creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

이학석사 학위논문

HUVEC과 HeLa 세포에서 SEPHS1 결핍이 세포에 미치는 차별적 영향

2022년 8월

서울대학교 대학원

생명과학부

권 동 인

HUVEC과 HeLa 세포에서 SEPHS1 결핍이 세포에 미치는 차별적 영향

지도교수 김 진 홍

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함
2022년 7월

서울대학교 대학원
생명과학부
권 동 인

권동인의 석사 학위논문을 인준함
2022년 7월

위 원 장 김 종 서 (인)

부위원장 김 진 홍 (인)

위 원 이 병 재 (인)

초 록

Selenophosphate Synthetase (SEPHS)는 21번째 아미노산인 selenocysteine을 합성할 때 필요하며, selenium donor인 selenophosphate를 합성할 때 사용되는 효소이다. 진핵생물에서는 두 가지 isoform인 SEPHS1과 SEPHS2가 존재한다. SEPHS2만이 효소 활성을 보인다. SEPHS1은 효소 활성은 없지만, 선행 연구를 통해 세포의 기능 유지 및 세포 내 산화-환원 항상성 조절에 관여한다고 밝혀졌다.

산화-환원 항상성은 세포 및 조직의 정상적인 기능을 유지하는 데 중요한 역할을 하며, 인간의 건강에 있어 퇴행성 질환 및 암과 같은 질병의 위험인자로 간주하고 있어 매우 중요한 생리적 조절기작이다. 이러한 산화-환원 항상성을 유지하는 데 있어 *Sephs1*이 중요한 역할을 함을 본 실험실 연구를 통해 밝혀졌다. 기존 실험들은 동물의 암 세포에서 SEPHS1 결핍을 통해 기능을 밝혀내었었다. 이번 연구에서는 사람의 자궁경부 암세포(HeLa)와 탯줄 정맥 내피 세포(HUVEC)에서 SEPHS1을 결핍시켜 기능을 규명하고자 knockdown을 유도하였다. SEPHS1이 knockdown 되었을 때 세포 내 ROS가 축적되었으며, 그중 superoxide가 축적되었음을 확인하였다. 또한 SEPHS1이 knockdown된 정상 세포에서는 이틀째부터 세포 사멸이 관찰되었다. 반면 암 세포에서는 세포 사멸이 관찰되지 않았다.

본 연구에서는 사람의 세포에서 SEPHS1이 결핍되었을 시 세포에 미치는 영향을 확인하고자 하며, 앞서 동물세포에서 밝혀진 SEPHS1의 기능인 산화 환원 항상성 유지가 사람 세포에서도 비슷한 영향을 주는지 확인하려 한다. 또한 정상 세포와 암 세포에서 SEPHS1을 결핍하였을 때 나타나는 차이점을 확인하고 그 이유를 분자적 수준 까지 연구하여 규명

하고자 한다.

주요어 : Selenophosphate synthetase 1, reactive oxygen species, redox homeostasis, oxidative stress, apoptosis

학 번 : 2019-28669

목 차

제 1 장 서 론 ····· 1
1
제 2 장 재료 및 방법 ····· 4
제 1 절 재료 ····· 4
제 2 절 세포 배양 ····· 4
제 3 절 SEPHS1 Knockdown transfection ····· 4
제 4 절 Quantitative rt-PCR ····· 5
제 5 절 ROS staining ····· 5
제 6 절 TUNEL assay ····· 6

제 3 장 결 과 ····· 7
제 1 절 HUVEC과 HeLa cell에서의 SEPHS1 mRNA knock-down ····· 7
제 2 절 SEPHS1 knockdown으로 인한 세포 사멸 관찰 ····· 11
제 3 절 SEPHS1 knock-down 세포에서의 ROS 축적 조사 ····· 17
제 4 절 SEPHS1 knockdown에 의한 ROS scavenger 발현 변화 ····· 20

제 4 장 고 찰 ····· 24

참고문헌 ····· 27
Abstract ····· 30

표 목 차

[표 1] qRT-PCR에 이용한 primer list ····· 22

그 림 목 차

[그림 1] SEPHS1 knockdown에 사용된 siRNA 서열. ····· 9
[그림 2] HeLa 세포와 HUVEC에서 SEPHS1 mRNA를 이용한 knockdown 효율 조사 ····· 10
[그림 3] SEPHS1 knockdown한 세포 사진 ····· 14
[그림 4] SEPHS1 knockdown 세포의 apoptosis 관찰 ····· 16
[그림 5] SEPHS1 knockdown HUVEC의 ROS 축적. ····· 19
[그림 6] Superoxide의 scavenger 유전자들의 발현 비교. ·· 21
[그림 7] SEPHS1 결핍으로 인한 ROS 축적과 SOD의 기능 26

제 1 장 서 론

필수 미량원소인 셀레늄은 면역력 증진, 항바이러스, 암의 예방 등 인간의 건강 유지에 중요하다. 셀레늄은 셀레늄 단백질이 합성되는 과정에서 selenocysteine(Sec) 형태로 co-translationally insertion되며 세포 내에서 항상성을 유지하는 역할을 한다. 셀레늄 단백질은 인간에서 25종의 단백질이 알려져 있으며[1], 세포 내 산화-환원 항상성 유지[2], 세포의 이동, 세포 골격조절[3,4] 및 세포 사멸의 조절[5] 등의 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

Selenophosphate synthetase(SEPHS, SelD)는 selenide와 ATP를 이용하여 selenophosphate(SeP)를 합성하는 효소이며, 생물체가 흡수한 셀레늄을 활성을 띄는 형태인 selenocysteyl tRNA로 합성하는 데 필수기질인 SeP을 제공하는 기능을 한다 .SEPHS는 고등 척추동물에서 2가지 종류의 isoform이 존재하며 그 중 하나인 SEPHS2는 SeP의 합성에 필수적인 역할을 한다고 알려져 있 다. 반면 SEPHS1의 경우 이러한 효소적 기능이 없음이 선행연구를 통해 밝혀졌었다[6]. 그러나 SEPHS1은 세포 내 산화-환원 항상성 조절에 필수적인 역할을 하는 것으로 선행연구를 통해 밝혀졌다[7]. SEPHS1은 세포 내 산화-환원 항상성 조절에 참여하는 유전자의 발현을 조절하는 기능을 하여, SEPHS1이 결핍 되었을 시 쥐의 배아 암세포, 혈관 암세포 등에서 ROS가 축적됨을 밝혔다.[8].
활성 산소종(Reactive oxygen species, ROS)은 체내 산소 대사 과정 중에 생성되며 산소를 포함하며 반응성이 높고 짧게 유지되는 물질이며 대표적으로 superoxide anion(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(HO•)이 포함된다. 이들은 각각 구별되는 물리화학적 특징과 반감기를 갖고 있으며, hydroxyl radical, superoxide anion,

hydrogen peroxide 순으로 산화력이 약해진다[9]. O_2^-는 주로 미토콘드리아의 산소 호흡 과정 중 전자전달계에서 electron leakage가 일어나거나 NADPH oxidase(NOX)에 의한 NADPH 산화 과정 에서 발생한다. H_2O_2는 세포 내 단백질의 cysteine residues를 산화시켜 산화-환원 반응을 조절하게 한다. H_2O_2가 Fe^{2+}와 반응하여 생성되는 HO•는 세포 내 DNA, 단백질과 지질을 무분별하게 손상시키는 toxicity가 있다[10,11]. 세포에 ROS가 과다 축적되는 경우 세포 내 macromolecule들이 손상되고, 암, 당뇨, 신경퇴행 등을 비롯한 각종 질병을 유도하며, 노화를 촉진시키는 등 생명체에 악영향을 준다[12].

