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

포유동물 혈관 내피 암세포에서 산화-환원 항상성 조절에 대한 *Sephs1*의 기능 연구

2022 년 2 월

서울대학교 대학원

생명과학부

김 유 민

포유동물 혈관 내피 암세포에서 산화-환원 항상성 조절에 대한 *Sephs1*의 기능 연구

지도 교수 이 병 재

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함
2021 년 11 월

서울대학교 대학원
생명과학부
김 유 민

김유민의 이학석사 학위논문을 인준함
2021 년 12 월

위 원 장 _____ 김 진 홍 _____ (인)

부위원장 _____ 이 병 재 _____ (인)

위 원 _____ 김 종 서 _____ (인)

초 록

Selenophosphate synthetase (SEPHS)는 21번째 아미노산인 selenocysteine을 합성할 때 selenium donor로 사용되는 selenophosphate을 합성하는 효소이다. 고등 진핵 생물의 SEPHS은 SEPHS1과 SEPHS2의 두 가지 isoform이 존재하나, 이 중 SEPHS2만이 효소 활성을 갖는다. 그러나 SEPHS1은 선행연구를 통해 개체의 생존 및 세포의 기능 유지에 필수적인 유전자로서 산화-환원 항상성 조절에 관여한다는 것이 밝혀졌다.

이번 연구에서는 mouse endothelial cancer cell인 2H11 세포에서 SEPHS1의 기능을 규명하고자 CRISPR-Cas9 시스템에 의한 *Sephs1* knockout을 유도하고, 이의 결실에 의해 영향 받는 세포의 기능을 조사하였다. 2H11 세포에서 *Sephs1* knockout에 따라 superoxide와 lipid peroxide의 축적과 nitric oxide의 감소가 나타났다. Superoxide의 축적은 xanthine oxidase와 NADPH oxidase 4의 활성화에 따라 superoxide의 생성이 증가했고, superoxide dismutase 1과 3 유전자 발현이 감소하여 superoxide가 제거되지 않았기 때문에 발생하였다. SEPHS1의 deficiency로 인해 축적된 산화 스트레스는 DNA damage를 유도하여 *Sephs1* knockout 세포에서 G2/M phase arrest를 일으킴으로써 세포 성장을 저해하였다. 또한 증가한 ROS와 감소한 nitric oxide로 인해 혈관 신생 능력이 감소하였다.

본 연구는 *Sephs1*이 knockout된 혈관 내피 암세포에서 superoxide가 주로 축적되었고, 이로 인해 세포 성장, 혈관 신생과 같은 기능이 저해되었다는 것을 밝혔다는 데 의의가 있다.

주요어 : 셀레늄, 셀레늄단백질, selenocysteine, selenophosphate synthetase 1, 활성산소종, 혈관 내피세포

학 번 : 2019-21185

목 차

제 1 장 서 론 1

제 2 장 재료 및 방법 5
제 1 절 재료 5
제 2 절 세포 배양 6
제 3 절 2H11 세포에서 *Sephs1* knockout 및 rescue cell line 제작 6
제 4 절 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) 8
제 5 절 Western blot 10
제 6 절 면역세포화학 (immunocytochemistry) 10
제 7 절 ROS 축적 조사 11
제 8 절 유세포 분석 (flowcytometry)을 통한 ROS level 조사 12
제 9 절 Scratch-wound assay 13
제 10 절 Tube formation assay 13
제 11 절 ROS scavengers와 inhibitors 처리 14
제 12 절 RNS 축적 조사 14
제 13 절 Cell cycle 조사 14
제 14 절 BrdU incorporation assay 15
제 15 절 통계 15

제 3 장 결 과 16
제 1 절 *Sephs1* KO 세포와 rescue 세포의 제작 및 검증 16
제 2 절 *Sephs1* KO 혈관 내피 암세포에서 superoxide와 lipid peroxide 축적 관찰 21
제 3 절 SEPHS1 deficiency로 인한 XO와 NOX4 활성화 26
제 4 절 SEPHS1 deficiency로 인한 redox regulator 변화 조사 및 RNS 감소 관찰 30
제 5 절 *Sephs1* KO 세포에서 DNA damage 축적으로 인한 G2/M phase arrest 및 세포 성장 감소 35
제 6 절 *Sephs1* KO 세포에서 혈관 신생 능력 저하 41

제 4 장 고 찰 46

제 5 장 참고문헌 50

Abstract 56

표 목차

[표 1] qRT-PCR에 사용한 primer list 9

그림 목차

[그림 1] *Sephs1* KO 세포와 rescue 세포의 DNA sequencing 결과 18
[그림 2] *Sephs1* KO 세포와 rescue 세포의 SEPHS1 발현 검증 19
[그림 3] *Sephs1* KO 세포의 세포골격 염색 20
[그림 4] *Sephs1* KO 세포의 ROS와 lipid peroxide 축적.....23
[그림 5] *Sephs1* KO 세포에서 축적된 ROS 종류 특정.....25
[그림 6] Superoxide 축적 경로 조사.....28
[그림 7] Xanthine oxidase와 NADPH oxidase isoforms의 변화 조사 29
[그림 8] Superoxide, hydrogen peroxide, lipid peroxide의 scavenger 유전자들의 발현 비교.....32
[그림 9] *Sephs1* KO 세포에서 RNS 변화 조사.....33
[그림 10] *Sephs1* KO 세포에서 nitric oxide 생성에 관여하는 유전자 발현 변화 조사.....34
[그림 11] BrdU assay를 통한 세포 분열 조사.....37
[그림 12] Cell cycle progression에 *Sephs1*의 KO이 미치는 영향 조사 38
[그림 13] Western blot으로 G2/M phase arrest marker의 발현 조사 39
[그림 14] γH2AX의 형성 여부 조사로 DNA damage 관찰 ..40
[그림 15] 세포의 wound healing 능력 조사.....43
[그림 16] *Sephs1* KO 세포에서 혈관 신생 능력 저하 관찰....44
[그림 17] 축적된 ROS와 nitric oxide level 조사 45

제 1 장 서 론

셀레늄은 필수 미량 원소로 생명 활동 유지에 있어 중요하다. 셀레늄이 부족할 경우 태아의 유산 확률이 올라가고[Barrington *et al.*, 1996], 뼈와 연골이 손상되는 카신벡 병이 유발되며[Peng *et al.*, 1991; Ge *et al.*, 1993], 정자의 운동능력 또한 저해되는 것으로 보고되었다[Scott *et al.*, 1998]. 그러나 과다하게 셀레늄에 노출될 경우 가축에서 alkali disease, blind stagger와 같은 질병의 발생이 보고된 바 있어[O'Toole *et al.*, 1995] 셀레늄 대사의 정교한 조절이 중요하다. 셀레늄은 selenocysteyl tRNA 형태로 셀레늄단백질 번역 과정에 co-translationally insertion[Lee *et al.*, 1989] 되어 셀레늄단백질의 활성화 부위에서 제 역할을 하며, 인간의 경우 25종의 셀레늄단백질이 보고되었다. 많은 종류의 셀레늄단백질이 산화 스트레스 및 산화-환원 항상성 조절에 참여한다[Kryukov *et al.*, 2003]. Selenocysteine의 합성은 셀레늄 공여자인 selenophosphate (SeP)의 합성이 필수적인 과정이며, 이는 selenophosphate synthetase (SEPHS)라는 효소에 의해 촉매된다[Glass *et al.*, 1993]. SEPHS는 ATP와 selenide를 기질로 하여 SeP를 합성하고, 이를 selenocysteyl tRNA의 합성에 제공한다[Veres *et al.*, 1994]. SEPHS는 고등 진핵생물에서 SEPHS1, 2 두 가지 종류의 isoform이 존재하며, 선행 연구를 통해 SeP의 합성에 SEPHS2만이 효소 활성을 갖는 것으로 보고되었다[Xu *et al.*, 2007]. 그러나 SEPHS1은 셀레늄 대사 과정에서 de-novo SeP의 합성이 아닌 selenium recycling에 참여하여 셀레늄 대사를 조절할 가능성이 제기된다[Tamura *et al.*, 2004].

*Sephs1*은 필수 유전자로 결손 동물 모델에서 쥐의 배아 발생 과정 중 배아의 사망이 관찰되었고[Tobe *et al.*, 2016], 세포 모델에서

Sephs1 결실 (knockout, KO)을 유도할 시 초파리에서 megamitochondria가 형성되고 비타민 B6의 전구체인 pyridoxal phosphate가 감소하며[Shim *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2011], 쥐의 배아 암세포 모델에서 산화-환원 항상성 조절에 참여하는 항산화 단백질 및 산화 스트레스 제거에 참여하는 셀레늄단백질의 발현 감소가 나타났고 이로 인해 활성산소가 축적됨이 보고된 바 있다[Jung *et al.*, 2021]. 이러한 선행 연구들은 *Sephs1*이 세포의 성장과 기능 유지에 있어 필수적인 역할을 하며, 특히 산화-환원 항상성 조절에 있어 항산화 단백질의 발현 조절을 통해 그 역할을 할 것임을 시사한다.

활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 산소를 포함한 화학적 반응성을 가진 분자들의 총칭으로, 일반적으로 생물체 내 다양한 생화학 반응에서 부반응물로서 생성된다[Sies, 1991]. ROS의 종류에는 superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 및 이들의 반응물인 peroxynitrite, lipid peroxide 등이 존재한다[Murphy *et al.*, 2011]. 과거의 경우 ROS는 세포의 손상을 유도하는 유해 물질로 인식되었으나, 현재는 적절한 양으로 조절될 때 조직의 재생[Dunnill *et al.*, 2017], 면역 반응[West *et al.*, 2011] 및 세포의 분화[Bigarella *et al.*, 2014] 등 다양한 생체 활동에서 2차 전달자로서 역할을 하는 것으로 보고되고 있다[Bartosz, 2009]. 그러나 과다한 양이 세포 내 존재하여 산화 스트레스가 발생할 경우 세포의 사멸 (apoptosis) 및 노화[Simon *et al.*, 2000; Davalli *et al.*, 2016]를 유도하고 개체 수준에서는 고혈압[Harrison *et al.*, 2007], 관절염[Filippin *et al.*, 2008] 및 암의 발생[Pelican *et al.*, 2004]을 유도하는 것으로 알려졌다. 따라서 ROS 양의 정교한 조절이 세포의 생명 활동 및 생리적 활성을 유지하는 데 필수적이다.

ROS는 주로 생체 내 물질대사 과정 중 발생하며, ROS가

생성되는 대표적인 세포의 장소 및 소기관으로는 미토콘드리아 내 전자전달계 및 cytochrome p450의 산화, 세포질의 xanthine oxidoreductase, NADPH oxidase, nitric oxide synthase uncoupling, cyclooxygenase, lipoxygenase[Brand, 2010; Snezhkina *et al.*, 2019] 등이 보고되었다. 생성된 ROS는 각 ROS를 제거하는 단백질과 이의 recycling 및 redox buffer로 작용하는 항산화 단백질의 작용으로 세포 내 산화-환원 항상성이 조절된다[Scandalios, 2002]. Superoxide의 경우 superoxide dismutase (SOD)가 특이적으로 제거하며, hydrogen peroxide는 catalase, glutathione peroxidase가 담당하고, hydroxyl radical 및 산화 스트레스의 제거에는 glutathione, NADPH, glutaredoxin, peroxyredoxin, thioredoxin 등이 참여하는 것으로 보고되었다[Snezhkina *et al.*, 2019]. 또한 reactive nitrogen species (RNS) 중 하나인 nitric oxide (NO)는 superoxide와 반응하여 peroxynitrite를 형성하여 superoxide를 제거한다[Beckman *et al.*, 1996]. NO와 ROS의 양의 조절, RNS/ROS의 비율은 세포 골격의 rearrangement, 세포의 이동 등 다양한 생리적 작용에 영향을 미친다.

이러한 항산화 단백질의 발현 및 RNS를 통한 산화-환원 항상성의 조절은 nucleus factor of erythrocyte like E2 (NFELE2, NRF2), sirtutin (SIRT), nuclear factor kappa B (NFkB) 등 과 같은 다양한 경로를 통해 조절되는 것으로 보고된 바 있다[DeNicola *et al.*, 2011; Hoesel *et al.*, 2013; Merksamer *et al.*, 2013].

혈관은 개체의 각 조직의 기능 유지 및 활동에 필요한 영양분과 산소를 공급하는 가장 중요한 결합조직으로 동맥과 정맥, 그리고 모세혈관으로 구성된다. 혈관은 가장 역동적인 기관으로 조직의 손상 및 개체의 성장에 따라 혈관의 신장 및 혈관 신생 (angiogenesis)을 통해 지속적으로 remodeling이 일어난다[dela Paz *et al.*, 2014; Logsdon *et*

al., 2014]. 이러한 혈관 및 혈관을 구성하는 혈관 내피세포의 기능에 활성산소 및 이로 인한 산화 스트레스가 중요한 조절자로 작용하는 것으로 보고된 바 있다[Maulik *et al.*, 2002]. 내피세포의 ROS 자극은 외상 및 질병으로 인한 조직의 손상에 대해 angiogenesis를 촉진하는 역할을 하며, 혈관의 탄성 조절 및 혈관의 수축·이완 등에 중요한 역할을 한다[Dunnill *et al.*, 2017; Faraci, 2006]. 그러나 과다한 ROS의 축적은 고혈압의 발병률을 높이고[Harrison *et al.*, 2007], 내피세포의 기능을 저하하여 내피세포의 노화 및 사멸, permeability 증가 등 ROS는 심혈관계 질환과 밀접하게 연관되어 있다[Cai *et al.*, 2000].

