

KLF 단백질들은 전사인자로서 역할을 하여 하위 유전자들의 발현을 증폭 또는 억제시키는 역할을 한다. 모든 KLF 단백질들은 C-말단에 C2H2 Zn finger domain을 가지고 있다. 본 연구에서 말과 인간, 쥐의 Zn finger domain의 서열적 특징을 비교해 본 결과 16개의 모든 말 KLF 단백질들의 C-말단에 Zn finger domain이 존재함을 확인하였다(Table 3, Fig. 2). 말의 Zn finger domain 또한 특정 DNA 서열에 결합하기 위해 중요한 cysteine과 histidine 잔기가 모두 보존되어 있었다. 말의 Zn finger domain은 총 3개의 domain으로 구성되어 있었으며 첫 번째와 두 번째 domain은 23개의 아미노산, 세 번째 domain은 21개의 아미노산으로 구성되었다. 이러한 결과는 말의 Zn finger domain이 인간과 쥐와 서열적인 상동성 뿐만 아니라, 구조적인 특징 또한 진화적으로 매우 잘 보존되어 있음을 나타낸다.

**Table 3.** Amino acid sequence similarities of KLFs from horse, human and mouse.

KLF family	Horse (%) homology with human		Horse (%) homology with mouse	
	Zn finger	CDS	Zn finger	CDS
KLF1	96.3	81.4	90.2	70.7
KLF2	96.3	95.8	96.3	86.6
KLF3	100.0	97.4	100.0	94.5
KLF4	100.0	91.2	100.0	85.8
KLF5	100.0	97.8	96.3	90.0
KLF6	98.8	93.6	98.8	90.5
KLF7	100.0	97.7	100.0	98.0
KLF8	100.0	88.2	100.0	83.7
KLF9	100.0	98.4	100.0	97.1
KLF10	98.8	94.4	98.8	85.2
KLF11	97.5	80.5	97.5	73.2
KLF12	100.0	98.8	100.0	97.5
KLF14	98.8	82.4	97.5	66.5
KLF15	98.8	86.1	100.0	85.1
KLF16	95.1	91.7	96.3	86.1
KLF17	84.0	63.6	77.8	47.0

