

대장암 세포 특이적인 CDX1에 의한  
Cyclooxygenase-2 발현 조절

연세대학교 대학원

의과학사업단

장 인 환

대장암 세포 특이적인 CDX1에 의한  
Cyclooxygenase-2 발현 조절

지도교수 윤 주 현

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2001년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

장 인 환

# 장인환의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2001년 12월 일

## 감사의 글

본 논문을 만들기까지 세심한 관심과 많은 격려로 충고하여주신 이원재 교수님, 윤주현 교수님, 김원호 교수님께 먼저 깊은 감사를 드립니다.

그리고 저의 연구 진행에 많은 도움을 주신 실험실 동료들인 용식이형, 성철이형, 지환이형, 기범이형, 상희, 그리고 김연희 선생님에게 고마움을 전합니다.

끝으로 많은 어려움 속에서도 사랑과 격려로 힘이 되어 주신 부모님과 누나들 그리고 주희에게 감사를 드립니다.

# 목 차

국문 요약 .....	1
I. 서론 .....	2
II. 재료 및 방법	
1. 세포 배양 .....	5
2. Plasmid construction .....	5
3. Site-directed mutagenesis .....	6
4. Transfection .....	7
5. Reporter gene assay .....	7
III. 결과	
1. 대장암 세포주에서 COX-2 유전자의 CDX1에 의한 특이적 조절 .....	9
2. 대장암 세포주에 의존적인 CDX1에 의한 COX-2 발현 증가 .....	9
3. Non-intestine cell에서의 CDX1 전사 조절 능력 조사 .....	11
4. COX-2 promoter deletion mutant를 이용하여 CDX1에 의해 조절되는 region 조사 .....	13
5. AP-1과CREmutated COX-2 promoter를 이용한 COX-2 발현 조절 조사 .....	16
6. CDX1에 의한 AP-1과 CRE 활성화도 증가 .....	18
가. CDX1에 의한 AP-1 활성화도 조절 .....	18
나. AP-1 활성화에 관여하는 전사 인자 복합체와 COX-2 발현과의 관계 .....	19
다. CDX1이 c-Jun 전사 인자 활성화에 미치는 영향 .....	20
라. CDX1에 의한 CRE의 활성화도 조절 .....	21
마. CDX-1이 CREB 전사 인자 활성화에 미치는 영향 .....	22

IV. 고찰	23
V. 결론	25
VI. 참고 문헌	26
영문 요약	31

## 그림 목차

그림 1. Caco-2 에서 CDX1 에 의한 COX-2 의 발현 조절	10
그림 2. 대장암이 아닌 다른 조직으로부터 유래된 세포에서의 CDX1 에 의한 COX-2 의 발현 조절능 확인	10
그림 3. CDX1 에 의한 <i>drosomycin</i> 의 발현 조절	12
그림 4. CDX1 의 activating domain 의 전사 조절능	12
그림 5. COX-2 promoter 내의 element 들의 위치와 mutant 의 모식도	14
그림 6. COX-2 promoter deletion constructs 의 발현 변화 분석	15
그림 7. COX-2 promoter 에 있어서 AP-1 과 CRE mutant 의 분석	17
그림 8-1. CDX1 에 의한 세포 특이적인 AP-1 활성화도 조절	18
그림 8-2. AP-1 활성화에 관여하는 전사 인자 복합체와 COX-2 발현과의 관계	19
그림 8-3. CDX1 이 c-Jun 전사 인자 활성화에 미치는 영향	20
그림 8-4. CDX1 에 의한 CRE 의 활성화도 조절	21
그림 8-5. CDX1이 CREB 전사 인자 활성화에 미치는 영향	22

## 국문 요약

### 대장암 세포 특이적인 CDX1에 의한 cyclooxygenase2 발현 조절

COX의 inducible isoform인 cyclooxygenase2 (COX-2)는 대장암에서 중요한 역할을 한다. COX-2 발현에 관여하는 많은 전사 인자가 보고 되었지만 대장 특이적인 COX-2 전사 인자에 관해서는 보고된 바 없다. 이에 본 연구는 대장암 특이적 oncogene인 CDX1에 의한 COX-2 발현 조절에 관해서 알아보았다. 그 결과, 1) Caco-2 세포에서 CDX1의 발현은 COX-2 reporter gene 발현을 조절하는 반면에 CDX2는 아무런 영향이 없었고, 2) 이러한 COX-2의 reporter gene 발현은 대장암 세포 특이적으로 관찰되었으며, 3) COX-2 promoter mutant 실험을 통해 CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절은 AP-1과 CRE를 통해서 일어난다는 것을 알았다. 또한 4) AP-1과 CRE minimal promoter의 발현이 CDX1에 의해 조절되며, 5) AP-1과 CRE를 mutation 시킨 COX-2 promoter의 CDX1에 의한 발현양은 wild type COX-2 promoter에 비해 현저하게 감소하였다. 이러한 결과들을 정리하면, CDX1의 대장암 세포에서 COX-2에 대한 조절 기작은 대장암 세포 특이적인 AP-1과 CRE의 활성화에 의해 일어난다고 볼 수 있다. 이러한 실험 결과는 대장암 발생과 진행에 있어서 CDX1의 oncogenic potential에 대한 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

핵심 되는 말 : 대장암, COX-2, CDX1, AP-1, CRE



# 대장암 세포 특이적인 CDX1에 의한 cyclooxygenase2 발현조절

< 지도교수 윤 주 현 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

장 인 환

## I. 서론

Homeobox gene은 *Drosophila*에서 처음 발견되었으며 많은 종에서 초기 발생, 기관 형성과 신생물 (neoplasia) 발생에 있어서 중요한 역할을 하고 특정 DNA sequence를 인식하는 homeo-domain을 암호화하여 유전자 전사를 촉진 또는 억제한다<sup>1</sup>. 이 유전자의 발현은 태아 말기에 대부분이 감소하나 소장과 대장 같은 cell renewal이 활발하고 cell remodeling을 하는 특정 기관에서는 성인에 있어서도 발현이 된다<sup>2</sup>. 대부분의 homeo-gene들은 HOM/Hox clusters라 명명되는 cluster에 존재하나 일부 유전자들은 genome에 산재 되어 있는데 caudal family가 그 대표적인 유전자이다. *Drosophila* caudal gene은 발생시 posterior structure 형성에 중요하며 성체에서는 gonads와 gut에 국한적으로 발현하여 intestinal development에 관계된 gene들을 발현시켜 gut의 기관형성과 분화에 관여한다<sup>3,4</sup>. *Drosophila* caudal gene의 mice homologue인 CDX1, CDX2 및 CDX4는 1980년대 후반과 1990년대 초에 걸쳐 보고되었으며 human CDX1과 CDX2는 1990년대 후반에 보고 되었다<sup>5</sup>. Mouse의 배아 상태에서는 각 유전자의 발현 양상이 복잡하지만 adult mouse에서는 소장과 대장의 상피세포에서만 발현된다<sup>2,6</sup>. CDX1과 CDX2의 DNA binding domain은 다른 homeo-domain처럼 AT가 많은 TTTAT sequence를 가진 DNA element와 결합하여 amino-terminal 부분에 위치한 activating domain에 의해 전사 활성이 일어난다<sup>7,8,9</sup>. CDX2가 다양한 유전자의 전사를 활성화한다는 연구가 보고되어 CDX2에 의해서 조절되는 유전자들이 밝혀지고 있는 반면 CDX1에 의해 조절되는 유전자에 관한 연구는 CDX2에 비해 잘 되어 있지 않다. CDX1에 의해 조절되는 HOXA7 유전자를 제외하고는 알려진 모든 조절 유전자는 CDX2에 의해 조절되는데 sucrase isomaltase, glucagon, intestinal phospholipaseA/lysopholipase, carbonic anhydrase, human guanylyl cyclase C와 lactase gene 등이다<sup>6,7,8</sup>. Transfected cell의 연구 결과, CDX2는 세포 성장을 억제할 수 있으나, CDX1에 의한 세포 분화에 관한 영향은 아직 보고된 바가 없다<sup>10</sup>.

최근 연구를 살펴볼 때 CDX1은 oncogenic potential을 가진다. 그 이유로는 첫째, CDX1 deficient mice는 대장암을 일으키지 않으며 CDX1의 발현과 함께 대장에서 metaplasia가 수반된다<sup>11,12</sup>. 둘째, Tumorigenicity를 유발하는 Ha-ras를 Caco-2에 transfection 시킨 후 CDX1의 mRNA양이 증가한다<sup>13,14</sup>. 셋째, intestinal epithelial cell에서 CDX1 발현과 함께 D-type cyclin들이 감소하며, D-type cyclin들의 감소는 cell cycle 진행을 억제하므로 CDX1은 intestinal epithelial cell의 분화를 조절한다고 추정되고 있다<sup>15</sup>. 반면, CDX2는 tumor suppressor gene으로 분류된다. Heterozygous CDX2 knock out mice는 대장암이 생기며, 또한 oncogenic ras를 transfection 시킨 대장암 세포주에서 CDX2의 mRNA 양이 현저하게 감소 한다<sup>16,17</sup>.

그러나 CDX1과 CDX2 모두 대장암에서 발현이 감소한다는 많은 연구결과가 보고 되었다<sup>14,18</sup>. CDX2는 tumor suppressor gene이므로 대장암에서 발현이 줄어든다는 것은 타당하나 CDX1의 oncogenic potential 견지에서 볼 때 발현 양의 감소는 상반되는 연구결과이다. 한편 rat을 model로 한 실험에서는 오히려 암 발생 초기에는 대장에서 CDX1의 발현이 증가한다고 보고되었고, 암 발생 초기에서 후기로 진행되면서 발현양이 서서히 감소하는 반면, CDX2 발현의 감소는 암 발생 초기에 일어난다고 추정된다<sup>19</sup>.