선행 연구를 통해 *Sephs1*의 기능은 세포 내 산화-환원 항상성 조절에 중요한 역할을 하고[Tobe *et al.*, 2016], 산화-환원 항상성 조절은 혈관 및 내피세포의 생리적인 활성 유지 및 각 질병 발병에 있어 위험 요소로 작용하는 바, 본 연구를 통해 혈관 내피 암세포에서 *Sephs1*의 KO을 유도하고 산화-환원 항상성 조절에 있어 이의 기능을 분자 및 세포 수준에서 규명하고자 한다.

제 2 장 재료 및 방법

1. 재료

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Hyclone에서 구매하였다. Fetal bovine serum (FBS)는 Serana에서 구매하였다. Antibiotic-antimycotic, Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS), trypan blue solution, rhodamine phalloidin, Lipofectamine® Reagent, blasticidin S HCl, puromycin은 Life Technologies에서 구매하였다. Neomycin은 AG Scientific에서 구매하였다. LentiCRISPR v2, psPAX2는 Addgene에서 구매하였다. Superoxide dismutase, catalase, N-acetyl cysteine (NAC), apocynin, allopurinol, Mito-TEMPO, angiotensin II, dihydroethidium (DHE), dihydrorhodamine 123 (DHR 123), propidium iodide (PI), PMSF cocktail (protease inhibitor), DAPI는 Sigma에서 구매하였다. GKT137831은 Cayman에서 구매하였다. 5-(and-6)chloromethyl-2'7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DAF-FM)은 Molecular Probes에서 구매하였다. 5-Bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU) Labeling and Detection Kit는 Roche에서 구매하였다. ECL reagent는 Amersham에서 구매하였다. SEPHS1, BrdU, gamma H2AX, Cyclin B1, Xanthine oxidase, CFL488 conjugated mouse IgG, CFL488 conjugated rabbit IgG 항체는 Santa Cruz Biotech에서 구매하였다. Alpha tubulin, 4HNE, cyclin A2, beta actin, mouse IgG cy3, rabbit IgG cy3 항체는 Abcam에서 구매하였다. HRP conjugated anti-rabbit IgG, HRP conjugated anti-mouse IgG 항체는 Genetex에서

구매하였다. Matrigel은 Corning에서 구매하였다. PVDF membrane은 GE Healthcare에서 구매하였다. BD에서 제작한 FlowJo™ Software Version 10.8.1를 유세포 분석에 사용하였다.

2. 세포 배양

2H11, HEK293T, GP2-293 세포는 10 % FBS와 1 % antibiotic-antimycotic이 포함된 DMEM 배지에서 37 ℃, 5 % CO_2가 공급된 상태로 배양되었다.

3. 2H11 세포에서 *Sephs1* knockout 및 rescue cell line 제작

*Mus musculus Sephs1*의 exon 8을 타겟팅한 sgRNA (single guide RNA)가 CRISPR online design tool (http://crispr.mit.edu, accessed on 3 November 2021)를 이용하여 디자인되었다. sgRNA_E8의 sequence는 5'-CACCGTAGGCCGAACATGTTTCCGC-3', 5'-AAACGCGGAAACATGTTCGGCCTAC-3'이다. 이 상보적인 sgRNA nucleotide들은 Ran *et al.*의 protocol에 따라 annealing 된 후 LentiCRISPR v2 vector에 cloning되었다 [Ran *et al.*, 2013]. Lentivirus를 만들기 위해 HEK293T 세포에 sgRNA-containing LentiCRISPR v2 vector와 virus packaging plasmid psPAX2, pMD2.G.가 동시에 transfection 되었다. 48시간 배양 후 lentivirus가 0.45 μm filter를 사용하여 harvest 되었다. Harvest한 lentivirus를

2H11 세포에 48시간의 incubation을 통해 infection 한 후 6일 간 2 mg/mL의 puromycin으로 selection이 진행되었다. Single clone은 96-well plate를 이용하여 얻은 후 각 clone에서 gDNA를 추출하여 primer를 사용해 PCR을 하였다 (forward: 5'-ACAAAGTGGGTGTTGGGTGT-3'; reverse: 5'-AGCCTTGTAACCATGCTGCC-3'). 증폭된 DNA fragment는 TA-cloning vector에 cloning한 후 각 clone을 sequencing하였다.

Sephs1 KO의 off-target effect를 배제하기 위해 rescue 세포가 제작되었다. 먼저 sgRNA region ([그림 1]의 box area)에 silent mutation이 wild type *Sephs1*에 도입되었다. 이는 Cas9 cleavage에 저항성을 가짐으로써 wild type SEPHS1을 발현하기 위함이다. Site-directed mutagenesis는 two-step PCR 방법으로 진행되었다 (primer set 1 forward: 5'-TACCGAGCTCGGATCCGAAC-3', reverse: 5'-CAATCCAAACATATTGCCACATGCTTTGCTCACAGCGGCCAT-3'; primer set 2 forward: 5'-CATGTGGCAATATGTTTGGATTGATGCATGGGACCTGCCAGA-3', reverse: 5'-GGTTTAAACGGGCCCTCTAG-3'). PCR products는 retroviral vector (pRV.neo; Bang *et al.*, 2015)에 BamHI/EcoRI site에 cloning되었고, plasmid는 retroviral packaging cell인 GP2-293 세포에 transfection 되었다. 48시간 배양 후 viral particle을 harvest하여 *Sephs1* KO 2H11 세포에 infection하였고, 400 μg/mL의 G418로 selection을 진행하였다.

4. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

세포에서 total RNA를 TRIZOL reagent를 사용하여 추출한 후 2000 ng의 RNA를 Mo-MuLV reverse transcriptase로 transcription 하였다. qRT-PCR은 manufacturer's instructions에 따라 PowerUP™ SYPR™ Green Master Mix와 Prism7300 (Applied Biosystems)를 이용하여 triplicate로 진행하였다. 본 연구에서 사용한 primer sequence는 [표 1]에 있다. *Hprt* 유전자가 internal control로 사용되었다.

표 1. qRT-PCR에 사용한 primer list.

Primer Name	Sequence (5'-3')
Hprt F	AGTCCCAGCGTCGTGATTAG
Hprt R	GTATCCAACACTTCGAGAGGTC
Sod1 F	GGAAGCATGGCGATGAAAGC
Sod1 R	AGGTCTCCAACATGCCTCTC
Sod2 F	CAATAATGTTGTGTCGGGCGG
Sod2 R	TCGGTGGCGTTGAGATTGTT
Sod3 F	GATGTTCTCCCATGTCCCGG
Sod3 R	GGAAATGGGGTGGGCGATAT
Gpx1 F	AGTTCGGACACCAGGAGAATG
Gpx1 R	GAGTGCAGCCAGTAATCACC
Catalase F	CGCTGAGAAGCCTAAGAACG
Catalase R	CCAGCGTTGATTACAGGTGA
Nox1 F	AGCTTTCTGAGTAGGTGTGCATATG
Nox1 R	TTGCAAAATGAGCAGGTGCCCCT
Nox2 F	AGTGAGCTTTCCCTGTGTCTT
Nox2 R	TGCCTTCGGTGATGTGCTTTA
Nox4 F	GTTGGGCCTAGGATTGTGTT
Nox4 R	CGGCTACATGCACACCTGA
Glrx1 F	GGGGAGCTGATGACTCGGCTGAA
Glrx1 R	AGGGGCACTGGCCATCAG
Prdx1 F	TATCAGATCCCAAGCGCACC
Prdx1 R	GCTGGACACACTTCACCATG
Gsta4 F	GATGCAAAAGGATGGACACCTG
Gsta4 R	TGGTTGCCAACGAGAAAAGC
Gpx4 F	CGTCTGAGCCGCTTAC
Gpx4 R	CCCATTTACACAGATCTTGCT
Nos2 R	CTATGGCCGCTTTGATGTGC
Nos2 R	TGGAGCACAGCCACATTGAT
Nos3 F	TGGGTTTAGGGCTGTGCGG
Nos3 R	CAATAGCTGCTCAGTGGGTGA

5. Western blot

세포를 PBS로 두 번 wash한 후 ice-cold lysis buffer (PBS with 0.5 % Triton X-100 and 0.1 % PMSF cocktail)로 harvest하였다. 세포 extract의 단백질 농도는 Bradford dye-binding method로 측정되었으며, 각 샘플에서 총 단백질의 20 μg을 10 % SDS-polyacrylamide gel electrophoresis에 사용하였다. PVDF membrane에 transfer한 후 SEPHS1 (1:1000), vinculin (1:1000), xanthine oxidoreductase (XOR, 1:1000), actin (1:5000), cyclin A2 (1:1000), cyclin B1 (1:2000)의 primary 항체를 4 ℃에서 overnight으로 incubation하였다. Membrane은 0.1 % Tween 20이 들어간 tris-buffered saline (TBS)로 wash한 후 secondary 항체를 상온에서 30분 간 반응시켰다. Immunolabeling은 ECL reagent를 사용하였으며 luminescence signal은 Chemi-DOC (Luminograph II, ATTO)를 이용하여 관찰했다. 각 blot의 band intensity는 ImageJ software (NIH)를 이용하여 측정하였다.

6. 면역세포화학 (immunocytochemistry)

1.5 x 10^4 개의 세포를 9 mm cover slip 위에 분주한 후 4 % paraformaldehyde (in PBS)로 고정하였다. PBS로 두 번 wash한 후 0.1 % Triton X-100 (in PBS)로 permeabilization 시켰다. 그 후 세포에 5 % FBS (in PBS)로 1시간 동안 상온에서 blocking을 진행했으며, SEPHS1 (1:100), alpha-tubulin (1:200), 4-

hydroxynonenal (4-HNE) (1:50), BrdU (1:100), gamma H2AX (1:100) primary 항체를 4 ℃에서 overnight으로 binding 시켰다. 그리고나서 anti-rabbit IgG conjugated with Cy3 또는 anti-mouse IgG conjugated with CFL488의 secondary 항체를 상온에서 30분 동안 binding 시킨 후 형광 현미경 (Nikon FL) 또는 LSM700 confocal 현미경 (Carl Zeiss)로 시그널을 관찰하였다.

7. ROS 축적 조사

일반적인 ROS는 CM-DCFDA를 이용하여 염색되었다. 세포를 염색 하루 전에 12-well plate에 5 x 10^4 의 농도로 분주했다. 다음 날 5 μM의 CM-DCFDA가 들어간 FBS 없이 1 % antibiotic-antimycotic이 포함된 DMEM을 넣어 30분 동안 37 ℃, 5 % CO_2가 공급된 상태로 배양하였고, PBS로 두 번 wash한 후 형광 현미경 (Nikon FL)로 470 nm의 excitation 파장에서 세포를 관찰하였다.

Superoxide는 DHE를 이용하여 염색되었다. 세포를 염색 하루 전에 12-well plate에 5 x 10^4 의 농도로 분주했다. 다음 날 10 μM의 CM-DCFDA가 들어간 10 % FBS와 1 % antibiotic-antimycotic이 포함된 DMEM을 넣어 15분 동안 37 ℃, 5 % CO_2가 공급된 상태로 배양하였고, PBS로 두 번 wash한 후 형광 현미경 (Nikon FL)로 531 nm의 excitation 파장에서 세포를 관찰하였다.

Hydrogen peroxide는 Tobe *et al.*의 방법을 이용하여 detection 하였다 [Tobe *et al.*, 2016]. Cytosolic roGFP2-Orp1 vector [Morgan *et al.*, 2011; Gutscher *et al.*, 2008]를 각 세포에 transfection하고 37 ℃, 5 % CO_2가 공급된 상태에서 24시간 배양 후 1.5 x 10^4 개의

세포를 9 mm cover slip 위에 분주하고 12시간 동안 37 ℃, 5 % CO_2 상태에서 배양하였다. PBS로 wash한 후 4 % paraformaldehyde (in PBS)로 고정했고, LSM700 confocal 현미경 (Carl Zeiss)로 세포를 관찰하였다. Morgan *et al.*에 따라 oxidized Orp1 (405 nm)와 reduced Orp1 (488 nm)의 ratio를 계산하였다 [Morgan *et al.*, 2011]. ImageJ software를 이용하여 같은 field의 405 nm image를 488 nm image로 나눈 후 'Blue Green Red' Look Up Table로 false-color ratio picture를 얻었다.

8. 유세포 분석 (flow cytometry)를 통한 ROS level 조사

6-well plate에 2 x 10^5 개의 세포를 분주했고 그 다음 날 ROS probe로 세포를 염색했다. 염색 후 세포를 harvest한 후 fluorescence-activated cell sorter (FACS, Canto II, BD Biosciences)를 통해 형광 intensity를 측정하였다. 최소 각 샘플에서 2 x 10^4 개의 세포를 counting했고 각 세포의 형광 distribution을 분석하여 histogram으로 나타냈다.

9. Scratch-wound assay

6-well plate에 3 x 10^5 개의 세포를 분주한 후 다음 날 yellow pipette tip으로 세포를 긁었다. PBS로 두 번 wash한 후 10 % FBS가 들어간 DMEM에서 37 ℃, 5 % CO_2 조건으로 12시간 동안 배양했다. 상처가 생긴 지역으로의 세포의 이동 양상을 사진 촬영 후 분석했다. Covered area는 0시간 째의 처음 wound area에서 12시간 후 wound area를 빼는 방식으로 계산했다. 실험은 triplicate로 진행되었다.

