

Antimicrobial Peptide CopA3 Induces Survivin Expression in Human Colonocytes Through the Transcription Factor Sp1

Ho Kim*

Division of Life Science and Chemistry, College of Natural Science, Daejin University, Pocheon, Gyeonggi-do 487-711, Korea

Received August 30, 2021 / Revised October 6, 2021 / Accepted October 18, 2021

CopA3 (LLCIALRKK), an antimicrobial peptide isolated from the Korean dung beetle, has been shown to suppress apoptosis in various cell types. CopA3 inhibits not only bacterial toxin-induced colonocyte apoptosis but also 6-hydroxy dopamine-induced neural cell apoptosis. Our recent study revealed that CopA3 directly binds to caspases (key regulators of apoptosis) and inhibits the proteolytic cleavage required for their activation. But molecular mechanisms underlying CopA3-mediated inhibition of apoptosis in multiple cell types remain unknown. Here we assessed possible effects of CopA3 on expression of survivin, which is known to inhibit apoptosis. In HT29 human colonocytes, CopA3 exposure markedly upregulated survivin expression in a concentration- and time-dependent manner. RT-PCR revealed that CopA3-mediated upregulation of survivin was attributable to increased gene transcription, and further showed that CopA3 also increased expression of Sp1, one of many transcription factors known to be involved in transcription of the survivin gene. Notably, blocking Sp1 by treatment with the Sp1 inhibitor, tolfenamic acid, significantly reduced CopA3-mediated upregulation of survivin. These results collectively suggest that CopA3 induces Sp1 expression, which in turn is involved in upregulation of survivin in human colonocytes. These novel findings establish another pathway for explaining the anti-apoptotic effects of CopA3 against various cellular apoptosis systems.

Key words : Antimicrobial insect peptide, anti-apoptosis, colonocytes, CopA3, survivin

서 론

애기뿔소뽕구리 유래 펩타이드 CopA3는 높은 항균 활성을 나타내는 물론[9] 세포자살을 억제한다고 알려져 왔다[7, 16]. CopA3는 *Clostridium difficile* 독신A가 유발하는 인간 대장상피세포 세포자살을 강하게 차단한다[7]. CopA3는 okadaic acid가 야기하는 신경세포 자살과정도 강하게 차단한다[16]. 최근 연구에서 CopA3가 세포사멸 촉진인자인 카스파제(caspase)와 직접적으로 결합하여 활성화를 위한 단백질-절단과정을 차단하는 것으로 밝혀졌다[10]. CopA3가 이황화결합을 통해 카스파제들과 결합하여 상위 카스파제에 의한 하위 카스파제들의 활성형 단백질 절단을 차단한다고 밝혀졌다[10]. 이와 같은 카스파제 억제 과정이 세포사멸을 차단하는 CopA3의 주요 작용기작으로 고려된다. 하지만 다양한 세포사멸을 차단하는 것으로 확인된 CopA3의 높은 항세포사멸 효능을 설명하기 위해서는 추가적인 기작 규명이 필요하다.

Survivin은 많은 세포사멸 억제 단백질들(inhibitor of apoptosis, IAP) 중의 하나이다[2, 5, 11, 12, 22]. 세포사멸신호가 활성화되면 survivin 단백질은 미토콘드리아에서 세포질로 유리된 다음 X-linked IAP와 결합 후, 세포사멸을 촉진하는 핵심 효소인 caspase-9의 활성형 절단과정을 차단하는 것으로 알려져 있다[2, 25]. 따라서 survivin 결핍은 세포사멸을 강하게 증가시키는 것으로 알려져 있다[11]. 반대로 survivin 과발현은 세포사멸을 감소시켜 세포 생존율을 증가시키는데, 이 현상은 암세포에서 빈번하게 관찰된다[5, 22]. 세포사멸의 핵심 조절인자인 survivin 유전자는 전사개시인자인 specificity protein 1 (Sp1)에 의해 발현이 증가 조절되며[3, 24], p53에 의해서는 반대로 발현이 억제된다고 밝혀졌다[21]. p53 유전자가 결핍되거나 돌연변이로 기능이상이 초래되면 survivin 발현이 증가한다[21, 23]. Survivin은 또한 ubiquitin-proteasome 경로를 통해서도 조절되는 것으로 알려져 있다[13]. Heat shock protein 90과 결합될 때, survivin 단백질의 변성 시간이 지연되어 survivin 단백질의 양이 높게 유지된다고 한다[19]. 이와 같은 이유로 survivin 유전자 발현에 대한 조절물질 개발은 세포사멸 조절은 물론 항암제 치료 효과를 달성함에 있어서 주요하게 고려된다.