CDS, coding sequence

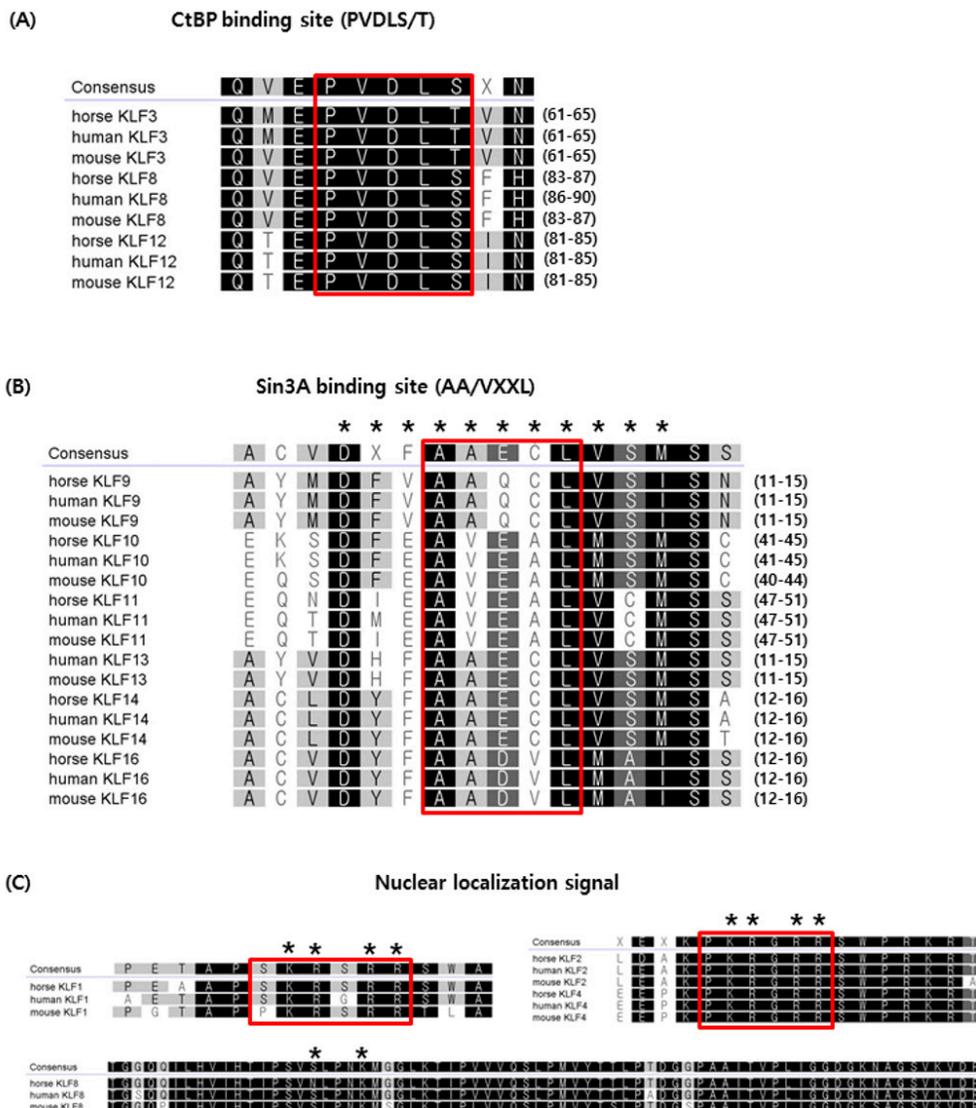


**Figure 2.** Multiple sequence alignment of KLF zinc finger domains in horse, human, and mouse. Carboxy-terminal DNA-binding regions of horse, human, and mouse KLFs are highly conserved. Three C2H2 zinc finger motifs are indicated above the consensus sequence. The conserved cysteine and histidine in the zinc fingers are shown in capital letter. The residues that bind and determine the sequence specificity to DNA are marked with asterisk.

### 말 KLF 단백질 내 전사 조절자의 기능적 결합 부위

Zn finger domain 뿐만 아니라, KLF family 단백질들의 N-말단에 존재하는 CtBP 결합 부위, Sin3A 결합 및 NLS 부위를 분석하였다. 인간과 쥐의 N-말단의 서열을 말 N-말단 서열과 alignment하고 기능적으로 중요한 위치만을 선별하였다. 그 결과 그룹 1에 속하는 말 KLF3, 8, 12번의 N-말단에 CtBP 결합 motif인 PVDLS/T가 존재함을 확인하였다(Fig. 3A). KLF3과 12번의 경우 인간, 쥐, 말에서 모두 같은 부위에 존재하였지만, KLF8번에서는 말과 쥐는 인간과 다른 부위에 존재하였다. 그룹 3에 속하며 Sin3A 결합 부위인 AA/VXXL을 지니고 있는 KLF9, 10, 11, 13, 14, 16번 또한 말에서도 동일하게 존재함을 확인하였다(Fig. 3B). 그러나 KLF13번은 아직까지 동정되지 않아서 말에서의 존재 유무는 확인할 수 없었다. 흥미롭게도 KLF10을 제외한 KLF 단백질에서 Sin3A의 결합부위의 위치가 모두 동일하였다. 아울러, KLF10의 Sin3A 결합 motif의 위치는 CtBP의 경우와는 달리 말과