10. Tube formation assay

Tube formation assay는 Cao *et al.*의 방식으로 수정하여 진행했다[Cao *et al.*, 2020]. 6-well plate에 1.5 x 10^5 개의 세포를 분주하였다. 다음 날 세포를 trypsin-EDTA로 떼어내고 10 % FBS와 1 % antibiotic-antimycotic이 들어간 DMEM으로 중화한 후 원심분리하여 harvest 했다. PBS로 wash 한 후 serum-free DMEM으로 resuspension하여 Matrigel로 사전에 coating 한 96-well plate에 3 x 10^4 개의 세포를 분주하였다. Matrigel로 coating한 96-well plate는 실험하기 전에 Matrigel 100 μL를 well에 분주하고 1시간 동안 37 ℃에서 굳힌 후 사용하였다. 세포 분주 후 6시간 동안 37 ℃, 5 % CO_2에서 배양했고, tube formation을 현미경으로 관찰했다. Mesh 형성은 ImageJ의 "Angiogenesis Analyzer" software plugin을 사용하여 분석되었다.

11. ROS scavengers와 inhibitors 처리

본 연구에서 NAC, catalase, SOD, Mito-TEMPO는 각각 1mM, 300 units/mL, 300 units/mL, 50 μM로 사용되었다. Allopurinol, GKT137831, VAS2780, ML171은 각각 50 μM, 50 μM, 5 μM, 5 μM로 사용되었다. ROS scavengers와 inhibitors는 세포에 처리 후 overnight 동안 배양되었으며, 다음 날 각각의 ROS probe를 이용하여 형광 현미경 또는 confocal 현미경으로 관찰하였다.

12. RNS 축적 조사

Nitric oxide 염색을 위해 세포를 DAF-FM 5 μM로 30분 동안 37 ℃, 5 % CO_2가 공급된 상태로 배양하였고, peroxynitrite 염색은 DHR123 10 μM로 30분 동안 같은 상태에서 배양하였다. 염색된 세포는 형광 현미경 (Nikon FL)로 관찰되었다.

13. Cell cycle 조사

Cell cycle 조사는 propionic iodide (PI)로 세포를 염색한 후 DNA content를 측정하는 방식으로 진행되었다. 세포는 12-well plate에 3 x 10^4의 농도로 분주한 후 37 ℃, 5 % CO_2가 공급된 상태로 12시간 동안 배양하였다. 12시간 배양 후 SOD, NAC을 *Sephs1* KO 세포에 처리하고 37 ℃, 5 % CO_2가 공급된 상태로 overnight 동안 배양하였다. 다음 날 세포를 harvest하고 PBS로 한 번 wash한 후 70 % ethanol로

4 ℃에서 overnight으로 고정하였다. 고정된 세포는 PBS로 두 번 wash한 후 RNase A (200 μg/mL)을 포함한 PBS에 resuspension하고 상온에서 10분 동안 incubation 했다. 그 후 세포는 100 μg/mL의 PI가 포함된 PBS에서 상온 30분 동안 incubation 되었고, 염색된 세포는 FACS (Canto II, BD Biosciences)와 FlowJo software를 사용하여 분석하였다.

14. BrdU incorporation assay

BrdU incorporation assay는 BrdU Labeling and Detection Kit를 이용하여 manufacturer's instructions에 따라 수행하였다. 세포는 24-well plate에 1.5 x 10^4의 농도로 분주하고 37 ℃, 5 % CO_2가 공급된 상태로 overnight 동안 배양하였다. 다음날 BrdU를 10 μg/mL의 농도로 growth media에 넣어준 뒤 2시간 동안 배양한 후, anti-BrdU 항체를 이용하여 immunocytochemistry로 BrdU를 detect하여 confocal 현미경 (Carl Zeiss)로 관찰하였다.

15. 통계

각 실험은 통계 분석을 위해 독립적인 3회 반복 실험으로 진행되었다. 통계적 유의성은 Tukey's multiple comparison test를 통해 one-way ANOVA로 검증하였다.

제 3 장 결 과

1. *Sephs1* KO 세포와 rescue 세포의 제작 및 검증

이번 연구의 목적인 혈관 내피세포에서 *Sephs1*의 KO를 유도하고 이에 따른 표현형과 그 중에서 산화-환원 항상성 조절에 미치는 *Sephs1*의 기능을 연구하기 위해 생쥐의 혈관 내피 암세포인 2H11 세포주에 *Sephs1* KO을 유도하였다. 선행연구에서 *Sephs1*의 KO는 shRNA에 의한 knockdown을 통해 유도되었다[Tobe *et al.*, 2016]. 그러나 이번 연구에서는 *Sephs1* KO 유도 효율을 높이고 반 영구적인 KO를 유지하고자 CRISPR-Cas9 시스템을 이용하여 *Sephs1*의 KO를 유도하였다. *Sephs1* exon 8에 상보적으로 결합할 수 있는 sgRNA와 Cas9을 2H11 세포에 lentivirus를 통해 전달하였고, 감염된 2H11 세포를 single cell selection을 통해 KO candidate를 선별 후 DNA sequencing으로 KO가 잘 유도되었는지 검증하였다[그림 1]. 또한 2H11 세포에서 *Sephs1* KO를 통해 나타난 표현형의 off-target effect를 배제하고자 아미노산 서열에는 변화가 없으나 PAM sequence와 sgRNA의 염기서열에 silent mutation을 유도하여 CRISPR-Cas9에 의한 KO를 회피하는 *Sephs1* CDS를 제작하여 *Sephs1* KO 세포에서 이의 발현을 회복시킨 rescue mutant를 제작하였다. 제작된 KO 세포 및 rescue mutant의 경우 각각 immunocytochemistry를 통해 SEPHS1의 양을 조사하였다. 그 결과 *Sephs1*의 KO을 유도한 2H11 세포에서 SEPHS1의 형광 시그널이 사라진 것을 확인하였고, 이의 발현이 rescue에서 다시 회복된 것을 확인하였다[그림 2]. 또한 SEPHS1의 deficiency로 인한

morphological change를 조사한 결과, 세포의 형태가 spindle과 같이 가늘고 긴 형태로 변화하였다[그림 3]. 특히 [그림 3]의 아래 panel에서 focal adhesion kinase (FAK)를 염색했을 때 lamellipodia에 있는 focal adhesion이 *Sephs1* KO 세포에서 제대로 형성되지 않았기 때문에 cell adhesion 능력이 떨어져 이러한 morphology가 나타나는 것으로 추측된다.

```
        1317
WT      TGGCGAAGATGGCCGCTGTGAGCAAAGCCTGC-GGAAACATGTTCGGCCTAATGCATGGGACCTGCCCAGAGACGTCAGGTA
KO #1   TGGCGAAGATGGCCGCTGTGAGCAAAGCCTGC----AACATGTTCGGCCTAATGCATGGGACCTGCCCAGAGACGTCAGGTA
KO #2   TGGCGAAGATGGCCGCTGTGAGCAAAGCCTGCTCTTTACATGTTCGGCCTAATGCATGGGACCTGCCCAGAGACGTCAGGTA
KO #3   TGGCGAAGATGGCCGCTGTGAGCAAAGCCTGC--GAAACATGTTCGGCCTAATGCATGGGACCTGCCCAGAGACGTCAGGTA
KO #4   TGGCGAAGATGGCCGCTGTGAGCAAAGCCTG-----------------------------------------------
Res     TGGCGAAGATGGCCGCTGTGAGCAAAGCATGT-GGCAATATGTTTGGATTGATGCATGGGACCTGCCCAGAGACGTCAGGTA

WT      AAAAGGGCGGGGTGGGTGCTGTTCCCTGGCCTGAGGGTTCAAGTCTGAGCCTGACACCCATGCCTTCCCCCTGCTGGGAGTT
KO #1   AAAAGGGCGGGGTGGGTGCTGTTCCCTGGCCTGAGGGTTCAAGTCTGAGCCTGACACCCATGCCTTCCCCCTGCTGGGAGTT
KO #2   AAAAGGGCGGGGTGGGTGCTGTTCCCTGGCCTGAGGGTTCAAGTCTGAGCCTGACACCCATGCCTTCCCCCTGCTGGGAGTT
KO #3   AAAAGGGCGGGGTGGGTGCTGTTCCCTGGCCTGAGGGTTCAAGTCTGAGCCTGACACCCATGCCTTCCCCCTGCTGGGAGTT
KO #4   ---------------------------------------------------ACACCCATGCCTTCCCC-TGCTGGGAGTT
Res     AAAAGGGCGGGGTGGGTGCTGTTCCCTGGCCTGAGGGTTCAAGTCTGAGCCTGACACCCATGCCTTCCCCCTGCTGGGAGTT
```

그림 1. *Sephs1* KO 세포와 rescue 세포의 DNA sequencing 결과. 이 논문에서 사용된 cell line의 *Sephs1* coding sequence (1317부터)를 align하였다. sgRNA는 box 표시되었고, PAM sequence는 밑줄로 표시되었다. *Sephs1* KO cell line에서 deletion mutation은 –로 표시되었고, insertion mutation은 진한 글씨이며, rescue cell line에서 substitution mutation은 진한 빨간 글씨로 표시되었다.

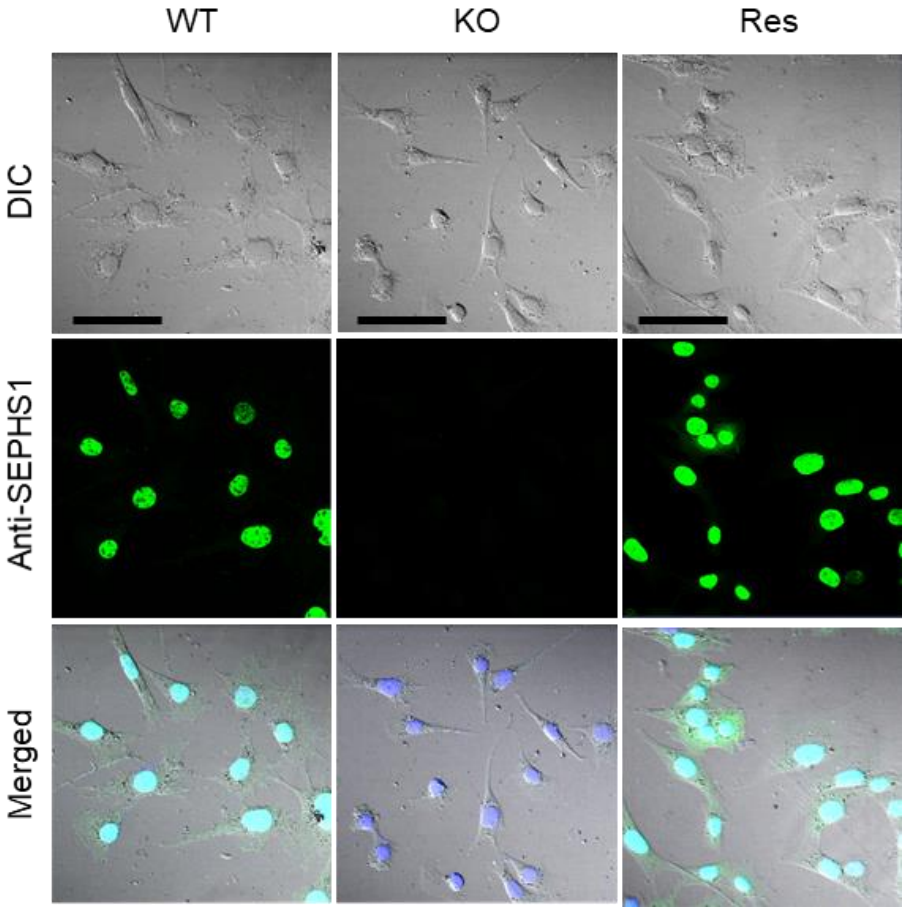


그림 2. *Sephs1* KO 세포와 rescue 세포의 SEPHS1 발현 검증. Immunocytochemistry를 통해 SEPHS1의 발현을 확인하였다. Scale bar는 100 μm를 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue; DIC, differential interference contrast.

