



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

쥐세포에서 **SPS1**에 의한 산화·환원
항상성과 악성 종양의 특성 조절

2016 년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

허 장 회

쥐세포에서 **SPS1**에 의한 산화·환원 항상성과 악성 종양의 특성 조절

지도교수 이 병 재

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함
2015 년 12 월

서울대학교 대학원
생명과학부
허 장 회

허장회의 석사 학위논문을 인준함
2015 년 12 월

위 원 장 이 준 호 (인)

부위원장 이 병 재 (인)

위 원 김 빛 내 리 (인)

국 문 초 록

Selenophosphate synthetase (SPS)는 셀레노시스틴 합성시 selenium donor로 작용하는 selenophosphate를 합성하는 효소이다. 고등 진핵 생물에는 SPS1과 SPS2 라는 2가지의 형태의 SPS paralogue가 있으며, 이중 SPS2만이 셀레노시스틴 합성을 촉매하며, SPS1은 셀레노시스틴 생합성 능력은 보이지 않는다. 여러 연구에서 SPS2는 세포의 생존에 필수적이지 않지만 SPS1은 오히려 필수적인 역할을 하는 단백질이라는 것이 제시되었다.

본 연구에서는 포유동물의 세포수준에서 SPS1의 기능을 밝히 고자 mouse embryonic cancer cell인 F9 세포에서 RNAi 기술을 이용하여 mouse *Sps1* mRNA를 표적으로 결핍 시켰다. *Sps1*의 결핍에 따라 산화·환원 항상성 조절 유전자인 glutaredoxin1 (*Glrx1*)의 발현이 감소되었으며 세포내에 reactive oxygen species (ROS)의 일종인 hydrogen peroxide의 축적이 일어났으나 superoxide는 축적되지 않았다. 또한 SPS1 결핍에 의해 악성 종양의 특성인 invasiveness가 감소하는 것을 관찰하였으며 성장저해가 일어나는 것도 관찰되었다. 이런 현상들은 *Sps1*이 결핍된 세포주에서 down-regulation 되었던 *Glrx1*을 과발현 시키면, 대조군 정도로 회복되는 것을 관찰하였다.

이러한 결과는 SPS1이 종양 세포의 악성화를 유도하거나 유지

시키는 데 요구되며, 이러한 과정은 *Glrx1*과 같은 산화·환원을 조절하는 유전자를 SPS1이 조절하면서 이뤄지고 있음을 제시해준다.

주요어 : cancer, reactive oxygen species, 셀레늄, 셀레노시스틴, 셀레늄단백질, selenophosphate synthetase 1

학 번 : 2014-20315

목 차

I. 서론	1
II. 재료 및 방법	10
1. Vector construct 제작	10
1.1. Mouse SPS1 knockdown-resistant (rescue) vector 제작	10
1.2. Mouse와 human <i>Glrx1</i> 과발현 vector 제작	12
1.3. Flag으로 융합된 mouse SPS1 발현 vector 제작	14
1.4. Hydrogen peroxide 탐지 probe 제작	16
2. F9 과 GP2-293 세포 배양	17
2.1. Mouse/human <i>Glrx1</i> KI과 mouse SPS1 rescue cell line 준비	17
2.2 Hydrogen peroxide 탐지 probe를 발현하는 cell 준비	18
3. CM-H ₂ DCFDA 염색을 이용한 ROS 관찰	19
4. 세포내 Hydrogen peroxide 탐지	20
5. DHE와 MitoSOX 염색을 이용한 세포내 superoxide 관찰	21
6. FACS 분석법에 의한 세포내 ROS의 정량	22
7. Cell growth rate assay	23
8. Invasion assay	23
9. F9 cell로부터 RNA 분리	24
10. RT-PCR	25
11. Real-time PCR	27
12. mouse SPS1의 세포 내 위치 관찰	28
III. 결과	29
1. Sps1의 결핍은 <i>Glrx1</i> 의 발현을 억제한다.	29
2. Sps1의 결핍은 세포내 ROS의 축적을 유도한다	32
3. Sps1 결핍은 세포내 superoxide의 축적을 동반하지 않는다	34
4. Sps1 결핍은 세포내 hydrogen peroxide의 축적을 유도한다	36
5. Sps1의 결핍은 많은 양의 ROS 축적을 동반한다	38

6. Sps1 결핍은 growth rate의 감소를 유도한다	40
7. Sps1 결핍은 invasiveness의 감소를 유도한다	45
8. Mouse SPS1은 세포 내 전반적으로 위치한다	44

IV. 고찰 46

V. Appendices 50

Appendix 표 1. Microarray analysis of differentially expressed genes related redox regulation in <i>Alb-Cre; Sps1^{fl/fl}</i> mouse liver	50
---	----

Appendix 표 2. Ingenuity Pathway Analysis of liver from control and <i>Alb-Cre; Sps1^{fl/fl}</i> mice	50
---	----

Appendix 표 3. Microarray analysis of differentially expressed genes in SPS1 knockdown F9 cells	50
---	----

Appendix 그림 1. Measurement of anchorage-independence in F9 cells	51
---	----

Appendix 그림 2. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products	52
--	----

VI. 참고문헌 53

Abstract 60

그 립 목 차

그림 1. Schematic overview of selenoprotein synthesis in eukaryotes	3
그림 2. Comparison of amino acid sequence of SPS1 paralogue and orthologue	6
그림 3. mRNA levels were measured by qPCR	31
그림 4. Detection of intracellular ROS in F9	33
그림 5. Detection of intracellular superoxide in SPS1-deficient F9 cells	35
그림 6. Accumulation of intracellular hydrogen peroxide in SPS1-deficient F9 cells	37
그림 7. Quantification of intracellular ROS in F9 cells ..	39
그림 8. Measurement of cell growth rate in F9 cells	41
그림 9. Detection and measurement of cell invasiveness in F9 cells	43
그림 10. Subcellular localization of mouse SPS1 in F9 cells	45

표 목 차

표 1. Rescue vector 제작 시 사용한 primer	11
표 2. Mouse 와 human Glrx1 overexpression vector 제작 시 사용한 primer	13
표 3. Mouse SPS1-flag tagging vector(pcDNA4/TO-SPS1-flag) 제작 시 사용한 primer	15
표 4. RT-PCR에 사용한 primer	22

I. 서론

셀레늄은 생체 내에서 필수적으로 요구되는 미량원소로서 원자량이 78.97이며 주기율표에서는 VIA족 4주기에 속하며 sulfur와 tellurium의 중간적인 화학적 성질을 가지고 있다. 셀레늄은 암의 예방, 성장 촉진, 노화 지연, 면역 증강, 남성의 생식력 증강, 심장병 예방, 발달과 발생과정에 필요, 항바이러스 작용 등의 다양한 생리적 조절작용을 수행한다고 알려져 있다(Lee et al., 1996; Papp et al., 2010; Fairweather-Tait et al., 2011; Hatfield et al., 2012; Rayman, 2012). 셀레늄은 단백질 내에서 셀레노시스틴(selenocysteine; Sec)의 형태로 존재하며, 생체 내에서는 셀레노시스틴 아미노산이 하나 혹은 그 이상을 가진 셀레늄 단백질 형태로 기능을 나타낸다(Lee et al., 1996). 셀레늄의 결핍은 왜소증, 근육퇴화, 암과 같은 각종 질환을 유발하며, 과다 시에는 시력 상실, 초식동물의 근육과 관절이 약화되는 질병 등이 발생된다(Franke, 1934a, b; O'Toole et al., 1995; Lee et al., 1996). 따라서 생체 내에서의 셀레늄의 양이 엄격하게 유지되어야 하며, 셀레늄단백질의 생합성도 정교하게 조절되어야 한다.

셀레노시스틴은 고유한 tRNA ($\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$)를 가지고 있으며 단백질 합성시 셀레노시스틴으로 charging된 $\text{tRNA}^{\text{[Ser]Sec}}$ 가 단백질 합성 종결

코돈으로 알려진 UGA 코돈(codon)을 인식하여 단백질 내로 삽입된다 (Chambers et al., 1986; Lee et al., 1989). 따라서 셀레노시스틴을 21번째 아미노산이라 부른다(Lee et al., 1989; Böck et al., 1991). UGA 코돈이 셀레노시스틴의 코돈으로 작용하기 위해서는 UGA 코돈의 downstream에 SECIS (selenocysteine insertion sequence) element 라고 하는 stem-loop 구조가 필요하다(Walczak et al., 1996; Tujebajeva et al., 2000). 원핵생물에서는 셀레늄 단백질 mRNA의 UGA 코돈 바로 뒤에, 진핵 생물에서는 mRNA의 3'-UTR에 SECIS element가 존재한다 (Berry et al., 1993). 셀레노시스틴의 합성은 serine이 먼저 tRNA^{[Ser]Sec}에 charging된 다음에 O-phosphoseryl tRNA^{[Ser]Sec} kinase에 의해 O-phosphoseryl tRNA^{[Ser]Sec}으로 전환된다(Carlson et al., 2004). 그 후 selenocysteine synthetase (SecS)에 의해 selenophosphate를 기질로 사용하여 O-phosphoseryl tRNA^{[Ser]Sec}의 인산기를 셀레늄기로 치환되면서 Sec-tRNA^{[Ser]Sec}이 된다(Xu et al., 2007). 셀레노시스틴으로 charging된 Sec-tRNA는 Sec-tRNA 고유한 translation elongation factor인 EFsec과 SECIS binding protein 2 (SBP2)를 매개로 ribosome의 A-site에 들어오게 되는 매우 특이적인 mechanism에 의해 단백질에 삽입된다(그림 1; Copeland et al, 2000; Hatfield et al., 2002).

박테리아에서 셀레노시스틴의 합성에 SelA (selenocysteine synthetase), SelB (selenocysteine specific translation factor), SelC

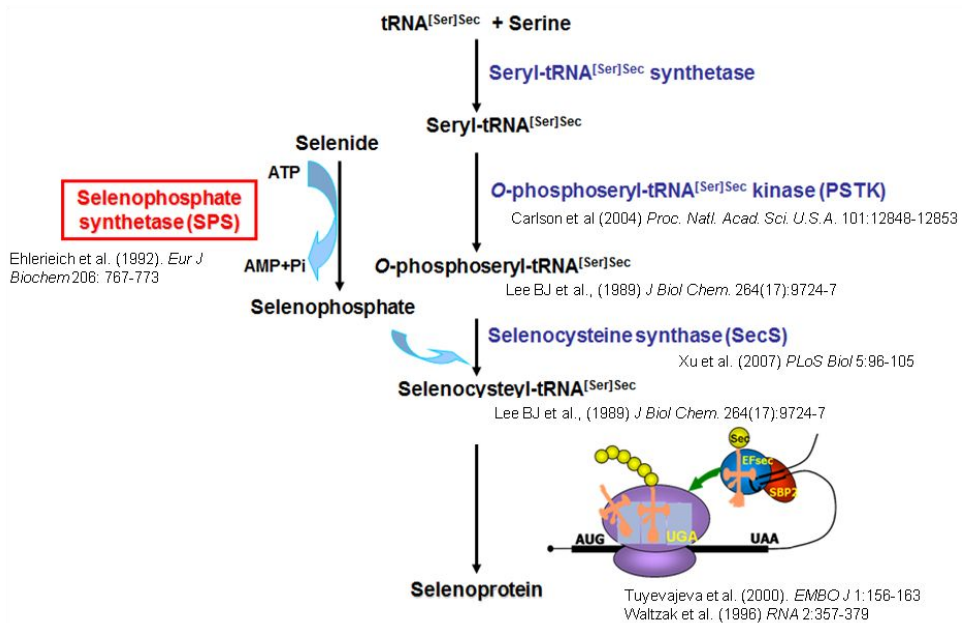


그림 1. Schematic overview of selenoprotein synthesis in eukaryotes. Biosynthetic pathway of selenoproteins rests on the production of the selenium donor compound, selenophosphate, from selenide and ATP. This reaction catalyzed by the enzyme selenophosphate synthetase (SPS). Selenophosphate is used to synthesize selenocysteine (Sec) from O-phosphoseryl-tRNA^{[Ser]Sec} by selenocysteine synthetase (SecS). Selenocysteyl-tRNA^{[Ser]Sec} recognizes UGA codon and incorporates Sec into the growing polypeptide to synthesize of selenoproteins.