대장암에서 또 하나의 중요한 역할을 하는 단백질은 prostaglandin을 생성하는 cyclooxygenase이다. 대장 상피세포에서 유전자의 돌연변이는 초기 암을 일으키며, 이차적인 유전자의 변이와 후성적 진행 인자 (epigenetic progression factor)가 암세포의 증식에 필수적이다<sup>20</sup>. 이러한 암 진행 인자 중 하나라고 여겨지는 prostaglandin은 정상세포에서 보다 암세포에서 많이 발현된다<sup>21,22</sup>. 세포막 구성 성분인 arachidonic acid로부터 prostaglandin을 만드는 효소인 cyclooxygenase (COX) 또는 prostaglandin H synthase (PHS)는 두 종류가 있다. 그 중 COX-1은 구성효소 인데 반하여 COX-2는 마이토젠과 transforming growth factor  $\alpha$  등의 사이토카인에 의하여 발현이 유도된다. 특히 COX-2의 특이적인 억제제인 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)는 대장암 발생과 진행을 억제시킨다는 연구 발표 이후 COX의 기능에 관한 많은 연구가 이루어져 왔다<sup>21,23</sup>.

대장암에서 COX-1이 아니라 COX-2의 발현이 높다는 연구결과는 지속적으로 발현하는 COX-1보다 특정 자극에 의해 발현되는 COX-2가 더 중요하다는 점을 강조한다<sup>21</sup>. Intestinal neoplasia mouse와 azoxymethane treated rat에서는 대장

암이 발생하는데 이 두 모델의 대장에서의 COX-2의 발현은 현저히 높고, 또한 adenomatous polyposis coli (APC) mutant mice는 수 많은 intestinal polyp를 가지는데, 이 APC mutant mice와 COX-2 null mice와 교배하여 얻은 자손은 gene dose dependent 방식으로 tumor가 감소한다<sup>25,26</sup>. 이와 같은 대장암을 일으키는 동물모델에 관한 연구는 COX-2가 대장암의 생성과 진행에 있어 중요한 역할을 한다는 증거를 제시한다. 또한 암이 증식함에 따라 영양분이 필요하고 이는 즉 혈관 생성이 수반되어야 하는데 COX-2에 의해 생성된 prostaglandin이 관여한다는 보고가 있다<sup>26</sup>. Tumor의 팽창시 cytotoxic T-cell과 macrophage의 면역학적 기작을 피해야 한다. Tumor 모델에서 macrophage가 분비하는 prostaglandin은 macrophage와 NK cell의 cytotoxicity를 억제하는 것과 같이 COX-2에 의해 생성된 prostaglandin은 같은 기능을 하여 tumor growth를 용이하게 한다<sup>27</sup>.

지금까지 연구를 미뤄볼 때, CDX와 COX-2의 발현은 대장암의 발생과 증식에 중요한 역할을 하며, COX-2 promoter에 CDX가 인식하는 여러 개의 TTTAT sequence를 가지므로 CDX1과 CDX2의 유전자 전사 조절 기능이 COX-2의 발현에 연관이 되어, 대장암의 발생과 증식에 관여 할 것으로 생각하였다. 이에 연구자는 첫째 CDX1과 CDX2에 의해 COX-2의 발현이 조절되는지와 이러한 조절 기작이 대장암 세포 특이적인지를 조사하고, 둘째 CDX1에 의한 COX-2의 발현 기작이 직접적인지 간접적인지 간접적이라면 어떤 조절인자가 관여하는지를 알아보고자 하였으며, 셋째 이 조절부위가 세포 특이적으로 CDX1에 의해 활성화되는지 또한 CDX1이 이 조절부위에 작용하는 전사 인자에 미치는 영향을 조사하였다.

## II. 실험 재료 및 방법

### 1. 세포 배양

Human colon cancer cell line Caco-2는 10 % 열 비활성화 (56 °C, 30 min)한 우 태아 혈청 (FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 포함한 배양 배지 DMEM (Gibco BRL)으로 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C 항온 배양기에서 배양시켰다. 여기에 항생제인 penicillin (50 unit/ml), streptomycin (50 µg/ml) (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 첨가하였다. Human embryonic kidney cell (HEK)과 NIH3T3는 RPMI1640 (Gibco BRL)으로 위와 동일한 방법으로 배양하였다.

초파리 세포인 Schneider 세포 (ATCC CRL-1963)는 10 % 열 비활성화 (56 °C, 30 min)한 우 태아 혈청을 포함한 Schneider 배양 배지 (Sigma, St. Louis, MO, USA)로 23 °C 항온 배양기에서 배양시켰다. 여기에 항생제인 penicillin (50 U/ml), streptomycin (50 µg/ml)을 넣어주었다.

### 2. Plasmid construction

#### 가. CDX1과 CDX2 construction

CDX1과 CDX2의 mammalian expression vector는 pcDNA3에 cloning 된 construct를 받아서 사용하였고<sup>28</sup>, CDX1과 CDX2의 초파리 expression vector 제작은 초파리 expression vector인 pPacPL vector에 cloning 하였다. CDX1의 c-terminal DNA binding domain을 없애고 activating domain (N-terminal 141 amino acid)만으로 yeast GAL4 binding domain과 fusion시켜 pFA2 CDX1 construct를 제작하였고 *trans*-reporting system을 이용하여 CDX1의 기능을 알아보았다.

#### 나. COX-2 reporter gene construction

COX-2 promoter (-1980부터 +1)가 PGL3 reporter gene에 cloning 된 construct를 구하였고<sup>29</sup>, COX-2 deletion mutant중 COX-2 (-1563), COX-2 (-1210)와 COX-2 (-966)는 promoter 내부의 enzyme site를 이용하여

PGL3 vector에 cloning 하였고, COX-2 (-870)부터 COX-2 (-180)까지 10개의 deletion mutant는 primer를 제작하여 PCR을 이용하여 PGL3 vector에 cloning하였다.

#### 다. minimal reporter gene

AP-1 minimal reporter gene과 CRE minimal reporter gene은 각각 7개 AP-1 site, 4개 CRE와 TATA 만으로 구성되어 있고 Stratagene (La Jolla, CA, USA)으로 부터 구입했다.

### 3. Site directed mutagenesis

COX-2 AP-1 mutant와 COX-2 CRE mutant 그리고 COX-2 AP-1/CRE double mutant의 제작은 site-directed mutagenesis system (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하였다.

먼저 point mutant를 만들기 위해서 primer를 제작했다.

AP-1 mutant primer (-216부터 -184까지, 33mer)

5'-GGCGGAAAGAAACAGCTGTTTTCGTCACATGGGC -3'

CRE mutant primer (-208부터 -180까지, 29mer)

5'- GAAACAGTCATTTATTCACATGGGCTTGG -3'

AP-1/CRE double mutant primer (-216부터 -180까지, 37mer)

5'- GGCGGAAAGAAACAGCTGTTTTATTCACATGGGCTTGG -3'

이 primer를 이용하여 site-directed mutagenesis system의 방법에 준하여 mutant들을 제작하고 mutation은 sequencing으로 확인하였다.

#### 4. Transfection

Animal cell line transfection reagent는 Fugene6 (Roche, Indianapolis, IN, USA)를 이용하였고 cell confluency가 50 %에서 60 %일 때 DNA: Fugene6의 비율을 1:2로 하여 transfection 후 48hr에서 luciferase activity를 측정하였다.

*Drosophila* Schneider cell line으로의 transfection은 calcium phosphate precipitation method을 사용하였다. Transfection 당일 세포가 80 % 정도의 confluency를 맞추어 사용하였다. 우선 Eppendorf tube 에 transfection하기 위한 각 DNA plasmid (total 20  $\mu\text{g}$ )를 넣고 22  $\mu\text{l}$ 의 TE 완충액과 31  $\mu\text{l}$ 의 2 M  $\text{CaCl}_2$ 를 넣고 멸균된 증류수로 250  $\mu\text{l}$ 의 양으로 맞추었다. 다른 Eppendorf tube에는 2배의 HBS (50 mM HEPES, 1.5 mM  $\text{NaHPO}_4$ , 280 mM NaCl, pH 7.1) 완충액 250  $\mu\text{l}$ 를 넣어주고, HBS가 들어있는 tube를 약간씩 vortexing하면서 위의 plasmid mixture를 조금씩 dropping 하면서 섞어주었다. 그 후 상온에서 30분간 방치하여 calcium phosphate precipitation을 유도한 후 Schneider cell에 직접 섞어주었다. 다음날 24 well plate에 분주하여 사용하였다.