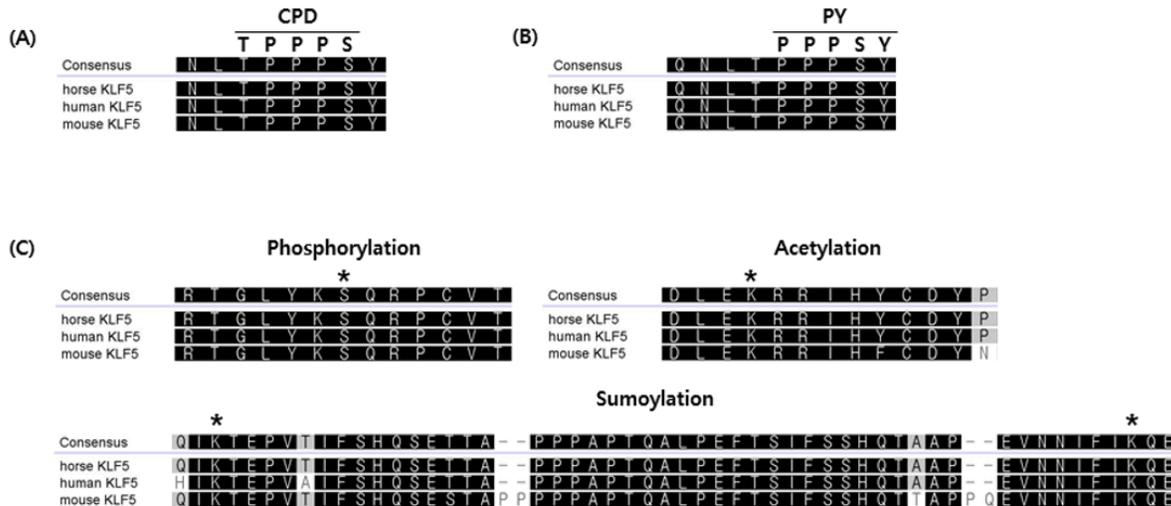
인간이 동일 하였다. NLS는 전사인자가 핵 내로 들어가는 과정에서 중요한 역할을 하며, 인간 KLF1은 두 개의 NLS를 지니고 있다. 첫 번째 NLS는 Zn finger domain과 근접하게 위치하고 있으며, 두 번째 NLS는 Zn finger domain 내에 위치하고 있다. 그러나 alignment 분석 결과 말의 KLF1은 Zn finger domain 앞에 존재하는 하나의 NLS만이 확인되었다(Fig. 3C). 인간의 KLF4 또한 두 개의 NLS가 N-말단과 Zn finger domain 근처에 각각 위치하고 있다. 말의 경우 Zn finger domain 앞에 위치하고 있는 하나의 NLS만이 확인되었다. 인간 KLF8의 경우 non-classic NLS 서열을 지니고 있다고 보고되었[11]. 151번과 200번 아미노산 잔기에 걸쳐 존재하며, 두 개의 NLS 역할에 중요한 잔기인 S165와 K171을 포함하고 있다. 말의 경우 148번과 197번 아미노산 잔기에 걸쳐 존재하였지만, 중요한 잔기인 두 개의 잔기의 상대적인 위치는 인간과 쥐에서와 같이 동일하였다. 본 연구 결과 말의 KLF 단백질들의 전사 조절인자의 기능적 결합부위는 인간과 쥐에서와 마찬가지로 매우 잘 보존되어 있음을 확인할 수 있었다.



**Figure 3.** Sequence alignment of conserved motifs in horse, human, and mouse KLFs. (A) CtBP binding site in KLF3, 8, and 12. The conserved PVDLS/T motif is shown in a red box. (B) Sin3A binding site in KLF9, 10, 11, 13, 14, and 16. The conserved AA/VXXL motif is shown in a red box. The residues corresponding to the conserved  $\alpha$ -helical region are shown in asterisk. (C) NLS sequences in KLF1, 2, 4, and 8. Core NLS residues in KLF1, 2, and 4 (a lysine and four arginines) are marked in asterisk in the conserved sequences (red boxes). Conserved serine and lysine in KLF8 are marked in asterisk. NLS, nuclear localization signal; CtBP, carboxy-terminal binding protein; Sin3A, SWI-independent 3A.