(selenocysteine specific tRNA), SelD (selenophosphate synthetase)가 필요하다는 것이 셀레늄단백질 합성 기능이 제거된 돌연변이체의 분석과 정에서 밝혀졌다(Leinfelder et al., 1990). 이 중 SelD는 selenide와 ATP를 이용하여 monoselenophosphate를 합성하는 과정을 촉매한다(Ehrenreich et al., 1992). 이 selenophosphate가 셀레노시스틴 생합성에서 selenium donor로 작용하기 때문에 SelD가 셀레늄단백질 합성에 필수적이라 할 수 있다.

박테리아와 하등 진핵 생물에는 한 가지 종류의 SPS (SelD)가 존재하는 반면에, 고등 진핵 생물에서는 SPS1과 SPS2 두 가지 형태(isoform 혹은 paralogue)가 존재한다(Guimaraes et al., 1996). SPS2는 박테리아 SelD의 보존된 활성화 부위인 Cys17이 셀레노시스틴으로 치환되어 있어 셀레늄단백질의 생합성 과정을 촉매할 뿐만 아니라, 자기 자신도 셀레늄단백질이다. 반면에 SPS1은 SPS2의 셀레노시스틴이 있는 자리에 *Drosophila*와 mammal에서 각각 Arg와 Thr으로 치환되어 있다(Low et al., 1995; Guimarães et al., 1996). SPS1과 SPS2의 단백질 서열은 잘 보존되어 있으며 human, mouse와 *Drosophila*에서 각각 72%, 71%, 45%의 서열 동질성을 보인다(Guimarães et al., 1996). 또한 SPS 단백질들에는 잘 보존된 2개의 motif가 이 두 isoform에 존재하며, motif A는 촉매에 필수적인 잔기인 Lys32를 포함하는 catalytic domain을 가지고 있고 motif B는 ATP/GTP binding protein 및 protein kinase 에서 발견되는

보존된 ATP binding domain을 가지고 있다(그림2; Guimareas et al., 1996; Low et al., 1996).

최근에 SPS2만이 selenophosphate를 합성하며 SPS1은 셀레늄단백질의 생합성 과정에서 기능을 하지 못한다고 보고된 바 있다(Xu et al., 2007). 또한, 초파리의 SPS1은 selenide-dependent AMP 합성 활성이 없으며(Persson et al., 1997), NIH3T3 cell 에서 SPS1을 knockdown해도 셀레늄단백질의 합성에는 영향을 주지 않았다(Xu et al., 2007).

SPS1은 셀레노시스틴의 합성에는 필수적이지 않지만 세포의 성장과 대사에 필수적이라는 증거들이 보고되고 있다. 예를들면, 초파리에서 SPS1을 knockout (KO)시키면 imaginal disc의 형성이 비정상적으로 되며 larval lethality 를 보인다는 보고(Alsina et al., 1998, 1999)와 초파리 (SL2)세포에서 SPS1의 발현을 억제시켰을 때 세포의 성장이 저해(Shim et al., 2009)된다고 보고된 바 있다. 이를 통해 SPS1이 세포의 성장에 필수적이라는 것을 시사한다.

또한, SPS1은 reactive oxygen species (ROS)의 축적과 연관된 것으로 보고된 바 있는데, 초파리 SPS1이 adult 세포에서 ROS의 축적을 통해 apoptosis를 억제하며(Morey et al., 2003), SPS1을 knockdown한 세포에서 ROS가 발생된다는 보고(Shim et al., 2009) 그리고 Alsina의 보고에 따르면 SPS1의 KO에 의한 larval lethality는 ROS의 축적을 통해 일어난다(Alsina et al., 1998, 1999).

SelD_E.coli	1	-----MSENSIRLTQVHG	14
Sephs1_Human	1	-----MSTRESFNPESEVLDKSFRLTFTEL	26
Sephs1_Mouse	1	-----MSTRESFNPESEVLDKSFRLTFTEL	26
Sephs1_Friut_fly	1	-----MSYAADVLSAHLLEHGGGDAELPRFFDPTAHDLDASFRLTFFDL	46
Sephs2_Human	1	MAEASATGACGEA-----MAAAEGSSQPAQLTLGRSFSNVPFFEPQALGLSPSWRLTFGFGM	57
Sephs2_Mouse	1	MAEAAAAGAAGETMAALVAAEGSLGPAQWASGRSFSNVPFFEPQTLGFSPSWRLTFGFGM	60
Sephs2_Friut_fly	1	-----MFQPEKHGLEPDLTKFTH	21
Motif A : catalytic domain (Jorge et al., 1996)			
SelD_E.coli	15	AKGKKSPKVIETILHSEQAQFYDNPILLVGNETR-----	49
Sephs1_Human	27	KSTKKYPQDVLDKLESLDENHFQED-----EQRLGAVMPRLGI	66
Sephs1_Mouse	27	KSTKKYPQDVLDKLESLDENHFQED-----EQRLGAVMPRLGI	66
Sephs1_Friut_fly	47	KPRKKYPQDVLSKLYSALQDDVSAQD-----CEPQLNVAIFRIGI	88
Sephs2_Human	58	KQVKKYPQEAALLKLAGLTRPDYRPPPLGRGLVGGDEEASQEAQLPAGAGPSPPTFPAIGI	117
Sephs2_Mouse	61	KQVKKYPQETLLKLEGLTRPALQPLPLTSGLVGGDEETVQEGGLSTFPGPSAFPSLGI	120
Sephs2_Friut_fly	22	TQVKKYPQKIVLEKYLRTGEIENKNN-----DGVLYGS	54
Selenoprotein containing Sec			
SelD_E.coli	50	-DDAAVYD--LNGTSVISTTDFPMIVDNPFDGRIATNATISDIFAMGGPIMATATIL	106
Sephs1_Human	67	GMDCVILPLR-HGGLSLVQTTDFYPIVDDPYMMGRICANVLSOLYANGYTECDNNLML	125
Sephs1_Mouse	67	GMDCVILPLR-HGGLSLVQTTDFYPIVDDPYMMGRICANVLSOLYANGYTECDNNLML	125
Sephs1_Friut_fly	89	GLDCSVILPLR-HGGLQLVQTTDFYPIVDDPYMMGRICANVLSOLYANGYTECDNNLML	147
Sephs2_Human	118	GMDCSVILPLR-HGGLSLVQTTDFYPLVEDPYMMGRICANVLSOLYANGYTECDNNLML	176
Sephs2_Mouse	121	GMDCSVILPLR-HGGLSLVQTTDFYPLVEDPYMMGRICANVLSOLYANGYTECDNNLML	179
Sephs2_Friut_fly	55	GMDCVILPLRHKDYLLICQYDFEYVNDRELGRILANVLSOLYANGYTECDNNLML	114
Catalytic essential residue (Kim et al., 1993)			
SelD_E.coli	107	GWPINKLSPEI-----AREVTEGGRYACQDAGI-----ALLAGGHSIDAPEPIFGLAVTIGVPT	159
Sephs1_Human	126	LGYSNKHTEHERDKYMLPIIQGFKDAEEAAGT-----SVTGGQTVLNFWIVLGGVATTVQQP	182
Sephs1_Mouse	126	LGYSNKHTEHERDKYMLPIIQGFKDAEEAAGT-----SVTGGQTVLNFWIVLGGVATTVQQP	182
Sephs1_Friut_fly	148	LAVSTKHTEKERDQVPLIMGFKDSALEAAGT-----TVTGGQSVNFWICTIGGVASTIQQP	204
Sephs2_Human	177	LSVDSQNSEEREKYTPUMVKQFQDAEEAGT-----AVTGGQTVNFWIITIGGVATVQQP	233
Sephs2_Mouse	180	LSVDSQNSEEREKYTPUMVKQFQDAEEAGT-----AVTGGQTVNFWIITIGGVATVQQP	236
Sephs2_Friut_fly	115	VSTSTSESEKERDQVYIGLYMKQFQNSLKANGYRNTPLIIFQLKINFWICTIGGATSVQRS	174
Motif B : ATP binding domain (Jorge et al., 1996; Low et al., 1995)			
SelD_E.coli	180	EFMKKNSTAQAGCKIFLTPLGIQVLTATKKSLLKPEHQGL-----IT	203
Sephs1_Human	183	NEFIMPDNAVVDQVILTKPLGTQAVAVHQWL-DIPEKWNKIKLVWTDQVELAVQDAM	241
Sephs1_Mouse	183	NEFIMPDNAVVDQVILTKPLGTQAVAVHQWL-DIPEKWNKIKLVWTDQVELAVQDAM	241
Sephs1_Friut_fly	205	NEFIVPDNAVVDQVILTKPLGTQAVNAHQWL-DQPERWNRIKLVWSEEDVRKAVHPRM	263
Sephs2_Human	234	NEFIMPDNAVVDQVILTKPLGTQAVNAHQWL-DNPERWNKIKLVWSEEDVRKAVHPRM	292
Sephs2_Mouse	237	NEFIMPDNAVVDQVILTKPLGTQAVNAHQWL-DNPERWNKIKLVWSEEDVRKAVHPRM	295
Sephs2_Friut_fly	175	EEIILPSNAQVDQVILTKPLGGQAMDAHLWQNLQTEKVKYKLLSECSADAIKETFEINAV	234
SelD_E.coli	204	EVNCRNNTAGASFANIEG/KAMQDVITGFG-LGHLSNCDQAGVQARVDVEAIPKLPQVEE	263
Sephs1_Human	242	MNINARLNRTAAGLMHTFNAAADITGFG-LGHACNLAKQQQNEVSVFIH-NLPVLAK	298
Sephs1_Mouse	242	MNINARLNRTAAGLMHTFNAAADITGFG-LGHACNLAKQQQNEVSVFIH-NLPVLAK	298
Sephs1_Friut_fly	264	NSINARLNFAAALMHKYNHGAADITGFG-LGHACITLAAHQKQVSVFIH-NLPVLAK	320
Sephs2_Human	293	FNINATLNRTAAGLMHTFNAAADITGFG-LGHSONLAKQQQNEVSVFIH-NLPVLAK	349
Sephs2_Mouse	296	FNINATLNRTAAGLMHTFNAAADITGFG-LGHSONLAKQQQNEVSVFIH-NLPVLAK	352
Sephs2_Friut_fly	235	KSMITVLNKNAAALMHKYQAHCAADITGFG-LGHANNLAKQKQKVFQFIN-KLPIIKI	291
SelD_E.coli	264	YIKLGAVPBGTERNFASYGLHGMENPREYDILLCOFOTSGGLLALVMPFAENEYKAT-A	321
Sephs1_Human	299	MAAVSKAQSN-----MFGLMHG-----TCPETSGGLLICLPPEQAARFCAEIKS	342
Sephs1_Mouse	299	MAAVSKAQSN-----MFGLMHG-----TCPETSGGLLICLPPEQAARFCAEIKS	342
Sephs1_Friut_fly	321	MAAVAKAQSN-----MFQLLQG-----HSAETSGGLLICLPPEQAAYCKDIK	364
Sephs2_Human	350	MAAVSKAQSN-----RFGLLQG-----TSAETSGGLLICLPPEQAARFCAEIKS	392
Sephs2_Mouse	353	MAAVSKAQSN-----RFGLLQG-----TSAETSGGLLICLPPEQAARFCAEIKS	395
Sephs2_Friut_fly	292	VLFKSTLYDQ-----STKFRSG-----PSVETSGGLLICLPADAAKPCDFE	335
SelD_E.coli	322	AEEFI-ELTATIGELVPARGPW-M-VEIR-----	347
Sephs1_Human	343	PKYGEHQAWIVGIVE-KGNRT-ARIIDKPRIIEVAPQVATQNVNPTPGAT-----	391
Sephs1_Mouse	343	PKYGEHQAWIVGIVE-KGNRT-ARIIDKPRIIEVAPQVATQNVNPTPGAT-----	392
Sephs1_Friut_fly	365	---CEGYQAWIVGIVE-KGNKT-ARIIDKPRVIEVPAKD-----	398
Sephs2_Human	393	SKYGEHQAWIVGIVE-KGNRT-ARIIDKPRVIEVLPQGAATAV-LAPDSSNASSEPS	448
Sephs2_Mouse	396	SKYGEHQAWIVGIVE-KGNRT-ARIIDKPRVIEVLPQGAATAV-LAPDSSNASSEPS	452
Sephs2_Friut_fly	336	ATNGEQKSFQIGHIT-AANESDAVLCEDVEFIEVSL-----	370

그림 2. Comparison of amino acid sequence of SPS1 paralogue and orthologue

뿐만 아니라 SPS1은 cell defense 와도 관련이 있으며, 초파리(SL2) 세포에서 SPS1의 발현을 억제시켰을 때 active vitamin B6 (pyridoxal phosphate)의 생성이 억제되고, vitamin B6의 부족은 거대미토콘드리아의 생성유도와 선천성면역(innate immunity)을 통한 세포의 방어시스템을 조절한다고 보고된 바 있다(Lee et al., 2011).