상기 근거를 바탕으로, 본 연구에서는, 세포사멸을 강하게 차단하는 CopA3 펩타이드 효능이 survivin 발현과 연관되어 있는지를 확인하고자 하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-31-539-1855, Fax : +82-31-539-1850

E-mail : hokim@daejin.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.

재료 및 방법

시약

survivin 항체, β -actin 항체, phospho-NF κ B 항체, phospho-p53 항체 등은 Cell Signaling Biotechnology 사(CA, USA)에서 구매하여 사용하였다. Sp1 항체는 Santa Cruz 사(CA, USA)에서 구입하였다. Cycloheximide, tolfenamic acid, MTT (3-[4,5-dimethyl-thiazole-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) dye, PI (propidium iodide) 등은 Sigma Aldrich 사(St. Louis, Mo, USA)에서 구입하였다.

세포배양

인간 대장상피 세포주인 HT29는 ATCC 사(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받았으며 McCoy's 5A 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)에 10% FCS (fetal calf serum, Invitrogen, USA)와 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Gland Island, NY)을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다[14].

Immunoblot analysis

약물을 처리한 세포는 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.5 mM EDTA, 1% Nonidet P-40)와 초음파를 이용 파쇄하였다. 단백질 분리를 위해서 Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 단백질들은 nitrocellulose membrane으로 transfer 하고 5% skim milk 속에서 1차 항체를 이용 12시간 반응하였다. 그 후 2차 항체를 상온에서 2시간 동안 추가 반응하고 New England Biolabs 사의 LumiGlo reagent를 이용하여 발색을 유도한 다음, chemiluminescence image analyzer (Fusion FX; Vilber Lourmat, Germany)를 이용하여 검출하였다[15].

세포독성 평가

96 well plate에 HT29세포를(10^3 cell/well) 준비하고 CopA3를 48시간 동안 처리한 다음 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium) dye를 첨가하고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 넣은 후 570 nm에서 ELISA reader (Model 3550, Bio-Rad, Canada)를 이용하여 측정하였다[8].

TUNEL staining

HT29 세포를 chamber slide (Lab-Tak II chamber slider system, USA)에 각 well당 4×10^4 로 분주 한 뒤 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, CopA3 (1 μ g/ml)를 처리하고 48시간 뒤 4% paraformaldehyde로 상온에서 10분간 고정시켰다. TUNEL assay는 Apoptosis Detection kit (Promega, Billerica, MA)를 사용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행하였다. PI staining은

1 μ g/ml 농도로 진행하였으며 mounting solution을 떨어뜨리고 형광현미경(Nicon, Japan) 하에서 관찰하였다. 200배율로 무작위적으로 3개의 필드를 관찰하여 평균 이미지를 사용하였다[16].

Reverse transcriptase-PCR

HT29 세포에 CopA3를 시간 별로 처리한 후 세포를 TRIzol 500 μ l를 이용하여 total RNA를 분리하였다. RT PreMix kit (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음, Maxime PCR PreMix kit (iNtRON, Seongnam, Korea)를 이용하여 25cycle 수준으로 PCR 을 수행하였다. 사용된 primer 염기서열은 다음과 같다. Survivin (forward primer): 5'-CACCGCATCTCTACATTCAA-3', Survivin (reverse primer): 5'-TCC TTTGACGCTTCTTTCAC-3', β -actin (forward primer): 5'-TGACGGGGTCACCCACACTGTGC-3', β -actin (reverse primer): 5'-CTAGAAGCATTTCGGGTGGACGGATGGAGGG-3'. PCR 수행 후, 1.0% agarose gel을 이용 전기영동하였으며, mRNA 발현 수준은 ChemiDoc imaging system (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)을 이용하여 분석하였다[11].