#### 5. Reporter gene assay

CDX1과 CDX2를 pcDNA3 vector에 cloning하고 COX-2 promoter 2 kb 부분을 luciferase를 포함하는 pGL3 vector에 cloning 하였다. 24 well plate에 cell을 subculture하고 DNA를 transfection 시킨 후 48시간 배양 후 luciferase activity 측정은 luciferase assay system (Promega)을 이용하였다. 세포의 배지를 제거하고 1X CCLB (cell culture lysis buffer: 25 mM Tris-phosphate, pH 7.8, 2 mM DTT, 2 mM 1,2-diaminocyclohexane -N,N,N,N-tetraacetic acid, 10 % glycerol, 1 % Triton X-100)를 세포 침전물 (pellet)에 150  $\mu\text{l}$  처리하였다. 상층액 10  $\mu\text{l}$ 에 제조사에서 제공하는 luci-ferase assay buffer 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하여 혼합액을 상온에서 반응시키고 이를 luminometer로 측정하였다. 이렇게 측정한 값을 transfection 효율을 보기 위해 같이 co-transfection 한  $\beta$ -galactosidase의 수치로 보정하였다.  $\beta$ -galactosidase activity는 1X CCLB 150  $\mu\text{l}$ 로 cell을 혼합한 용액에서 50  $\mu\text{l}$ 를 취하여 1X CCLB 100  $\mu\text{l}$ 와 혼합하고 여기에  $\beta$ -galactosidase assay buffer (200 mM sodium phosphate, pH 7.3, 2

mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM β-mercaptoethanol, 1.33 mg/ml *o*-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)를 150 μl 처리하였다. 이를 37 °C에서 반응을 시켜 발색 정도를 보고 1 M Tris 500 μl를 넣어 반응을 멈추고 이것을 흡광도 420 nm에서 측정하였다.

### III. 결 과

#### 1. 대장암 세포 주에서 COX-2 유전자의 CDX1에 의한 특이적 조절

인체 대장 조직의 발생에 중요한 역할을 하는 CDX1 유전자는 대장암을 유발할 수 있는 oncogene으로 알려져 있지만 그 현상을 분자적 수준에서 설명하지 못하고 있다<sup>13</sup>. CDX1의 oncogene으로서의 특성이 대장암과 밀접한 관계가 있는 COX-2 유전자의 전사 조절에 영향을 주어서 발생하는 현상인지를 살펴보기 위하여 transient transfection을 통한 reporter gene assay를 수행하였다.

먼저 COX-2 유전자의 promoter region (-1980부터 +1까지)을 luciferase 유전자에 fusion 시킨 reporter construct를 제조하고 이를 human CDX1 또는 CDX2와 함께 co-transfection 시켜서 COX-2의 발현이 조절되는지를 확인하였다. 실험은 대장암 유래 세포주인 Caco-2 세포주를 이용하였다. 실험 결과 COX-2의 발현은 CDX1의 양에 비례적으로 증가하였고 CDX2에 대해서는 아무런 영향이 없었다 (그림 1). 본 실험 조건에서는 최대 7.3 배의 활성 증가를 보였다 (그림 1). 그러므로 COX-2의 증가는 CDX1의 특이적 표적 유전자임을 알 수 있었다. 이와 같은 실험 결과로 보아 Homeobox CDX1과 COX-2 유전자의 발현과는 밀접한 상관 관계가 있다는 사실을 알 수 있었고 또한 COX-2는 CDX1 특이적인 표적 유전자라는 가능성을 제시한다.

#### 2. 대장암 세포주에 의존적인 CDX1에 의한 COX-2 발현 증가

지금까지 보고에 의하면 CDX family의 homeobox 유전자들은 대장 조직에 특이적으로 발현된다고 알려져 있다<sup>2</sup>. 따라서 CDX1에 의한 COX-2 유전자의 전사 조절이 대장암 세포주에서 특이적 조절 양상을 나타내는지를 알아보기 위하여 위와 동일한 실험을 다른 조직 유래의 세포를 이용하여 실험하였다. 인간 유래의 HEK (human embryonic kidney cell) 세포주와 생쥐 유래의 fibroblast인 NIH-3T3에서는 CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절 기능은 Caco-2에서의 결과와는 상반되게 전혀 영향이 없는 것으로 확인되었다 (그림 2). 이상의 결과는 CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절은 대장 세포주에서 특이적으로 일어나는 현상임을 시사한다.



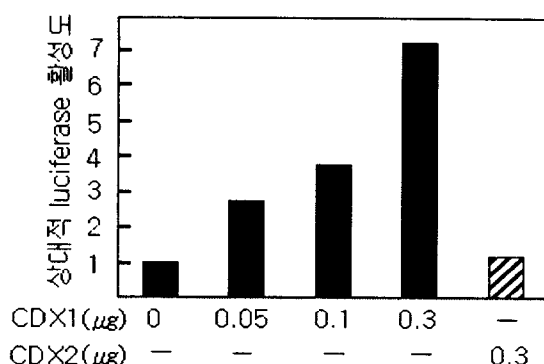


그림 1. Caco-2에서 CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절

CDX1 또는 CDX2를 COX-2 reporter construct와 함께 Caco-2 세포에 일시적으로 transfection 시켰다. COX-2 reporter gene 0.03 μg, β-galactosidase construct 0.1 μg, CDX1 각각 0.05, 0.1, 0.3 μg 그리고 CDX2는 0.3 μg을 사용하였다. Transfection 한지 48 시간이 경과한 뒤에 luciferase activity를 측정하였고 β-galactosidase activity로 나누어 계산하였다.

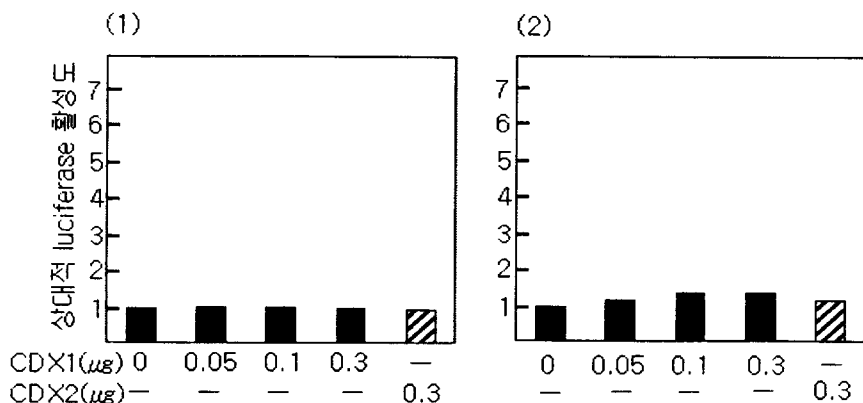


그림 2. 대장암이 아닌 다른 조직으로부터 유래된 세포에서의 CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절능 확인

(1) 인간 신장 유래의 human embryonic kidney cell (HEK) 세포주와 (2) 생쥐 유래의 fibroblast인 NIH3T3 세포에 일시적으로 transfection 하였다. COX-2 reporter gene 0.03 μg, β-galactosidase construct 0.1 μg, CDX1 각각 0.05, 0.1, 0.3 μg 그리고 CDX2는 0.3 μg을 사용하였다. Transfection 한지 48 시간이 경과한 뒤에 luciferase activity를 측정하였다.

### 3. Non-intestine cell에서의 CDX1 전사 조절 능력 조사

CDX1에 의한 COX-2 전사 조절이 대장 조직에서만 특이적으로 일어나는 현상에 대해서는 아직 구체적으로 설명하지 못하고 있다. 하지만 그 가능성은 CDX1의 전사 조절 기능 자체가 조직 특이적이거나 또는 CDX1에 의한 COX-2의 전사 조절 기능이 조직 특이적일 수 있다. 이와 같은 가능성을 알아 보기 위해서 CDX가 다른 CDX 의존성 유전자의 발현을 non-intestine cell에서 조절하는가를 조사하였다. 현재 CDX1 의존성 표적 유전자는 잘 알려져 있지 않으므로 초파리의 CDX 의존성 유전자로서 항진균 펩타이드 유전자인 *drosomycin* reporter plasmid를 이용하였다<sup>30</sup>.

NIH3T3 세포에서 *drosomycin* reporter plasmid를 초파리 CDX인 caudal (CAD) 또는 human CDX1과 함께 co-transfection 하였다. 이 결과 CAD에 의해서 발현이 조절되는 *drosomycin* 발현이 CDX1 발현 양에 의해서도 비례적으로 증가하였다 (그림 3). 이 결과로 “CDX1의 발현과 기능”이 조직 특이적인 것이 아니라 “COX-2에 대한 CDX1의 발현 조절 기능”이 특이적임을 알 수 있었다.

COX-2에 대한 CDX1의 발현 조절 기능이 특이적이라는 결과를 확인하기 위하여 CDX1의 transcriptional activity를 가지는 activating domain과 yeast Gal4의 DNA binding domain이 fusion된 plasmid (pFA2 CDX1) 및 yeast Gal4 binding site를 가지는 reporter plasmid (pFR-luci)를 Caco-2, HEK 와 NIH3T3에 co-transfection하여 transcriptional activity를 측정하였다.

이 실험 결과, Caco-2, HEK와 NIH3T3 세 세포에서 모두 pFA2 CDX1에 의하여 reporter plasmid의 발현이 증가 하였으므로, CDX1의 전사 조절능은 CDX1 그 자체가 세포 특이적 것이 아니라 target 유전자의 promoter 특이적이라는 것을 예상할 수 있었다 (그림 4).

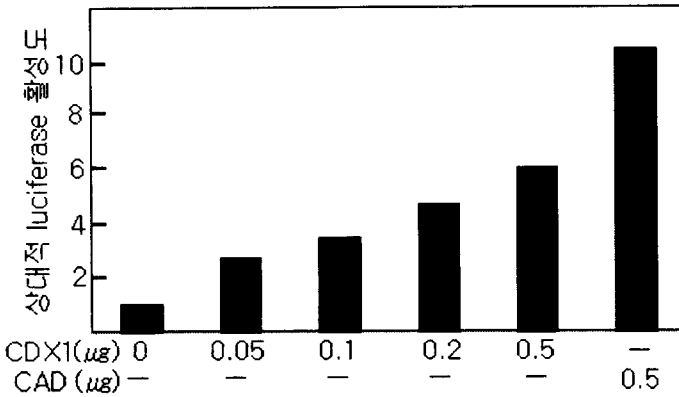


그림 3. CDX1에 의한 *drosomycin*의 발현 조절

NIH3T3 mice fibroblast 세포에 일시적으로 transfection 하였다.