세포 내 축적된 ROS는 세포의 산화 스트레스를 유도하며, 산화 스트레스는 세포에 다양한 영향을 준다. 세포에 적은 농도의 ROS가 축적되면 세포는 ROS를 산화-환원 반응에 활용하여 세포 활동에 도움이 되지만 높은 농도의 ROS가 생기게 되면 산화-환원 반응이 붕괴되며 세포에 해로운 영향을 준다[13]. 특히 암 세포의 경우 신진대사가 매우 활발하게 일어나며 과도한 성장과 불충분한 혈관으로 인해 저산소 상태가 유지되어 ROS가 증가한다. 이 때문에 DNA 손상이 일어나며, 많은 산화-환원 관련 기작에 관여하여 세포의 생존과 치료 저항성을 나타내게 된다[14]. 따라서 산화 스트레스는 암 세포에서 나타나는 여러 주요 특징들의 원인이 되며 암 세포가 유지 되도록 한다.

SEPHS1의 결핍으로 HUVEC과 HeLa cell에서 발생하는 ROS의 발생여부와 종류에 대해 아직 밝혀진 사실이 없으며, 사람의 정상 세포 중 하나인 HUVEC과 암 세포인 HeLa cell의 비교를 통해 oxidative stress가 세포에 따라 어떤 영향을 주는지 비교해 볼 수 있다.

선행 연구에 따르면 동물세포에서 SEPHS1이 결핍되면 ROS가 축적되며, 세포의 종류에 따라 ROS 종류와 산화-환원 항상성 유지 메커니즘

이 다르게 작용한다. 앞서 연구된 결과를 보면 SEPHS1 결핍 시 유도된 ROS는 대부분의 세포에서 증가하였는데 ROS 종류에 차이가 있거나 산화-환원 항상성이 유지되는 메커니즘이 달라 세포마다 다른 표현형이 나타났다. 여러 동물세포에서 ROS 축적과 서로 다른 표현형을 관찰하였기에 사람의 세포에서도 비슷한 형태의 메커니즘이 작용하는지 알아보기 위해 실험을 수행하였고 이는 ROS의 증가로 인한 산화 스트레스가 세포에 주는 영향에 관해 확인해 볼 수 있다.

실험실에서 이전에 연구했던 내용에 따르면 mouse에서 SEPHS1이 knock-out되었을 때 day 8.5 embryo는 발달이 저해되었으며, day 14.5에서는 재흡수(resorption) 되었다. 이렇듯 암이 아닌 세포에서는 SEPHS1이 결핍되었을 때 세포가 사멸한다는 사실을 확인할 수 있었다[14]. 하지만 mouse의 암세포인 2H11에서는 SEPHS1이 결핍되어도 세포 사멸이 발생하지 않았고, 세포의 생장 저해만 나타났다. 이러한 연구를 바탕으로 사람의 암세포와 정상 세포를 하나씩 선별하여 차별적인 영향을 확인해 보았다.

ROS의 조절이 오늘날 암, 신경퇴행성 질환 등에 중요하게 작용한다고 알려진 만큼, *Sephs1* 에 의해 조절되는 산화-환원 항상성 유지 메커니즘과 그로 인한 산화 스트레스에 대해 보다 명확하게 규명할 수 있다. 또한 두 세포를 비교하여 세포에 따른 산화 스트레스에 대한 반응으로 인한 산화-환원 항상성 조절 기작의 차이점을 규명한다면 세포에 따른 각종 질병 발병의 원인을 확인하고 이러한 질환에 대한 새로운 진단 및 치료법을 제공할 수 있을 것이라 기대한다.

제 2 장 재료 및 방법

제 1 절 재료

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Hyclone에서 .구매하였다. Endothelial Cell Growth Basal Medium-2 (EBM-2)는 LONZA에서 구매하였다. Fetal bovine serum (FBS)는 Serana에서 구매하였다. Antibiotic-antimycotic, Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS)와 trypan blue는 Life Technologies에서 구매하였다. Dihydroethidium(DHE), DAPI H2O2, rotenone, CM-DCFDA는 sigma에서 구매하였다. SEPHS1 siRNA는 바이오니아에서 구매하였다. SEPHS1, SOD1, SOD2, SOD3 primer는 코스모진텍에서 구매하였다. Metafectene pro는 biontex에서 구매하였다. TUNEL assay kit는 promega에서 구매하였다.

제 2 절 세포 배양

HeLa cell은 10% FBS와 1% antibiotic-antimycin이 포함된 DMEM 배지에서, HUVEC은 EGM-2 배지에서 37℃, 5% CO_2가 공급되는 상태로 배양되었다.

제 3 절 SEPHS1 knockdown transfection

siRNA transfection을 이용한 transfection을 위해 SEPHS1의 exon3의 5'- AGACGACCCUUACAUGAUG -3', 5'- CAUCAUGUAAGGGUCGUCU -3'의 상보적인 dsRNA와 exon6/7 junction의 5'- GCUGGAUAUCCCUGAGAAA -3', 5'- UUUCUCAGGGAUAUCCAGC -3'의 상보적인 dsRNA를 섞어서 사용하였다. Transfection은 Metafectene pro 제품을 이용하였다. 세포를 24well plate에 각 well당 $1x10^5$만큼 seeding을 한 후 하루 동안 두었다. 이후 각 well당 metafectene 1ul + DMEM 40ul와 15pmol siRNA +

DMEM 30ul를 만들어 섞은 후 pipetting을 2번 천천히 진행하였다. Negative control인 siControl의 경우에는 siRNA대신 negative control siRNA를 넣어주었다. 이후 room temperature에 15min incubation을 진행하였다. 세포가 seeding 된 24well plate에 70ul씩 mixture를 넣고 3hr 동안 incubator에 넣어둔다. 3hr후 complete media로 교체해 주었다.

제 4 절 Quantitative RT- PCR

Transfection한 후 하루 혹은 이틀 지난 세포에서 TRIZOL reagent를 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 2ug을 정량한 후 Mo-MuLV reverse transcriptase를 이용하여 transcription을 진행하였다. 이후 획득한 DNA를 SYBR green Master Mix와 섞은 후 Prism7300을 이용하여 qRT-PCR을 진행하였다. 이때 sample은 triplicate로 준비하여 진행한다. 본 실험에서 사용한 primer sequence는 [표 2]에 있다. ActB 유전자를 internal control로 사용하였다.

제 5 절 ROS staining

일반적인 ROS를 염색하는 CM-DCFDA를 이용하여 염색하였다. 세포 염색 하루 전에 24well plate에 $5x10^4$의 농도로 seeding 하였다. 하루가 지난 후 5uM의 CM-DCFDA가 들어간 DMEM + 1% antibiotic-antimyotic 배지를 넣고 30min 동안 37℃ 5% CO_2가 공급되는 상태로 배양하였다. 이후 PBS로 두 번 wash하고 형광 현미경(Nikon FL)로 470nm에서 관찰하였다. Positive control인 H2O2는 CM-DCFDA와 같이 넣어주었다.

ROS중 superoxide를 염색하는 DHE를 이용하여 염색하였다. 세포 염색 하루 전에 24well plate에 $5x10^4$의 농도로 seeding 하였다. 하루가 지난 후 10uM의 DHE가 들어간 DMEM +10% FBS + 1% antibiotic-antimyotic 배지를 넣고 15min 동안 37℃ 5% CO_2가 공급되는 상태로 배양하였다. 이후 PBS로 두 번 wash하고 형광 현미경(Nikon FL)로 531nm에서 관찰하였다. Positive control인 rotenone은 DHE와 함께 넣어

주었다.