Statistical analysis

모든 실험은 3회 반복으로 수행하여 표준오차로 나타내었고 SIGMA-STAT professional statistics software program (Jandel Scientific Software, USA)의 t-test를 이용하여 유의성을 검정하였다[20].

결과 및 고찰

곤충 유래 항균펩타이드 CopA3 자극은 인간 대장상피세포에서 survivin 단백질 양을 증가시킴

많은 연구에서, 항균펩타이드 CopA3가 다양한 스트레스로 유발되는 세포사멸을 차단함이 밝혀졌다[7, 10, 16]. 연구자 등도 최근 연구를 통해 CopA3가 카스파제에 직접 결합하면 그들의 활성화-절단과정이 차단됨을 보고하였다[10]. 본 연구에서는 세포사멸을 차단하는 핵심 단백질인 survivin의 발현에 CopA3가 영향을 미치는지 확인하였다. 이를 위해, 인간 대장 상피세포(HT29)에 CopA3 (1 μ g/ml)를 시간 별로 처리한 뒤 survivin 단백질의 양적 변화를 immunoblot analysis로 확인하였다. CopA3 처리 후 5시간부터 survivin 단백질의 양이 유의하게 증가하였으며 9시간까지 유지됨을 확인하였다(Fig. 1A). 다음으로 연구자 등은 CopA3를 농도 별로 처리하고(0, 0.1, 0.5, 1, 5 μ g/ml), survivin 변화를 확인하였다. Fig. 1B에서 처럼, CopA3 농도에 비례하여 survivin 양이 증가함을 확인하였다. 1 μ g/ml CopA3 농도에서 survivin 단백질 양이 유의하게 증가하였으며 5 μ g/ml 농도까지 유지됨을 확인하였다(Fig. 1B). 일반적으로 세포사멸 과정에서 survivin 발현이 증가한다

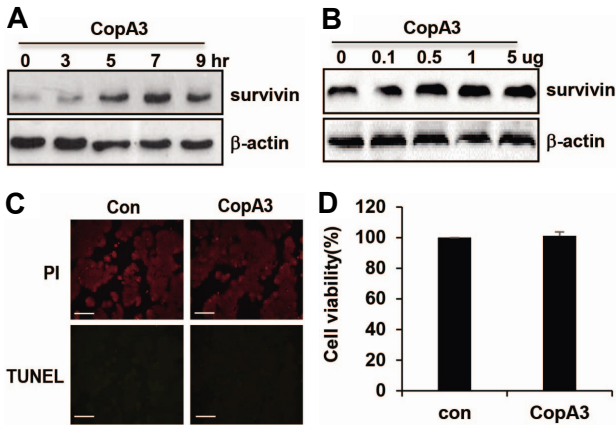


Fig. 1. The insect-derived antimicrobial peptide CopA3 increases survivin expression in human colonocytes. (A, B) HT29 human colonocytes were incubated with CopA3 (1 μg/ml) for the indicated durations (A) or with different concentrations of CopA3 (0, 0.1, 0.5, 1, or 5 μg/ml) for 5 hr (B). Proteins in cell lysates were resolved by SDS-PAGE on 15% gels, and blots were probed with antibodies against survivin (16 kDa) and b-actin (42 kDa). The presented results are representative of three independent experiments. (C) DNA fragmentation was detected by TUNEL assay. Cells were grown on coverslips, treated with CopA3 (1 μg/ml) for 48 hr, and then incubated with propidium iodide to stain nuclei (Bar = 50 μm). Results are representative of three independent experiments. (D) Cells were incubated with CopA3 (1 μg/ml) for 48 hr and cell viability was measured by MTT assay. Results are presented as means ± SEM (error bars) of three experiments performed in triplicate, expressed as a percentage relative to untreated controls.