CDX의 조파리 homologue인 CAD에 의해 조절되는 *drosomycin* reporter plasmid 0.05  $\mu$ g,  $\beta$ -galactosidase construct 0.1  $\mu$ g, CDX1 각각 0.05, 0.1, 0.2, 0.5  $\mu$ g 그리고 CAD는 0.5  $\mu$ g를 사용하였다.

Transfection 한지 48 시간이 경과한 뒤에 luciferase activity를 측정하였다.

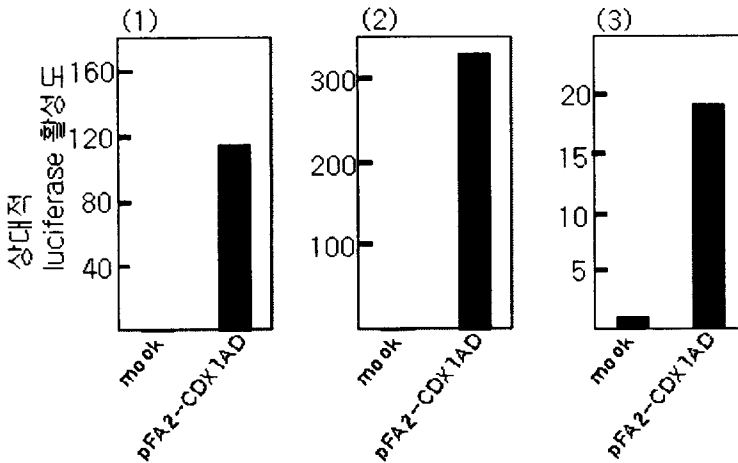


그림 4. CDX1의 activating domain의 전사 조절능

(1) Caco-2, (2) HEK와 (3) NIH3T3를 일시적으로 transfection하였다.

CDX1의 transcriptional activity를 가지는 activating domain과 yeast Gal4의 DNA binding domain이 fusion된 plasmid (pFA2 CDX1)와 yeast Gal4 binding site를 가지는 reporter plasmid (pFR-luci)를 이용하는 CDX1 *trans*-reporting system을 사용하였고, reporter plasmid (pFR-luci) 0.05, pFA2 CDX1 0.5  $\mu$ g 그리고  $\beta$ -galactosidase construct 0.1  $\mu$ g를 사용하여 transfection 48 시간 후 luciferase activity를 측정하였다.

#### 4. COX-2 promoter deletion mutant를 이용하여 CDX1에 의해 조절되는 region 조사

CDX1에 의한 COX-2 promoter의 활성이 CDX1 binding element를 인지하여 COX-2의 발현을 조절하는 직접적인 기작 인지, COX-2 발현에 관여한다고 알려진 전사 인자를 조절하는 간접적인 기작 인지를 알아 보기 위하여 COX-2 promoter deletion mutant를 제작하였고 CDX1에 의해 조절 되는 COX-2 promoter 상의 위치와 관련된 전사 인자를 찾기 위해 다음과 같이 실험하였다.

CDX1의 초파리 homologue CAD의 binding sequence는 TTTAT와 TTTAC라고 알려져 있다<sup>7,8,9</sup>. 그러므로 COX-2의 promoter에서 위의 두 sequence를 기준으로 deletion mutant를 제작하였다. 전체 13개의 COX-2 deletion mutant 중 COX-2 mutant -1563 부터 COX-2 mutant -660 까지 5개 construct는 CDX1의 binding sequence인 TTTAT 와 TTTAC를 가진 promoter region을 deletion 시켰고, COX-2 mutant -490부터 COX-2 mutant -180까지는 지금까지 알려진 COX-2를 조절하는 중요한 전사 인자인 NF- $\kappa$ B, NFIL-6, c-Jun, c-Fos 그리고 CREB을 기준으로 deletion 하였다<sup>31</sup> (그림5).

COX-2 promoter (wt) 2 kb와 각각의 COX-2 promoter deletion mutant를 Caco-2에 transient transfection 시켰고 CDX1과 각각의 mutant들을 transient co-transfection 시켜 COX-2 promoter 상에서 어떤 element가 COX-2 발현에 중요한 지를 알아 보았다.

COX-2 mutant -1563부터 COX-2 mutant -660까지의 결과는 COX-2 wild type과 비교하여 발현에 현저한 변화를 볼 수 없었다 (그림6A). COX-2 mutant -490부터 COX-2 mutant -210까지의 결과에서도 여전히 COX-2 wt과 비교하여 발현의 변화는 없으나, AP-1 site가 deletion된 COX-2 mutant -200에서는 COX-2 wt의 55 %, CRE site가 deletion된 COX-2 mutant -190과 E-box가 deletion된 COX-2 mutant -180에서는 COX-2 wt의 22 %만 발현함을 확인하였다 (그림 6A). 한편, AP-1과 CRE가 deletion되면 luciferase activity가 현저하게 줄어들지만 CDX1의 전사조절능은 TATA만 남은 COX-2 mutant -180에서도 여전히 존재하였다 (그림 6B). 각각의 deletion mutant의 basal (mock) luciferase 활성도를 비교하면, AP-1과 CRE deletion mutant는 wild type의 32 %만 발현하였다. 이로 보아 대장암 세포에서 endogeneous AP-1과 CRE의 활성이 COX-2의 basal 활성에 중요한 요인임을 알 수 있었고, CDX1에 의한

COX-2의 발현 조절에서도 AP-1과 CRE 라는 두 *cis*-element가 모두 중요하다는 점을 알 수 있었다. 그리고 대장암 세포에서 CDX1에 의한 COX-2 발현 시 TATA는 major *cis*-element는 아니지만, CDX1에 의해 TATA 관련 전사조절 인자들 또한 조절 될 것으로 예상할 수 있었다.