이밖에도 SPS1은 glutamate transporter (dmGlut 또는 l(2)01810)와 glutamine synthetase 1 (GS1)의 발현유도를 통해 세포내 glutamine의 축적과 거대미토콘드리아의 생성을 유발하기도 한다(Shim et al., 2009).

Mammal에서는 SPS1이 세포 내에서 L-selenocysteine (L-Sec)을 재 활용하는 selenium salvage system을 통해 selenophosphate를 합성하는데 참여할 것이라고 제안되었으나(Tamura et al. 2004) 아직 검증되지 않았다. 그리고 human rectal carcinoma에서 normal cell과 비교해 SPS1이 overexpression 되며 SPS1이 rectal carcinogenesis를 일으키는 역할을 할 것이라고(Choi et al., 2011) 보고된 바 있다. Human SPS1은 5가지 종류의 alternative splicing variants가 존재하며 이들은 각각 세포 내 위치가 다르며 조직특이적인 발현양이 다르다. 또한, 암세포 특이적으로 각각의 splice variant들은 cell cycle의 조절을 받기 때문에 각 variant들의 subcellular localization, interaction 그리고 expression에 따라 다른 역할을 할 것이라는 보고도 있다(Kim et al., 2010).

이를 종합하여 볼 때, SPS1은 셀레늄단백질 합성에는 관여하지 않지

만 다른 필수적인 기능을 할 것으로 예상되나 아직 포유동물에서의 생화학적·분자세포생물학적 기능 분석이 제대로 이뤄지지 않고 있다. 본 연구는 포유동물에서의 SPS1의 기능을 규명하고자, 쥐를 모델동물로 하였고 RNA interference (RNAi) 방법을 사용해 포유동물에서의 SPS1의 분자세포생물학적 기능을 알아보려고 하였다.

먼저, 공동연구 그룹에서 *in vivo*에서의 SPS1 기능을 밝히기 위해 liver specific SPS1 KO mouse를 제작하였고, 그 결과로 liver에서 SPS1이 KO되어도 phenotype의 변화는 없었지만 microarray 분석에서 산화·환원 조절 유전자인 *Glrx1* (-43.5 fold), *Gsta4* (-3.61 fold), *Gsto1* (-2.06 fold), *Gstm3* (3.14 fold)의 fold-change 값이 높았다(Appendix 표 1). 그리고 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)분석에서는 SPS1이 hepatotoxicity로서 liver에서 glutathione-depletion과 관련이 있는 것으로 나타났다(Appendix 표 2). SPS1을 knockdown한 F9 cell에서도 microarray 분석을 하여 DEGs (differentially expressed genes)를 동정한 결과에서도 산화·환원 조절 유전자인 *Gsto1* (-5.2 fold), *Glrx1* (-4.5 fold)의 fold-change가 높게 나왔다(Appendix 표 3). *Drosophila* cell에서 SPS1 knockdown에 의해 ROS가 발생된다는 보고(Shim et al., 2009)와 liver KO mouse와 *Sps1* 결핍 F9 cell에서 유사하게 산화·환원을 조절하는 유전자가 DEGs로 동정된 것을 종합해보면 SPS1이 산화·환원 항상성 조절과 관련이 높을 것으로 생각된다. 본 연구에서는 *Sps1* 결핍에 의한

표현형의 변화가 산화·환원 조절 유전자 중 liver KO mouse에서 fold-change가 매우 높게 일어난 *Glrx1*에 의해 일어났는지 조사하였다. 먼저, mouse embryonic cancer cell인 F9 cell에서 mouse *Sps1* mRNA에 대한 shRNA를 발현하는 세포주(F9/shSPS1)를 공동 연구 그룹으로부터 제공받아서 실험에 사용하였다. shSPS1 발현 세포주에서의 *Sps1* mRNA 양은 약 90%가 knockdown되었으며, *Glrx1*의 mRNA양도 약 90%가 down-regulation 되었다. 세포내 redox state의 변화를 관찰하고자 ROS를 탐지하는 실험을 하였고, 악성 종양 특성의 변화를 조사하고자 growth rate과 invasiveness를 assay 하였다.

II. 재료 및 방법

1. Vector construct 제작

1.1. Mouse SPS1 knockdown-resistant (rescue) vector 제작

Knockdown-resistant SPS1 (rescue)발현 vector를 제작하기 위해 shSPS1의 target sequence의 seed region에 존재하는 서열 중 3 군데의 염기에서 silent mutation이 일어나도록 primer를 design하였으며, 돌연변이는 2단계의 PCR 과정을 통하여 수행되었다. 첫 번째로 2개의 DNA fragment (5'-half와 3'-half)를 만들기 위해 F9 cell의 cDNA를 주형으로 하였고, 5'-half를 만들기 위해 SPS1 KI F1과 SPS1 KI R1 primer를 사용하였으며, 3'-half를 만들기 위해 SPS1 KI F2와 SPS1 KI R2 primer를 사용하여 증폭하였다. 만들어진 PCR 산물은 SPS1 KI F1과 SPS1 KI R2 primer를 사용해 nest-PCR을 해서 3개의 silent mutation을 가진 full-length의 SPS1-Rescue construct를 만들었다. SPS1-Rescue construct는 pcDNA4/TO vector (Invitrogen)의 *Bam*HI과 *Eco*RI site에 ligation 하였고, *DH5a* 균주에 transformation 하였다. 제작된 plasmid는 제한효소 분석을 통하여 확인하였고 DNA sequencing을 통해 벡터가 제대로 만들어졌다는 것을 확인하였다.

Rescue vector 제작 시 사용한 primer는 Table 1과 같다.

Table 1.

Primer name	5' → 3'
SPS1 KI F1	AGTCGGATCCACCATGTCTACTCGAGAGT
SPS1 KI R1	CTTGATAGGCTAACTCTACG
SPS1 KI F2	CGTAGAGTTAGCCTATCAAG
SPS1 KI R2	GACTGAATTCTTAGGAGGTGGCACCAG

*밑줄은 silent mutation 염기를 표시함.

1.2. Mouse와 human *Glx1* 과발현 vector 제작

Mouse *Glx1*(m*Glx1*)을 과발현하는 vector의 제작을 위해, F9 cell로부터 얻은 cDNA의 *Glx1* ORF를 주형으로 하였고 mGLRX1-KpnI F와 mGLRX1-EcoRI R primer를 사용해서 증폭하였다. PCR 산물은 pcDNA4/TO vector의 *KpnI*과 *EcoRI* site에 ligation하였고, *DH5a* 균주에 transformation 하였다. Human *Glx1*(h*Glx1*)을 overexpression 하는 vector는 HeLa cell로부터 얻은 cDNA의 *Glx1* cDNA를 주형으로 하였고, 그리고 BamHI-hGLRX1 F와 EcoRI-hGLRX1 R primer를 사용해 증폭하였으며 *BamHI*과 *EcoRI* site를 ligation 하였다는 것 이외의 다른 방법은 앞과 동일하였다. 제작된 plasmid는 제한효소 분석을 통하여 확인하였고 DNA sequencing을 통해 벡터가 제대로 만들어졌다는 것을 확인하였다.

Mouse 와 human *Glx1* overexpression vector 제작 시 사용한 primer는 Table 2와 같다.

Table 2.

Primer name	5' → 3'
mGLRX1-KpnI F	AGTCGGTACCAGCATGGCTCAGGAGTTT
mGLRX1-EcoRI R	GACTGAATTCTTATAACTGCAGAGCTCCAA
BamHI-hGLRX1 F	ACTGGGATCCGCAACTGAGGATTCTTCC
EcoRI-hGLRX1 R	ACTGGAATTCTGTGGTTACTGCAGAGC

1.3. Flag으로 융합된 SPS1 발현 vector 제작

세포내 위치를 조사하기 위하여 Flag으로 융합된 mouse *Sps1*을 과발현하는 vector를 제작하였다. F9 cell로부터 얻은 cDNA의 *Sps1* ORF를 주형으로 하였고 BamHI-SPS1 F 와 EcoRI-flag-SPS1 R primer를 사용하여 증폭하였다. PCR 산물은 pcDNA4/TO vector의 *Bam*HI과 *Eco*RI site에 ligation하였고, *DH5a* 균주에 transformation 하였다. 제작된 plasmid는 제한효소 분석을 통하여 확인하였고 DNA sequencing을 통해 벡터가 제대로 만들어졌다는 것을 확인하였다.

Mouse SPS1-flag tagging vector(pcDNA4/TO-SPS1-flag) 제작 시 사용한 primer는 Table 3과 같다.

Table 3.

Primer name	5' → 3'
BamHI-SP S1-F	CTAGGGATCCGAACCATGTCTACTCGAGAGTCC TTTAACCCG
EcoRI-flag -SPS1-R	TCAGGAATTCTTACTTGTCGTCATCGTCTTTG TAGTCGGAGGTGGCACCAGGTGTGGGGTTCACGT

1.4. Hydrogen peroxide 탐지 probe 제작

Cytosolic 과 mitochondrial hydrogen peroxide는 Tobias.P.Dick으로부터 제공받았은 roGFP2-Orp1 융합 단백질 probe를 이용하였다(Gutscher et al., 2008 and Morgan et al., 2011). F9 세포에서 retroviral vector가 복제되지 않기 때문에 원본 vector (cytosolic pLPCX-roGFP2-Orp1과 mitochondrial pLPCX-roGFP2-Orp1)의 *NdeI*과 *XbaI* 제한효소 자리로 잘라서 pcDNA4/TO vector로 cloning 하였다. *DH5a* 균주에 transformation 하였으며, 제작된 plasmid는 제한효소 분석을 통하여 확인하였고 DNA sequencing을 통해 벡터가 제대로 만들어졌음을 확인하였다.

2. F9과 GP2-293 cell culture

Mouse embryonic cancer cell인 F9 세포와 retroviral packaging cell인 platinum GP2-293 cell (Clontech)은 37℃, 5% CO₂ 공급 상태에서 10% FBS (Hyclone)를 포함한 DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Hyclone) 배지로 배양하였다. F9 cell의 배양은 0.1% gelatin (Sigma)이 코팅된 plate를 사용하였다.

2.1. Mouse 와 human *Glx1*의 과발현과 mouse SPS1 rescue cell line 준비

SPS1이 knockdown된 F9 cell은 37℃, 5% CO₂ 공급 상태에서 10% FBS 를 포함한 DMEM 배지로 배양하였다. Mouse 와 human *Glx1* overexpression vector와 rescue vector를 transfection하기 위해 6well-plate에 cell (4×10^5 cells)을 분주하고 24시간 후, 각 well당 2μg의 vector, 6μl의 PLUS reagent와 6μl의 Lipofectamine을 각각 100μl의 serum-free DMEM과 섞은 후 상온에서 15분간 배양하였고, 두 용액을 섞은 뒤 30분간 더 배양한 후 800μl의 serum-free DMEM 상태의 cell에 처리하였다. 5시간 후 serum을 포함한 DMEM으로 바꾼 뒤 하루 동안 배양하였고 vector가 들어간 cell만을 선별하기 위해 400μg/ml의 zeocin을 넣고 배양하였다.