고 알려져 있기 때문에, CopA3에 의한 survivin 증가가 CopA3에 의한 세포독성에 기인하는 2차적인 현상인지 확인할 필요가 있다. 따라서 연구자 등은 CopA3 자극이 HT29세포에 대해 세포사멸이나 세포독성을 유발하는지 여부를 TUNEL assay와 MTT assay로 각각 평가하였다. Fig. 1C에서처럼, CopA3가 처리된 인간 대장상피세포에서 TUNEL 양성반응이 관찰되지 않았다. 그리고 CopA3 처리는 세포 독성도 야기하지 않았다 (Fig. 1D). 이상의 결과를 종합하면, 인간 대장상피세포에서 CopA3에 의한 survivin 단백질 증가는 세포독성이나 세포사멸 반응과 무관한 현상임을 보여준다.

인간 대장상피세포에서 CopA3 자극은 survivin 유전자의 전사를 증가시킴

연구자 등은 다음으로 CopA3 처리 후 증가하는 survivin이 전사 조절의 결과인지 확인하였다. 이를 위해 HT29세포에 CopA3를 시간 별로 처리한 후 mRNA를 분리하고 RT-PCR을 수행하여 survivin의 전사량 변화를 확인하였다. Fig. 2에서처럼, CopA3 처리는 시간의존적으로 survivin 유전자의 전사를

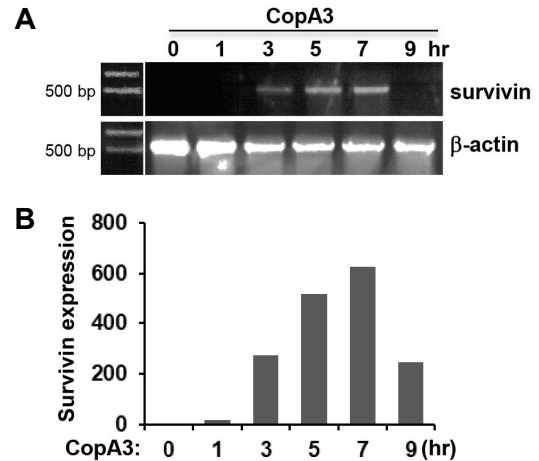


Fig. 2. CopA3 increases transcription of the survivin gene in human colonocytes. HT29 cells (10^5 cells/well) were treated with CopA3 (1 μg/ml) for the indicated times. Upper panel: Total RNA was isolated, cDNA was synthesized, and survivin and β-actin were amplified by PCR. The results shown are representative of three separate experiments. Lower panel: Densitometric quantification of survivin mRNA expression.

증가시켰다. Survivin의 기저 전사량이 CopA3 처리 3시간부터 유의하게 높아짐을 확인하였으며, 최고 전사량 증가가 처리 5시간과 7시간 후에 나타남을 확인하였다. 하지만 9시간 이후에는 기저 수준으로 다시 낮아지는 것으로 확인되었다. 상기 전사체 증가 시간은 survivin 단백질 양 변화 시간(Fig. 1A)과 일치하였다. 이상의 결과는 인간 대장상피세포에서 CopA3 처리 이후에 증가하는 survivin 단백질의 양적 증가는 전사 활성화에 기인함을 보여준다.

CopA3에 의한 survivin 증가는 단백질-변성을 조절하는 CopA3 효능에 비의존적임

이전 연구에서 연구자 등은 CopA3가 유비퀴틴-프로테아좀 (ubiquitin-proteasome) 경로를 통해 표적단백질 양을 조절한다고 보고하였다. 구체적으로 살펴보면, CopA3는 대장상피세포 속 p21 단백질의 변성 (degradation)을 촉진시켜서 그 양을 감소시키고 이를 통해 세포 성장을 증가시킨다[7]. 이 결과를 바탕으로, 연구자 등은 다음으로 CopA3가 유비퀴틴-프로테아좀 경로를 통해서 survivin 단백질의 변성 조절에 관여하는지 확인하였다. 이를 위해서 번역 억제제인 cycloheximide (CHX) [7, 16]를 처리하고, 세포로부터 시간 별 단백질을 분리한 다음, survivin 단백질의 양적 변화를 추적하였다. 일부 세포는 CHX와 CopA3 함께 처리해줌으로서 CopA3 유무에 따라 survivin 단백질 변성 과정에 변화가 나타나는지 확인하였다. Fig. 3에서처럼, 인간 대장상피세포 속 survivin 단백질 변성이 3시간 이후부터 진행되며, 9시간에 최고치를 나타냄을 확인하였다. 그러나 상기 변화가 CopA3 처리 유무에 따라 영향을 받지