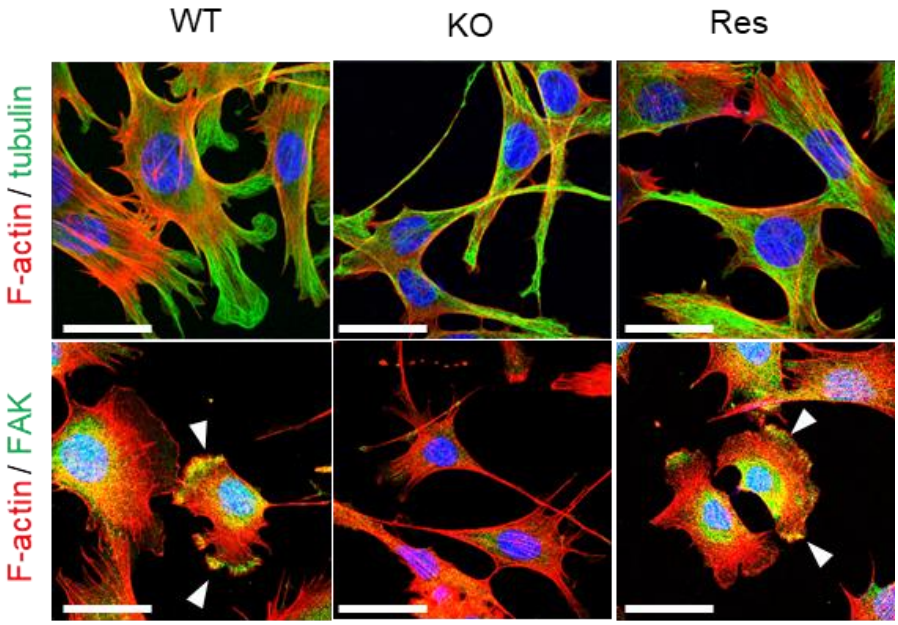
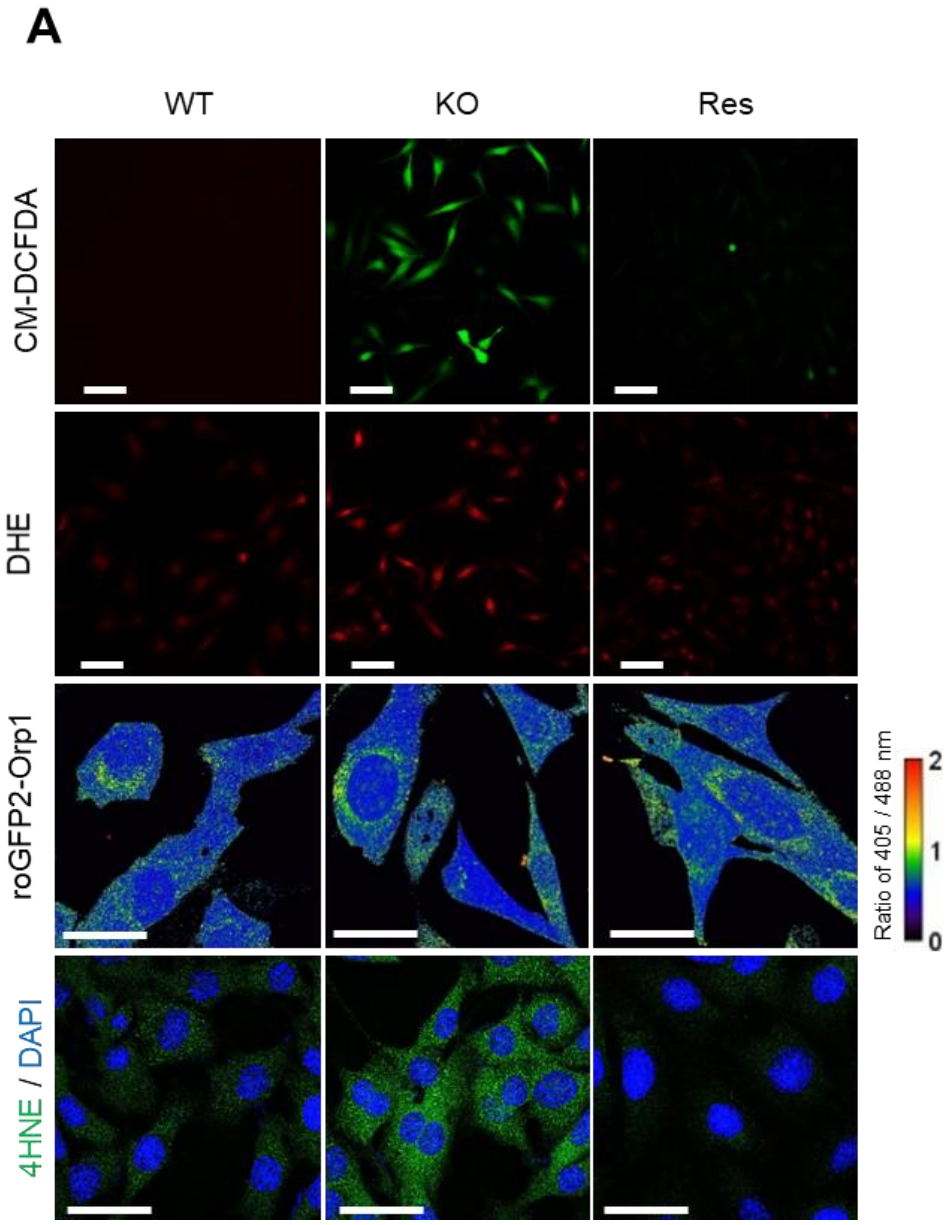


그림 3. *Sephs1* KO 세포의 세포골격 염색. 위의 panel에서는 F-actin과 tubulin이 각각 빨간색과 초록색으로 염색되었으며, 아래 panel에서는 F-actin과 FAK가 각각 빨간색과 초록색으로 염색되었다. 아래 panel의 화살표는 focal adhesion을 나타내고, 대부분의 FAK가 F-actin과 겹쳐지기 때문에 노란색으로 보인다. Scale bar는 50 μm를 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue; FAK, focal adhesion kinase.

2. *Sephs1* KO 혈관 내피 암세포에서 superoxide와 lipid peroxide 축적 관찰

SEPHS1의 deficiency를 유도한 선행연구[Tobe *et al.*, 2016]에서 공통적으로 세포 내 ROS의 축적이 관찰되었기 때문에 이번 연구에서 ROS 축적 여부를 우선적으로 관찰하였다. ROS의 축적 조사는 일반적인 ROS를 CM-DCFDA로 염색하여 형광 시그널의 세기를 조사하였고, superoxide는 특이적인 probe인 dihydroethidium (DHE)를 통해 조사하였다. 또한 hydrogen peroxide의 경우 유전적으로 제작된 특이적 probe인 roGFP2-Orp1을 retrovirus를 통해 wild type (WT)과 *Sephs1* KO, rescue mutant에 도입한 후 probe의 산화 상태를 조사하였고, lipid peroxide의 축적 여부를 조사하기 위해 lipid peroxidation의 부 생성물인 4-hydroxynonenal (4-HNE)를 immunocytochemistry를 통해 조사하였다. 그 결과 *Sephs1* KO 세포에서 CM-DCFDA 및 DHE의 형광의 세기가 각각 2.34, 2.23 배 증가한 것을 관찰하였고, 이는 rescue mutant에서 WT와 비슷한 수준으로 회복되었다. 그러나 이와 반대로 hydrogen peroxide는 각 세포 간 유의미한 차이를 나타내지 않았다. Lipid peroxidation의 경우 *Sephs1* KO에서 WT 대비 2 배 가량 증가하였고, 이 또한 rescue mutant에서 회복되었다[그림 4]. 이러한 결과는 2H11 세포에서 *Sephs1*의 KO이 superoxide 및 lipid peroxide의 축적을 유도하나 hydrogen peroxide의 축적에는 크게 기여하지 않는 점을 시사한다. 이를 검증하기 위해 superoxide, hydrogen peroxide의 특이적 scavenger로 알려진 SOD, catalase를 세포에 처리하여 일반적인 ROS 수준의 변화를 조사하였다[그림 5]. N-acetyl cysteine (NAC)은 ROS

scavenging의 양성대조군으로서 사용하였다. 그 결과 SOD 및 NAC을 처리한 그룹에서 CM-DCFDA의 형광 세기가 KO 세포에 비해 유의미하게 감소하였고, catalase를 처리한 *Sephs1* KO 세포에서 형광 시그널의 변화가 미미하였다. 이러한 결과는 *Sephs1* KO이 유도된 2H11 세포에서 superoxide가 축적됨을 시사한다.


A
WT
KO
Res
CM-DCFDA
DHE
roGFP2-Orp1
4HNE / DAPI
Ratio of 405 / 488 nm
2
1
0

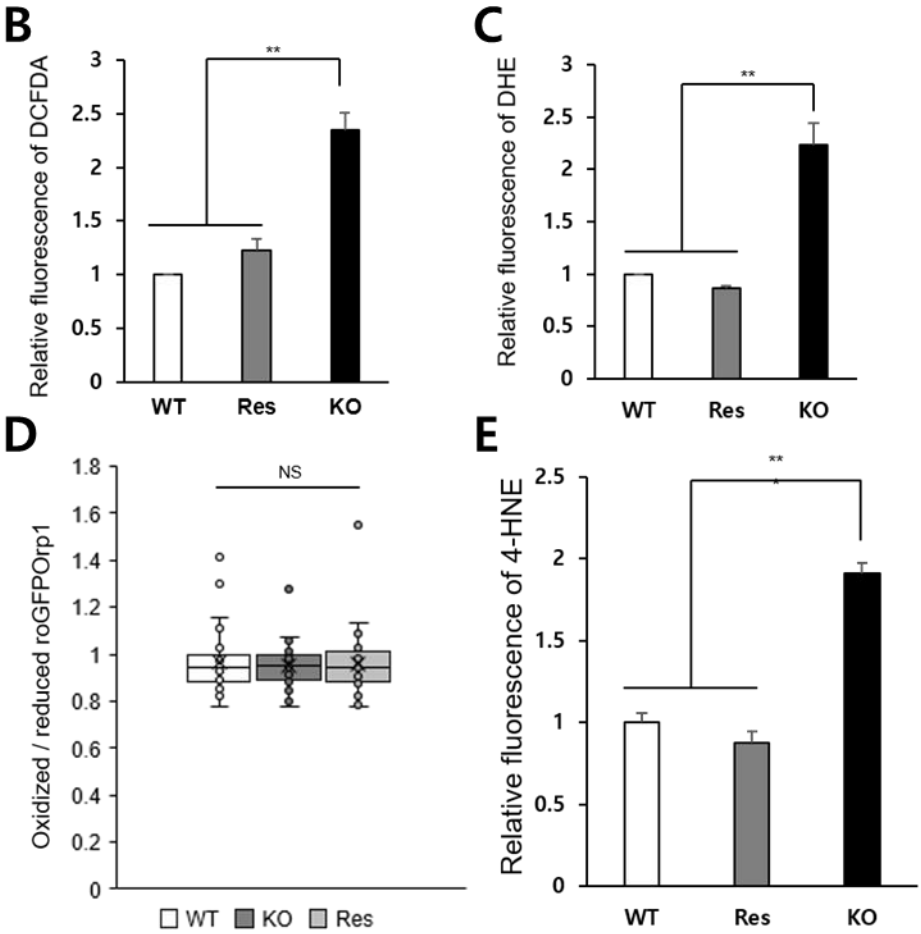


그림 4. *Sephs1* KO 세포의 ROS와 lipid peroxide 축적. (A) 일반적인 ROS 염색을 위해 CM-DCFDA, superoxide 염색을 위해 DHE를 사용했고, hydrogen peroxide를 조사하기 위해 roGFP2-Orp1 probe를 이용했으며, lipid peroxide를 조사하기 위해 anti-4HNE로 immunocytochemistry를 하였다. Oxidized Orp (405 nm)와 reduced Orp (488 nm)의 ratio는 재료 및 방법에 언급한 대로 계산하였다. Scale bar는 CM-DCFDA, DHE의 경우 100 μm, roGFP2-Orp1와 4HNE의 경우 50 μm를 나타낸다. (B) CM-DCFDA의 형광 시그널을 유세포 분석으로 정량화하였다. (C) DHE의 형광 시그널을 유세포 분석으로 정량화하였다. (D) Oxidized Orp (405 nm)/Reduced (488 nm) roGFP2-Orp1 probe의 ratio를 box plot으로 나타냈다. (E) 면역화학염색으로 detect한 4-HNE의 형광 시그널 세기를 정량화하였다. NS와 **은 각각 not significant와 p-value < 0.01을 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