2.2 Hydrogen peroxide 탐지 probe를 발현하는 cell의 준비

Hydrogen peroxide 탐지용 probe (cytosolic 과 mitochondrial pcDNA4/TO-roGFP2-Orp1)를 F9 cell(F9, F9/shSPS1, F9/shSPS1/Rescue, F9/shSPS1/oemGLRX1)에서 발현시키기 위해 각 cell line을 24well-plate에 0.8×10^5 cell 만큼 분주하고 24시간 후, 각 well당 0.5 μ g의 vector, 1.25 μ l의 PLUS reagent와 1.25 μ l의 Lipofectamine 을 각각 100 μ l의 serum-free DMEM과 섞은 후 상온에서 15분간 배양하였고, 두 용액을 섞은 뒤 30분간 더 배양한 후 200 μ l의 serum-free DMEM 상태의 cell에 처리하였다. 5시간 후 serum을 포함한 DMEM으로 바꾼 뒤 하루 동안 배양하였다.

3. CM-H₂DCFDA 염색을 이용한 ROS 관찰

F9 cell을 0.1% gelatin 으로 코팅된 35mm dish에 2×10^5 cell 만큼 접종하고 37℃, 5% CO₂ 공급 상태에서 16시간 배양하였다. CM-H₂DCFDA (Molecular Probes) 염색은 제조사 protocol을 따랐으며 약간의 수정된 방법으로 수행하였다. 35mm dish에서 배양액을 제거 후 RPMI 1640 (Gibco)로 2회 washing 하고 1μM의 CM-H₂DCFDA 로 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 40분간 배양하였다. 그 후 phenol-red가 들어 있지 않은 RPMI 으로 2회 washing 하고 EVOS FL (AMG) 형광현미경으로 관찰하였다. Excitation 파장은 470nm 파장을 사용하였다. Counterstaining을 하기 위해 10μg/ml Hoechst 33258 (Invitrogen)을 사용하였으며 excitation 파장은 352nm 파장을 사용하였다.

4. 세포내 hydrogen peroxide 탐지

Transient하게 hydrogen peroxide 탐지 probe (cytosolic과 mitochondrial pcDNA4/TO-roGFP2-Orp1)를 발현하는 세포를 0.1% gelatin으로 코팅된 μ -slide 8well (Ibidi, Germany)에 0.5×10^5 cell 만큼 접종하고 37°C, 5% CO₂ 공급 상태에서 12시간 배양하였다. 세포를 1x PBS로 washing하고 3% paraformaldehyde (Sigma)로 상온에서 7분간 fixation 한 다음 1x PBS로 3번 washing 하였다. 그 후 LSM 700 confocal microscope (Carl Zeiss)를 이용하여 관찰하였다. Probe의 산화 (405nm)와 환원(488nm)된 형태의 비율은 Morgan 방법(Morgan et al., 2011)을 따랐으며 약간의 수정된 방법으로 수행하였다. 100배 배율로 촬영된 image를 ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>)를 사용하여 background subtraction 하였으며, threshold 조절 후 405와 488nm 사진을 stacking하였다. 그 후 동일한 영역(Thresholding method : Li)을 선택하였고, 405nm 사진의 intensity를 488 nm 사진으로 나눴셈하여 ratio를 구하였다. 이 과정을 각 cell line 마다 6개의 다른 field를 반복 후 평균을 구하였다.

Ratio image는 405nm 사진을 488nm 사진으로 pixel 대 pixel 로 나뉘어서 만들었으며, ImageJ look up table의 'Fire'를 사용해서 false-color ratio 그림을 만들었다.

5. DHE와 MitoSOX 염색을 이용한 세포내 superoxide 관찰

F9 세포내의 세포질 superoxide와 미토콘드리아 superoxide를 탐지하기 위해 dihydroethidium (DHE, Invitrogen)와 MitoSOX (Invitrogen)를 각각 사용하여 염색하였다. F9 세포를 0.1% gelatin 으로 코팅된 35mm dish에 2×10^5 cell 만큼 접종하고 37°C, 5% CO₂ 공급 상태에서 16시간 배양하였다. 35mm dish에서 배양액을 제거 후 RPMI 1640로 2회 washing 하고 각각 1μM의 DHE와 MitoSOX로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분간 배양하였다. 그 후 phenol-red가 들어있지 않은 RPMI으로 2회 washing 하고 EVOS FL 형광현미경으로 관찰하였다. Excitation 파장은 531nm 파장을 사용하였다. Counterstaining을 하기 위해 10μg/ml Hoechst 33258을 사용하였으며, excitation 파장은 352nm 파장을 사용하였다.

6. FACS 분석법에 의한 세포내 ROS의 정량

각 세포에 존재하는 ROS양을 측정하기 위하여 fluorescence-activated cell sorting (FACS) 분석을 수행하였다. 1 μ M의 CM-H₂DCFDA로 세포를 staining 한 후 cold-RPMI 으로 1회 washing 하고 trypsin-EDTA로 세포를 떼어내어 50ml tube로 옮긴 뒤, 2,000rpm 에서 5분간 원심분리 하였다. 그리고 상층액을 제거하고 phenol-red가 들어 있지 않은 cold-RPMI로 1회 washing 후 2,000rpm에서 5분간 원심 분리 하였다. 그런 다음 세포를 phenol-red가 포함되지 않은 1ml의 cold-RPMI에 풀어준 후 5ml tube로 옮겼다. FACS Calibur (BD Science)를 이용하여 분석하였으며, 총 50,000개의 세포를 counting 하였다.

데이터 분석은 FACS를 통해 sorting된 세포를 Foward scatter (FSC) 와 Side scatter (SSC)로 분리후 major한 population만 추출하여 CM-H₂DCFDA 시약의 세기를 측정하였다.

7. Cell growth rate assay

0.1% gelatin이 코팅된 96well plate에 5×10^3 cells/well로 세포를 접종하고 37°C, 5 % CO² 공급 상태에서 4일간 배양하였다. 각각의 시간별 (Day0, 1, 2, 3, 4)로 trypan blue exclusion 방법으로 (Strober et al., 2001) 살아있는 세포를 counting 하였다.

8. Invasion assay

F9 세포의 invasion 되는 정도를 조사하기 위해 0.8µm pore 크기의 24well matrigel invasion chamber (Corning)를 사용하였다. 세포를 수확한 후 serum이 들어있지 않은 DMEM에 2×10^4 cell/ml 농도로 chamber의 안쪽에 세포를 접종하고 10시간 동안 배양하였다. 이때 lower chamber에는 serum이 포함된 DMEM 500µl를 넣고 37°C, 5% CO² 공급 상태에서 10시간 배양하였다. 윗면의 invasion 되지 않은 세포들은 cotton plug로 제거하고 아랫면의 invasion된 세포들은 메탄올로 fixation한 뒤 hematoxylin과 eosin으로 staining 하였다. 100배 배율로 세포를 촬영하였다.

9. F9 cell로부터 RNA 분리

F9 세포를 배양한 35mm dish에서 media를 제거한 뒤 Trizol reagent를 500 μ l 첨가하고 pipetting하여 세포를 떼어 내어 1.5ml tube로 옮긴 후 상온에서 5분간 incubation 하였다. Chloroform을 100 μ l 첨가하고 15초간 세게 흔들어 준 후 상온에서 3분간 incubation 하였다. 그 후 sample을 4 $^{\circ}$ C에서 13,200rpm의 속도로 15분간 원심분리 하였다. 원심분리가 끝나면 무색의 수용액 층인 상층을 새로운 1.5ml tube로 옮겨주었다. 200 μ l의 isopropanol (Burdick & Jackson)을 첨가하고 상온에서 10분간 incubation한 후, 4 $^{\circ}$ C에서 13,200rpm의 속도로 10분간 원심분리 하였다. 원심분리가 끝나면 상층액을 제거한 후 1ml의 75% ethanol을 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 13,200 rpm의 속도로 5분간 원심분리 하고 상온에서 10분간 pellet을 말렸다. Pellet은 0.1% DEPC 증류수 60 μ l에 녹였다.

10. RT-PCR

F9 cell에서 추출한 2 μ g의 total RNA에 oligo dT primer (100pmole)를 넣고 DEPC 증류수로 volume을 11.55 μ l로 맞춘 후, 70 $^{\circ}$ C에서 5분간 incubation 하였다. 여기에 5x M-MLV buffer, 5mM dNTP mix, M-MLV reverse transcriptase (50unit, Promega), RNase inhibitor (5unit, Promega)를 첨가하여 총 20 μ l의 반응액을 만든 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 80분간 incubation 하였다. 그 후 70 $^{\circ}$ C에서 15분간 불활성화 시킨 후 생성된 cDNA를 PCR template로 사용하였다. PCR 반응에는 10x PCR buffer, 10mM dNTP mix, primer (10pmole), template, Taq polymerase (2.5unit)을 혼합하고 95 $^{\circ}$ C에서 30초, 54 $^{\circ}$ C에서 30초, 72 $^{\circ}$ C에서 30초의 조건으로 cycle을 반복하여 증폭하였다. 증폭된 DNA는 2% agarose gel에 전기영동 하여 분석하였다.

RT-PCR에 사용한 primer는 Table 5 와 같다.

Table 5.

Primer name	5' → 3'
ACTB-F	AGAGCTAGGAGCTGCCTGAC
ACTB-R	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC
mSPS1-F	AAGACGTAGAGTTGGCATAC
mSPS1-R	TTTGGGGGACTTGATCTCTG
mGlx1-F	GGGGAGCTGATGACTCGGCTGAA
mGlx1-R	AGGGGCACTGGCCATCAGCA
hGlx1-F	GATCCTCAGTCAATTGCCCA
hGlx1-F	GCTTTAGCCGCGTCAGCAGT
mSPS1(Rescue)-F	AAGACGTAGAGTTAGCCTAT
mSPS1(Rescue)-R	AGTGGCACCTTCCAGGGTCAA

11. Real-time PCR

RT-PCR에 사용한 cDNA를 template로 사용하였고 여기에 Table 5에 기술된 primer mix (10pmole)와 2x SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems)를 혼합한 총 20 μ l의 반응액을 optical 96well reaction plate (Applied Biosystems)에 넣었다. 이 plate를 7300 real-time PCR (Applied Biosystems) 기계에 넣고, 95 °C에서 30초, 54 °C에서 1분, 72 °C에서 1분의 조건으로 40cycle을 반복하여 증폭하였다. 형광 측정은 각 annealing 단계에서 이루어졌고, 측정을 위하여 threshold cycle (Ct)를 사용하였다. Relative mRNA level을 구하기 위해 comparative Ct($\Delta\Delta$ Ct) 방법(Schmittgen TD et al., 2008)을 사용하였고 *Actb*의 $\Delta\Delta$ Ct 값으로 normalization 하였다.

12. mouse SPS1의 세포 내 위치 관찰

SPS1의 세포 내 위치를 관찰하기 위해서, C-terminus에 flag을 fusion시킨 SPS1을 발현 시키는 vector (pcDNA4/TO-SPS1-flag)를 F9 cell에 transfection하였다. Staining 하루 전에 poly-lysine으로 코팅된 coverglass에 transfection된 세포를 옮기고 배양한 후에, 세포를 1x PBS로 washing하고, 4% paraformaldehyde 로 상온에서 30분간 fixation 한 다음, 1x PBS로 3번 washing 하고, 0.1% Triton X-100 (Amresco)로 10분간 permeabilization하였다. 그 후 5% BSA (Roche)용액으로 상온에서 1시간 동안 blocking하고, anti-Flag antibody (1:2,000, Sigma)가 들어있는 blocking solution으로 갈아 준 뒤, 상온에서 1시간동안 incubation하였다. 그리고 3% BSA용액으로 10분씩 3번 washing 후 Alexa 488 conjugated anti-mouse IgG (1:1000, Molecular Probes)가 들어있는 blocking solution으로 상온에서 1시간 incubation 하였다. Counterstaining하기 위해, 1x PBS로 10분씩 3번 washing한 후 PI (propidium iodide, 100µg/ml, Sigma)와 RNase A (200µg/ml, Sigma)로 상온에서 30분간 incubation 하고 10% glycerol (Sigma)로 mounting 하였다. 그 후 LSM 700 confocal microscope를 이용하여 관찰하였다. Alexa 488의 excitation 파장은 488nm 이며, PI는 555nm 파장을 사용하였다.

III. 결 과

1. *Sps1*의 결핍은 *Glx1*의 발현을 억제한다.