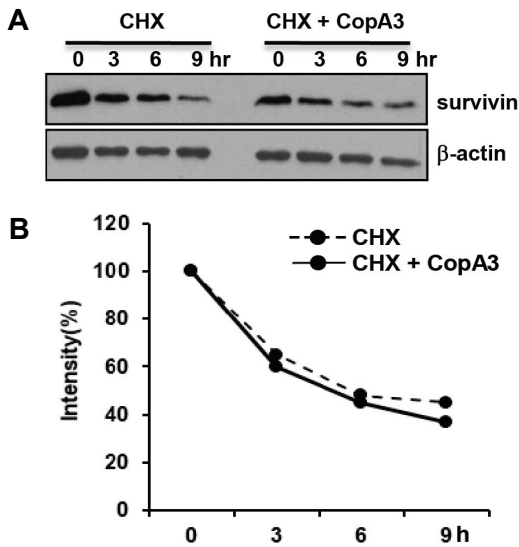


Fig. 3. CopA3 has no effect on the half-life of survivin protein. HT29 cells were incubated with 1 µg/ml CopA3 in the presence or absence of cycloheximide (CHX; 50 µg/ml) for the indicated times. Proteins in cell lysates were resolved by SDS-PAGE on 15% gels, and blots were probed with antibodies against survivin (16 kDa) and b-actin (42 kDa). The presented results are representative of three independent experiments.

않음이 확인되었다. 이 결과는 CopA3 자극 후 인간 대장상피 세포에서 나타나는 survivin의 양적 증가가 단백질 변성 조절이 아닌 전사 조절에 절대적으로 의존적임을 보여준다.

CopA3에 의한 survivin 전사 증가는 전사개시인자인 specificity protein 1 (Sp1)에 의존적임

다음으로 우리는 CopA3에 의한 survivin 전사 조절에 관여하는 핵심 전사개시인자를 동정하고자 하였다. Survivin 유전자 발현을 조절하는 전사개시인자로는 Sp1과 Sp3 [3, 24] 그리고 p53 [21]과 NFκB [6] 등이 알려져 있다. 상기 전사인자들의 결합부위들은 survivin 유전자 프로모터 부위에 잘 보존되어 있다. 실제 상기 전사인자들이 결합되거나 돌연변이가 발생될 경우, survivin 발현이 영향을 받는다고 알려져 있다[21, 23]. 이를 위해, HT29세포에 시간 별로(0, 3, 5, 7시간) CopA3 (1 µg/ml)를 처리한 후, 전사개시인자들의 활성화 여부를 평가하였다. Fig. 4A에서처럼, 특이하게도 CopA3 자극은 Sp1 양을 유의하게 증가시켰다. 그러나 CopA3은 p53과 NFκB들의 활성화에 영향을 없었다. CopA3에 의한 Sp1 증가 시간이 survivin 증가 시간과 유의하게 일치함을 확인하였다(Fig. 4A). 이 결과는 Sp1 전사개시인자가 CopA3에 의한 survivin 발현 증가에 핵심적으로 관여함을 의미한다. 이를 추가적으로 증명하기 위해, CopA3을 처리할 때, Sp1 억제제인 tolfenamic acid (100 µM) [1, 4, 18]를 함께 처리해준 후 survivin 발현 변화를 추적하였다. 기존 결과처럼, survivin은 CopA3 처리 후 높게

증가하였다(Fig. 4B). 그러나 tolfenamic acid가 동시에 처리된 경우, CopA3에 의한 survivin 발현 증가 현상이 사라짐을 확인하였다(Fig. 4B). Sp1 단백질 양도 survivin 발현 양상과 동일하게 변화됨도 확인하였다(Fig. 4B). 이상의 결과들을 고려하면, CopA3에 의한 Sp1 활성화가 survivin 전사 증가에 주요한 선행 신호경로임을 알 수 있다. 실제 많은 연구에서도 Sp1은 survivin 발현에 핵심 전사개시인자로 알려져 있다[3, 24]. 예를 들어, 신경암세포에 tolfenamic acid를 처리하여 Sp1과 Sp3 단백질을 억제하면 survivin 감소를 유발하여 세포자살이 강하게 촉진된다[4]. 반대로 Sp1 유전자 과발현은 survivin 전사를 유도하여 많은 세포에서 세포사멸이 억제된다고 알려져 있다[3].