## 말 KLF 단백질의 번역 후 변형

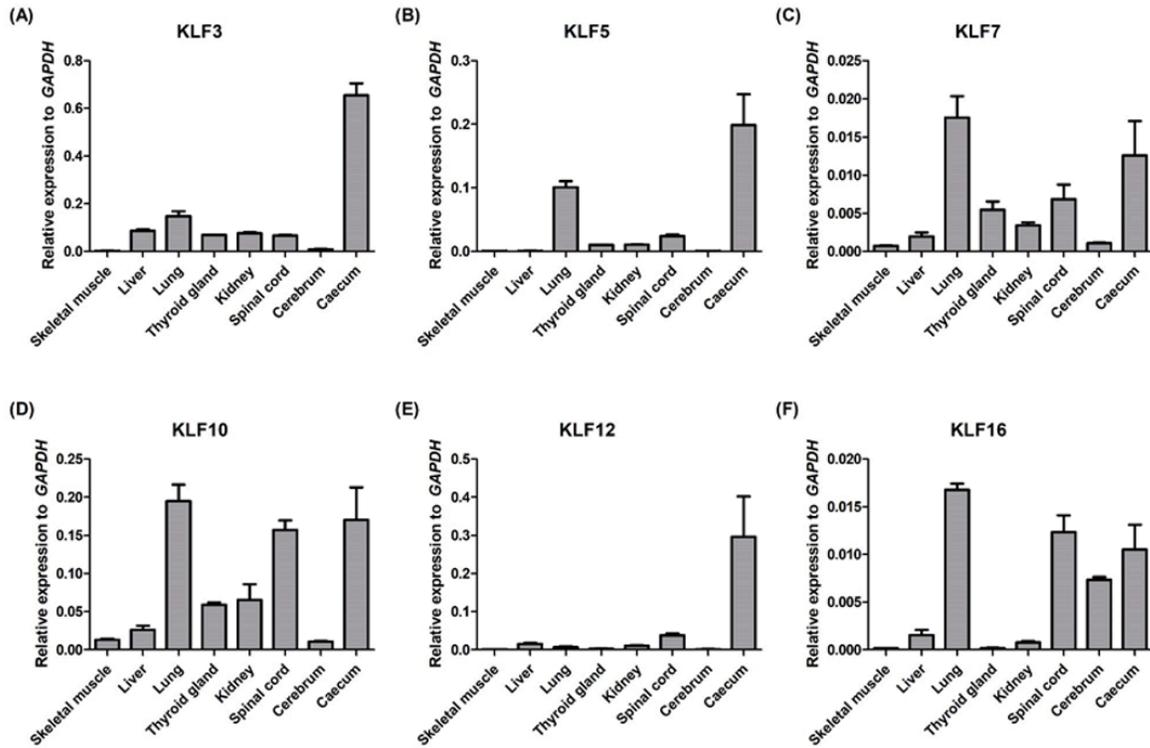
인간 KLF5 단백질은 ubiquitination과 phosphorylation, acetylation, sumoylation의 번역 후 변형 과정을 거친다. 말의 KLF5도 이러한 번역 후 변형 과정이 일어나는 부위의 존재 여부를 확인하였다. 그 결과 말의 KLF5 단백질 서열 내 Fbw7이 결합하는 CPD motif (Fig. 4A)와 WWP1 E3 ubiquitin ligase가 결합하는 PY motif(Fig. 4B)가 존재함을 확인하였다. 이러한 결과는 KLF5 단백질이 Fbw7과 WWP1을 통해 ubiquitin-proteasome pathway를 거침을 시사한다. 또한 말 KLF5 단백질 서열 내에 PKC phosphorylation 부위인 S153과 p300 acetylation 부위인 K369와 두 개의 sumoylation 부위인 K162와 K209가 모두 존재함을 확인하였다(Fig. 4C). 말 KLF5의 CDS 상동성이 인간과 쥐와 90% 이상임을 고려할 때, 본 연구 결과는 말의 KLF5 또한 인간과 쥐와 유사하게 단백질 번역 후 변형과정을 거침을 시사한다.



**Figure 4.** Post-translational modification sequences in horse, human, and mouse KLF5. The Fbw7 binding CPD motif (A), WWP1 binding PY motif (B), PKC phosphorylation site serine, acetylation site lysine, and sumoylation site lysines (C) are highly1 conserved among the horse, human, and mouse KLF5 sequences. The post-translational modification residues are marked in asterisk. Fbw7, F-box/WD repeat-containing protein 7; CPD, CDC4 phosphodegrom; WWP1, NEDD4-like E3 ubiquitin-protein ligase; PY, PPSY motif; PKC, protein kinase C.