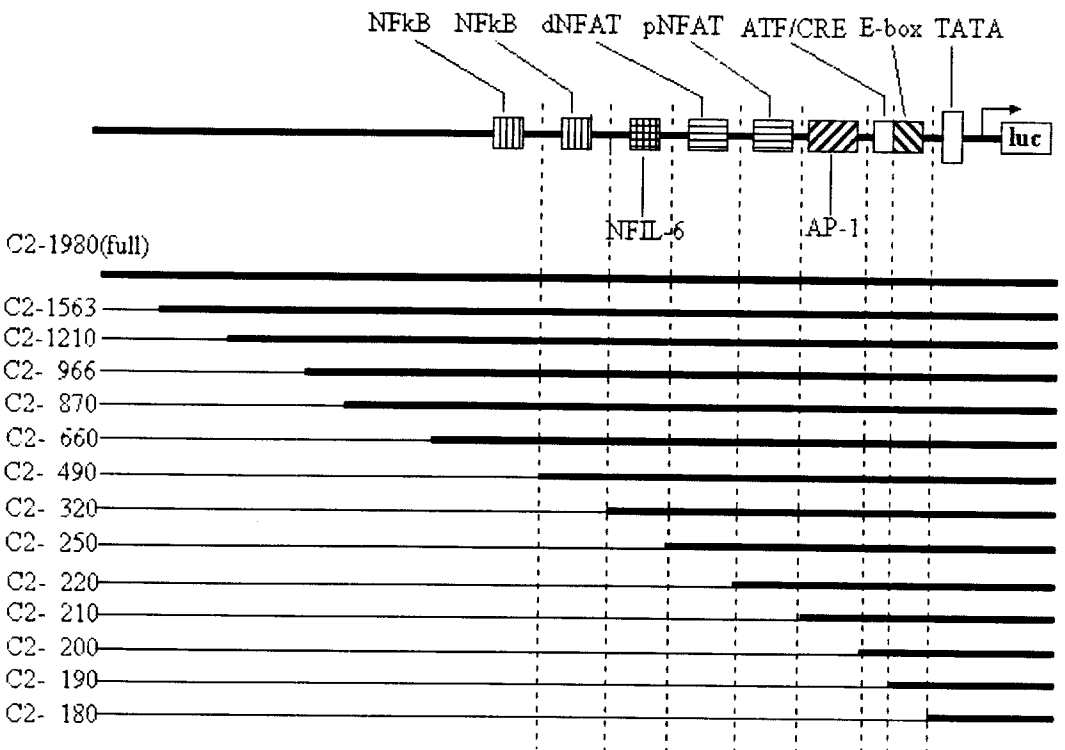


그림 5. COX-2 promoter 내에 잘 알려진 element들의 위치와 deletion mutant construct 모식도

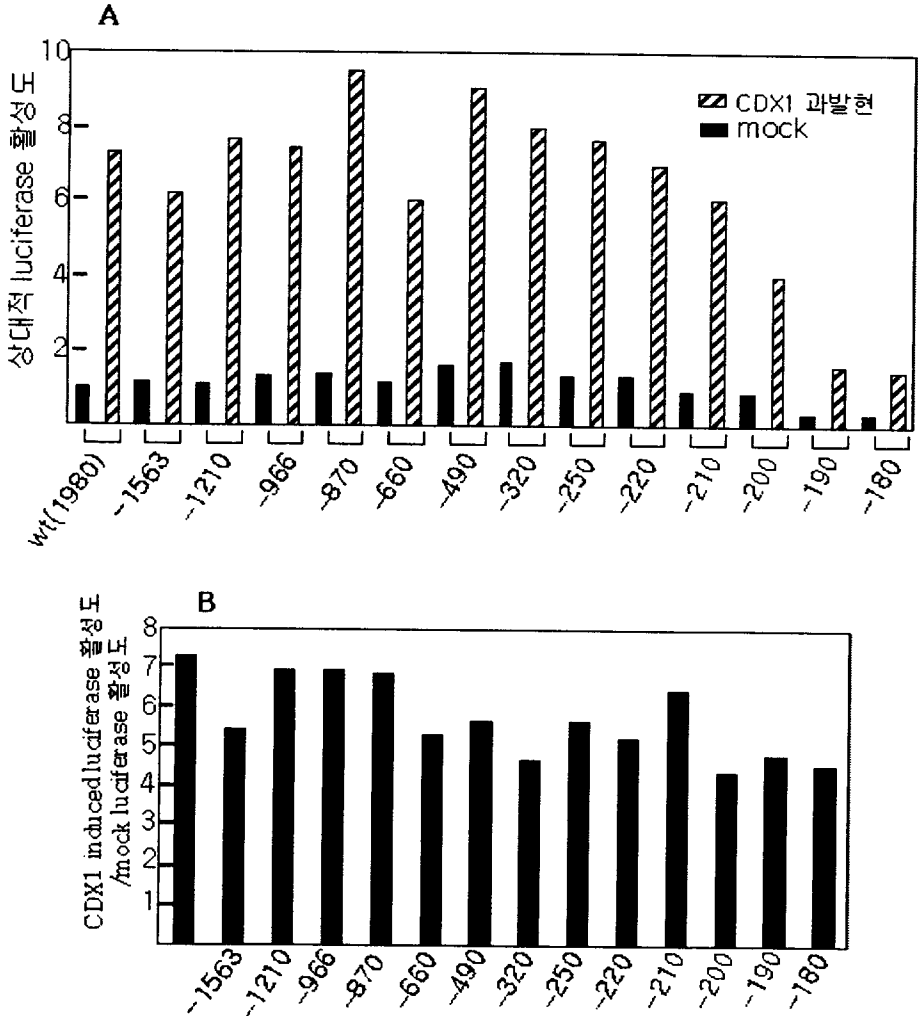


그림 6. COX-2 promoter deletion constructs의 발현 변화 분석  
 (A) Caco-2 세포에 COX-2 promoter -1980부터 -180까지 전부 13 deletion reporter gene 0.03  $\mu$ g과 CDX1 0.3  $\mu$ g 그리고  $\beta$ -galactosidase 0.1  $\mu$ g을 transfection 한지 48 시간 후 luciferase activity를 측정하였다. (B) Luciferase activity를 측정하여 얻은 CDX1-induced luciferase 활성도를 각각의 mock luciferase 활성도로 나누어 CDX1에 의해 발현 증가된 비율을 비교하였다.

## 5. AP-1과 CRE mutated COX-2 promoter를 이용한 COX-2 발현 조절 조사

AP-1과 CRE *cis*-elements들의 중요성을 검증하기 위해서 site-directed mutagenesis system을 이용하여 AP-1과 CRE element-mutated COX-2 promoter를 제작하였다. 3종류의 COX-2 mutant promoter (AP-1 mutant, CRE mutant, AP-1/CRE double mutant)를 제작하여 COX-2 wild type과 비교하여 발현 감소 양상이 COX-2 deletion mutant와 같은지를 확인하는 실험을 다음과 같이 수행하였다. Caco-2, HEK와 NIH3T3에 대해서 3종류의 COX-2 mutant promoter와 CDX1 또는 pcDNA3 (mock)를 co-transfection하여 CDX1 과발현 시 COX-2 mutant promoter의 luciferase activity 변화와 COX-2 wild type promoter의 luciferase activity를 비교하였다.

Caco-2에서 COX-2 wild type promoter와 비교하면 CDX1 과발현 시 AP-1 mutant COX-2는 67 %, CRE mutant COX-2는 31 % 그리고 AP-1/CRE double mutant는 27 % 발현하는 것으로 나타났다 (그림 7). HEK, NIH3T3에서는 AP-1 mutant, CRE mutant, AP-1/CRE double mutant COX-2 promoter 순으로 서서히 mock 값이 낮아졌지만 CDX1에 의해서는 아무런 변화가 없었다 (그림 7). 이와 같은 결과로 보아 COX-2의 basal 활성과 CDX1 induced 활성에 있어서 AP-1과 CRE 라는 두 종류의 *cis*-elements가 모두 중요하다는 사실을 알 수 있었다.

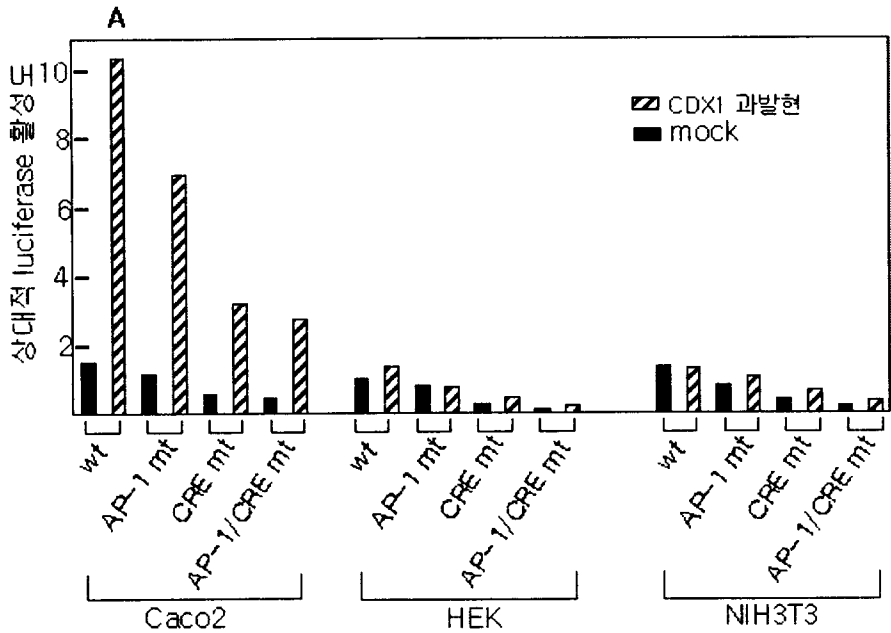


그림 7. COX-2 promoter에 있어서 AP-1과 CRE mutant의 분석  
 Caco-2, HEK 와 NIH3T3 세포에 AP-1 mutant (mt), CRE mutant (mt)와 AP-1/CRE double mutant (mt) 3개의 COX-2 promoter construct를 이용하여 CDX1과 co-transfection 한지 48 시간 후 luciferase activity를 측정 하였다.



## 6. CDX1에 의한 AP-1과 CRE 활성화 증가

COX-2 deletion promoter와 point mutation을 일으킨 promoter 실험에서 COX-2 발현에 있어서 AP-1과 CRE가 중요한 *cis*-element라는 것을 알았다. 이는 CDX1이 AP-1과 CRE의 활성화 증가를 유도함으로써 COX-2 발현을 조절한다는 사실을 시사한다. 이를 증명하기 위하여 CDX1이 AP-1 또는 CRE의 활성도를 직접 증가시킬 수 있는가를 조사하였다.

### 가. CDX1에 의한 AP-1 활성화 조절

본 연구에는 다른 조절 인자들이 배제되고 AP-1 element 와 TATA만으로 promoter가 구성되어 있는 AP-1 minimal luciferase reporter를 이용하였다. AP-1 minimal reporter의 경우 Caco-2 세포에 CDX1과 함께 co-transfection하여 reporter activity의 변화를 조사한 결과 7.5배 정도의 활성화 증가를 보인 반면에 CDX2는 아무런 영향을 주지 못하였다 (그림 8-1). 또한 HEK, NIH3T3에서는 CDX1과 CDX2는 AP-1 minimal reporter의 activation에 영향을 주지 않았다 (그림 8-1).

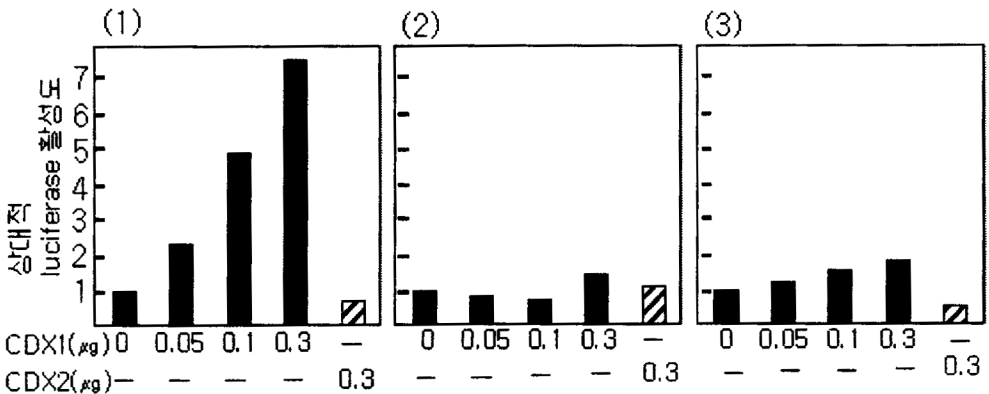


그림 8-1. CDX1에 의한 세포 특이적인 AP-1 활성화 조절  
 (1) Caco-2, (2) HEK와 (3) NIH3T3세포에 AP-1 binding site와 TATA만 존재하는 AP-1 minimal promoter reporter gene과 CDX1 또는 CDX2를 이용하여 co-transfection하고 48 시간 후 luciferase activity를 측정하였다.