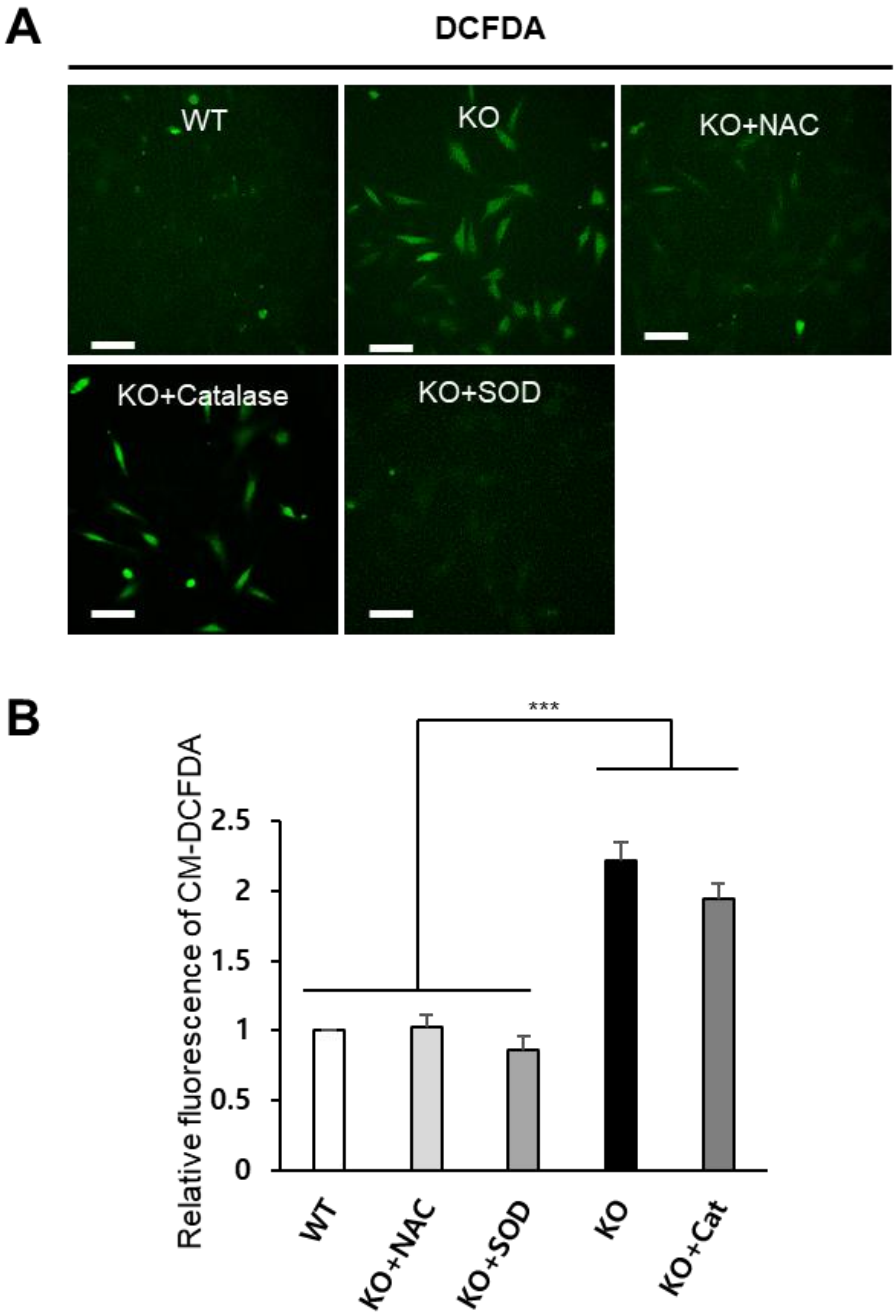


그림 5. *Sephs1* KO 세포에서 축적된 ROS 종류 특정. (A) 여러 scavenger를 Sephs1 KO 세포에 처리한 후 CM-DCFDA로 염색한 결과 superoxide가 축적된 것을 확인하였다. Scale bar는 100 μm를 나타낸다. (B) (A)의 형광 시그널 세기를 정량화하였다. ***는 p-value < 0.001을 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

3. SEPHS1 deficiency로 인한 XO와 NOX4 활성화

이러한 superoxide의 축적 기전을 규명하고자 superoxide의 생성 경로에 간섭하는 특이적인 scavenger 혹은 inhibitor를 *Sephs1* KO 세포에 처리하여 superoxide의 level 변화를 조사하였다. Superoxide의 주된 생성 장소인 미토콘드리아의 전자전달계의 영향을 조사하고자 특이적 scavenger인 Mito-TEMPO를 처리하였고, 세포질에서의 superoxide 발생 정도를 조사하기 위해 selective inhibitor인 allopurinol (xanthine oxidoreductase), GKT (NOX 1, 4), VAS2780 (NOX2), ML171 (NOX1)을 각각 *Sephs1* KO 세포에 처리하고 DHE의 형광 세기를 조사하였다[그림 6]. 그 결과 allopurinol 및 GKT를 처리한 KO 세포에서 DHE의 형광 세기가 감소하였고, 나머지 처리군에서는 큰 변화를 나타내지 못했다. 이러한 결과는 2H11 세포에서 *Sephs1* KO로 인한 superoxide의 축적은 xanthine oxidase 및 NOX4에 의한 것임을 시사한다.

위의 결과의 보다 정확한 검증을 위해 xanthine oxidoreductase (XOR)의 상태를 조사하였다. Xanthine oxidoreductase는 xanthine dehydrogenase (XDH)와 xanthine oxidase (XO)로 구성되며, XO의 경우 XDH의 proteolytic cleaved 형태로 hypoxanthine을 xanthine, xanthine을 uric acid로 만드는 과정에서 물과 산소를 이용해 superoxide와 hydrogen peroxide를 형성한다[Nishino *et al.*, 2008]. 따라서 이를 검증하기 위해 western blot을 통해 XDH와 XO의 양을 조사하였다. 그 결과 *Sephs1* KO 세포에서 XDH 대비 XO의 밴드가 WT보다 약 1.6 배 증가하였고, rescue mutant에서 WT와 비슷한 수준으로 감소하였다 [그림 7A]. 한편 superoxide 축적에 대한 NOX

family의 영향을 보다 면밀하게 규명하기 위해 mouse endothelial cell에서 발현하는 것으로 알려진 *Nox1, Nox2, Nox4*의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통해 확인하였다. 그 결과 *Sephs1* KO 세포에서 *Nox1*, *Nox2*의 발현은 WT에 비해 유의미한 변화가 나타나지 않았으나, *Nox4*의 경우 WT 대비 약 3 배 가량 발현이 증가한 것을 관찰하였다[그림 7B]. 종합하여 SEPHS1의 deficiency가 XO와 *Nox4* 활성화가 superoxide의 축적을 유도한 것으로 판단된다.

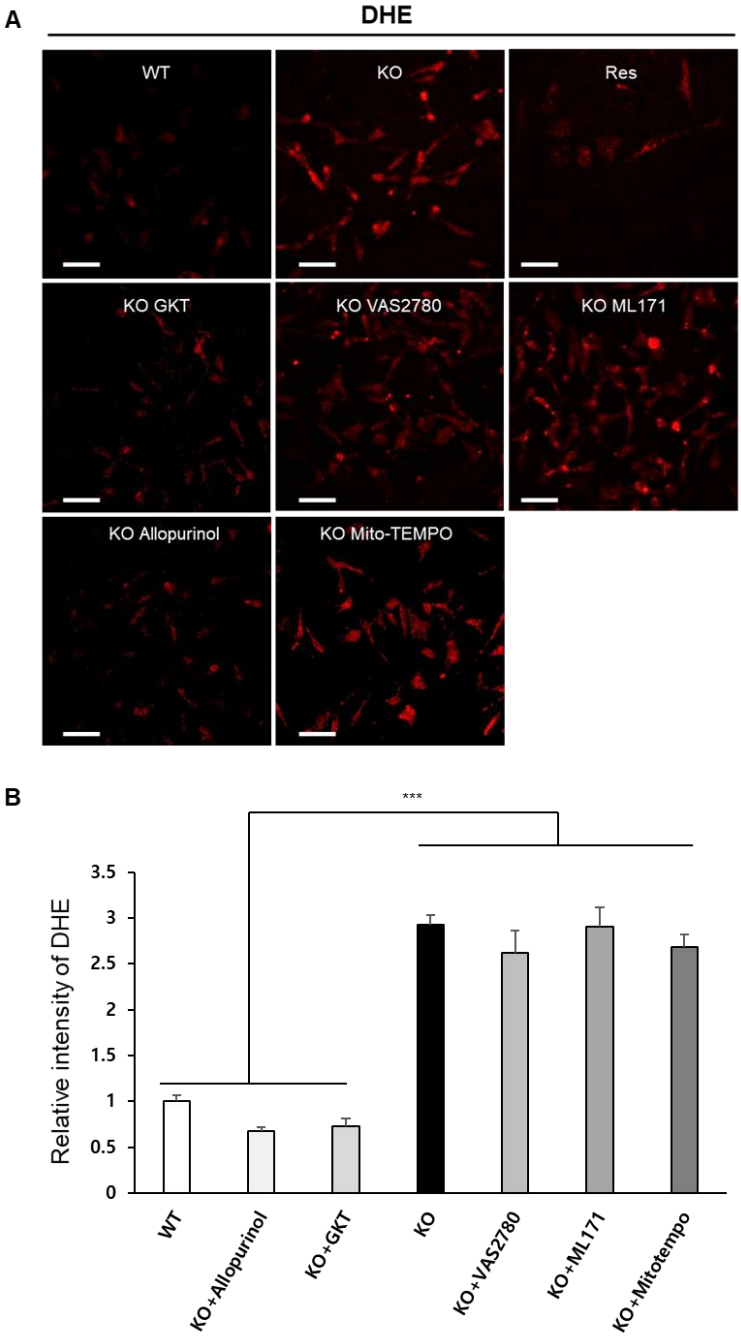


그림 6. Superoxide 축적 경로 조사. (A) *Sephs1* KO 세포에 superoxide 생성 inhibitors (allopurinol, GKT, VAS2780, ML171) 또는 superoxide scavenger (Mito-TEMPO)를 처리한 후 DHE 염색을 진행하였다. Scale bar는 100 μm를 나타낸다. (B) (A)의 DHE 형광 시그널 세기를 정량화하였다. ***은 p-value < 0.001을 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

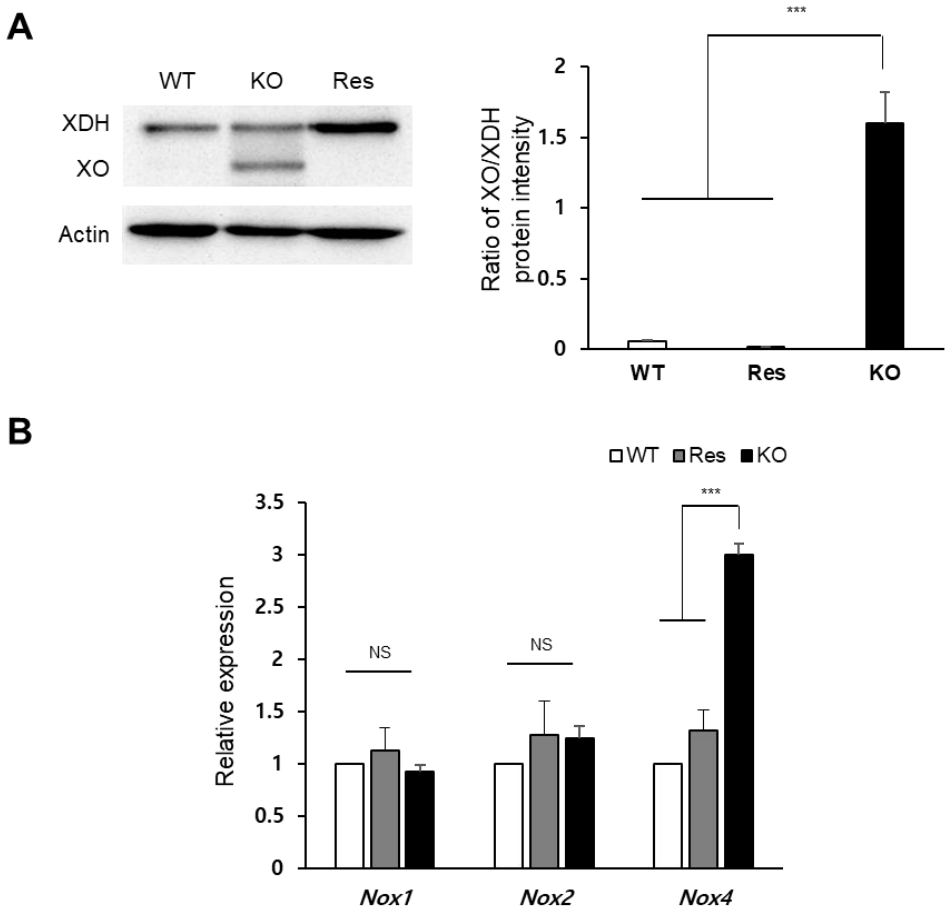


그림 7. Xanthine oxidase와 NADPH oxidase isoforms의 변화 조사. (A) Anti-XOR 항체를 사용하여 western blot을 진행하였다. Actin은 internal control로 사용되었다. XDH, xanthine dehydrogenase; XO, xanthine oxidase. (B) qRT-PCR로 NADPH oxidase들의 상대적인 유전자 발현 (relative expression) 정도를 비교하였다. Relative expression은 wild type (WT), knockout (KO), rescue (Res)의 ΔCt 비율을 나타낸다. NS와 ***은 각각 not significant와 p-value < 0.001을 나타낸다.

4. SEPHS1 deficiency로 인한 redox regulator 변화 조사 및 RNS 감소 관찰

SEPHS1 deficiency에 의해 축적된 superoxide는 주로 xanthine oxidase 및 *Nox4*를 통해 축적된 것으로 판단된다. 따라서 그 다음으로 superoxide를 제거하는 scavenger의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통해 조사하였다. 그 결과 cytoplasmic SOD인 *Sod1*과 extracellular space에 위치하는 *Sod3*이 WT 대비 각각 약 50 %, 30 % 수준으로 감소하였으나 미토콘드리아에 주로 존재하는 *Sod2*의 경우 WT와 큰 차이를 나타내지 않았으며, hydrogen peroxide를 제거하는 *catalase* 및 *Gpx1* 또한 WT와 유의미한 차이를 나타내지 못했다[그림 8]. 한편 lipid peroxidation 산물들을 제거하는 *Glrx* (glutaredoxin), *Prdx1* (peroxiredoxin 1), *Gsta4* (glutathione S-transferase alpha 4), *Gpx4* (glutathione peroxidase 4)의 mRNA 발현 역시 SEPHS1의 deficiency에 의해 감소하였음을 확인하였다. 이러한 결과는 SEPHS1의 deficiency가 superoxide와 lipid peroxide의 제거에 관여하는 다양한 scavenger의 유전자 발현에 영향을 미쳤고, 이를 통해 세포의 산화 스트레스 축적에 기여하였음을 시사한다.