상기 결과들은 CopA3 자극이 Sp1 생산을 유도하고 이를 통해 최종적으로 survivin 발현이 증가됨을 보여준다. 이 결과는 또한 CopA3가 Sp1 유전자의 전사 과정을 증가시킬 수 있다는 사실을 우리에게 보여준다. 기존 연구에서, Sp1 유전자의 전사 과정이 Sp1 단백질 자신과 NF- κ B, E2F 전사개시인자 등에 의해 조절된다고 밝혀졌다[17]. 이를 종합해보면, CopA3는 Sp1 유전자의 전사를 활성화시켜 Sp1 단백질을 증대하고, 이를 통해 최종 survivin 발현을 촉진하는 것으로 보인다. 일단 CopA3 자극으로 Sp1이 양적으로 증가하면 양성-되먹임방식으로 더욱 더 축적되어 survivin 발현을 최대로 촉진시키는 것으로 추정된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 연구자 등은 본 연구를 통해서

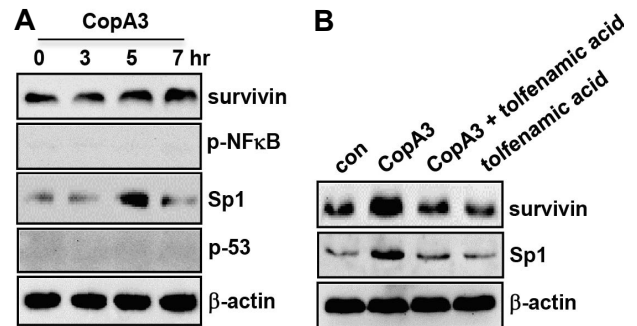


Fig. 4. CopA3 upregulates survivin expression through Sp1. (A) HT29 cells (10^5 cells/well) were treated with CopA3 (1 µg/ml) for the indicated times. Proteins in cell lysates were resolved by SDS-PAGE on 10% gels, and blots were probed with antibodies against survivin (16 kDa), phospho-NF- κ B (65 kDa), phospho-p53 (53 kDa), Sp1 (106 kDa) and b-actin (42 kDa). The presented results are representative of three independent experiments. (B) HT29 cells were incubated with medium (con), CopA3 alone (1 µg/ml), CopA3 plus tolfenamic acid (100 µM), or tolfenamic acid alone (100 µM) for 6 hr. Proteins in cell lysates were resolved by SDS-PAGE on 15% gels, and blots were probed with antibodies against survivin, Sp1 and b-actin. The presented results are representative of three independent experiments.

강력한 세포사멸 억제 효능을 보이는 CopA3의 항세포사멸 분자기작을 새롭게 제시하였다고 사려된다.