나. AP-1 활성화에 관여하는 전사 인자 복합체와 COX-2 발현과의 관계

이상의 결과는 CDX1이 AP-1 활성화에 직접적으로 관여한다는 것을 시사한다. 지금까지 보고에 의하면 AP-1 활성화는 c-Jun/c-Jun homodimer, c-Fos/c-Fos homodimer 또는 c-Jun/c-Fos heterodimer 등으로 구성된 전사 인자 복합체들에 의해서 주로 조절된다고 알려져 있다<sup>32</sup>. 그러므로 본 연구에서 사용된 대장암 세포주에서는 COX-2가 어떤 전사 인자 복합체에 의해서 주로 조절 되는지를 살펴보기 위하여 Caco-2에 c-Jun과 c-Fos 그리고 COX-2 reporter plasmid를 co-transfection하였다. c-Jun 과발현 시 COX-2 발현이 5배, c-Fos 과발현 시 3.3배 증가 하였고, c-Jun과 c-Fos 모두 과발현 시 1.7배 증가하였다. 이 결과로 보아 c-Fos/c-Fos homodimer 또는 c-Jun/c-Fos heterodimer보다 c-Jun/c-Jun homodimer가 COX-2의 발현에 가장 중요한 전사 인자 복합체로 생각된다 (그림 8-2).

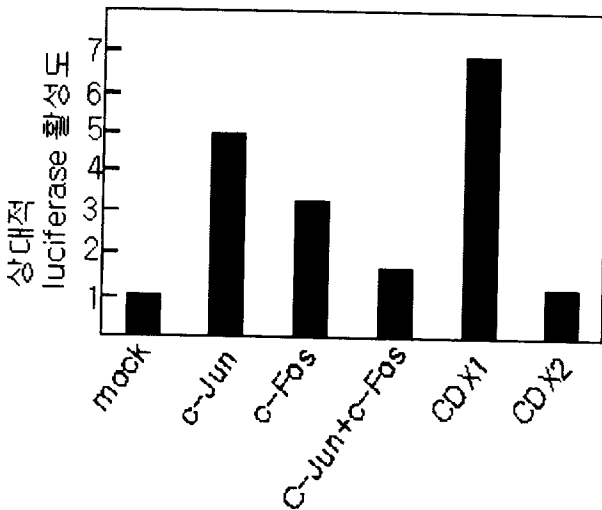


그림 8-2. AP-1 활성화에 관여하는 전사인자 복합체와 COX-2 발현과의 관계  
Caco-2 세포에 COX-2 reporter gene과 c-Jun 또는 c-Fos 또는 CDX1 또는 CDX2 co-transfection하여 luciferase activity를 측정하였다.

다. CDX1이 c-Jun 전사 인자 활성화에 미치는 영향

AP-1 활성화에 관여하는 c-Jun 전사 인자는 전사 인자 활성화 도메인 (activation domain)의 인산화가 필수적인 것으로 알려져 있다<sup>33</sup>. CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절이 c-Jun의 인산화에 직접 혹은 간접적으로 관여하는지를 알아보기 위하여 c-Jun *trans*-reporting system을 사용하여 실험하였다. 이를 위하여 c-Jun의 transcriptional activity를 가지는 activating domain과 yeast Gal4의 DNA binding domain이 fusion된 plasmid (pFA2 c-Jun)와 yeast Gal4 binding site를 가지는 luciferase reporter plasmid (pFR-luci)를 Caco-2 세포주에 co-transfection하여 transcriptional activity를 측정하였다. Caco-2 세포주에서 pFA2c-Jun만을 transfection 한 경우와 pFA2c-Jun과 CDX1 co-transfection 한 경우의 측정값에서 차이가 없으므로 CDX1은 c-Jun의 인산화에 관여하지 않음을 알 수 있었다 (그림 8-3).

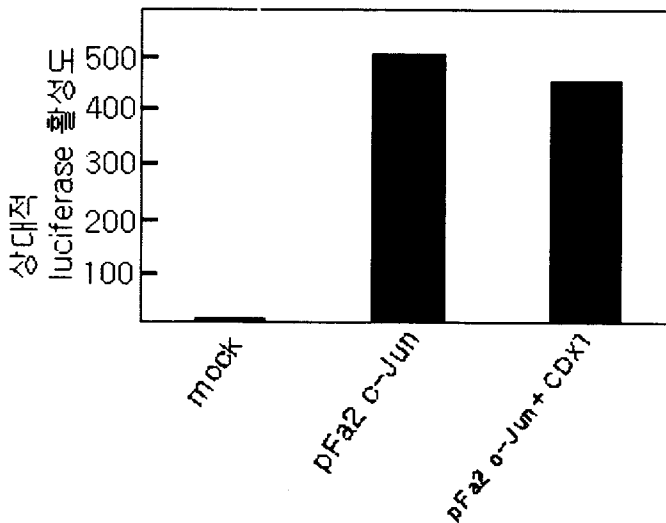


그림 8-3. CDX1이 c-Jun 전사인자 활성화에 미치는 영향

Caco-2 세포에 c-Jun *trans*-reporting system을 사용하여 pFA2 c-Jun, CDX1과 pFR-Luc plasmid로 co-transfection하여 luciferase activity를 측정하였다.

라. CDX1에 의한 CRE의 활성화 조절

CREB에 의해 인지되는 CRE와 TATA만으로 promoter가 구성되어 있고 luciferase를 발현하는 CRE minimal promoter plasmid를 이용하여 CDX1에 의해 CREB이 activation되는지를 위와 같은 방법으로 실험을 하였다. 실험결과 Caco-2에서는 약 4배의 활성화도를 보였다 (그림 8-4). 한편 CDX2는 아무런 영향을 주지 못하였다. 반면에 HEK와 NIH3T3에서는 CDX1과 CDX2는 CRE minimal reporter의 활성화도에 영향을 주지 않았다 (그림 8-4).

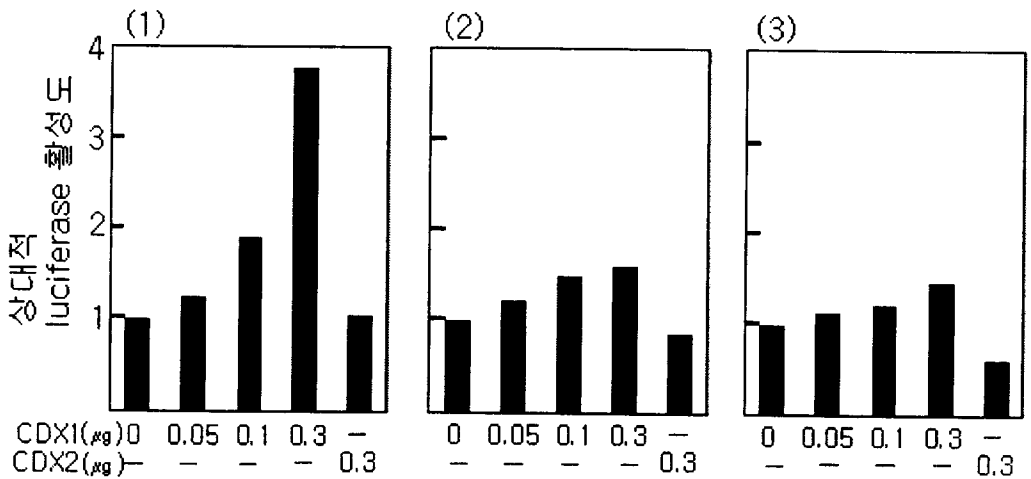


그림 8-4. CDX1에 의한 CRE의 활성화 조절

(1) Caco-2, (2) HEK 와 (3) NIH3T3 세포에 CRE와 TATA만으로 promoter가 구성되어 있는 CRE minimal promoter gene과 CDX1 또는 CDX2를 co-transfection하여 luciferase activity를 측정하였다.

#### 마. CDX1이 CREB 전사 인자 활성화에 미치는 영향

CRE 활성화에 관여하는 CREB 전사 인자는 전사 인자 활성화 도메인의 인산화가 필수적인 것으로 알려져 있다<sup>34</sup>. CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절이 CREB의 인산화에 직접 혹은 간접적으로 관여하는지를 알아보기 위하여 CREB *trans*-reporting system을 사용하여 실험하였다. 이를 위하여 CREB의 transcriptional activity를 가지는 activating domain과 yeast Gal4의 DNA binding domain이 fusion된 plasmid (pFA2 CREB) 및 reporter plasmid (pFR-luci)를 Caco-2 세포에 co-transfection하여 transcriptional activity를 측정하였다. Caco-2 세포에 pFA2 CREB만을 transfection 한 경우와 pFA2 CREB과 CDX1을 co-transfection 한 경우, 측정 값에서 차이가 없으므로 CDX1은 CREB의 인산화에 관여하지 않음을 알 수 있었다 (그림 8-5).