제 6 절 TUNEL assay

하루 전에 24well-plate에 glass를 넣고 gelatin으로 30min 동안 코팅한다. 그 후 세포를 $5x10^4$으로 seeding한다. Overnight이 지난후 glass를 꺼내어 4% formaldehyde in PBS로 25분 동안 4℃에서 fix를 진행한다. 이후 PBS로 5분씩 두 번 씻는다. 0.2% Triton x-100 in PBS로 5분 동안 반응시킨다. PBS로 5분씩 두 번 씻는다. Positive control에는 DNase1을 처리하고 15min동안 기다린다. FBS로 두 번 세척한다. 100ul의 equilibration buffer를 넣어서 5분 반응시킨다. 50ul의 TdT reaction mix를 넣고 커버슬라이드로 거품이 없게 덮은 후 60분동안 37℃ humidified chamber에서 반응시킨다. 이때부터 빛이 차단된 상태로 진행한다. 한시간이 지나면 coverslip을 제거하고 2XSSC에 15분 반응시킨다. PBS로 5분씩 3번 씻는다. Counter staining을 위해 DAPI를 뿌려준다. Mounting media를 이용하여 cover glass를 덮고 형광현미경으로 관찰한다.

제 3 장 결 과

제 1 절 HUVEC과 HeLa cell에서의 SEPHS1 mRNA knock-down

이번 연구 목적인 사람 세포에서의 SEPHS1 기능 연구 및 산화-환원 항상성 조절에 미치는 영향을 확인하기 위해 연구에 필요한 세포주 HUVEC과 HeLa를 확보하였다. 선행 연구에서는 동물세포에서 CRISPR-Cas9 방식을 이용하여 SEPHS1 knockout을 유도하였었다. 기존의 실험과는 다르게 이번 실험에서는 정상 세포와 암세포 사이의 차이를 확인하기 위해 정상 세포인 HUVEC과 암세포인 HeLa cell을 비교해야 하는데, 정상 세포에서 SEPHS1이 결핍되었을 시 세포 사멸이 관찰되었기 때문에 knockout 방식이 아닌 knockdown 방식을 이용하였다. siRNA는 human SEPHS1의 mRNA에서 exon3와 exon6과 exon7사이의 서열을 이용하여 제작하였다[표 1].

Knockdown의 효율을 알아보기 위해 대조군으로 metafectene만 transfection한 세포와 실험군으로 SEPHS1 siRNA와 metafectene mixture를 transfection한 세포를 준비하였다. siRNA transfection 이후 날짜별로 cell에서 RNA extraction을 진행하였고 얻은 RNA를 qRT-PCR을 통해 정량적으로 비교하였다. siRNA와 metafectene을 처리한 직후부터 SEPHS1 RNA의 양을 매일 측정하였고 대조군의 SEPHS1 mRNA양 대비 실험군의 감소량을 비교하였다. 날짜가 지날수록 사람의 암세포인 HeLa 에서는 transfection 후 하루가 지났을 때부터 knockdown 효과가 90% 이상 나타났으며, 이틀째에 제일 높은 knockdown 효과가 나타났다. 넷째 날부터는 서서히 siRNA의

knockdown 효율이 떨어졌다. 이렇듯 시간이 지나면서 회복되는 이유는 식물세포와는 다르게 동물세포에서는 주입한 siRNA가 복제되지 않기 때문이다[그림 1A]. 사람의 정상 세포인 HUVEC 에서는 HeLa 세포와는 다르게 셋째 날부터는 세포가 사멸되어 siRNA transfection에 의한 knockdown 효율을 확인하지 못했다. 첫째날은 60% 정도의 knockdown 효율이 나타났으며 두쨋날은 90% 이상의 효율이 나타났다[그림 1B].

sihSEPHS1(E3)

Sense : AGACGACCCUUACAUGAUG

Antisense : CAUCAUGUAAGGGUCGUCU

sihSEPHS1(E6/7)

Sense : GCUGGAUAUCCCUGAGAAA

Antisense : UUUCUCAGGGAUAUCCAGC

표 1. SEPHS1 knockdown에 사용된 siRNA 서열. 이 논문에서 사용한 SEPHS1 siRNA는 mRNA의 exon3과 exon6/7 junction을 target으로 두 개를 제작하였다. 세포에서 SEPHS1 knockdown을 위해 siRNA를 transfection할때는 두 siRNA를 섞어서 사용하였다.

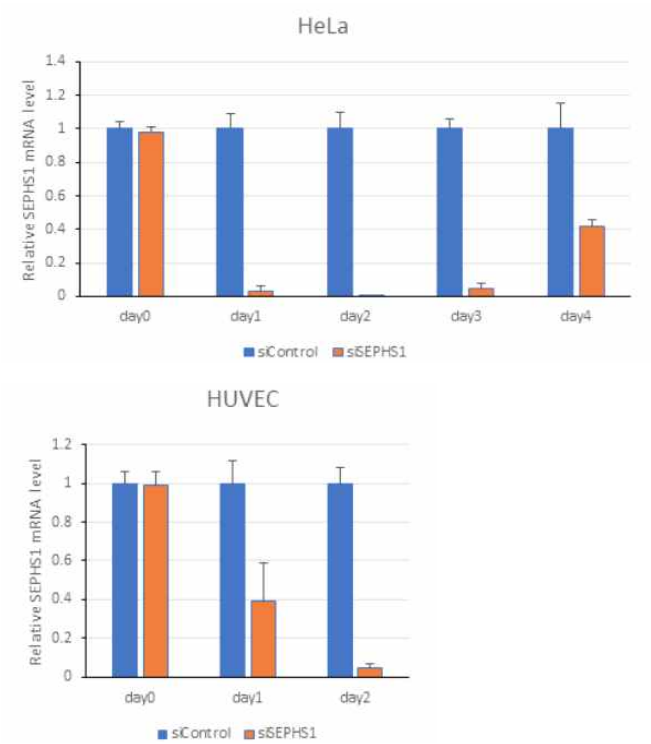


그림 1. HeLa 세포와 HUVEC에서 SEPHS1 mRNA를 이용한 knockdown 효율 조사. 세포에 transfection을 진행한 후 mRNA양을 qRT-PCR을 이용해 정량 측정을 진행하였고 대조군인 siControl과 실험군인 siSEPHS1의 양을 비교하였다. (A) HeLa 세포에서 둘째날부터 90% 이상의 효율이 나타났으며, 넷째날부터 회복됨을 확인할 수 있다. (B) HUVEC 에서는 셋째 날부터 세포 사멸이 관찰되었으며, 둘째 날 90% 이상의 효율이 나타났다.

제 2 절 SEPHS1 knockdown으로 인한 세포 사멸 관찰

HeLa cell과 HUVEC에서 SEPHS1을 knockdown 하였을 때 암세포인 HeLa와는 다르게 정상세포인 HUVEC에서 둘째 날부터 세포의 사멸이 관찰되었다. 같은 조건으로 진행한 대조군인 siControl은 세포사멸이 관찰되지 않았다[그림 2A]. 이를 통해 SEPHS1 결핍이 HUVEC에서 세포사멸을 유도함을 알 수 있다.