감사의 글

이 논문은 2021 학년도 대전대학교 학술연구비 지원에 의한 것임.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- Adwan, L. I., Basha, R., Abdelrahim, M., Subaiea, G. M. and Zawia, N. H. 2011. Tolfenamic acid interrupts the de novo synthesis of the beta-amyloid precursor protein and lowers amyloid beta via a transcriptional pathway. *Curr. Alzheimer Res.* **8**, 385-392.
- Altieri, D. C. 2010. Survivin and IAP proteins in cell-death mechanisms. *Biochem. J.* **430**, 199-205.
- Chen, Y., Wang, X., Li, W., Zhang, H., Zhao, C., Li, Y., Wang, Z. and Chen, C. 2011. Sp1 upregulates survivin expression in adenocarcinoma of lung cell line A549. *Anat. Rec.* **294**, 774-780.
- Eslin, D., Sankpal, U. T., Lee, C., Sutphin, R. M., Maliakal, P., Currier, E., Sholler, G., Khan, M. and Basha, R. 2013. Tolfenamic acid inhibits neuroblastoma cell proliferation and induces apoptosis: a novel therapeutic agent for neuroblastoma. *Mol. Carcinog.* **52**, 377-386.
- Kannangai, R., Wang, J., Liu, Q. Z., Sahin, F. and Torbenson, M. 2005. Survivin overexpression in hepatocellular carcinoma is associated with p53 dysregulation. *Int. J. Gastrointest. Cancer* **35**, 53-60.
- Kawakami, H., Tomita, M., Matsuda, T., Ohta, T., Tanaka, Y., Fujii, M., Hatano, M., Tokuhisa, T. and Mori, N. 2005. Transcriptional activation of survivin through the NF-kappaB pathway by human T-cell leukemia virus type I tax. *Int. J. Cancer* **115**, 967-974.
- Kim, D. H., Hwang, J. S., Lee, I. H., Nam, S. T., Hong, J., Zhang, P., Lu, L. F., Lee, J., Seok, H., Pothoulakis, C., Lamont, J. T. and Kim, H. 2016. The insect peptide CopA3 increases colonic epithelial cell proliferation and mucosal barrier function to prevent inflammatory responses in the gut. *J. Biol. Chem.* **291**, 3209-3223.
- Kim, H., Kokkotou, E., Na, X., Rhee, S. H., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2005. Clostridium difficile toxin A-induced colonocyte apoptosis involves p53-dependent p21(WAF1/CIP1) induction via p38 mitogen-activated protein kinase. *Gastroenterology* **129**, 1875-1888.
- Kim, S. J., Kim, I. W., Kwon, Y. N., Yun, E. Y. and Hwang, J. S. 2012. Synthetic Coprisin analog peptide, D-CopA3 has antimicrobial activity and pro-apoptotic effects in human leukemia cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 264-269.
- Kim, Y. H., Hwang, J. S., Yoon, I. N., Lee, J. H., Lee, J., Park, K. C., Seok, H. and Kim, H. 2021. The insect peptide CopA3 blocks programmed cell death by directly binding caspases and inhibiting their proteolytic activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **547**, 82-88.
- Lamers, F., van der Ploeg, I., Schild, L., Ebus, M. E., Koster, J., Hansen, B. R., Koch, T., Versteeg, R., Caron, H. N. and Molenaar, J. J. 2011. Knockdown of survivin (BIRC5) causes apoptosis in neuroblastoma via mitotic catastrophe. *Endocr. Relat. Cancer* **18**, 657-668.
- Li, D., Hu, C. and Li, H. 2018. Survivin as a novel target protein for reducing the proliferation of cancer cells. *Biomed. Rep.* **8**, 399-406.
- Liu, Y. B., Gao, X., Deeb, D., Brigolin, C., Zhang, Y., Shaw, J., Pindolia, K. and Gautam, S. C. 2014. Ubiquitin-proteasomal degradation of antiapoptotic survivin facilitates induction of apoptosis in prostate cancer cells by pristimerin. *Int. J. Oncol.* **45**, 1735-1741.
- Lu, L. F., Kim, D. H., Lee, I. H., Hong, J., Zhang, P., Yoon, I. N., Hwang, J. S. and Kim, H. 2017. Potassium acetate blocks clostridium difficile toxin A-induced microtubule disassembly by directly inhibiting histone deacetylase 6, thereby ameliorating inflammatory responses in the gut. *J. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 693-699.
- Na, X., Zhao, D., Koon, H. W., Kim, H., Husmark, J., Moyer, M. P., Pothoulakis, C. and LaMont, J. T. 2005. Clostridium difficile toxin B activates the EGF receptor and the ERK/MAP kinase pathway in human colonocytes. *Gastroenterology* **128**, 1002-1011.
- Nam, S. T., Kim, D. H., Lee, M. B., Nam, H. J., Kang, J. K., Park, M. J., Lee, I. H., Seok, H., Lee, D. G., Hwang, J. S. and Kim, H. 2013. Insect peptide CopA3-induced protein degradation of p27Kip1 stimulates proliferation and protects neuronal cells from apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **437**, 35-40.
- Nicolas, M., Noe, V. and Ciudad, C. J. 2003. Transcriptional regulation of the human Sp1 gene promoter by the specificity protein (Sp) family members nuclear factor Y (NF-Y) and E2F. *Biochem. J.* **371**, 265-275.
- Papineni, S., Chintharlapalli, S., Abdelrahim, M., Lee, S. O., Burghardt, R., Abudayyeh, A., Baker, C., Herrera, L. and Safe, S. 2009. Tolfenamic acid inhibits esophageal cancer through repression of specificity proteins and c-Met. *Carcinogenesis* **30**, 1193-1201.
- Park, S., Park, J. A., Jeon, J. H. and Lee, Y. 2019. Traditional and novel mechanisms of Heat Shock Protein 90 (HSP90) inhibition in cancer chemotherapy including HSP90 cleavage. *Biomol. Ther.* **27**, 423-434.
- Pothoulakis, C. and Lamont, J. T. 2001. Microbes and microbial toxins: paradigms for microbial-mucosal interactions II. The integrated response of the intestine to Clostridium difficile toxins. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **280**, G178-183.
- Raj, D., Liu, T., Samadashwily, G., Li, F. and Grossman, D.