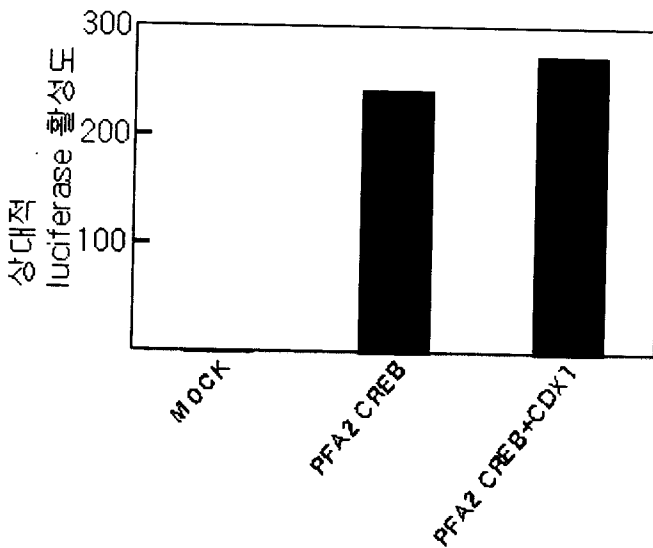


그림 8-5. CDX1이 CREB 전사인자 활성화에 미치는 영향

Caco-2 세포에 CREB *trans*-reporting system을 사용하여 pFa2 CREB, CDX1과 pFR-Luc plasmid로 co-transfection하여 luciferase activity를 측정하였다.

#### IV. 고찰

대장암과 COX-2 과발현과의 상관 관계는 잘 알려져 있다<sup>21,24</sup>. 특히 COX-2의 특이적인 억제제인 NSAIDs (nonsteroidal anti-inflammatory drugs)가 COX-2를 억제하여 대장암 발생과 진행을 억제 시킨다는 연구 발표 이후, COX-2의 발현 조절은 암의 발생 기전을 이해하는데 중요시 여겨져 많은 연구가 진행되었다<sup>21,22</sup>. 이러한 연구 결과 COX-2의 발현을 조절하는 c-Jun, c-Fos, CREB, NF- $\kappa$ B, NF-IL6 등과 같은 많은 전사 인자들이 밝혀졌으며, COX-2는 mRNA instability sequence를 여러 개 가지므로 mRNA stability 또한 COX-2 발현 조절 연구에 있어서 중요하게 여겨지고 있다<sup>31,35</sup>. 이와 같은 많은 직, 간접적인 전사 인자들이 보고되고 있지만 COX-2 조절에 관여하는 대장 특이 조절 인자에 대해서는 보고된 바가 없다.

본 연구에서는 대장 특이 homeobox 전사 인자인 CDX1과 CDX2 중 CDX1은 대장 세포 특이적으로 AP-1과 CRE의 활성화를 통하여 COX-2 발현을 조절한다는 것을 밝혀내었다. Homeobox 유전자인 CDX는 본래 발생에 중요하고 intestinal cell renewal에 중요하게 관여한다고 알려져 있지만, 최근 보고에 의하면 암과 밀접한 관계를 가지는 것으로 보고되고 있다<sup>11,12</sup>. 특히 CDX1은 deficient mice 실험에 의하면 oncogenic potential을 가진다고 알려져 있고, 대장암 세포주인 HT29에서 CDX1과 CDX2의 과발현 시 면역 관련 유전자인 human leukocyte antigen (HLA) 1과 large multifunctional protease (LMP) 2의 mRNA 발현을 증가시킨다는 보고는 있으나, 대장암과 관련된 CDX1의 직접적인 target 유전자에 대해서는 보고된 바가 없다<sup>36</sup>. COX-2의 과발현은 tumor 팽창 시 cytotoxic T-cell과 macrophage에 대한 immune escape를 유발하고 혈관 생성을 야기한다. 본 연구 결과에서와 같이 대장암 세포에서 CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절은 CDX1의 oncogenic potential에 대한 하나의 기전으로 설명할 수 있을 것이다<sup>26</sup>.

CDX1의 oncogenic potential에 대한 또 하나의 설명은 CDX1에 의한 COX-2 조절이 AP-1과 CRE를 통한다는 점에 초점을 맞출 수 있다. AP-1은 Fos와 Jun 계열 단백질에 의해 활성화되며, 특히, c-Jun/c-Jun, c-Fos/c-Fos의 homodimer 또는 c-Jun/c-Fos heterodimer에 의해 인지되어 활성화되는 것으로 잘 알려져 있다<sup>32</sup>. 본 실험 결과는 c-Jun/c-Jun homodimer에 의해 COX-2 promoter의 AP-1 활성화가 가장 큰 영향을 받는 것으로 나타났으며, CDX1에 의한 AP-1의 활성화 시 c-Jun activating domain의 인산화가 영향을 받는 것이 아니라 c-

Jun의 mRNA 양이 증가되는 것으로 생각된다. ras-raf-mek-erk의 신호 전달 과정은 AP-1을 조절하는 upstream이며, 다양한 종류의 암세포에서 이 신호 전달 과정에 관련된 단백질들의 돌연변이로 인해 ras 신호 전달의 비정상적인 활성화가 유발된다. 쥐 fibroblast에 c-Jun 또는 c-Fos를 과발현시켜 여러 유전자의 mRNA의 변화를 측정 한 결과, tumor invasion과 metastasis에 관여하는 matrix metalloproteinases (MMPs), angiogenesis에 관여하는 VEGF와 angiogenin 그리고 COX-2를 포함한 여러 유전자의 발현이 증가하였다<sup>33,37</sup>. 또한, CRE 활성화 시 발현되는 Wnt induced secreted protein (WISP) 1은 oncogenic activity를 가지며 cell cycle 관련 유전자 cyclin D1와 cell survival 관련 유전자 bcl-2의 발현에 있어서 CRE는 중요한 *cis*-element이다<sup>38,39,40</sup>. 이러한 oncogene들 중 일부는 대장암 세포에서 CDX1에 의한 AP-1과 CRE가 활성화될 때 영향을 받을 것이라 생각되며, 이는 CDX1의 oncogenic potential에 대한 가능성을 제시할 수 있을 것이다.

본 실험의 결과 중 흥미로운 점은 CDX1에 의한 COX-2의 발현 조절이 세포 특이적이라는 결과이다. CDX1의 COX-2 발현에 대한 기능이 대장암 세포에서만 작용하며 또한 CDX1에 의한 AP-1과 CRE의 활성화도 같은 세포에서 일어난다. 이러한 CDX의 세포 특이적인 발현 조절 기능에 관한 연구들을 보면 retinoic acid에 의한 CDX1의 조절 그리고 CDX2에 의한 guanylyl cyclase C 조절이 대장, 소장 유래 세포 특이적이라는 발표가 되었으나, 발현 조절에 관한 정확한 이유는 아직 잘 알려지지 않았다<sup>41</sup>. 그러나 최근 co-activator 연구에 의하면 특정 co-activator는 세포 특이적이며 promoter 특이적인 방식으로 다른 전사 조절 인자와 결합하여 전사 조절 인자의 세포 특이적 전사 조절 기능을 나타내게 한다는 보고가 있다<sup>42</sup>. 이러한 연구 결과들은 대장 세포 특이적으로 발현하고 promoter 특이적으로 기능을 하는 co-activator와의 상호 작용에 의해 COX-2에 대한 CDX1의 세포 특이적인 기능이 나타난다는 가능성을 제시한다.

본 실험의 모든 결과는 reporter gene을 이용하여 얻은 결과이므로 CDX1과 CDX2 stable cell line을 구축한 후 COX-2의 protein 수준에서 발현 조절되는지를 확인해야 하며, 또한 c-Jun, c-Fos와 CREB의 protein 발현의 증감과 AP-1 site, CRE의 electro mobility gel shift assay를 시행하여 CDX1 과발현에 의한 c-Jun, c-Fos와 CREB의 promoter 상에서의 결합이 증가함을 확인해야 한다.

이 실험에서 중요하게 다루지 않았지만, COX-2 deletion mutant에서 TATA만

남아있음에도 여전히 CDX1에 의해 COX-2의 발현이 조절된다는 결과는 다른 많은 유전자들의 발현에 있어서 중요하게 생각된다. 이 결과는 CDX1이 TATA binding protein 또는 basal 전사 인자와 association하거나 이 factor의 전사를 조절함으로써 다른 많은 유전자들의 발현에 영향을 줄 수 있다는 것을 시사한다.

## V. 결론

본 연구에서는 첫째 CDX1과 CDX2에 의해 COX-2의 발현이 조절되는지와 이러한 조절 기작이 대장암 세포 특이적인지를 조사하고, 둘째 CDX1에 의한 COX-2의 발현 기작이 직접적인지 간접적인지, 간접적이라면 어떤 조절인자가 관여하는지를 알아보려고 하였으며, 셋째 이 조절 부위가 세포 특이적으로 CDX1에 의해 활성화되며, 또한 CDX1이 이 조절부위에 작용하는 전사 인자에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

CDX1은 대장암 세포 특이적으로 AP-1과 CRE를 활성화하고, CDX1에 의한 세포 특이적인 AP-1과 CRE의 활성화는 c-Jun과 CREB의 post-translation modification이 아닌 전사 조절을 통해 일어날 것으로 사료된다. 따라서 대장암 세포에서 CDX1의 COX-2에 대한 조절 기작은 대장암 세포 특이적인 AP-1과 CRE의 활성화에 의해 일어난다. 이러한 실험 결과는 대장암 발생과 진행에 있어서 CDX1의 oncogenic potential에 대한 가능성을 제시할 수 있을 것이다