## 말 KLF family 유전자의 조직별 발현

Thoroughbred 품종의 골격근과 간, 폐, 갑상선, 신장, 척수, 대뇌, 맹장 조직을 이용하여 cDNA를 합성 후 시료들을 섞어 16개의 KLF 유전자를 표적하는 primer를 이용해 RT-PCR을 수행하였다. 그 중 KLF3과 5, 7, 10, 12, 16이 조직별 cDNA mixture에서 발현을 보였다. 그 후, 해당 primer들을 활용하여 각 조직별 발현을 확인 해 보았다. GAPDH의 발현을 기준으로 normalization하여 절대값을 확인하였다. 그 결과 KLF3는 맹장에서 특이적으로 발현이 높았으며(Fig. 5A), KLF5는 폐와 맹장에서 발현이 높았다(Fig. 5B). KLF7 또한 KLF5와 유사하게 폐와 맹장에서 발현이 다른 조직에 비해 발현이 높았지만, 절대적인 발현량은 낮았다(Fig. 5C). KLF10의 경우 폐와 척수, 맹장에서 발현이 높았으며(Fig. 5D), KLF12는 맹장에서 특이적으로 발현이 높았다(Fig. 5E). 마지막으로 KLF16은 폐와 척수, 대뇌, 맹장에서 발현이 높았지만, KLF7과 마찬가지로 절대적인 발현량이 낮았다(Fig. 5F). 본 연구 결과 6개의 KLF 유전자는 맹장에서 공통적으로 높은 발현을 보였으며, 폐 조직에서 높은 발현을 나타내어 조직 특이적 발현을 확인할 수 있었다.



**Figure 5.** The mRNA expression levels of horse KLF3, 5, 7, 10, 12 and 16 in the horse tissues. The mRNA expression level of KLF genes were measured by qRT-PCR. 8 different Thoroughbred horse tissues including skeletal muscle, liver, lung, thyroid gland, kidney, spinal cord, cerebrum, and caecum were used. GAPDH was used as a reference gene. GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

## Discussion

말에서는 현재까지 *Equus caballus*와 *Equus przewalskii* 두 가지 종에 대한 genome 서열 분석이 완료되었다. Thoroughbred 품종은 *Equus caballus* 종에 속한다. *Equus przewalskii* 종의 경우 인간과 쥐에서 현재까지 알려진 17개의 KLF family 유전자의 mRNA 서열이 생물정보학적 분석을 통해 알려져 있다. 그러나 *Equus caballus* 종은 KLF13을 제외한 16개의 KLF family 유전자만 생물정보학 분석을 통해 알려진 상태이다. 따라서 본 연구는 말의 16개의 KLF family 유전자를 대상으로 인간과 쥐의 KLF family 유전자와 비교·분석하였다. KLF family 유전자들은 전사인자로서 세포내에서 다양한 역할을 수행한다. 따라서 KLF 유전자의 연구는 운동의 중요한 모델로서 활용되고 있는 말에서도 중요하며, genome 및 RNA sequencing의 결과 확인된 서열 데이터를 기반으로 추가적인 연구가 필요하다. 아울러, KLF9와 10, 14번은 간에서 당대사에 관여한다고 보고되었으며(Cui, 2019; Wang, 2017; Yang et al., 2017), KLF15는 골격근의 GLUT4의 발현조절에 직접적인 역할을 한다고 보고되었다(Zorzano et al., 2005) 또한 KLF15가 결여된 쥐에서 비정상적인 지방과 에너지 대사를 보이며, 극단적인 당에너지 의존도와 근육 피로도에 따른 운동의 지속력에 심각한 영향을 준다고 보고되었다(Haldar et al., 2012). 따라서 KLF 유전자에 대한 연구는 말 운동·생리에 대한 메커니즘을 이해하는데 중요한 후보 유전자로 활용될 수 있어, 이에 대한 연구가 매우 중요하다. 그러나 말의 genome 서열이 알려져 있음에도 불구하고, 말 KLF family 유전자의 연구가 미비한 실정이다. 이에 본 연구에서 KLF family 유전자의 구조 및 특징을 다른 종과 비교·분석 하였다. 말 KLF family 단백질들은 비교적 연구가 잘 되어있는 인간과 쥐의 서열과 비교하였을 때 진화적으로 매우 잘 보존되어 있었으며(Table 2, Fig. 1), 특히 전사인자로서 매우 중요한 domain인 C2H2 Zn finger domain은 높은 상동성을 나타내었다(Fig. 2). 이를 통해 말 KLF 전사인자들의 하위 유전자의 결합 부위를 예측할 수 있으며, KLF family 단백질들의 분자생물학적 메커니즘을 규명하는데 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