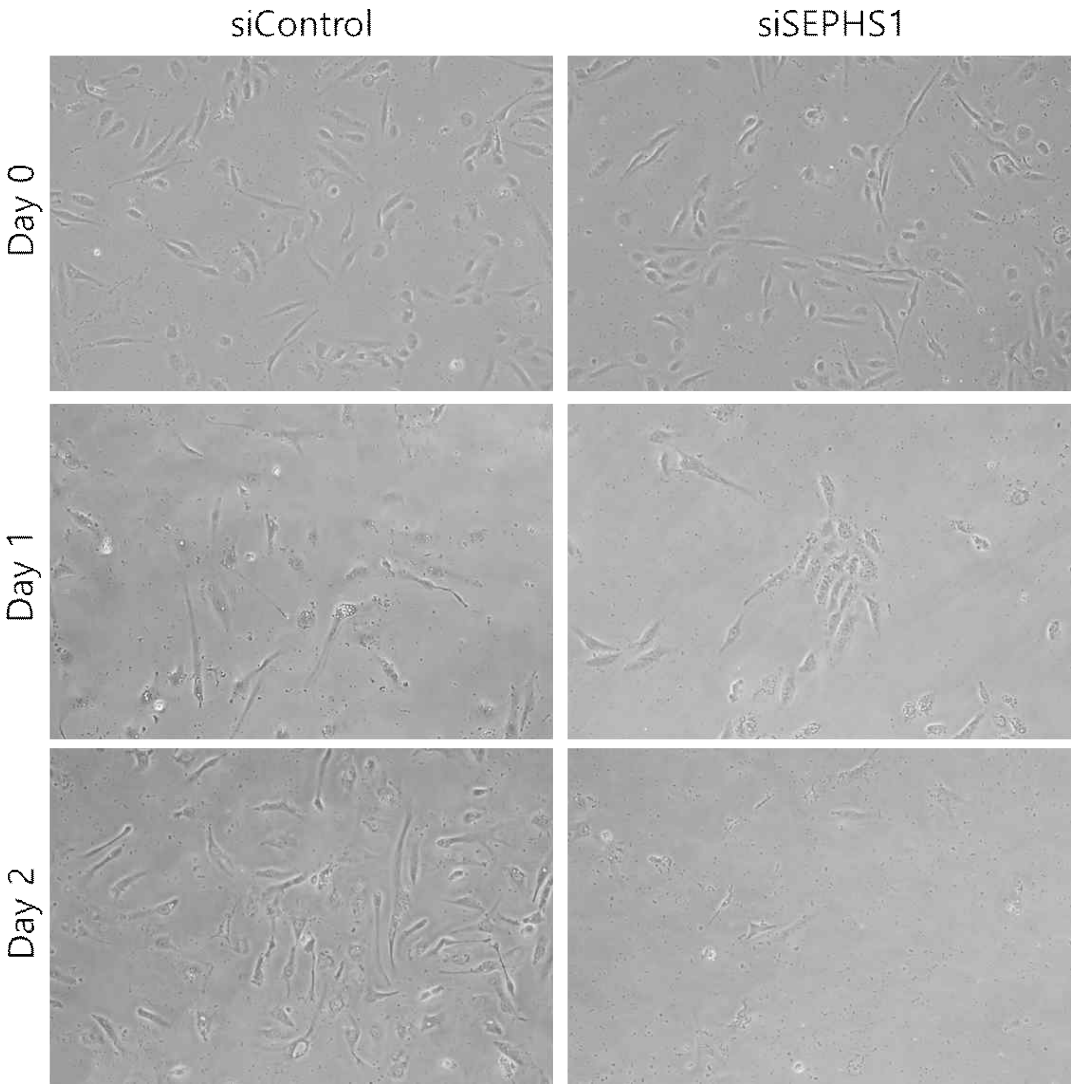
반면 HeLa cell에서는 SEPHS1이 결핍되어도 세포사멸이 발생하지 않았다. 하지만 대조군인 siControl은 시간이 지남에 따라 세포의 수가 증가하는데, 실험군인 siSEPHS1은 시간이 지나도 세포 수가 크게 증가하지 않았다. 셋째 날 사진을 보면 세포 밀도가 크게 차이 난다[그림 2B].

이러한 결과를 통해 사람의 정상세포인 HUVEC 에서는 SEPHS1이 세포의 생존에 기여하며, 결핍시 세포사멸이 유도됨을 알 수 있다. 반면에 암세포인 HeLa에서는 SEPHS1이 결핍되면 세포사멸까지는 일어나지 않지만 세포의 성장이 저해되므로, 세포 생장에 SEPHS1이 영향을 줌을 확인할 수 있다.

세포의 사멸에는 apoptosis, autophagy, necrosis 등의 여러 종류가 있는데 이중 apoptosis를 확인할 수 있는 TUNEL assay를 사용하여 관찰해 보았다. SEPHS1 knockdown시 세포 사멸이 일어난 HUVEC 세포를 실험해 보았으며, transfection 후 둘째 날 세포 대부분이 사멸하였기에 transfection 후 하루가 지났을 때 TUNEL assay를 진행하였다. Positive control로 DNase1을 처리한 세포를 사용하였으며, metafectene만 주입한 siControl과 metafectene과 siRNA를 같이 주입한 siSEPHS1

그룹을 비교하였다. Positive control 그룹은 모든 세포에서 TUNEL signal이 나타났다. siControl 그룹은 signal이 전혀 보이지 않았지만 siSEPHS1 그룹에서는 일부 세포에서 신호들이 보였다. SEPHS1이 knockdown 되면 세포들이 apoptosis로 유도하는 것으로 판단된다.

A



B

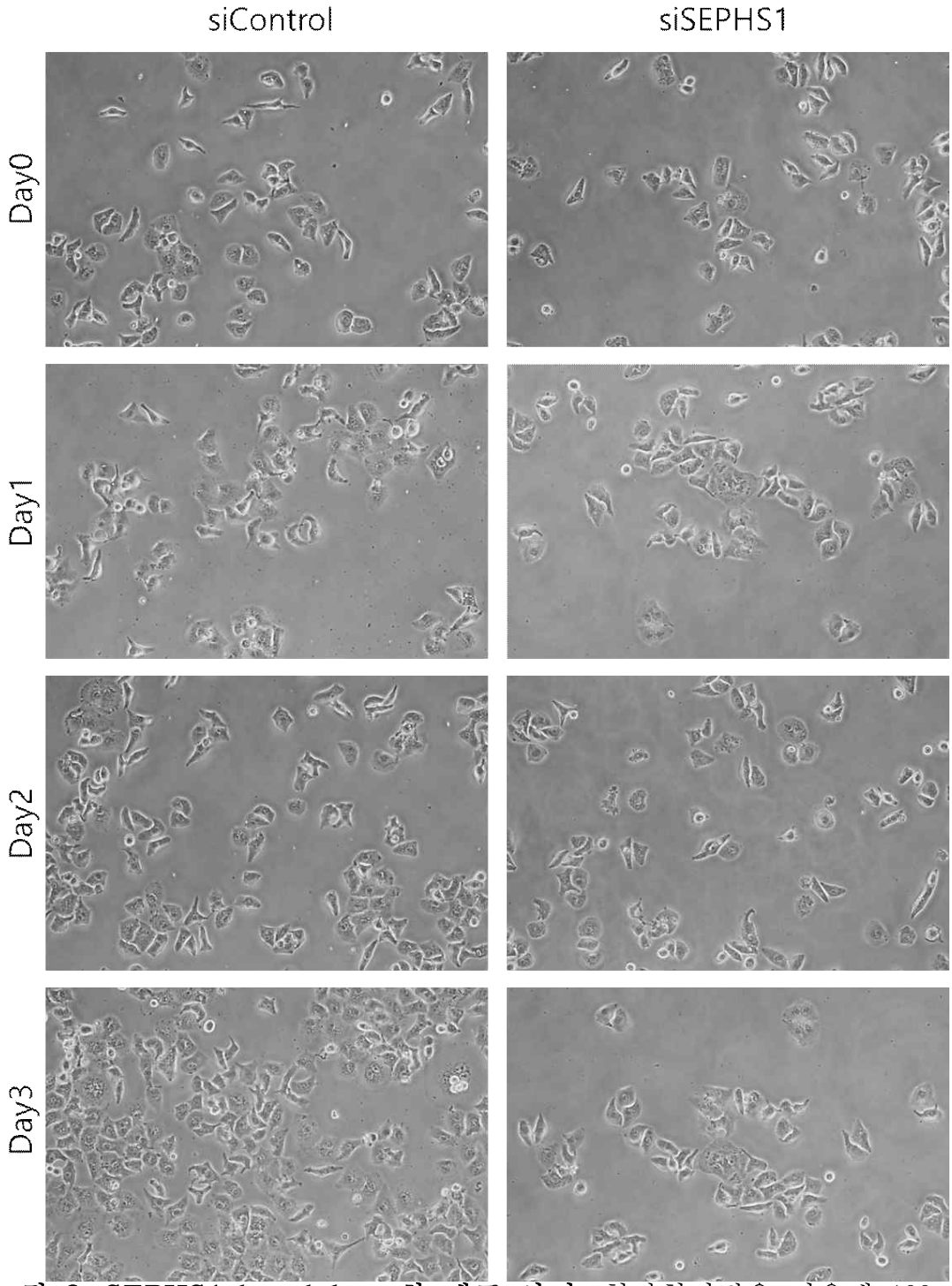


그림 2. SEPHS1 knockdown한 세포 사진. 형광현미경을 이용해 100x로 사진을 찍은 후 관찰하였다. (A) HUVEC에서 siRNA를 이용하여

SEPHS1 knockdown을 진행하였을 때 대조군인 siControl과는 달리 실험군인 siSEPHS1은 둘째 날 세포사멸이 관찰되었다. (B) HeLa cell에서는 HUVEC과는 달리 시간이 지나도 세포사멸이 관찰되지 않았다. 하지만 siControl에 비해 siSEPHS1 세포는 생장이 저해되었다.