다음으로 산화-환원 항상성 조절에 참여하는 RNS의 영향을 조사하기 위해 NO 및 peroxynitrite 특이적 probe인 DAF-FM, DHR123을 통해 각각의 level을 조사하였다[그림 9]. 그 결과 두 가지 probe의 signal 모두 *Sephs1* KO에서 감소한 것을 관찰하였다. Nitric oxide가 줄어든 원인을 찾아보고자 nitric oxide synthase (NOS)의 mRNA 발현을 qRT-PCR을 통해 확인해본 결과 *Nos2*와 *Nos3*의 발현 모두 *Sephs1* KO 세포에서 감소하였으며, rescue mutant에서 회복한

것을 관찰하였다[그림 10]. Peroxynitrite는 superoxide와 NO가 반응하여 생성되는데, *Sephs1* KO 세포에서 superoxide는 축적되어 있지만 NO의 양은 부족하기 때문에 peroxynitrite 역시 감소한 것으로 추측된다.

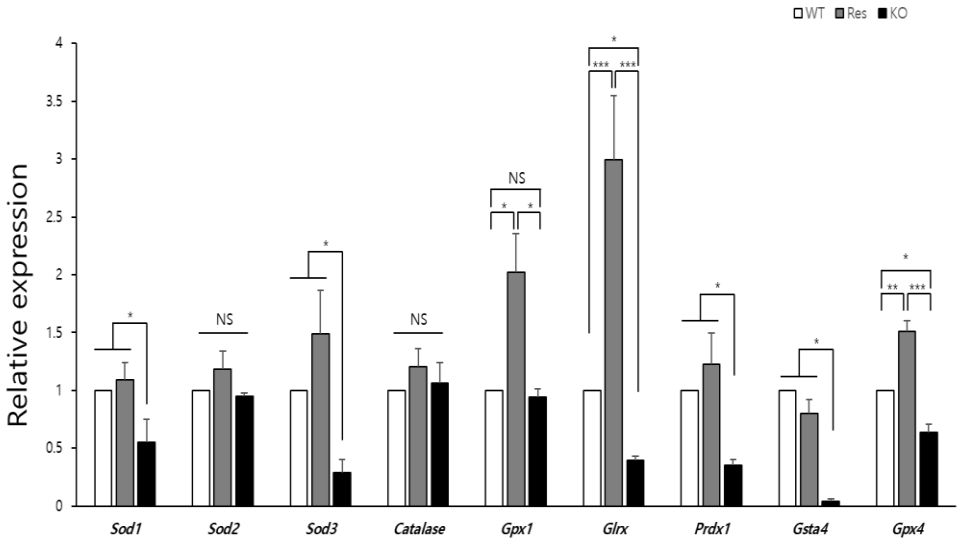


그림 8. Superoxide, hydrogen peroxide, lipid peroxide의 scavenger 유전자들의 발현 비교. qRT-PCR로 각 유전자의 발현 level을 측정하였다. NS, *, **, ***은 각각 not significant와 p-value < 0.05, 0.01, 0.001을 나타낸다. 실험에 사용된 primer는 [표 1]에서 확인할 수 있다. WT, wild type; Res, rescue; KO, knockout.

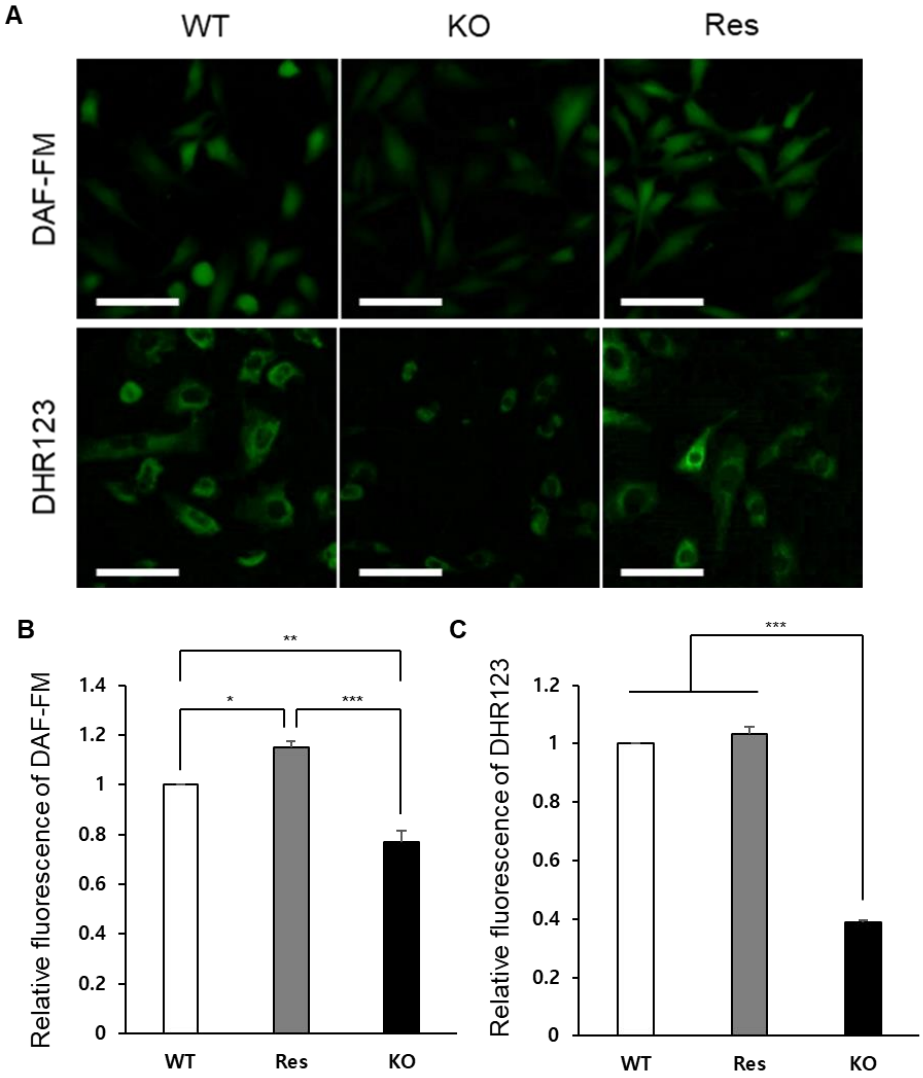


그림 9. *Sephs1* KO 세포에서 RNS 변화 조사. (A) Nitric oxide를 염색하기 위해 DAF-FM, peroxynitrite를 염색하기 위해 DHR123이 사용되었다. Scale bar는 100 μm를 나타낸다. (B) DAF-FM의 형광 시그널 세기를 정량화하였다. (C) DHR123의 형광 시그널 세기를 정량화하였다. *, **, ***은 각각 p-value < 0.05, 0.01. 0.001을 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

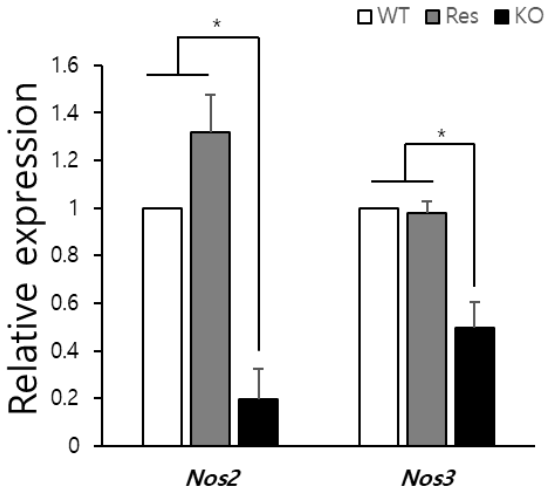


그림 10. *Sephs1* KO 세포에서 nitric oxide 생성에 관여하는 유전자 발현 변화 조사. qRT-PCR로 nitric oxide를 생성하는 *Nos2*, *Nos3*의 발현 변화를 조사하였다. *는 p-value < 0.05를 나타낸다. WT, wild type; Res, rescue; KO, knockout.

5. *Sephs1* KO 세포에서 DNA damage 축적으로 인한 G2/M phase arrest 및 세포 성장 감소

선행연구에서 SEPHS1의 deficiency가 포유동물 세포에서 세포의 성장을 저해하는 결과[Tobe *et al.*, 2016]가 나타났기 때문에 2H11 세포에서도 역시 *Sephs1* KO에 의한 세포 성장 저해 여부를 확인하고, 더 나아가 ROS 축적과의 상관관계를 조사하고자 BrdU incorporation assay를 진행하였다[그림 11]. 그 결과 *Sephs1* KO 세포에서 BrdU의 형광 시그널이 WT (71 %) 대비 약 3.5 배 감소하였으며 (20 %), 이는 rescue mutant에서 회복되었고 (65 %), NAC과 SOD를 처리한 *Sephs1* KO 그룹에서 회복되는 것을 관찰하였다 (각각 69 %와 65 %). 이러한 결과는 *Sephs1* KO에 의해 축적된 superoxide에 의해 세포의 성장이 저해됨을 시사한다. 이에 cell cycle 변화 양상을 확인해보기 위해 *Sephs1* KO 세포에서 PI staining 후 유세포 분석을 통한 DNA content 변화를 조사하였다[그림 12]. 그 결과 *Sephs1* KO 세포에서 G2/M phase에 해당하는 세포의 비율이 WT 대비 유의미하게 증가하였고, 이러한 변화는 rescue mutant와 NAC 및 SOD를 처리한 2H11 *Sephs1* KO 세포에서 회복되었다. 축적된 ROS, 특히 superoxide가 어떠한 경로를 통해 G2/M phase에 머물러 있는 세포의 비율을 증가시켰는지 조사하기 위해 western blot을 통해 cyclin A2, B1의 양을 각각 조사하였다[그림 13]. *Sephs1* KO 세포에서 G2 arrest marker인 cyclin A2의 양이 WT에 비해 증가하였고, NAC, SOD를 처리한 *Sephs1* KO 세포 및 rescue mutant에서 감소하였다. M phase arrest marker인 cyclin B1의 경우 *Sephs1* KO 세포에서 WT에 비해 감소했고 NAC, SOD를 처리한 *Sephs1* KO 세포와 rescue

mutant에서는 발현을 회복한 것으로 보아 *Sephs1*의 KO로 인해 축적된 superoxide가 G2/M phase arrest 중에서도 G2 check point에 머무르는 세포의 비율을 증가시킨 것으로 판단된다. *Sephs1* KO에 의한 G2/M phase arrest 유도 기전을 조사하기 위해 G2/M phase arrest의 중요한 원인 중 하나인 DNA double strand break를 gamma H2AX (H2AX의 인산화 형태) foci의 형성 여부로 조사해보기 위해 면역화학염색을 진행한 결과 *Sephs1* KO 세포에서 WT 대비 유의미한 수준으로 gamma H2AX foci가 형성되었고, 이는 NAC 및 SOD를 처리한 *Sephs1* KO 세포에서 사라지는 것을 관찰하였다[그림 14]. 이러한 결과는 SEPHS1 deficiency로 인해 축적된 superoxide에 의해 DNA damage가 유도되었음을 시사한다.

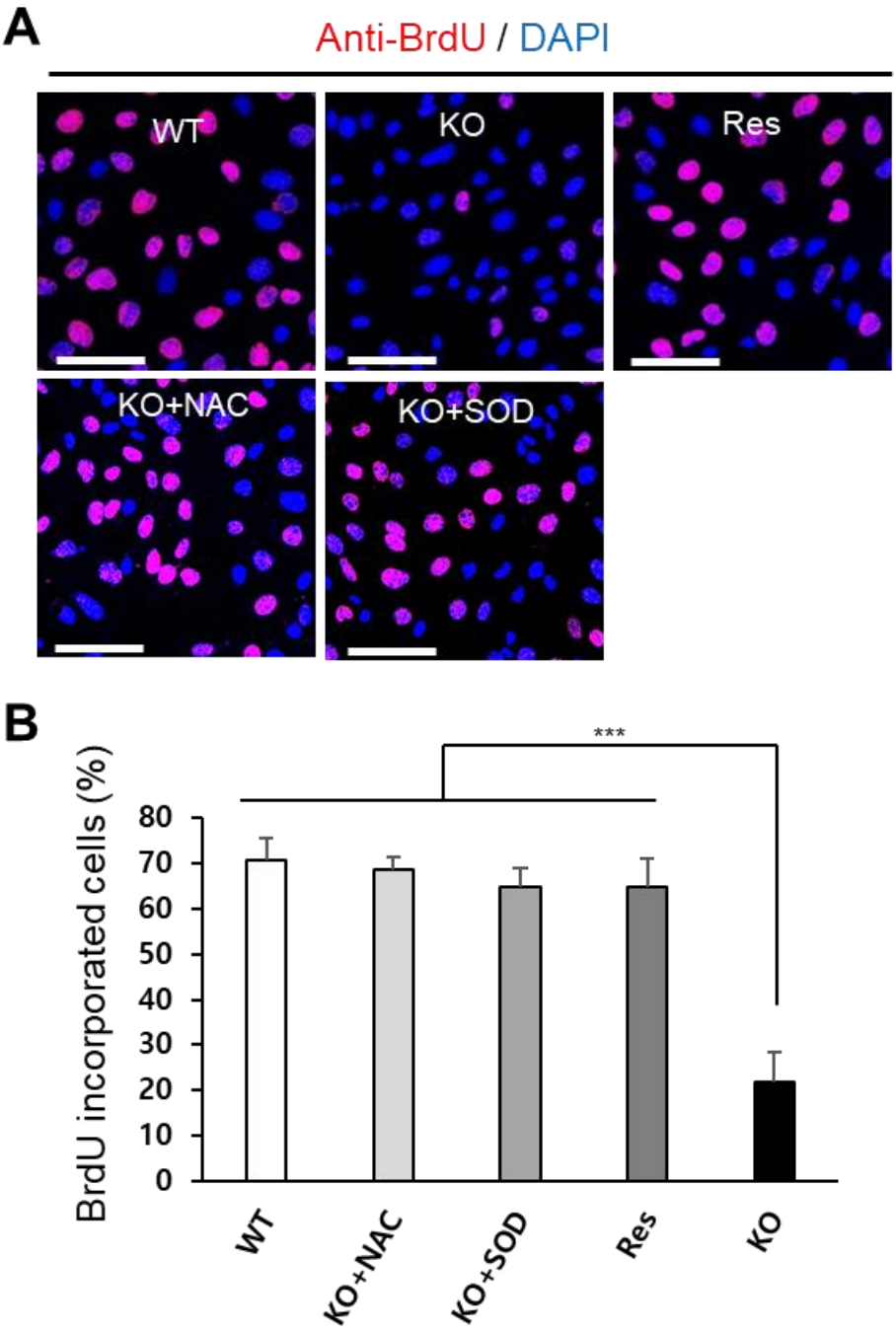


그림 11. BrdU assay를 통한 세포 분열 조사. (A) BrdU incorporation 시그널은 빨간색이며 핵은 DAPI (파란색)으로 counterstaining 되었다. Scale bar는 100 μm를 나타낸다. (B) BrdU incorporated 세포의 population의 비율을 측정했다. ***는 p-value < 0.001을 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