KLF family 단백질들은 전사인자로서 역할을 하기 때문에 다른 전사 조절인자들과 기능적으로 상호작용하여 다른 유전자들의 전사를 증폭 또는 억제한다. 말 KLF family 단백질들은 인간과 쥐와의 서열적 상동성 뿐만 아니라, 다른 유전자와의 기능적 결합부위 또한 많은 공통점을 나타내었다. 특히, 기능적 분류에 중요한 역할을 하는 CtBP와 Sin3A의 결합 부위가 매우 잘 보존되어 있어, 향후 KLF 연구에 후보 상호작용 단백질로 역할을 할 것으로 사료된다(Fig. 3). 그러나 핵 내로의 이동에 중요한 역할을 하는 NLC의 존재가 인간의 연구결과와는 다르기 때문에 추가적인 연구를 통한 NLC 연구가 필요하다. 또한 KLF5의 번역 후 변형과정이 인간과 쥐의 것과 매우 유사하기 때문에(Fig. 4), 진화적으로 서열 뿐만 아니라 기능적인 면에서도 잘 보존되어 있음을 알 수 있다. 그러나 인간과는 달리 말은 운동능력이 뛰어나고 식이에 따른 에너지 대사적 측면이 다르기 때문에, 서열 및 기능적 상동성이 높더라도 실제적인 세포 내 기능 규명이 필요하다.

KLF13은 Sin3A와 상호작용하는 그룹 3에 속하는 KLF 유전자이기 때문에 향후 Sin3A의 결합부위 및 타 종의 KLF13의 하위 유전자 발현 연구를 통해 KLF13의 동정이 가능할 것으로 사료된다.

조직별 발현을 통한 유전자의 연구 시료 결정은 효율적인 연구를 위해 매우 중요하다. KLF family 유전자들은 전사인자로서 그 중요성이 매우 높고, 조직별 특이적인 발현을 나타내기 때문에, 다양한 조직을 활용하여 발현의 유무를 확인하는 작업은 추후 연구를 위해 중요하다. 본 연구에서는 8개의 조직에서 발현하는 KLF 3, 5, 7, 10, 12, 16번을 타겟으로 분석하였으며, 특이적으로 맹장 및 폐에서 높은 발현을 확인하였다(Fig. 5). 말은 초식동물로 맹장이 매우 크며, 영양분의 흡수에 중요한 역할을 하고 셀룰로오스를 분해하는 박테리아가 존재한다. 이는 말 KLF 유전자의 역할이 맹장에서 중요할 것을 시사하며 KLF10의 당대사와의 관련성을 고려할때(Yang et al., 2017), 말의 맹장에서의 KLF 유전자의 역할이 중요함을 알 수 있다.

말의 폐는 말 운동 · 생리에서 중요한 역할을 담당한다. 말은 강한 운동 시 폐출혈이 일어나게 되며, 이는 저조한 경주성적과 관련이 깊다(Crispe et al., 2019). 폐에서 발현하는 KLF 유전자가 폐 발달에 중요한 역할을 함이 보고 되었고(Jiang, 2013; Wani et al., 1999), KLF 유전자들의 세포사멸을 조절하는 역할을 고려하였을 때, KLF5와 KLF10와 같이 폐 조직 내 발현이 높은 유전자들을 중심으로 폐 세포 내의 역할을 규명하는 연구가 중요할 것으로 사료된다. 아울러, 16개의 말 KLF family 유전자들의 모든 발현 유무를 확인하기 위해 더 많은 조직별 시료를 활용한 분석이 필요하며, 이는 향후 말 KLF 유전자의 메커니즘 연구에 중요한 자료로 활용될 것으로 사료된다.