공동 연구 그룹으로부터 mouse SPS1에 대한 shRNA를 발현하는 F9 세포주를 제공받은 뒤, SPS1 knockdown efficiency를 확인하기 위하여 RNA를 추출 한 뒤 RT-PCR과 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 그림 3 에서와 같이 대조군(F9 과 F9/pSuper)에 비해 90% *Sps1* mRNA 의 양이 감소한 것을 관찰하였다.

또한 다른 연구자에 의해 수행된 F9 SPS1 KD (F9/shSPS1) cell의 microarray 분석에 따르면 *Sps1* 결손에 의해 redox homeostasis 조절 단백질인 *Glx1*이 4.2 배 down-regulation 된다는 결과(Appendix 표3)가 있었는데, 동일한 현상이 나타나는지 확인하고자 추출해 두었던 RNA를 사용해 RT-PCR과 real-time PCR을 수행하였다. 그 결과 microarray의 결과와 유사하게 *Sps1* 결핍 세포주에서는 대조군(F9, F9/pSuper)에 비해 *Glx1*이 약 90% 정도 감소되었다(그림 3).

Mouse *Sps1*을 결핍시켰을 때, *Glx1*의 발현감소가 사용하였던 shRNA에 의한 off-target effect에 의한 것인지 아니면 on-target effect 인지를 알아보기 위해, shSPS1의 target 서열의 seed region에 3개의 silent mutation을 도입하여 SPS1의 단백질의 아미노산 서열은 변화되지 않으면서 shSPS1에 의해 knockdown 되지 않는 SPS1

(knockdown-resistant *Sps1*, rescue)을 발현하는 vector를 제작하고 이를 *Sps1* 결핍 세포주에 transfection 하였다. 이로부터 RNA를 추출하여 qRT-PCR을 수행한 결과, endogenous *Sps1* mRNA의 양은 knockdown 되었을 때의 감소한 상태를 유지하였으나 rescue *Sps1* mRNA의 양은 상당히 많은 정도로 발현된 것을 알 수 있었다 (그림 3). 이때 *Glx1*의 mRNA 양도 따라서 약 5.5 배 회복되었다($p < 0.01$). 이 결과는 *Sps1* 결핍에 의한 *Glx1*의 down-regulation은 off-target effect가 아니라는 것을 제시한다.

Sps1 결핍에 의한 표현형의 변화가 down-regulation 되었던 *Glx1*에 의한 것인 조사하고자 human과 mouse *Glx1*을 발현하는 vector를 제작하고 이를 *Sps1* 결핍 세포주에 transfection하였다. 이로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR을 수행한 결과, 결핍된 *Sps1* mRNA 양은 감소한 상태를 유지하였으나 human *Glx1*의 양은 상당히 많은 정도 발현된 것을 알 수 있었다(그림 3). 또한 mouse *Glx1*의 mRNA 양도 90% 감소된 상태를 유지하였다. Mouse *Glx1*을 과발현한 *Sps1* 결핍 세포주에서도 과발현한 mouse *Glx1*의 양은 상당히 많은 정도 발현하였지만, *Sps1*과 endogenous *Glx1*의 양은 변하지 않은 것을 볼 수 있다(Appendix 그림 2).

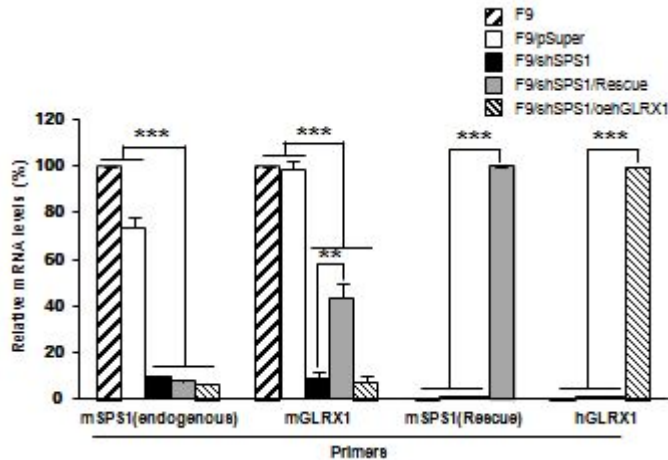


그림 3. mRNA levels were measured by qPCR. cDNAs were amplified using specific primer sets as described in EXPERIMENTAL and subjected to RT-PCR (A) and real-time PCR (B). ACTB was used as an internal control. Statistical significance was tested by one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. ** and *** denotes statistical difference at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively.

2. *Sps1*의 결핍은 세포내 ROS의 축적을 유도한다.

F9 cell에서 *Sps1* 결핍에 의해 감소되었던 *Glrx1*은 세포 내에서 산화·환원 항상성을 조절하는 유전자로 알려져 있다(Fernandes and Holmgren., 2004; Menon et al., 2011). 이것은 *Sps1* 결핍에 의해 ROS의 축적이 일어날 수 있다는 것을 제시해 주는데, 이것을 확인하기 위해 *Sps1*이 결핍된 F9 세포주내 ROS의 발생 여부를 대조군인 non-transfected F9 과 pSuper backbone vector 가 transfection된 세포주(F9/pSuper)와 비교하였다. 그 결과 대조군(F9, F9/pSuper)에서는 background 정도의 ROS가 있는 반면, *Sps1* 결핍 세포주(F9/shSPS1)에서는 background보다 강한 ROS가 탐지되었다(그림 4). 이는 초파리에서 *Sps1*의 결핍이 ROS의 축적을 일으킨다는 보고(Shim et al., 2009)와 일치하는 결과이다.

*Sps1*의 결핍에 의한 ROS의 축적이 down-regulation되었던 *Glrx1*과 관련되었는지 조사하기 위해 homologous system인 mouse *Glrx1*과 heterologous system인 human *Glrx1*을 *Sps1* 결핍 F9 세포주에서 각각 과발현시켰다. 각 세포주에서 DCFDA를 이용하여 ROS를 탐지한 결과, mouse *Glrx1*과 human *Glrx1*이 과발현된 세포주(F9/shSPS1/oemGLRX1와 F9/shSPS1/oehGLRX1)에서의 ROS가 *Sps1*이 대조군(F9, F9/Super) 정도로 유지되었다. 또한, rescue 세포주에서도 ROS가 background 수준으로 유지되었다.

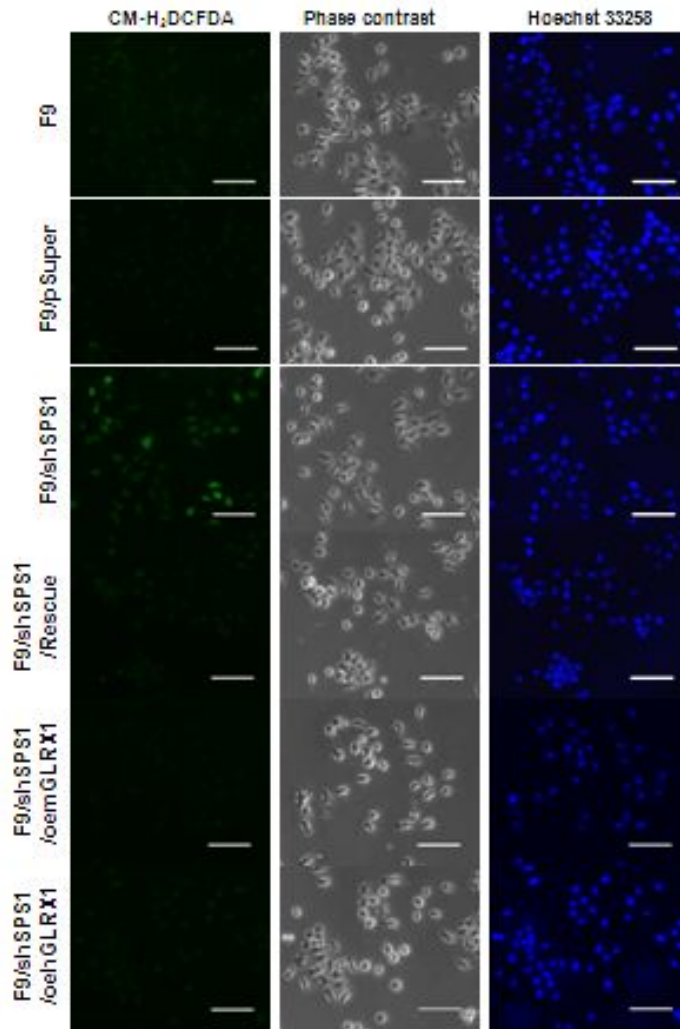


그림 4. Detection of intracellular ROS in F9. Cells were stained with CM-H₂DCFDA to detect intracellular ROS and then counter stained with Hoechst 33258 as described in EXPERIMENTAL. Cells were photographed under a fluorescence microscope (100x). Scale bars represent 100 μ m.

3. *Sps1* 결핍은 세포내 superoxide의 축적을 동반하지 않는다.

그림 5에서 나타난 ROS 축적을 검출할 때 사용한 CM-H₂DCFDA 시약은 hydrogen peroxide, superoxide 및 RNS 등 다양한 종류와 반응할 수 있기 때문에 어떤 특정 ROS가 발생 되었는지를 알 수 없다 (Kalyanaraman et al., 2012). 그래서 먼저 *Sps1*의 결핍에 의해 발생된 ROS의 종류를 알아보려고 하였고, 세포질 superoxide를 탐지하는 DHE와 미토콘드리아 superoxide를 탐지하는 MitoSOX 를 사용하여 세포를 염색하였다.

그 결과 *Sps1*이 결핍되어도 cytosol (그림 5A)과 mitochondria (그림 5B) 모두에서 superoxide가 탐지되지 않았다. 이는 *Sps1* 결핍에 의해 superoxide가 아닌 다른 종류의 ROS가 발생되었음을 시사한다.

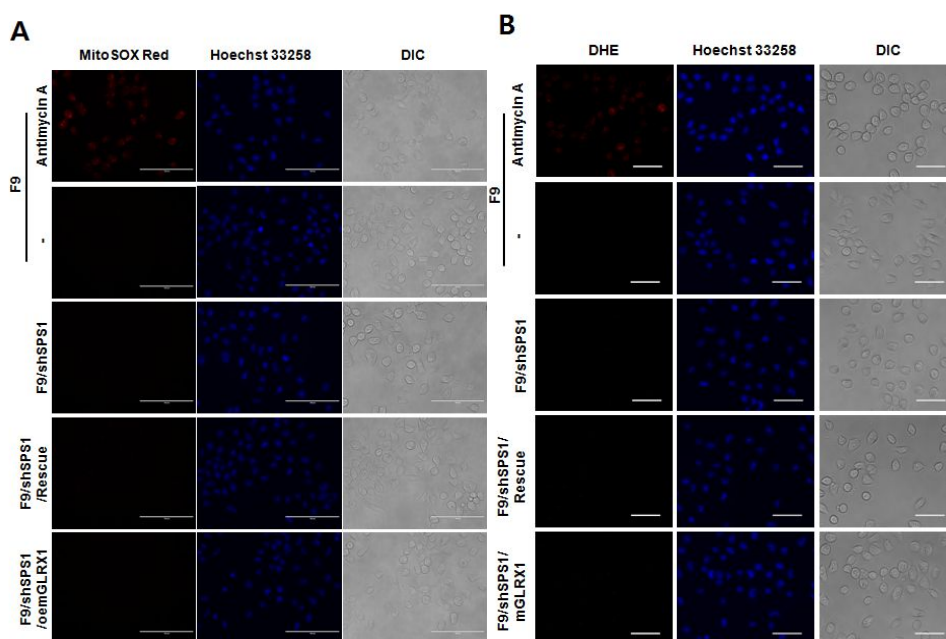


그림 5. Detection of intracellular superoxide in SPS1-deficient F9 cells. Cells were stained with MitoSOX to detect mitochondrial superoxide (A) and with DHE to detect cytosolic superoxide (B), and then counterstained with Hoechst 33258 as described in EXPERIMENTAL. 1 μ M antimycin A treatment was used as a control. Cells were photographed under a fluorescence microscope. Scale bars represent 200 μ m (A) and 50 μ m (B), respectively.

4. *Sps1* 결핍은 세포내 hydrogen peroxide의 축적을 유도한다.