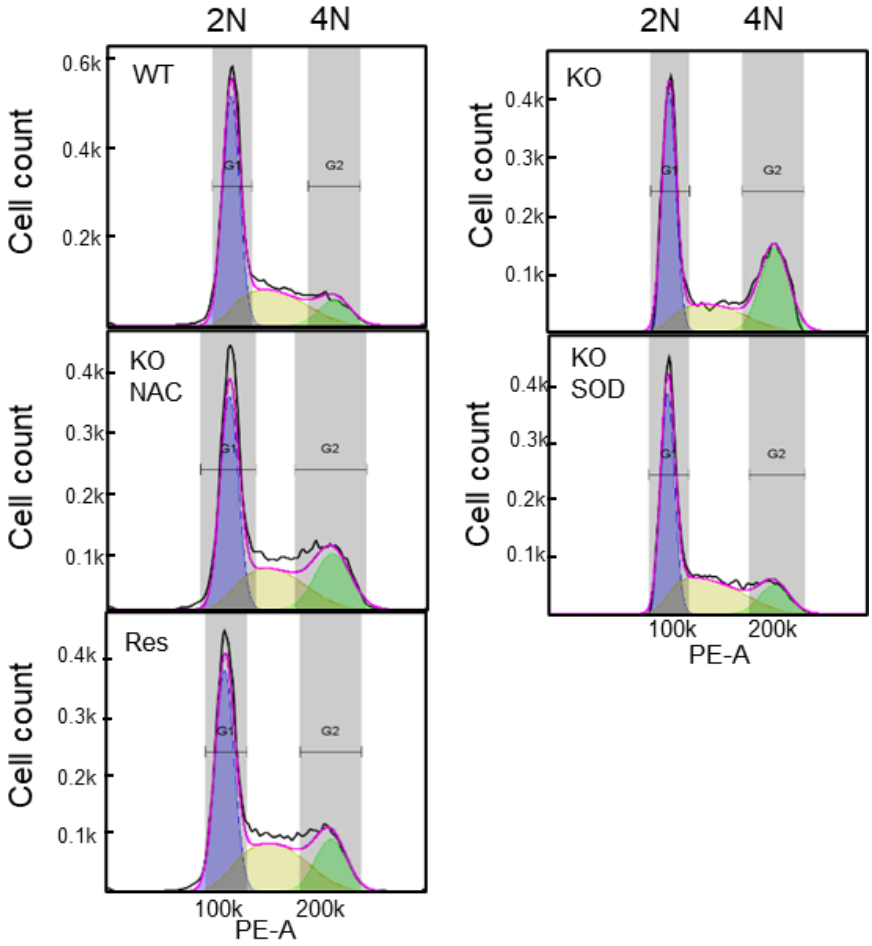


그림 12. Cell cycle progression에 *Sephs1*의 KO이 미치는 영향 조사. 세포는 PI로 염색된 후 유세포 분석이 진행되었다. 각 세포의 DNA content를 histogram으로 시각화하였다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

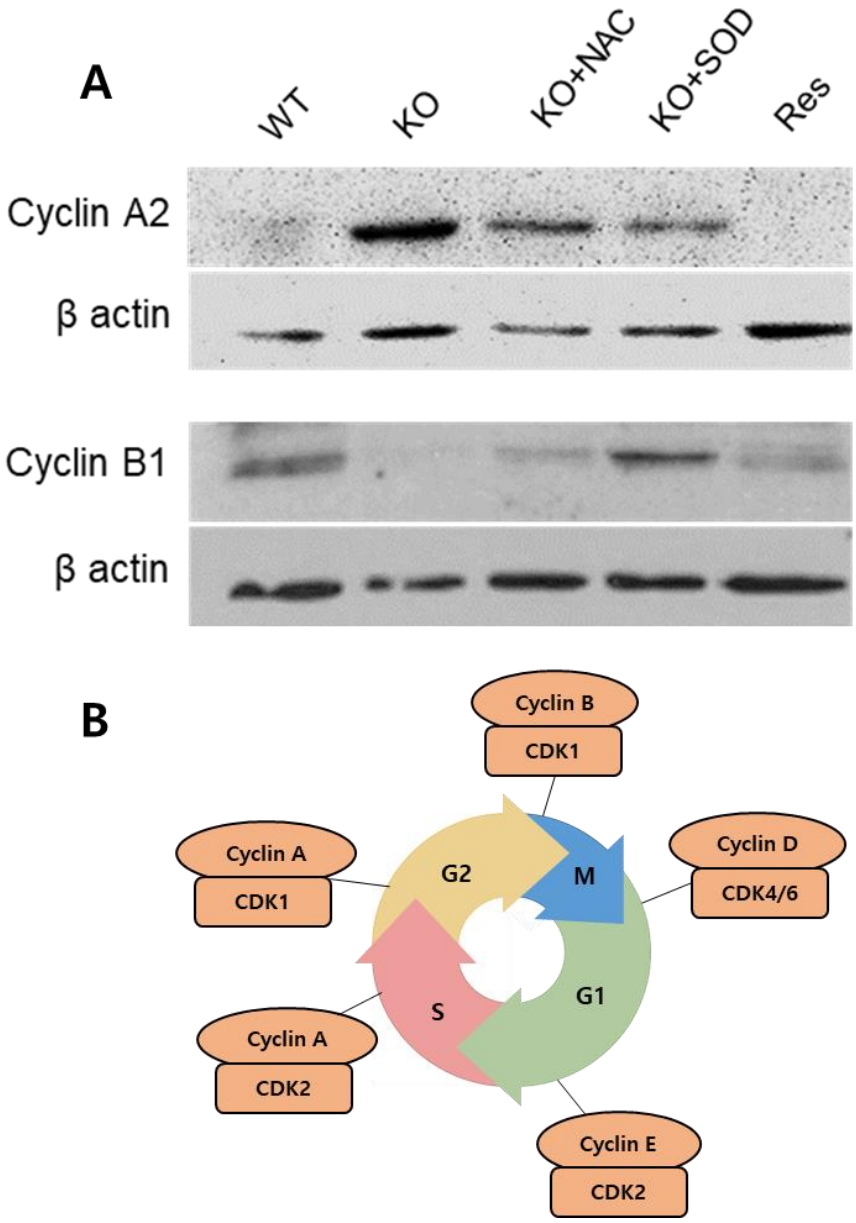


그림 13. Western blot으로 G2/M phase arrest marker의 발현 조사. (A) β actin이 internal control로 사용되었다. (B) Cell cycle progression에 관여하는 cyclin과 cyclin-dependent kinase (CDK)를 모식도로 나타내었다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

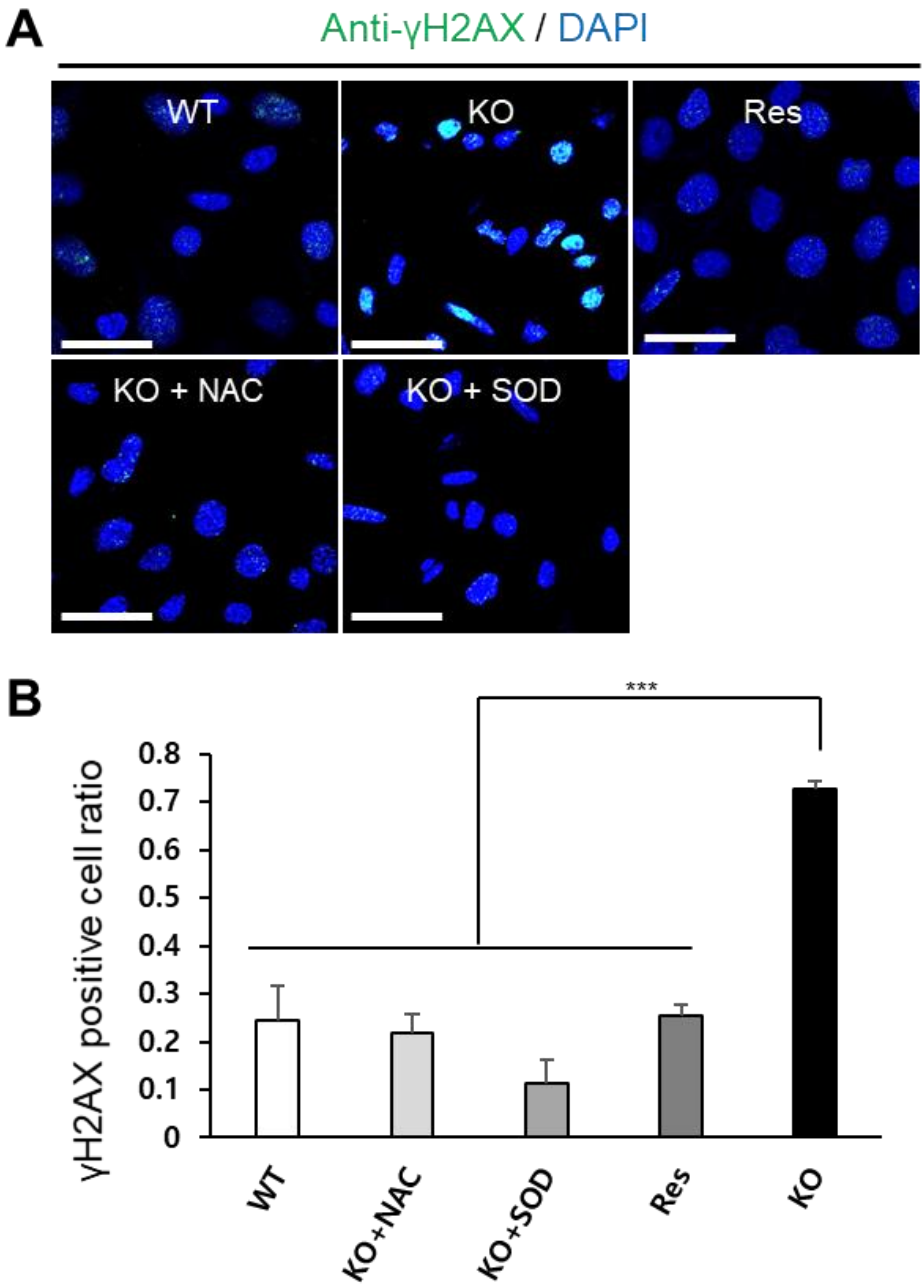


그림 14. γH2AX의 형성 여부 조사로 DNA damage 관찰. (A) 핵은 DAPI로 counterstaining 되었다. Scale bar는 50 μm를 나타낸다. (B) γH2AX의 형광 intensity를 정량화하였다. ***는 p-value < 0.001을 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

6. *Sephs1* KO 세포에서 혈관 신생 능력 저하

선행연구[Tobe *et al.*, 2016]에서 SEPHS1의 deficiency가 cell proliferation과 더불어 cell invasion과 같은 암세포의 malignancy를 저해하는 결과가 관찰되었다. 혈관 내피세포에서 혈관 신생은 매우 중요한 요소 중 하나이기 때문에 본 연구에서 *Sephs1*의 KO이 혈관 신생에 미치는 영향을 조사해보고자 scratch-wound assay와 tube formation assay를 진행하였다. 먼저 세포의 wound healing 능력을 scratch-wound assay를 통해 조사하였다 [그림 15]. 그 결과 *Sephs1* KO 세포에서 wound area로의 이동이 WT 대비 감소하였고, 이는 NAC과 SOD를 처리한 그룹에서 회복되었으며, rescue mutant에서 또한 회복되었다. 이러한 결과는 *Sephs1*의 KO에 의해 축적된 ROS가 세포의 wound healing 능력을 저해함을 시사한다. 다음으로 혈관 내피세포의 혈관 신생을 조사하기 위해 tube formation assay를 수행하였다. 그 결과 *Sephs1*의 KO이 내피세포의 혈관 신생을 저해한 것을 확인하였다[그림 16]. Tube 구조를 나타내는 mesh의 count를 통해 혈관 신생의 정도를 조사한 결과 *Sephs1* KO 세포에서 mesh가 전혀 형성되지 않았으나 NAC, SOD 및 angiotensin II 처리한 그룹에서 회복되었다. 특히 NAC과 angiotensin II를 동시에 처리한 그룹에서 WT와 거의 비슷한 수준으로 mesh의 형성이 회복된 바, *Sephs1*의 KO이 ROS의 축적과 RNS의 감소, 두 가지 요소를 통해 혈관 신생을 저해할 것으로 판단된다. 따라서 이러한 현상을 검증하기 위해 NAC, angiotensin II, NAC과 angiotensin II를 동시에 처리한 세포에서 ROS와 RNS의 변화를 조사하였다 [그림17]. 그 결과 *Sephs1* KO 세포에서 증가한 CM-DCFDA의 시그널이 NAC, NAC과 angiotensin

II를 동시에 처리한 그룹에서 각각 감소하였고, 흥미롭게도 angiotensin II를 처리한 그룹에서도 다소 감소하였다. 또한 DAF-FM을 통해 조사한 NO의 경우 NAC, angiotensin II, NAC과 angiotensin II를 동시에 처리한 그룹에서 모두 *Sephs1* KO에 의해 감소한 NO의 level을 회복하여 *Sephs1*의 KO에 의해 축적된 ROS 및 감소한 RNS의 영향으로 내피세포에서 혈관 신생이 저해될 것으로 판단된다.