2008. Survivin repression by p53, Rb and E2F2 in normal human melanocytes. *Carcinogenesis* **29**, 194-201.
22. Small, S., Keerthivasan, G., Huang, Z., Gurbuxani, S., Crispino, J. D. 2010. Overexpression of survivin initiates hematologic malignancies *in vivo*. *Leukemia* **24**, 1920-1926.
23. Tomicic, M. T., Christmann, M. and Kaina, B. 2010. Topotecan triggers apoptosis in p53-deficient cells by forcing degradation of XIAP and survivin thereby activating caspase-3-mediated Bid cleavage. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **332**, 316-325.
24. Xu, R., Zhang, P., Huang, J., Ge, S., Lu, J. and Qian, G. 2007. Sp1 and Sp3 regulate basal transcription of the survivin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 286-292.
25. Xu, W., Ngo, L., Perez, G., Dokmanovic, M. and Marks, P. A. 2006. Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **103**, 15540-15545.

초록 : 인간 대장상피세포에서 항균펩타이드 CopA3에 의한 survivin 발현 조절 기작 규명

김호*

(대전대학교 과학기술대학 생명화학부 생명과학전공)

근층에서 유래한 항균펩타이드 CopA3는 다양한 세포사멸 과정을 차단한다고 알려져 있다. 세균 독소에 의한 상피세포 세포사멸이나 6-hydroxy dopamine이 야기하는 신경세포 세포사멸 모두를 차단한다. 연구자 등은 최근에 CopA3가 카스파제에 직접 결합하여 그들의 활성화-절단과정을 차단한다고 보고하였다. 하지만 강력한 CopA3의 항세포사멸 효능을 설명하기 위해서는 추가적인 규명이 필요한 실정이다. 본 연구에서는 세포사멸경로의 핵심 억제자인 survivin 발현에 미치는 CopA3의 영향을 확인하였다. 인간 대장상피세포(HT29)에 CopA3를 처리한 뒤 survivin 발현을 추적한 결과, survivin 단백질 양이 유의하게 증가함을 확인하였다. RT-PCR을 통해서 CopA3가 survivin 유전자의 전사를 증가시킴을 확인하였다. 그리고 CopA3 자극이 Sp1 발현을 증가시키는 사실과, Sp1 억제 물질인 tolfenamic acid 처리가 CopA3에 의한 survivin 증가를 차단한다는 결과들을 바탕으로 우리는 CopA3가 Sp1을 통해 survivin 발현을 유도한다는 최종 결론을 도출하였다. 한편 본 연구를 통해서 CopA3의 강력한 항세포사멸 효능을 설명할 수 있는 분자기작을 새롭게 제시하였다고 사려된다.