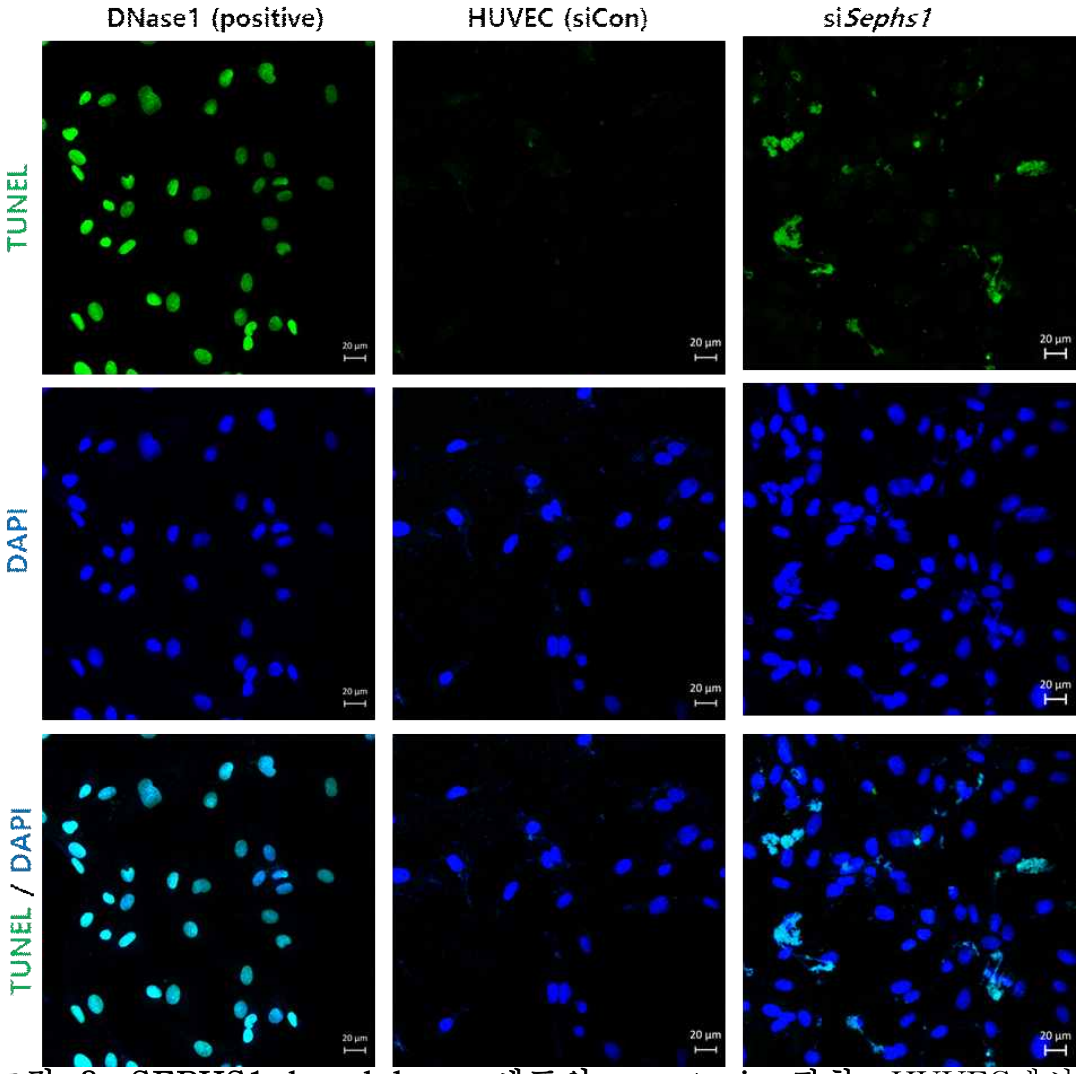


그림 3. SEPHS1 knockdown 세포의 apoptosis 관찰. HUVEC에서 TUNEL assay를 진행하였다. Positive control로 DNase1을 처리한 세포를 관찰했을때 TUNEL signal이 나타났고 knockdown을 하지 않은 HUVEC 에서는 TUNEL signal이 나타나지 않았다. SEPHS1을 knockdown한 siSEPHS1 그룹은 TUNEL signal이 나타났다.

제 3 절 SEPHS1 knock-down 세포에서의 ROS 축적 조사

이전 실험에서 동물 세포의 SEPHS1이 산화-환원 항상성 유지에 관여한다고 알려져 있으며 결핍시 ROS가 축적된다는 사실들이 밝혀져 있다. 세포 사멸이 일어나는 HUVEC 세포에서 ROS를 검출하기 위해 CM-DCFDA와 DHE staining을 진행하였다. CM-DCFDA는 일반적인 ROS를 전반적으로 염색을 하며, DHE는 ROS중에서도 superoxide를 염색한다.

염색은 positive control, siControl, siSEPHS1 3가지 그룹으로 나누어 진행하였다. Positive control로는 CM-DCFDA는 H2O2를 이용하였고 DHE의 positive control로는 rotenone을 이용하였다. 염색 결과 positive control은 모두 염색되었으며, siControl은 거의 염색되지 않았고, siSEPHS1은 둘다 염색되었다. 이를 통해 SEPHS1이 결핍되면 ROS가 축적되며, 그중에서 superoxide가 축적됨을 알 수 있다[그림 4A].

이를 명확히 증명하기 위해 SOD scavenger를 세포 배지에 추가하여 세포 내에 축적되는 ROS의 종류가 무엇인지 확인하였다. 먼저 일반적인 ROS를 제거하는 N-acetylcysteine(NAC)을 처리해 보았다. CM-DCFDA로 염색하였을 때 siSEPHS1에서는 염색이 되었었는데, NAC을 처리했을 때는 염색이 되지 않았다. 동일한 방식으로 superoxide를 염색하는 DHE 염색에서도 염색이 안되었다.

ROS중 superoxide의 scavenger인 superoxide dismutase(SOD)를 처리해 보았다. SOD는 SOD1, SOD2, SOD3 세가지 종류가 있으며 각각 cytoplasmic SOD, manganase SOD, extracellular SOD이다. 이 중에서 SOD1을 세포 배지에 처리하여 세포를 배양하였다. CM-DCFDDA와 DHE를 이용해 염색했을 때 둘다 siSEPHS1 그룹에서 염색이 되지 않았

다. 이를 통해서 SEPHS1 결핍이 세포의 ROS 축적을 유도하며, 그중에서도 특히 superoxide가 축적된다는 사실을 알 수 있었다[그림 4B].