## VI. 참고 문헌

1. Scott MP, Tamkun JW, Hartzell GW 3rd. The structure and function of the homeodomain. *Biochim Biophys Acta* 1989; 28: 25-48.
2. James R, Kazenwadel J. Homeobox gene expression in the intestinal epithelium of adult mice. *J Biol Chem* 1991; 266: 3246-51.
3. La Rosee A, Hader T, Taubert H, Rivera Pomar R, Jackle H. Mechanism and Bicoid-dependent control of hairy stripe 7 expression in the posterior region of the *Drosophila* embryo. *EMBO J* 1997; 16: 4403-11.
4. Wu LH, Lengyel JA. Role of caudal in hindgut specification and gastrulation suggests homology between *Drosophila* amnioproctodeal invagination and vertebrate blastopore. *Development* 1998; 125: 2433-42.
5. Hu Y, Kazenwadel J, James R. Isolation and characterization of murine homeobox gene *cdx-1*. *J Biol Chem* 1993; 268: 27214-27225.
6. Suh E, Chen L, Taylor J, Traber PG. A homeodomain protein related to caudal regulates intestine-specific gene transcription. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 7340-51.
7. Taylor JK, Boll W, Levy T, Suh E, Siang S, Mantei N, et al. Comparison of intestinal phospholipase A/lysophospholipase and sucrase-isomaltase genes suggest a common structure for enterocyte specific promoters. *DNA Cell Biol* 1997; 16: 1419-28.
8. Trinh KY, Jin T, Drucker DJ. Identification of domains mediating transcriptional activation and cytoplasmic export in the caudal homeobox protein *Cdx-3*. *J Biol Chem* 1999; 274: 6011-9.
9. Park J, Schulz S, Waldman SA. Intestine-specific activity of the human guanylyl cyclase C promoter is regulated by CDX2. *Gastroenterology* 2000; 119: 89-96.
10. Suh E, Traber PG. An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 619-25.
11. Subramanian V, Meyer BI, Gruss P. Disruption of the murine homeobox gene *CDX1* affects axial skeletal identities by altering the mesodermal expression domains of Hox genes. *Cell* 1995; 83: 641-53.

12. Silberg DG, Furth EE, Taylor JK, Schuck T, Chiou T, Traber PG. CDX1 protein expression in normal, metaplastic, and neoplastic human alimentary tract epithelium. *Gastroenterology* 1997; 113: 680–2.
13. Chastre E, Empereur S, Di Gioia Y, el Mahdani N, Mareel M, Vleminckx K, et al. Neoplastic progression of human and rat intestinal cell lines after transfer of the ras and polyoma middle T oncogenes. *Gastroenterology* 1993; 105: 1776–89.
14. Vider BZ, Zimmer A, Chastre E, Gespach C, Halperin M, Mashiah P, et al. Deregulated expression of homeobox-containing genes, HOXB6, B8, C8, C9, and Cdx-1, in human colon cancer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 272: 513–8.
15. Lynch J, Suh ER, Silberg DG, Rulyak S, Blanchard N, Traber PG. The caudal-related homeodomain protein CDX1 inhibits proliferation of intestinal epithelial cells by down-regulation of D-type cyclins. *J Biol Chem* 2000; 275: 4499–506.
16. Ee HC, Erler T, Bhathal PS, Young GP, James RJ. Cdx-2 homeodomain protein expression in human and rat colorectal adenoma and carcinoma. *Am J Pathol* 1995; 147: 586–92.
17. Lorentz O, Cadoret A, Duluc I, Capeau J, Gespach C, Cherqui G, et al. Downregulation of the colon tumour-suppressor homeobox gene Cdx-2 by oncogenic ras. *Oncogene* 1999; 18: 87–92.
18. Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, et al. Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human CDX1 and CDX2 homeobox. Downregulation of CDX1 and CDX2 mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 1997; 74: 35–44.
19. Ren P, Silberg DG, Sirica AE. Expression of an intestine-specific transcription factor (CDX1) in intestinal metaplasia and in subsequently developed intestinal type of cholangiocarcinoma in rat liver. *Am J Pathol* 2000; 156: 621–7.
20. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis.

Cell 1990; 61: 759–67.

21. Marnett LJ. Aspirin and the potential role of prostaglandins in colon cancer. *Cancer Res* 1992; 52: 5575–89.
22. Rigas B, Goldman IS, Levine L. Altered eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 1993; 122: 518–23.
23. Rosenberg L, Palmer JR, Zauber AG, Warshauer ME, Stolley PD, Shapiro S. A hypothesis: nonsteroidal anti-inflammatory drugs reduce the incidence of large-bowel cancer. *J Natl Cancer Inst* 1991; 83: 355–8.
24. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclo-oxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994; 107 : 1183–8
25. Singh J, Hamid R, Reddy BS. Dietary fat and colon cancer: modulation of cyclooxygenase-2 by types and amount of dietary fat during the postinitiation stage of colon carcinogenesis. *Cancer Res* 1997; 57: 3465–70.
26. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, et al. Cyclooxygenase-2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996; 56: 2556–60.
27. Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene* 1999; 18: 7908–16.
28. Mallo GV, Soubeyran P, Lissitzky JC, Andre F, Farnarier C, Marvaldi J, et al. Expression of the CDX1 and CDX2 homeotic genes leads to reduced malignancy in colon cancer-derived cells. *J Biol Chem* 1998; 273: 14030–6.
29. Kutchera W, Jones DA, Matsunami N, Groden J, McIntyre TM, Zimmerman GA, et al. Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 4816–20.
30. Ryu JH, Nam KB, Jang IH, Kim SC, Yoon JH, Nam HJ, et al. Homeobox

gene *Caudal* is up-regulated in response to microbial infection and is necessary for the full induction of Rel/NF- $\kappa$ B dependent innate immune gene in *Drosophila*. submitted.

31. Iniguez MA, Martinez-Martinez S, Punzon C, Redondo JM, Fresno M. An essential role of the nuclear factor of activated T cells in the regulation of the expression of the cyclooxygenase-2 gene in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 2000; 275: 23627-35.
32. Van Dam H, Castellazzi M. Distinct roles of Jun : Fos and Jun : ATF dimers in oncogenesis. *Oncogene* 2001; 20: 2453-64.
33. Vogt PK. Jun, the oncoprotein. *Oncogene* 2001; 20: 2365-2377.
34. Xie W, Herschman HR. v-src induces prostaglandin synthase 2 gene expression by activation of the c-Jun N-terminal kinase and the c-Jun transcription factor. *J Biol Chem* 1995; 270: 27622-8.
35. Shaywitz AJ, Greenberg ME. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem* 1999; 68: 821-61.
36. Soubeyran P, Mallo GV, Moucadel V, Dagorn JC, Iovanna JL. Overexpression of CDX1 and CDX2 homeogenes enhances expression of the HLA-I in HT-29 cells. *Mol Cell Biol Res Commun* 2000; 3: 271-6.
37. Ozanne BW, McGarry L, Spence HJ, Johnston I, Winnie J, Meagher L, et al. Transcriptional regulation of cell invasion: AP-1 regulation of a multigenic invasion programme. *Eur J Cancer* 2000; 36: 1640-8.
38. Xu L, Corcoran RB, Welsh JW, Pennica D, Levine AJ. WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev* 2000; 14: 585-95.
39. D'Amico M, Hult J, Amanatullah DF, Zafonte BT, Albanese C, Bouzahzah B, et al. The integrin-linked kinase regulates the cyclin D1 gene through glycogen synthase kinase 3beta and cAMP-responsive element-binding protein-dependent pathways. *J Biol Chem* 2000; 275: 32649-57.
40. Pugazhenth S, Miller E, Sable C, Young P, Heidenreich KA, Boxer LM, Reusch JE. Insulin-like growth factor-I induces bcl-2 promoter through the transcription factor cAMP-response element-binding protein. *J Biol*

Chem 1999; 274: 27529-35.

41. Park J, Schulz S, Waldman SA. Intestine-specific activity of the human guanylyl cyclase C promoter is regulated by CDX2. *Gastroenterology* 2000; 119: 89-96.
42. Taylor JK, Levy T, Suh ER, Traber PG. Activation of enhancers by the homeobox gene CDX2 is cell line specific. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2293-300.

## ABSTRACT

Cell type specific regulation of cyclooxygenase2 by CDX1 in colon cancer cell

Jang In-Hwan

*Brain korea 21 project for medical sciences*

*The Graduate school, Yonsei University*

(Directed by Professor Yoon Joo-Heon)

Cyclooxygenase 2 (COX-2) is an inducible isoform of prostaglandin H synthase which is thought to play an important role in colon carcinogenesis. Although many transcription factors responsible for the modulation of COX-2 expression have been reported, intestine-specific transcription factor for COX-2 induction is presently unknown. Here we present evidence showing that intestine-specific oncogenic homeotic protein CDX1 is involved in the upregulation of COX-2 transcription. We found that 1) Ectopic expression of CDX1 in Caco-2 cells enhances basal COX-2 reporter activity whereas overexpression of CDX2 gives no noticeable effect, 2) this CDX1-induced COX-2 reporter activity is observed only in the intestine cells, 3) reporter assay with various mutant constructs for COX-2 promoter reveals that CDX1 upregulates COX-2 expression via AP-1 and CRE sites, 4) minimal AP-1 and CRE reporter activity can be enhanced by overexpressing CDX1 in an intestine-specific manner 5) CDX1-induced COX-2 reporter activity is drastically reduced when AP-1 and CRE sites are simultaneously mutated. All together, these results suggest that CDX1 up-regulates COX-2 expression through AP-1 and CREB signaling in an intestine-specific manner. Although the role of CDX1 in colorectal cancer is presently controversial, our results may explain the possible oncogenic potential of CDX1 in the intestine tumorigenesis.

Keywords : colorectal cancer, COX-2, CDX1, AP-1, CRE