Sps1 결핍에 의해 발생된 ROS가 hydrogen peroxide인지 조사하기 위해 roGFP2-Orp1 융합 단백질을 probe로 사용하였다. Hydrogen peroxide가 존재하면 roGFP2-Orp1 융합 단백질이 산화되면서 405nm/488nm 비율이 증가하게 된다. 그림 6A, B를 통해 *Sps1* 결핍에 의해 미토콘드리아와 세포질 모두에서 roGFP2-Orp1의 산화된 형태가 많아졌으며, 405/488nm 비율 또한 각각 1.5와 1.6배($p < 0.01$, $p < 0.05$) 증가한 것을 볼 수 있다(그림 6C, D).

뿐만 아니라, *Sps1* 결핍에 의해 down-regulation 되었던 *Glrx1*을 과발현 (F9/shSPS1/oemGLRX1)하면 세포내의 hydrogen peroxide가 대조군 수준으로 회복되었다. 이는 그림 4의 ROS 관찰 결과와 일치되는 것으로, 이를 통해 *Sps1* 결핍에 의해 세포내 축적되는 ROS는 hydrogen peroxide임을 알 수 있으며 *Glrx1*이 hydrogen peroxide의 조절에 중요하다는 것을 알 수 있다.

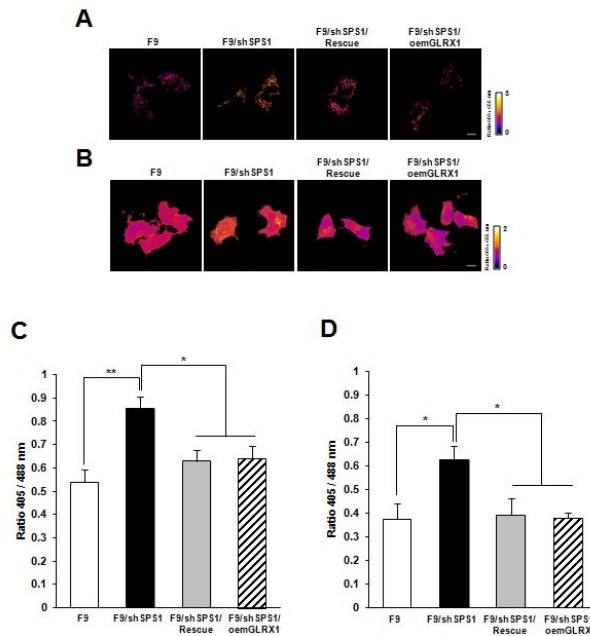
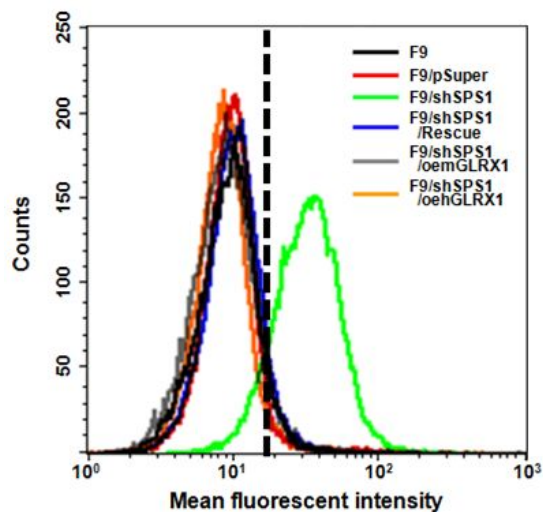


그림 6. Accumulation of intracellular hydrogen peroxide in SPS1-deficient F9 cells. (A-B) Detection of intracellular hydrogen peroxide using roGFP2-Orp1 probes. Vectors encoding mitochondrial roGFP2-Orp1 (A) or cytosolic roGFP2-Orp1 (B) were transfected into SPS1-deficient F9 and control cells and the 405/488nm ratio images were obtained as described in the EXPERIMENTAL. Scale bars represent 10 μ m. Quantification of microscopy data of mitochondrial (C) and cytosolic (D) hydrogen peroxide. Emission ratios from 6 fields for each samples were averaged. Error bars represent standard deviation. * and ** denotes statistical difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively.

5. *Sps1*의 결핍은 많은 양의 ROS 축적을 동반한다.

ROS가 축적된 세포의 수와 세포내에 축적된 ROS 양을 조사하기 위해 각각의 세포주를 CM-H₂DCFDA로 염색한 후 FACS 분석으로 형광 세기를 측정하였다. 그림 4의 결과와 일치하게 *Sps1* 결핍 세포주(mean 값 : 약 32)가 대조군(F9, F9/pSuper)(mean 값 : 약 9)에 비해 형광 세기가 강해졌다(그림 7A). 또한 강한 형광 세기를 가지는 세포들의 수에서도 차이가 크게 나는 것을 볼 수 있는데, *Sps1* 결핍 세포주는 약 80%가 강한 형광을 나타내는 반면 대조군에서는 약 3%만이 강한 형광을 나타냈다(그림 7B). 또한, *Glrx1*을 과발현시킬 경우(F9/shSPS1/oemGLRX1, F9/shSPS1/oeGLRX1) 대조군 수준으로 유지되는 것을 볼 수 있으며, F9/shSPS1/Rescue cell은 대조군과 비슷하였다. 이는 SPS1이 산화·환원 조절 유전자인 *Glrx1*의 발현 조절을 통해 세포내의 ROS양을 조절한다고 볼 수 있다.

(A)



(B)

	F9	F9/pSuper	F9/shSPS1	F9/shSPS1/ Rescue	F9/shSPS1/ oemGLRX1	F9/shSPS1/ oehGLRX1
Mean	9.11	9.2	32.21	10.1	10.8	8.23
Left(%)	97.49	98.65	20.28	96.54	97.13	97.99
Right(%)	2.51	1.35	79.72	3.46	2.87	2.01
Total(%)	100	100	100	100	100	100

그림 7. Quantification of intracellular ROS in F9 cells. (A)

Representative FACS plot showing the amount of intracellular ROS.

(B) Mean value of each cell line and percent of the cell population in each quadrant.

6. *Sps1* 결핍은 growth rate의 감소를 유도한다.

Shim의 보고에 따르면, *Drosophila* 세포에서 SPS1을 결핍시키면 growth가 inhibition 되는데(Shim et al., 2009), 이는 SPS1이 cell growth에 필수적이라는 것을 의미한다. 그래서 mouse cell에서도 SPS1의 결핍이 growth rate에 변화를 일으키는지 알아보하고자 F9/pSuper 와 F9/shSPS1 cell에 대해 cell growth rate assay를 하였다. 그 결과 *Sps1*이 결핍된 세포주(F9/shSPS1)의 경우 대조군(F9/pSuper)에 비해 3일부터 cell growth가 유의한 차이로 감소하기 시작하였다(그림 8). 또한, F9/shSPS1/Rescue cell에서는 growth rate이 대조군(F9/pSuper)과 비슷한 수준으로 유지되는 것을 볼 수 있었다. 이러한 사실은 *Sps1*이 F9 세포와 같은 포유동물 세포의 성장에도 필수적이라고 볼 수 있다.

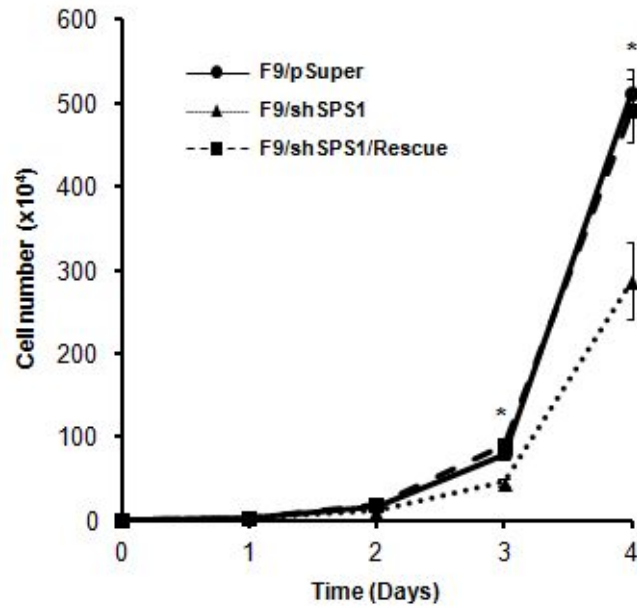


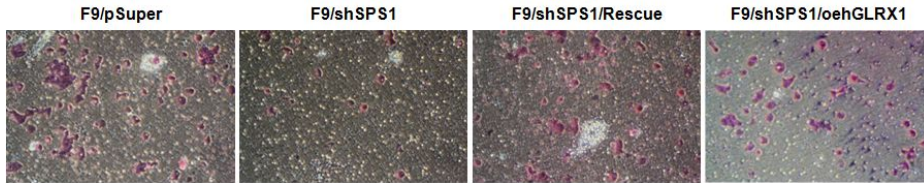
그림 8. Measurement of cell growth rate in F9 cells. Effect of knockdown of *Sps1* on the cell growth rate of F9 cells (F9/shSPS1). Living cell numbers were counted using Trypan blue and counted every 24 h over a 96 h period. * denote statistical difference at $P < 0.05$.

7. *Sps1* 결핍은 invasiveness의 감소를 유도한다.

Sps1 결핍에 의한 F9 세포의 growth rate 감소 결과(그림 8)는 SPS1이 F9세포의 악성 종양의 특성에 영향을 줄 수 있다는 것을 의미한다. 또한 공동연구자에 의한 microarray data분석과 DEG에 의한 IPA analysis 결과 DEG들이 Cancer가 top Network group으로 예측되었다. 따라서 *Sps1* 결핍이 암세포의 악성 종양의 특성의 변화를 가져올 것이라고 예측하고 악성 종양의 특성 중의 하나인 cell invasiveness를 관찰하였다. Matrigel membrane을 통과해 아랫면으로 이동한 *Sps1* 결핍 세포주(F9/shSPS1)의 수가 대조군인 F9/pSuper에 비해 감소되었다(그림 9A). 반면에, F9/shSPS1/Rescue세포주는 F9/pSuper 수준으로 invasiveness가 유지되었다(그림 9A). 흥미로운 사실은 F9/shSPS1/oehGLRX1에서도 invasiveness가 대조군 수준으로 유지되었다(그림 9A).

각각의 cell line에서 invade된 cell 수를 counting 했을 때, F9/shSPS1 cell이 대조군(F9/pSuper)과 비교해 약 6배 감소된 반면, F9/shSPS1/Rescue와 F9/shSPS1/hGLRX1은 *Sps1* 결핍 세포주에 비해 각각 4.5와 4.2배 증가하였다(그림 9B). 이러한 사실은 *Sps1* 결핍에 의한 invasiveness의 감소는 대부분 *Glrx1*의 감소에 기인한 것이라는 점을 제시한다.

(A)



(B)

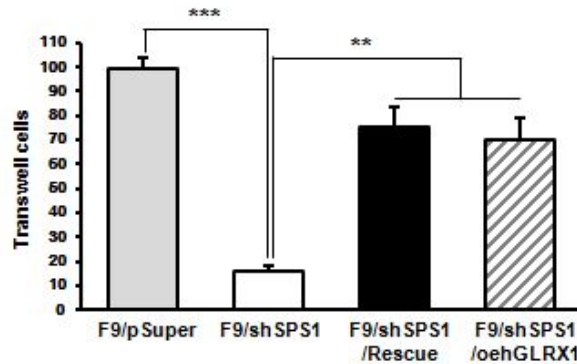


그림 9. Detection and measurement of cell invasiveness in F9 cells. (A) Invasion assay in F9 cells. Invaded cells were stained as described in 재료 및 방법 and photographed (100x). (B) Invaded cells per 3.3 mm² were counted. Error bars represent standard deviation. ** and *** denotes statistical difference at $P < 0.01$ and $P < 0.001$, respectively. Data shown are representative of three independent experiments.