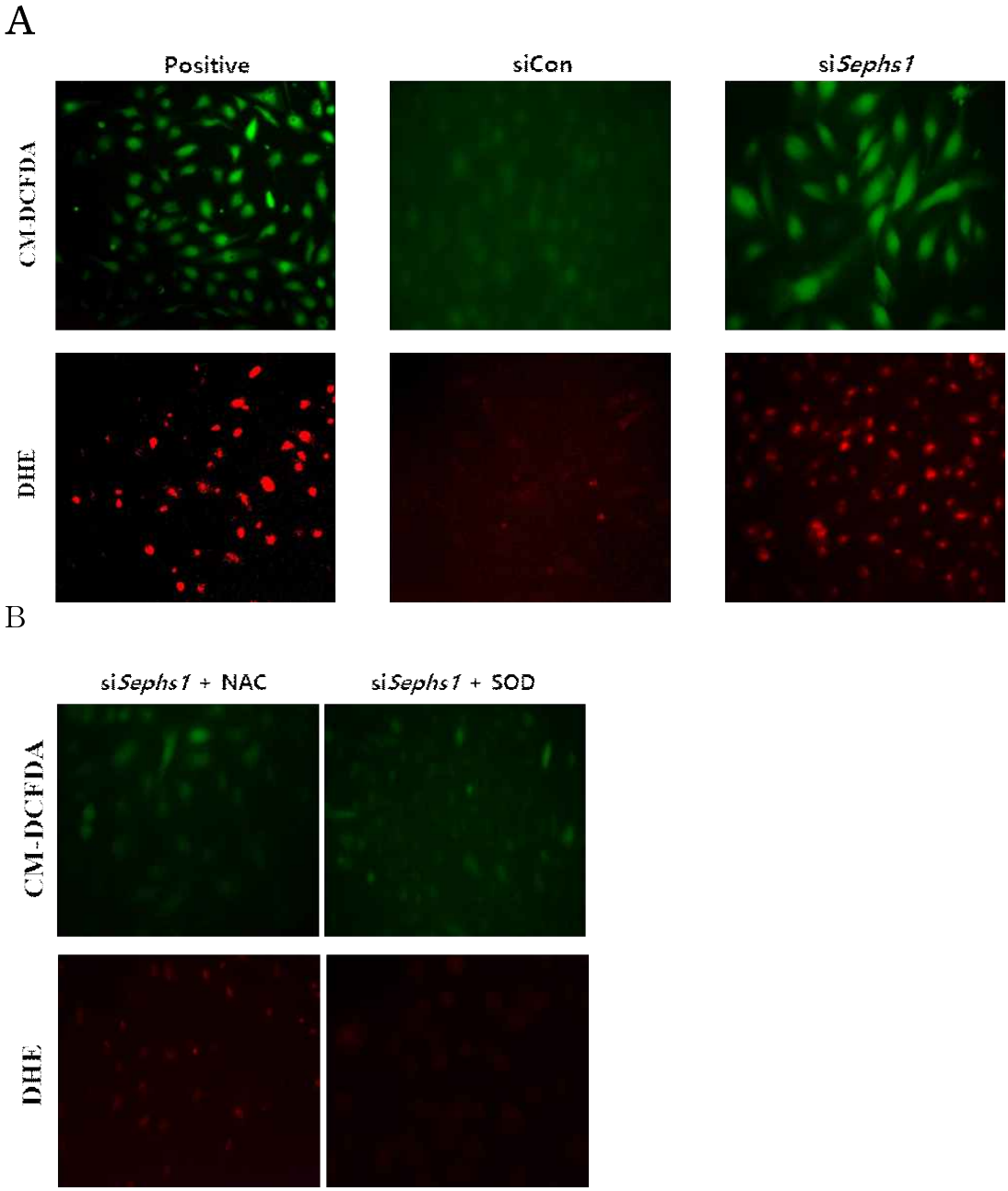


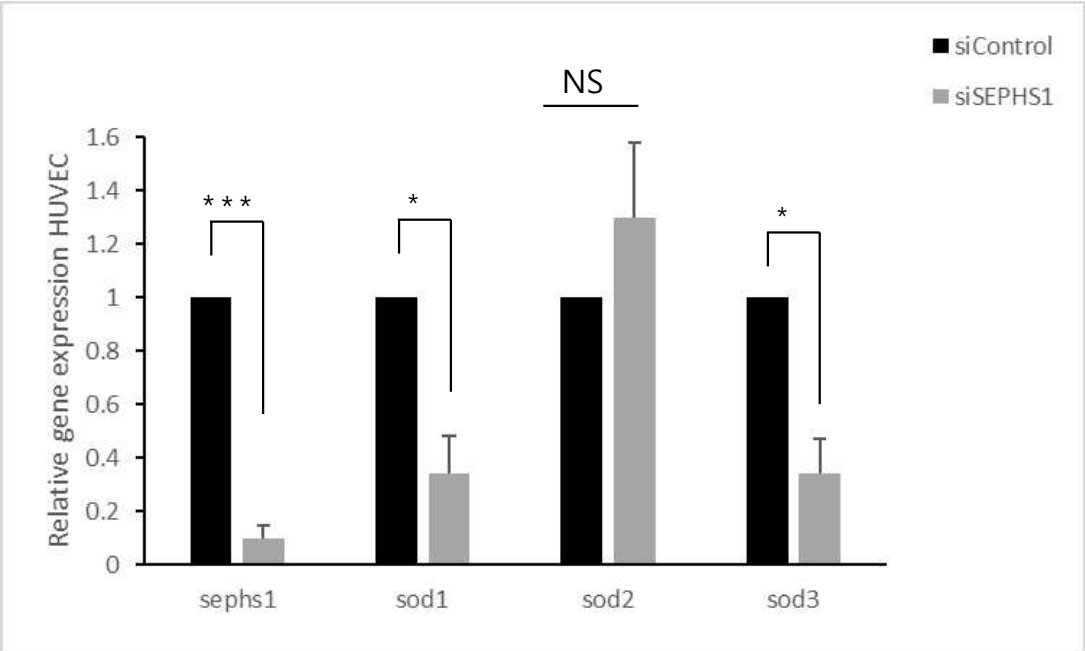
그림4. SEPHS1 knockdown HUVEC의 ROS 축적. (A)HUVEC에서 일반적인 ROS와 superoxide를 각각 염색하는 CM-DCFDA와 DHE를 염색 하였다. Positive control로는 CM-DCFDA에는 H2O2를, DHE에는 rotenone을 사용하였다. (B) ROS scavenger인 NAC(일반적인 ROS)과 SOD(superoxide)를 사용하여 ROS가 감소하는지 확인하였다.

제 4 절 SEPHS1 knockdown에 의한 ROS scavenger 발현 변화

세포내에 축적된 ROS를 제거하는 scavenger를 조사하여, siControl과 siSEPHS1이 얼마나 차이가 존재하는지 확인하고자 실험을 통해 정량적으로 비교해 보았다. ROS scavenger인 SOD1, SOD2, SOD3에 대한 primer를 이용하여 mRNA level을 비교하였다.. 이 유전자들에 대한 mRNA양을 qRT-PCR을 통해 정량적으로 비교하였다. HUVEC에서는 SEPHS1 결핍 시 SOD1과 SOD3가 적게 발현됨을 확인할 수 있다. SOD2는 감소하지 않았다. 이를 통해 cytoplasmic과 extracellular에 위치한 SOD가 감소하여 세포 내 ROS 축적이 이루어졌음을 알 수 있다. 특히 cytoplasmic에 존재하는 SOD가 없으므로 세포 내 다량의 ROS가 축적되어 세포사멸이 일어났다[그림 5A].

이와는 다르게 HeLa cell에서는 SOD1과 SOD2의 양이 거의 변하지 않고 SOD3만 감소하였다. 이도 HUVEC에 비해서는 적게 감소하였다. 결과를 보면 HeLa cell에서는 상대적으로 SOD1이 적게 감소하였고 이를 통해 세포 내 ROS 축적이 HUVEC에 비해 상대적으로 적었고, 이에 따라 세포사멸이 발생하지 않았다. 하지만 SOD3는 동일하게 감소하였기에 extracellulr matrix에 ROS가 축적되어 세포간 결합이 약해져 세포 생장이 저해되었을 것이다[그림 5B].

A.



B.