## Acknowledgments

이 과제는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음

## References

- Basu, P., Sargent, T. G., Redmond, L. C., Aisenberg, J. C., Kransdorf, E. P., Wang, S. Z., Ginder, G. D. and Lloyd, J. A. 2004. Evolutionary conservation of KLF transcription factors and functional conservation of human  $\gamma$  in chicken. *Genomics* 84, 311-319.
- Brayer, K. J. and Segal, D. J. 2008. Keep your fingers off my DNA: protein-protein interactions mediated by C2H2 zinc finger domains. *Cell. Biochem. Biophys.* 50, 111-131.
- Chen, X. and Bieker, J. J. 2001. Unanticipated repression function linked to erythroid Kruppel-like factor. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3118-3125.
- Chen, Z., Lei, T., Chen, X., Zhang, J., Yu, A., Long, Q., Long, H., Jin, D., Gan, L. and Yang, Z. 2010. Porcine KLF gene family: Structure, mapping, and phylogenetic analysis. *Genomics* 95, 111-119.
- Cook, T., Gebelein, B., Belal, M., Mesa, K. and Urrutia, R. 1999. Three conserved transcriptional repressor domains are a defining feature of the TIEG subfamily of Sp1-like zinc finger proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 29500-29504.
- Crispe, E. J., Secombe, C. J., Perera, D. I., Manderson, A. A., Turlach, B. A. and Lester, G. D. 2019. Exercise - induced pulmonary haemorrhage in Thoroughbred racehorses: a longitudinal study. *Equine. Vet. J.* 51, 45-51.