8. Mouse SPS1은 세포 내 전반적으로 위치한다.

*Sps1*의 결핍이 *Glx1*과 같은 산화·환원 항상성 조절 유전자의 발현 저해를 유도하기 때문에 SPS1이 이들의 발현에 어떤 역할을 하는지 즉, 신호전달자로 작용하는지 아니면 전사 인자로 작용하는 지를 알아보기 위한 기초 실험으로 SPS1의 세포내 위치를 조사하였다. Mouse SPS1의 C-terminus에 flag을 융합한 단백질 발현 벡터를 F9 cell에 transfection 하였다. 48시간 후에 immunocytochemistry 방법을 통해 발현된 단백질의 위치를 관찰하였다. 그 결과 SPS1은 핵과 lamellipodium과 filopodium을 포함한 세포에 전반적으로 위치하는 것을 알 수 있었다(그림 10). 여기서 주목할 점은 어떤 세포에서는 세포질 보다는 핵에 더 높은 농도로 존재하는 것이 관찰 되었는데 이러한 사실은 SPS1의 기능이 1가지가 아니라 여러 가지로 작용한다는 점을 시사한다.

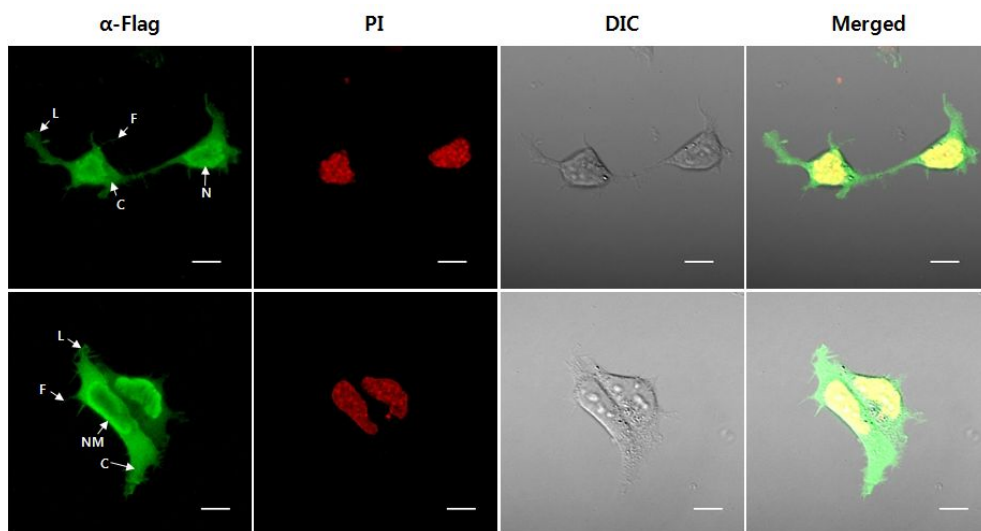


그림 10. Subcellular localization of mouse SPS1 in F9 cells.

Flag-tagged mSPS1 overexpression vector was transfected into F9 cells. Cells were incubated for 48 hours after transfection, fixed and permeabilized. mSPS1 was detected by mouse anti-Flag antibody and Alexa 488 anti-mouse IgG antibody (green). Nucleus was stained with PI (red) and cells were observed under a confocal microscope. Upper and lower panels represent different fields of the same glass slide. Scale bars represent 10 μ m. C, cytosol; F, filopodium; L, lamellipodium; NM, nuclear membrane; N, nucleus.

IV. 고 찰

본 연구에서는 roGFP2-Orp1 융합단백질을 이용하여 세포내 hydrogen peroxide를 탐지 했을 때, *Sps1* 결핍 세포주의 미토콘드리아와 세포질 모두에서 roGFP2-Orp1 융합단백질의 산화된 형태가 증가되었기 때문에 세포내 hydrogen peroxide가 축적되었다는 것을 알 수 있었다. 반면, 포유동물 세포의 호흡시 많이 발생하는 superoxide를 탐지했을 때에는 *Sps1* 결핍 세포주와 대조군 사이에는 차이가 없었다. 이를 통해 *Sps1* 결핍에 의해 축적되는 ROS는 superoxide가 아닌 hydrogen peroxide임을 알 수 있는데, 이는 *Sps1* 결핍에 의해 cell growth의 감소로 인한 superoxide의 발생 감소가 나타났거나 superoxide dismutase (SOD)의 변화가 생기지 않는 등의 superoxide 제거 시스템에는 이상이 없는 것으로 보이며, 반면 hydrogen peroxide를 제거하는 catalase의 활성이 감소되었거나 peroxiredoxin 과 같은 hydrogen peroxide 제거 단백질의 발현이 감소되는 등의 hydrogen peroxide 제거 시스템에 이상이 발생되었을 수 있음을 시사한다. 그렇기 때문에 후속 연구를 통해 *Sps1* 결핍에 의한 세포내 ROS 시스템 조절에 대한 정확한 mechanism 연구가 필요하다. 그리고 ROS 관찰시 사용한 CM-H₂DCFDA 시약은 hydrogen peroxide에 특이적이지 않고 RNS와도 반응(Kalyanaraman et al., 2012)할 수 있기 때문에 RNS가 발생되었는지 여부를 조사할 필요가

있다.

SPS1이 악성 종양을 유지하는데 필요하다는 것은 *Sps1* 결핍 세포주에서 invasiveness (그림 8), growth (그림 9), anchorage-independence (Appendix 그림 1)가 감소하는 결과를 통해 알 수 있다. *Sps1* 결핍 세포주에서 감소되었던 악성 종양의 특성이 *Glrx1*의 과발현을 통해 회복된 결과는 악성 종양의 특성 조절이 *Glrx1*과 관련 있다는 것을 시사한다. Fernandes의 보고에 따르면, *Glrx1*은 다양한 종양에서 up-regulation되며(Fernandes et al., 2009), Mollbrink의 보고에 따르면, *Glrx1*이 악성 종양의 metastasis된 곳에서 특이적으로 발현이 높아진다(Mollbrink et al., 2014). 이러한 보고들을 통해 *Sps1* 결핍 세포주에서 나타난 악성 종양의 특성이 저해된 것은 SPS1에 의해 조절되는 *Glrx1*을 통해 일어난다고 볼 수 있다.

본 연구를 통해 *Sps1* 결핍에 의한 ROS 축적과 악성 종양의 특성 조절이 연관성 있음을 나타내는데, 이는 oxidative stress가 metastasis를 저해한다는 Piskounova의 보고(Piskounova et al., 2015)와 cell migration과 invasion이 ROS에 의해 조절된다(Luanpitpong et al., 2010)는 Luanpitpong의 보고를 통해 둘의 연관성이 뒷받침된다. 한편, hydrogen peroxide도 세포내에서 cell differentiation, proliferation 그리고 hypoxic signal transduction과 같은 다양한 생리과정에 참여한다고 보고된 바 있기 때문에(Lennicke et al., 2015), hydrogen peroxide를 포

함한 ROS가 악성 종양의 특성을 조절하는데 중요한 것으로 보이며, SPS1의 세포내 산화·환원 항상성 조절이 악성 종양을 유지 하는데 중요한 요소라는 점을 제시한다. 그렇게 때문에 어떠한 조절 기작을 통해 일어나는지 알기 위해서는 후속연구가 필요하며, NAC과 같은 ROS scavenger를 처리했을 때 *Sps1* 결핍 세포주의 invasiveness와 같은 악성 종양의 특성이 회복되는지 또는 hydrogen peroxide를 대조군에 처리했을 때 *Sps1* 결핍 세포주와 동일한 표현형이 관찰되는지 등을 검증해 볼 필요가 있다.

SPS1이 세포 전체에 위치(그림 10)하고 있기 때문에 *Glrx1*의 조절은 SPS1이 전사 인자로 작용할 수 있을 뿐만 아니라, 산화·환원 조절 단백질들의 전사 인자인 Nrf2와 같은 단백질들과의 interaction을 통해 ROS를 조절할 수 있다는 것으로 예상된다. 그러나 SPS1이 세포전체에 골고루 위치하기 때문에 반드시 전사인자로 작용한다고 볼 수 없으며 추후 *Sps1*이 결핍된 세포에서 SPS1의 위치조사가 이루어져야 할 것이다. 또한 SPS1의 세포내 분포는 SPS1이 전사조절 기능 외에 다른 단백질들과의 interaction을 통해 또 다른 기능을 나타낼 수 있음을 시사하기 때문에 후속연구가 필요할 것이다.

한편, *Sps1* 결핍 세포주에 knockdown-resistant *Sps1*을 발현시켰을 때(F9/shSPS1/Rescue) *Glrx1*의 mRNA 양은 대조군에 비해 45%만 회복되었다. 하지만 이때 SPS1 결핍에 의한 효과 즉, cell growth, ROS 축적

그리고 invasiveness가 대조군과 같은 정도로 회복되었다. 여기서 강조되어야 할 것은 Rescue vector를 유지시키기 위하여 zeocin을 배지에 계속 첨가하였다는 점이다. 따라서 *Glr1*의 발현이 원래의 양만큼 회복되지 않은 것은 항생제 효과인것으로 추정된다. 그렇지만 45%의 *Glr1*의 양만으로도 phenotype의 변화를 되돌려 놓기에 충분하다는 것을 제시한다.

종합해보면 본 연구를 통해 포유동물의 cellular metabolism에서의 SPS1 역할로 산화·환원 항상성 조절과 악성 종양을 유지 및 조절하는 역할에 대해 제시하였다. 하지만 이러한 SPS1의 산화·환원 항상성 조절과 악성 종양을 유지시키는 역할이 F9 세포에서만 국한된 것인지 그리고 다른 포유동물들에서도 동일한 역할을 하는지 등을 조사해볼 필요가 있으며, 더 나아가 SPS1의 다른 역할을 밝히기 위한 후속 연구가 필요할 것이다.

V. Appendices.

Appendix Ⅹ 1. Microarray analysis of differentially expressed genes related redox regulation in *Alb-Cre; Sps1^{fl/fl}* mouse liver (Ryuta Tobe, NIH, unpublished).

Fold change	UniGene	Gene	
-43.5	Mm.25844	<i>Glx</i>	Glutaredoxin
-3.61	Mm.2662	<i>Gsta4</i>	Glutathione S-transferase, alpha 4
-2.06	Mm.378931	<i>Gstol</i>	Glutathione S-transferase omega 1
3.14	Mm.440885	<i>Gstm3</i>	Glutathione S-transferase, mu 3

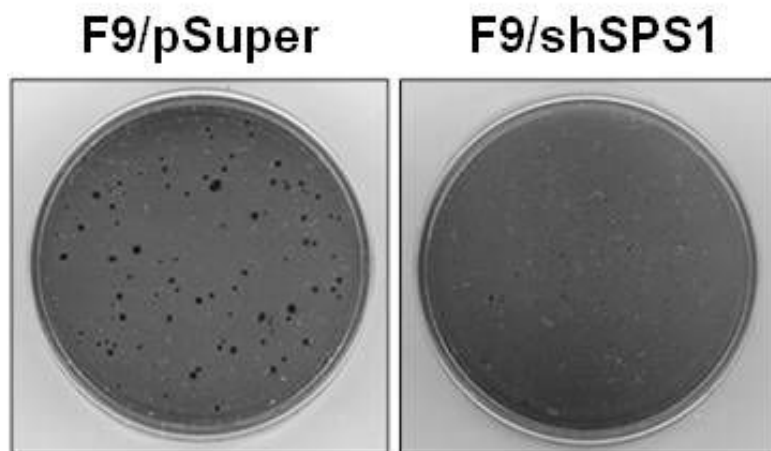
Appendix Ⅹ 2. Ingenuity Pathway Analysis of liver from control and *Alb-Cre; Sps1^{fl/fl}* mice ($n=3/\text{group}$; $P < 0.05$; Fold Cutoff = 2.0)(Ryuta Tobe, NIH, unpublished).