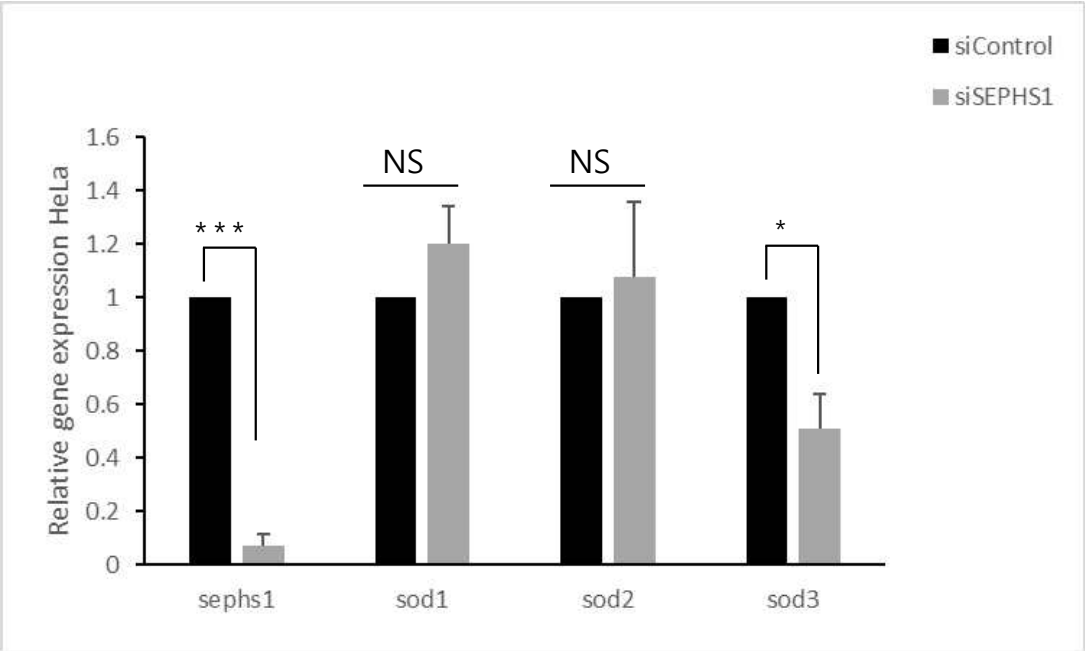


그림 5. Superoxide의 scavenger 유전자들의 발현 비교. Superoxide와 관련된 유전자들의 발현 level을 qRT-PCR을 이용하여 측정하였다.

NS, *, ***은 각각 not significant와 p-value < 0.05, 0.005를 나타낸다. 실험에 사용된 primer는 [표 2]에서 확인가능하다.

표 2. qRT-PCR에 이용한 primer list

Primer Name	Sequence (5'-3')
Sod1 F	CTCACTCTCAGGAGACCATTGC
Sod1 R	CCACAAGCCAAACGACTTCCAG
Sod2 F	CTGGACAAACCTCAGCCCTAAC
Sod2 R	AACCTGAGCCTTGGACACCAAC
Sod3 F	CCCCCACTCAGTAGGTCTGA
Sod3 R	AGATCGTCAGGTCAAAGGCG

제 4 장 고 찰

이번 연구는 선행 연구들과는 다르게 사람의 세포를 이용하여 실험을 진행하였으며, 암세포인 HeLa cell과 정상 세포인 HUVEC을 비교해보기 위해 실험을 진행하였다.

선행 연구에서는[Tobe *et al.*, 2016] 배아 암세포인 F9 cell에서 SEPHS1이 결손 되었을 때 ROS가 축적이 되었으며, ROS 중 특히 hydrogen peroxide가 축적되었음을 확인할 수 있었다. 또한 다른 연구 결과에서는 [Jung J *et al*, 2021] 마우스 세포인 2H11 세포에서도 ROS가 축적됨을 확인하였다. 하지만 이 세포에서는 superoxide가 증가하였다. 이러한 연구들을 보면 SEPHS1이 결손되었을 때 세포내에 ROS가 축적이 되며, 세포에 따라 다른 종류의 ROS가 축적됨을 확인할 수 있다.

기존의 실험들은 대체로 여러 동물의 암세포에서 SEPHS1 결핍이 세포의 산화-환원 항상성 조절에 관여함을 밝혔는데, 이번 실험에서는 사람의 암세포와 정상 세포를 하나씩 선별하여 비교하였다. 이 데이터는 세포를 하나씩만 사용하였기에 암세포와 정상 세포로 일반화할 수 없다는 한계가 있지만, 하나의 기준점을 제시해 줄 수 있다 생각한다.

우선적으로 암세포인 HeLa cell에서는 SEPHS1이 결핍 되었을 때 세포 생장이 저해됨을 확인 할 수 있었다. 반면 HUVEC의 경우에는 세포 사멸이 일어났다. 이는 TUNEL assay를 통해 apoptosis 기작으로 인한 사멸임을 확인하였다. 즉 SEPHS1 결핍이 정상 세포에서는 세포 생존에 영향을 줄 정도로 중요한 역할을 하지만, 암세포인 HeLa cell에서는 동일한 결핍 조건에서도 암세포의 특이적인 기작 덕분에 세포 사멸까지 일어나지는 않았다.

이러한 차이점이 나타나는 이유를 살펴보기 위해 일반적으로 SEPHS1의 기능이라 밝혀진 산화-환원 항상성 조절 기작에 어떤 변화가 생겼는지 알아보기 위해 ROS 염색을 진행하였다. 일반적인 ROS를 염색하는 CM-DCFDA로 염색을 진행하였을 때 SEPHS1이 결핍된 HUVEC 세포에서는 signal이 나타났다. 또한 ROS 중 superoxide를 염색하는 DHE staining을 진행해 보았을때도 동일하게 SEPHS1이 결핍된 HUVEC에서만 염색이 되었다. 이러한 결과를 보았을 때 SEPHS1 결핍은 세포내 superoxide가 축적되게 하며 이로 인해 세포 생존에 영향을 주었음을 알 수 있다. 하지만 이 실험의 한계점은 ROS의 여러 종류인 hydrogen peroxide나 lipid peroxide등을 확인해 보지 못했고 오직 superoxide만 확인했다는 점이다. 즉 superoxide가 축적된 것은 사실이지만 이에 추가적인 ROS 축적이 세포 생존에 영향을 주었을 수도 있다. 또한 HeLa cell에서 superoxide 축적을 확인하지 못하였기에 정확한 원인분석은 하기 어렵다. ROS scavenger에 의한 차이인지 확실하게 명시하기 위해선 HeLa cell의 CM-DCFDA와 DHE의 염색 결과가 필요하다.

마지막으로 superoxide가 축적되었을 때 세포내에서 superoxide를 제거하기 위한 scavenger가 어떻게 작용하는지 확인하기 위해 superoxide의 scavenger인 SOD를 정량적으로 측정해 보았다. SOD에는 3가지 종류가 있는데 SOD1, SOD2, SOD3가 있다. 이들은 각각 cytoplasmic SOD, mitochondrial SOD, extracellular SOD이다. 이들을 qRT-PCR을 이용하여 mRNA level에서 비교하였고, 이를 통해 상대적인 발현량을 비교하였다. HUVEC의 경우에는 SOD1, SOD3가 control 세포에 비해 적게 발현되었으며, 이를 통해 SEPHS1이 결핍된 세포내 축적된 superoxide가 대조군에 비해 제거되지 않음을 알 수 있다. 반면에 HeLa cell의 경우 SOD1, SOD2가 거의 변하지 않았고, SOD3가 적게 발현하여

superoxide가 HUVEC에 비해 많이 제거되었으리라 판단된다. 하지만 HeLa cell도 동일하게 SOD3가 감소하여 extracellular matrix에 ROS가 발생하여 세포 생장에 영향을 주었다. 이러한 결과도 예측일 뿐이고, 실제로 HeLa cell에서 superoxide의 양이 적은지, extracellular matrix의 superoxide가 두 세포 모두 증가하였는지 비교해 볼 필요가 있다.