- Cui, A., Fan, H., Zhang, Y., Zhang, Y., Niu, D., Liu, S., Liu, Q., Ma, W., Shen, Z., Shen, L., Liu, Y., Zhang, H., Xue, Y., Cui, Y., Wang, Q., Xiao, X., Fang, F., Yang, J., Cui, Q. and Chang, Y. 2019. Dexamethasone-induced Krüppel-like factor 9 expression promotes hepatic gluconeogenesis and hyperglycemia. *J. Clin. Investig.* 129(6), 2266-2278.
- Fan, Y., Lu, H., Liang, W., Hu, W., Zhang, J., & Chen, Y. E. 2017. Krüppel-like factors and vascular wall homeostasis. *Journal of molecular cell biology*, 9(5), 352-363.
- Haldar, S. M., Jeyaraj, D., Anand, P., Zhu, H., Lu, Y., Prosdocimo, D. A., Eapen, B., Kawanami, D., Okutsu, M., Brotto, L., Fujioka, H., Kerner, J., Rosca, M. G., McGuinness, O. P., Snow, R. J., Russell, A. P., Gerber, A. N., Bai, X., Yan, Z., Nosek, T. M., Brotto, M., Hoppel, C. L. and Jain, M. K. 2012. Kruppel-like factor 15 regulates skeletal muscle lipid flux and exercise adaptation. *PNAS.* 109, 6739-6744.
- Jiang, J., Chan, Y. S., Loh, Y. H., Cai, J., Tong, G. Q., Lim, C. A., Robson, P., Zhong, S. and Ng, H. H. 2008. A core Klf circuitry regulates self-renewal of embryonic stem cells. *Nat. Cell. Biol.* 10, 353-360.
- Jiang, M., Ku, W. Y., Fu, J., Offermanns, S., Hsu, W. and Que, J. 2013. Gpr177 regulates pulmonary vasculature development. *Development.* 140, 3589-3594.
- Mehta, T. S., Lu, H., Wang, X., Urvalek, A. M., Nguyen, K. H. H., Monzur, F., Hammond, J. D., Ma, J. Q. and Zhao, J. 2009. A unique sequence in the N-terminal regulatory region controls the nuclear localization of KLF8 by cooperating with the C-terminal zinc-fingers. *Cell. Res.* 19, 1098-1109.
- Miller, I. J. and Bieker, J. J. 1993. A novel, erythroid cell-specific murine transcription factor that binds to the CACCC element and is related to the Kruppel family of nuclear proteins. *Mol. Cell. Biol.* 13, 2776- 2786.
- Nagai, R., Friedman, S. L. and Kasuga, M. 2009. (Editors) *The Biology of Kruppel-like Factors*. New York: Springer.
- Pandya, K. and Townes, T. M. 2002. Basic residues within the Kruppel zinc finger DNA binding domains are the critical nuclear localization determinants of EKLF/KLF-1. *J. Biol. Chem.* 277, 16304-16312.
- Pearson, R., Fleetwood, J., Eaton, S., Crossley, M. and Bao, S. 2008. Kruppel-like transcription factors: a functional family. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 40, 1996-2001.
- Ravasi, T., Huber, T., Zavolan, M., Forrest, A., Gaasterland, T., Grimmond, S. and Hume, D. A. 2003. Systematic characterization of the zinc-finger-containing proteins in the mouse transcriptome. *Genome. Res.* 13, 1430-1442.
- Schuijfer, M., Hilger-Eversheim, K., Dobner, T., Bosserhoff, A. K., Moser, M., Turner, J., Crossley, M. and Buettner, R. 2001. Induction of AP-2alpha expression by adenoviral infection involves inactivation of the AP-2rep transcriptional corepressor CtBP1. *J. Biol. Chem.* 276, 27944-27949.
- Shields, J. M. and Yang, V. W. 1997. Two potent nuclear localization signals in the gut-enriched Kruppel-like factor define a subfamily of closely related Kruppel proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 18504-18507.
- Spittau, B., Wang, Z., Boinska, D. and Kriegelstein, K. 2007. Functional domains of the TGF-beta-inducible transcription factor Tieg3 and detection of two putative nuclear localization signals within the zinc finger DNA-binding domain. *J. Cell. Biochem.* 101, 712-722.
- Suske, G., Bruford, E. and Philipsen, S. 2005. Mammalian SP/KLF transcription factors: bring in the family. *Genomics* 85, 551-556.
- Te Moller, N. C. and van Weeren, P. R. 2017. How exercise influences equine joint homeostasis. *The Veterinary Journal*, 222, 60-67.
- Turner, J. and Crossley, M. 1998. Cloning and characterization of mCtBP2, a co-repressor that associates with basic Kruppel-like factor and other mammalian transcriptional regulators. *EMBO. J.* 17, 5129-5140.
- Van Vliet, J., Crofts, L. A., Quinlan, K. G., Czolij, R., Perkins, A. C. and Crossley, M. 2006. Human KLF17 is a new member of the Sp/KLF family of transcription factors. *Genomics* 87, 474-482.
- Van Vliet, J., Turner, J. and Crossley, M. 2000. Human Kruppel-like factor 8: a CACCC-box binding protein that associates with CtBP and represses transcription. *Nucleic. Acids. Res.* 28, 1955-1962.

- Wang, L., Tong, X., Gu, F., Zhang, L., Chen, W., Cheng, X., Xie, L., Chang, Y. and Zhang, H. 2017. The KLF14 transcription factor regulates hepatic gluconeogenesis in mice. *J. Biol. Chem.* 292, 21631-21642.
- Wani, M. A., Wert, S. E. and Lingrel, J. B. 1999. Lung Kruppel-like factor, a zinc finger transcription factor, is essential for normal lung development. *J. Bio. Chem.* 274, 21180-21185.
- Wu, J. and Lingrel, J. B. 2004. KLF2 inhibits Jurkat T leukemia cell growth via upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1. *Oncogene* 23, 8088-8096.
- Yang, X., Chen, Q., Sun, L., Zhang, H., Yao, L., Cui, X., Gao, Y., Fang, F. and Chang, Y. 2017. KLF10 transcription factor regulates hepatic glucose metabolism in mice. *Diabetologia.* 60, 2443-2452.
- Zhang, J. S., Moncrieffe, M. C., Kaczynski, J., Ellenrieder, V., Prendergast, F. G. and Urrutia, R. 2001. A conserved alpha-helical motif mediates the interaction of Sp1-like transcriptional repressors with the corepressor mSin3A. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5041-5049.
- Zorzano, A., Palacin, M. and Guma, A. 2005. Mechanisms regulating GLUT4 glucose transporter expression and glucose transport in skeletal muscle. *Acta. Physiol.* 183, 43-58.