Hepatotoxicity

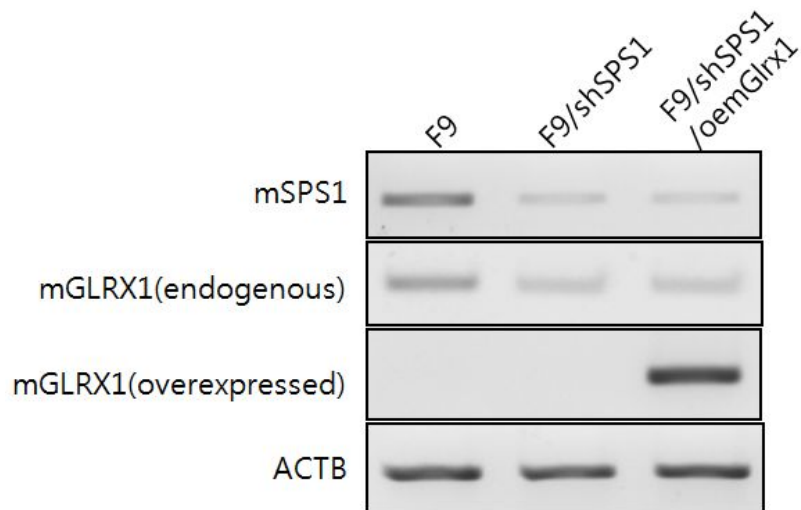
<i>Name</i>	<i>P-value</i>
Glutathione Depletion In Liver	1.37E-05 - 2.91E-01
Liver Regeneration	2.35E-03 - 1.08E-01
Liver Inflammation/Hepatitis	4.99E-03 - 1.00E00
Liver Steatosis	4.99E-03 - 6.25E-02
Liver Proliferation	7.06E-03 - 3.75E-01

Appendix Ⅹ 3. Microarray analysis of differentially expressed genes in SPS1 knockdown F9 cells(Ryuta Tobe, NIH, unpublished).

Fold change	UniGene	Gene	
-4.5	Mm.25844	<i>Glx</i>	Glutaredoxin
-5.2	Mm.378931	<i>Gstol</i>	Glutathione S-transferase omega 1



Appendix 그림 1. Measurement of anchorage-independence in F9 cells. Effect of knockdown of *Sps1* (F9/shSPS1) on colony formations in soft agar assay. Cells were grown in soft agar for 10 days and stained with *p*-iodonitrotetrazolium (Ryuta Tobe, NIH, unpublished).



Appendix 그림 2. Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products. cDNAs were amplified using specific primer sets as described in EXPERIMENTAL and subjected to RT-PCR. β -actin was used as an internal control.

VI. 참고문헌

Alsina B, Serras F, Baguña J, Corominas M (1998) patufet, the gene encoding the *Drosophila melanogaster* homologue of selenophosphate synthetase, is involved in imaginal disc morphogenesis. *Mol Gen Genet.* 257(2):113-23

Alsina B, Corominas M, Berry MJ, Baguna J, Serras F (1999) Disruption of selenoprotein biosynthesis affects cell proliferation in the imaginal discs and brain of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci.* 112 (Pt 17):2875-84.

Berry MJ, Banu L, Harney JW, Larsen PR (1993) Functional characterization of the eukaryotic SECIS elements which direct selenocysteine insertion at UGA codons. *EMBO J.* 12(8):3315-3322

Böck A, Forchhammer K, Heider J, Baron C. (1991) Selenoprotein synthesis: an expansion of the genetic code. *Trends Biochem Sci.* 16(12):463-7.

Carlson BA, Xu XM, Kryukov GV, Rao M, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2004) Identification and characterization of phosphoseryl-tRNA[Ser]Sec kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(35):12848-53

Chambers IJ, Frampton P, Goldfarb N, Affra WM, Harrison PR (1986) The structure of the mouse glutathione peroxidase gene: The selenocysteine in the active site is encoded by the 'termination' codon, TGA. *EMBO J* 5(6):1221-1227

Choi SY, Jang JH, Kim KR (2011) Analysis of differentially expressed genes in human rectal carcinoma using suppression subtractive hybridization. *Clin Exp Med.* 11(4):219–26.

Chung HJ, Yoon SI, Shin SH, Koh YA, Lee SJ, Lee YS, Bae S (2006) p53-Mediated enhancement of radiosensitivity by selenophosphate synthetase 1 overexpression. *J Cell Physiol.* 209(1):131–41.

Copeland PR, Fletcher JE, Carlson BA, Hatfield DL, Driscoll DM (2000) A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J* 19(2):306–14

Ehrenreich A, Forchhammer K, Tormay P, Veprek B, Böck A (1992) Selenoprotein synthesis in *E. coli*. Purification and characterisation of the enzyme catalysing selenium activation. *Eur J Biochem.* 206(3):767–73

Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR (2011) Selenium in human health and disease. *Antioxid Redox signal.* 14(7):1337–1383

Fernandes AP and Holmgren A (2004) Glutaredoxins: glutathione-dependent redox enzymes with functions far beyond a simple thioredoxin backup system. *Antioxid Redox Signal.* 6(1):63–74.

Fernandes AP, Capitanio A, Selenius M, Brodin O, Rundlöf AK, Björnstedt M (2009) Expression profiles of thioredoxin family proteins in human lung cancer tissue: correlation with proliferation and differentiation. *Histopathology.* 55(3):313–20.

Frank, KW (1934a) A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant food stuff. I. Results obtained in preliminary feeding trials. *J Nutr* 8:579-608

Frank KW (1934b) A new toxicant occurring naturally in certain samples of plant food stuff. II. The occurrence of the toxicant in the protein fraction. *J Nutr* 8:609-613

Guimarães MJ, Peterson D, Vicari A, Cocks BG, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Ferrick DA, Kastelein RA, Bazan JF, Zlotnik A (1996) Identification of a novel selD homolog from eukaryotes, bacteria, and archaea: is there an autoregulatory mechanism in selenocysteine metabolism?. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(26):15086-91

Hatfield DL and Gladyshev VN (2002) How selenium has altered our understanding of the genetic code. *Mol. Cell. Biol.* 22: 3565-3576

Hatfield DL, Berry MJ, Gladyshev VN (2012) Selenium: Its Molecular Biology and Role in Human Health, New York: Springer Science + Business Media, LLC

Kalyanaraman B., Darley-Usmar V, Davies KJ, Dennery PA, Forman HJ, Grisham MB, Mann GE, Moore K, Roberts LJ 2nd and Ischiropoulos H. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med.* 52(1):1-6.

Kim JY, Lee KH, Shim MS, Shin H, Xu XM, Carlson BA, Hatfield DL, Lee BJ (2010) Human selenophosphate synthetase 1 has five splice variants with unique interactions, subcellular

localizations and expression patterns. *Biochem Biophys Res Commun.* 18;397(1):53-8

Lee BJ, Worland PJ, Davis JN, Stadtman TC, Hatfield DL (1989) Identification of a selenocysteyl-tRNA(Ser) in mammalian cells that recognizes the nonsense codon, UGA. *J Biol Chem.* 264(17):9724-7

Lee BJ, Park SI., Park JM, Harold S, Hatfield DL (1996) Molecular biology of selenium and its role in human health. *Mol. Cells.* 6: 509-520

Lee KH, Shim MS, Kim JY, Jung HK, Lee E, Carlson BA, Xu XM, Park JM, Hatfield DL, Park T, Lee BJ (2011) Drosophila selenophosphate synthetase 1 regulates vitamin B6 metabolism: prediction and confirmation. *BMC Genomics.* 12:426.

Leinfelder W, Forchhammer K, Veprek B, Zehelein E, Böck A (1990) In vitro synthesis of selenocysteinyl-tRNA(UCA) from seryl-tRNA(UCA): involvement and characterization of the selD gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87(2):543-7

Lennicke C, Rahn J, Lichtenfels R, Wessjohann LA, Seliger B (2015) Hydrogen peroxide - production, fate and role in redox signaling of tumor cells. *Cell Commun Signal.* 14;13:39.

Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN (2008) Selenoproteinless animals: selenophosphate synthetase SPS1 functions in a pathway unrelated to selenocysteine biosynthesis. *Protein Sci.* 17(1):176-82.

Low SC, Harney JW, Berry MJ (1995) Cloning and functional characterization of human selenophosphate synthetase, an essential component of selenoprotein synthesis. *J Biol Chem.* 270(37):21659–64

Luanpitpong S, Talbott SJ, Rojanasakul Y, Nimmannit U, Pongrakhananon V, Wang L, Chanvorachote P. (2010) Regulation of lung cancer cell migration and invasion by reactive oxygen species and caveolin-1. *J Biol Chem.* 285(50):38832–40

Menon D and Board PG (2013) A role for glutathione transferase Omega 1 (GSTO1-1) in the glutathionylation cycle. *J Biol Chem.* 288(36):25769–79

Mollbrink A, Jawad R, Vlamis-Gardikas A, Edenvik P, Isaksson B, Danielsson O, Stål P, Fernandes AP (2014) Expression of thioredoxins and glutaredoxins in human hepatocellular carcinoma: correlation to cell proliferation, tumor size and metabolic syndrom. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 27(2):169–83

Morey M, Corominas M, Serras F (2003) DIAP1 suppresses ROS-induced apoptosis caused by impairment of the selD/sps1 homolog in *Drosophila*. *J Cell Sci.* 116(Pt 22):4597–604

Morgan B, Sobotta MC, Dick TP. (2011) Measuring E(GSH) and H₂O₂ with roGFP2-based redox probes. *Free Radic Biol Med.* 51(11):1943–51.

O'Toole D and Raisbeck MF (1995) Pathology of experimentally induced chronic selenosis (alkali disease) in yearling cattle. *J Vet Diagn Invest.* 7(3):364–73

Papp LV, Holmgren A, Khanna KK (2010) Selenium and selenoprotein in health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 12(7):793–795

Persson BC, Bock A, Jackle H, Vorbruggen G (1997) SelD homolog from *Drosophila* lacking selenide-dependent monoselenophosphate synthetase activity. *J. Mol. Biol.* 274:174 - 180.

Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddlestun SE, Zhao Z, Leitch AM, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ (2015) Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature*. 527(7577):186–91

Rayman MP (2012) Selenium and human health. *Lancet*. 379(9822):1256–1268

Schmittgen TD, Livak KJ (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 3(6):1101–8

Shim MS, Kim JY, Jung HK, Lee KH, Xu XM, Carlson BA, Kim KW, Kim IY, Hatfield DL, Lee BJ (2009) Elevation of glutamine level by selenophosphate synthetase 1 knockdown induces megamitochondrial formation in *Drosophila* cells. *J Biol Chem*. 284(47):32881–94.

Strober W (2001) Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. Appendix3:Appendix 3B

Tamura T, Yamamoto S, Takahata M, Sakaguchi H, Tanaka H, Stadtman TC, Inagaki K (2004) Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling

L-selenocysteine and Sps2 for selenite assimilation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(46):16162-7.

Tujebajeva RM, Copeland PR, Xu XM, Carlson BA, Harney JW, Driscoll DM, Hatfield DL, Berry MJ (2000) Decoding apparatus for eukaryotic selenocysteine insertion. *EMBO Rep.* 1(2):158-63

Walczak R, Westhof E, Carbon P, Krol A (1996) A novel RNA structural motif in the selenocysteine insertion element of eukaryotic selenoprotein mRNAs. *RNA.* (4):367-79

Xu XM, Carlson BA, Mix H, Zhang Y, Saira K, Glass RS, Berry MJ, Gladyshev VN, Hatfield DL (2007) Biosynthesis of selenocysteine on its tRNA in eukaryotes. *PLoS Biol.* 5(1):e4.

Abstract

Selenophosphate synthetase (SPS) is an enzyme that synthesizes selenophosphate, which acts as selenium donor during selenocysteine biosynthesis. In higher eukaryotes, there are two forms of SPS paralogue, SPS1 and SPS2. SPS2 catalyzes the synthesis of selenophosphate, while SPS1 has a largely unknown function. Several studies suggest that SPS1 plays essential roles in cells, but molecular and cellular function of SPS1 in mammals has not been elucidated.

In this study, targeted removal of *Sps1* mRNA in mouse F9 embryonic cancer cell by RNAi to reveal the molecular and cellular function of SPS1 in F9 cells. As a result, *Sps1*-deficiency led to the decrease of *Glrx1* expression level which regulates redox homeostasis and the accumulation of ROS, especially hydrogen peroxide, in the cells. Furthermore, malignant properties of F9 cells were reversed to normal cells. Also, the overexpression of down-regulated *Glrx1*, regardless of homologous or heterologous system, showed that ROS and malignant properties were recovered to as control cells.

These results suggest that SPS1 is an essential mammalian enzyme with roles in regulating redox homeostasis and promoting and/or sustaining cancer.

keywords : selenium, selenocysteine, selenoprotein, selenophosphate

synthetase 1, cancer, reactive oxygen species

Student Number : 2014-20315