이러한 실험들을 통해 HUVEC과 HeLa cell에서 SEPHS1이 결핍되었을 때 나타나는 현상에 차이가 있음을 확인하였다. 다른 세포들을 이용해 실제 암세포와 정상 세포사이의 차이점인지 확인하고 이를 암세포 연구에 기여할 수 있을것이라 생각한다.

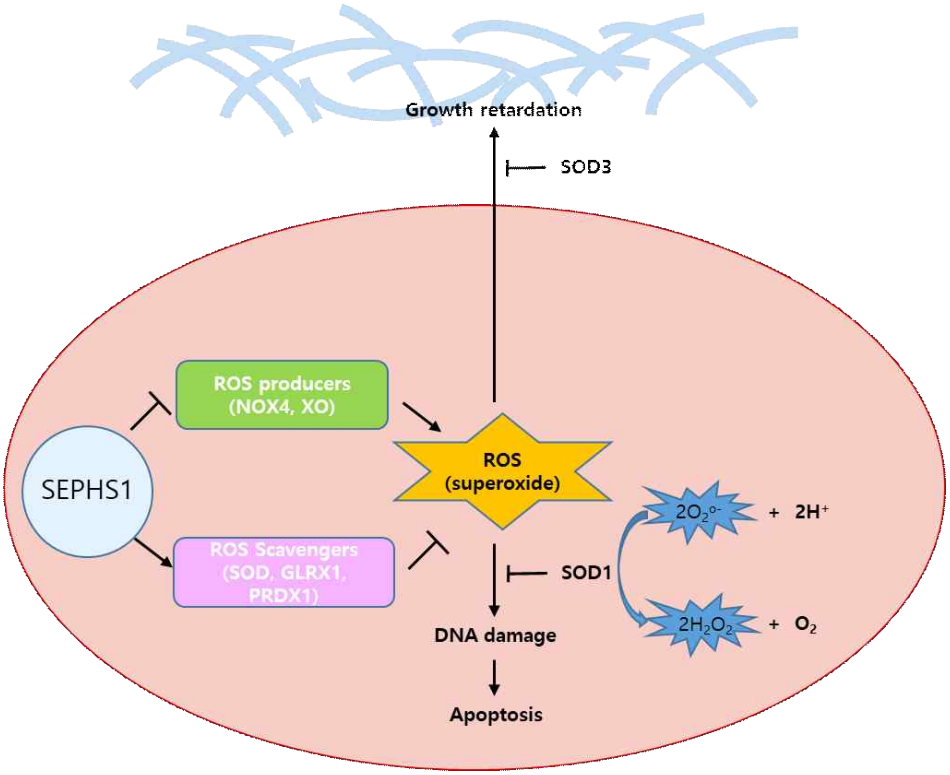


그림 7. SEPHS1 결핍으로 인한 ROS 축적과 SOD의 기능.

SEPHS1이 결핍되면 ROS가 세포 내에 축적되며, SOD1은 세포내 superoxide를 감소시켜 세포사멸을 억제하며, SOD3는 extracellular matrix의 superoxide를 감소해 세포 생장을 원활하게 한다.

참 고 문 헌

[1] Gromer, S., Eubel, J.K., Lee, B.L., Jacob, J. (2005). Human selenoproteins at a glance. Cell Molecular Life Science *62(21)*, 2414-2437.

[2] Bellinger, F.P., Raman, A.V., Reeves, M.A., Berry, M.J. (2009). Regulation and function of selenoproteins in human disease. Biochemical Journal *422* , 11-22.

[3] Bang, J., Huh, J.H., Na, J.W., Lu, Q., Carson, B.A., Tobe, R., Tsuji, P.A., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., Lee, B.J. (2015). Cell Proliferation and Motility Are Inhibited by G1 Phase Arrest in 15-kDa Selenoprotein-Deficient Chang Liver Cells. Molecules and Cells *38(5)*, 457-465.

[4] Bang, J., Jang, M., Huh, J.H., Na, J.W., Shim, M., Carlson, B.A., Tobe, R., Tsuji, P.A., Gladyshev, V.N., Hatfiled, D.L., Lee, B.J. (2015). Deficiency of the 15-kDa selenoprotein led to cytoskeleton remodeling and non-apoptotic membrane blebbing through a RhoA-ROCK pathway. Biochemical and Biophysical Research Communications *24* , 884-890.

[5] Yoshiro, S., Yasukazu, Y., Takashi, A., Kazuhiko T., Etsuo, N. (2003). Cell Death Caused by Selenium Deficiency and Protective Effect of Antioxidants. Journal of Biological Chemistry *278* , 39428-39434.

[6] Xu, X.M., Carlson, B.A., Irons, R., Mix, H., Zhong, N., Gladyshev, V.N.,

Hatfield, D.L. (2007). Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. Biochmical Journal *404* , 115-120.

[7] Tobe, R., Carlson, B.A., Huh, J.H., Castro, N.P., Xu, X.M., Tsuji, P.A., Lee, S.G., Bang, J., Na, J.W., Kong, Y.Y., Beaglehole, D., Southon, E., Seifried, H., Tessarollo, L., Salomon, D.S., Schweizer, U., Gladyshev, V.N., Hatfield, D.L., Lee, B.J. (2016). Selenophosphate synthetase 1 is and essential protein with roles in regulation of redox homeostasis in mammals. Biochemical Journal *473(14)*, 2141-2154.

[8] Jung, J.; Kim, Y.; Na, J.; Qiao, L.; Bang, J.; Kwon, D.; Yoo, T.-J.; Kang, D.; Kim, L.K.; Carlson, B.A.; Hatfield, D.L.; Kim, J.-H.; Lee, B.J. Constitutive Oxidative Stress by SEPHS1 Deficiency Induces Endothelial Cell Dysfunction. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 11646.

[9] G.R. Buettner(1993). The spin trapping of superoxide and hydroxyl free radicals with DMPO (5,5-dimethylpyrroline-N-oxide): more about iron. Free Radic. Res. Commun., 19 (Suppl 1) pp. S79-S87

[10] B. Commoner, J. Townsend, G.E. Pake.(1954). Free radicals in biological materials. Nature, 174 (4432) pp. 689-691

[11] Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. Journal of Cell Biology *217(6)*, 1915-1928.

[12] Schieber, M., Chandel, N.S., (2014). ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. Current Biology *24* , R453-R462.

[13] Thannickal, V.J.; Fanburg, B.L. Reactive oxygen species in cell signaling. Am. J. Physiol. Cell. Mol. Physiol. 2000, 279, L1005-L1028.

[14] Vera-Ramirez, L.; Ramirez-Tortosa, M.; Perez-Lopez, P.; Granados-Principal, S.; Battino, M.; Quiles, J.L. Long-term effects of systemic cancer treatment on DNA oxidative damage: The potential for targeted therapies. Cancer Lett. 2012, 327, 134-141

Abstract

Differential effect of SEPHS1 deficiency on HUVEC and HeLa cell

Dongin /kwon

School of Biological Science

The Graduate School

Seoul National University

Selenophosphate Synthetase (SEPHS) is an enzyme needed for synthesizing selenophosphate which functions as donor of selenium for selenocysteine. In eukaryotes, two isoforms of SEPHS (SEPHS1 and SEPHS2) exist. Only SEPHS2 shows enzymatic activities. However, It is reported that SEPHS1 is involved in maintaining cells and regulation redox homeostasis.

In this study, SEPHS1 is also important in human cells redox homeostasis. HeLa as human cancer cells and HUVEC as human normal cells are used to show SEPHS1 activity. When SEPHS1 was knock-downed by transfection of SEPHS1 siRNA, ROS was accumulated in cells. After HUVEC get transfected cell death occurred. On the other hand, HeLa cell growth was inhibited.

This study has a significance in human cell SEPHS1 redox homeostasis activity. This will show the difference SEPHS1

deficiency reaction on HUVEC and HeLa cell.

keywords : Selenophosphate synthetase 1, reactive oxygen species, redox homeostasis, oxidative stress, apoptosis
Student Number : 2019-28669