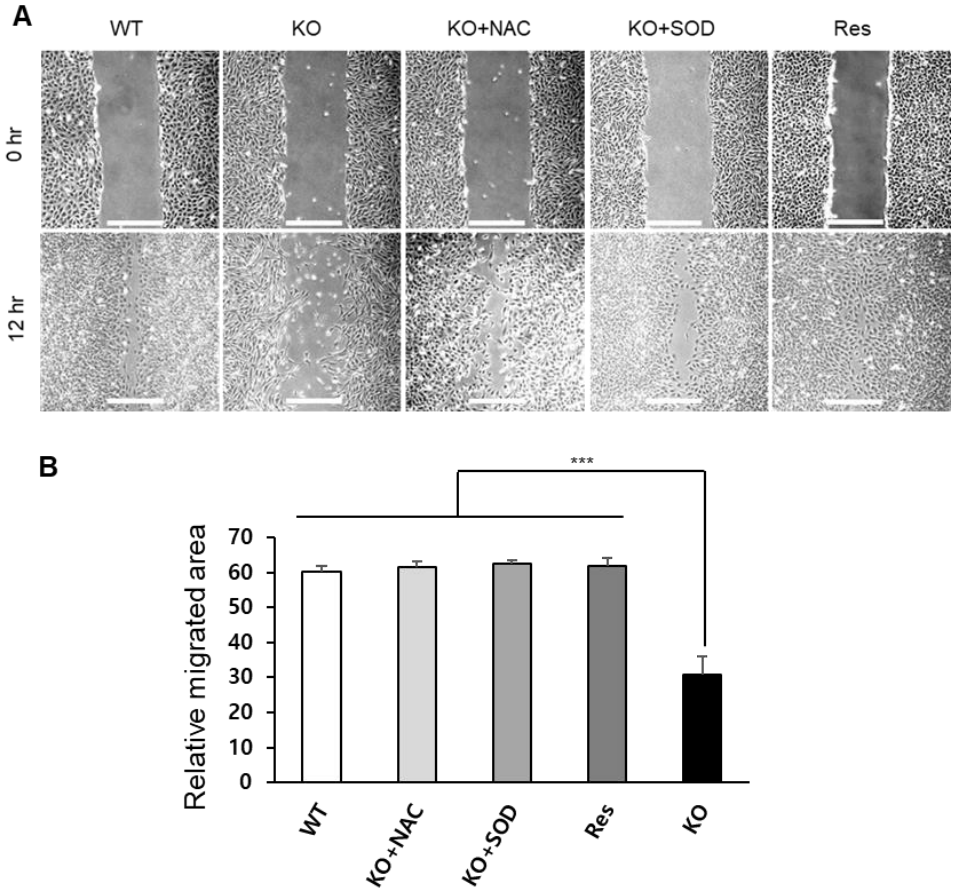


그림 15. 세포의 wound healing 능력 조사. (A) 2H11 세포의 wound healing 능력이 scratch-wound assay로 측정되었다. Scale bar는 500 μm를 나타낸다. (B) (A)에서 상대적인 wound healing 정도를 측정하였다. Migrated area는 ImageJ를 사용하여 재료 및 방법에 언급한 방식으로 측정되었다. ***는 p-value < 0.001을 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

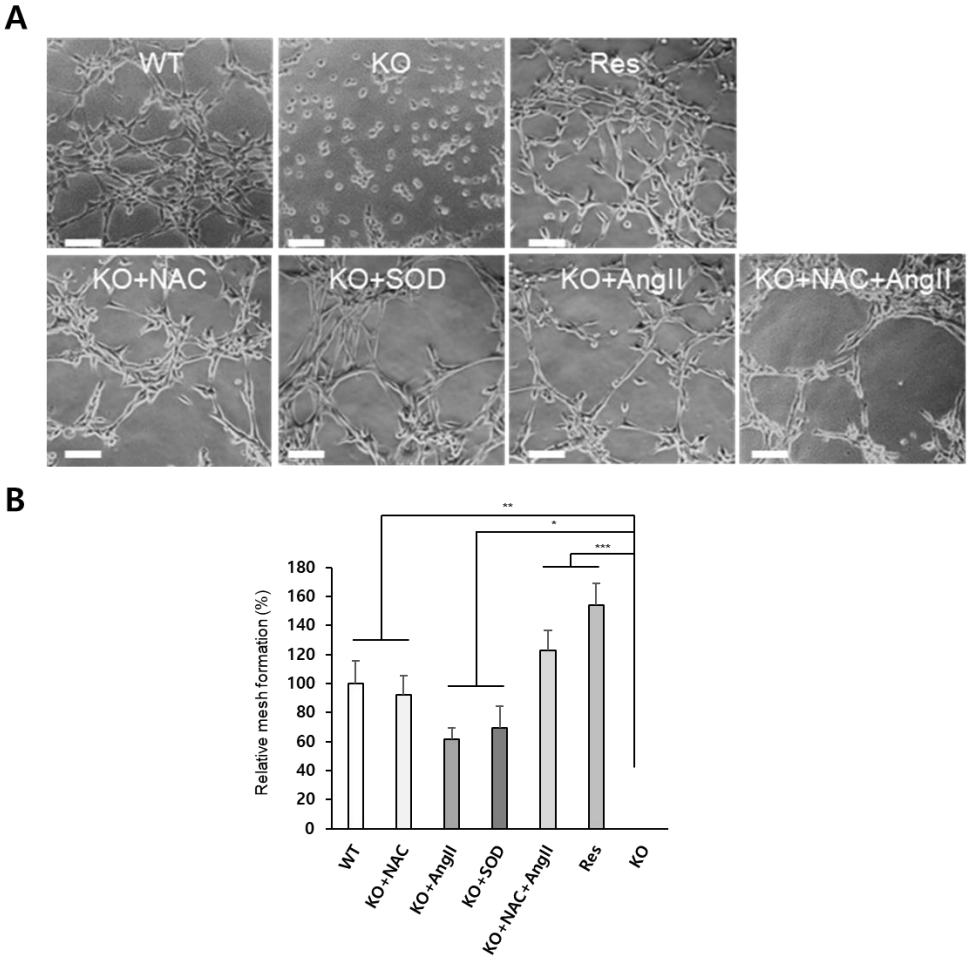


그림 16. *Sephs1* KO 세포에서 혈관 신생 능력 저하 관찰. (A) 혈관 신생 능력을 조사하기 위해 tube formation assay를 진행하였다. Scale bar는 100 μm를 나타낸다. (B) 각 세포 그룹에서 상대적인 mesh 형성 정도를 조사하였다. Mesh 개수와 이에 따른 상대적인 mesh 형성은 재료 및 방법에서 설명한 방식으로 분석했다. *, **, ***는 각각 p-value < 0.05, 0.01, 0.001을 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

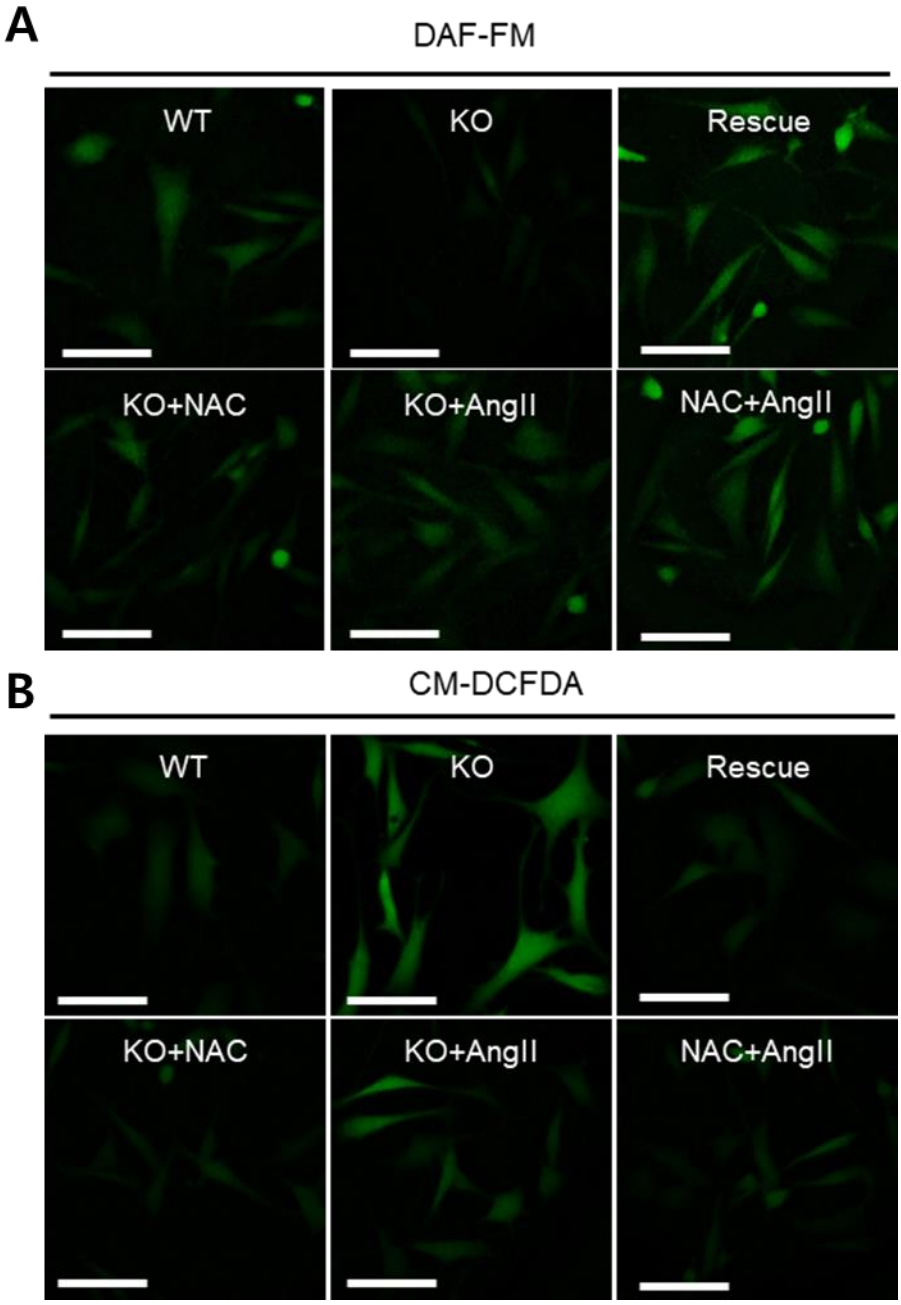


그림 17. 축적된 ROS와 nitric oxide level 조사. (A) Nitric oxide를 DAF-FM으로 염색하였다. Scale bar는 100 μm를 나타낸다. (B) 일반적인 ROS를 CM-DCFDA로 염색하였다. Scale bar는 100 μm를 나타낸다. WT, wild type; KO, knockout; Res, rescue.

제 4 장 고 찰

이번 연구의 의의는 SEPHS1에 의한 산화-환원 항상성 조절의 특성이 세포 특이적으로 나타난 것을 증명한 것과 ROS의 생성 경로의 동정 및 산화 스트레스에 의한 세포의 생리적 변화를 입증한 데 있다.

선행 연구[Tobe *et al.*, 2016]에서 배아 암세포인 F9 세포에서 SEPHS1 deficiency로 인해 ROS가 축적되었지만 이 경우 hydrogen peroxide가 관찰되었으나, 이번 연구의 2H11 세포에서는 hydrogen peroxide는 변화가 미미하나 superoxide가 증가한 것이 차이점이며 이는 세포 특이적으로 SEPHS1에 의한 산화-환원 항상성 조절이 일어남을 암시한다. 또한 ROS의 축적 원인도 선행 연구와 차이점이 있는데, F9 세포의 경우 SEPHS1의 결핍은 *Glrx1*과 다양한 GST (glutathione S-transferase) 유전자 발현을 망가뜨림으로써 hydrogen peroxide의 축적을 유도하였다. 그러나 본 연구에서 혈관 내피 암세포인 2H11 세포에서는 *Sephs1*이 KO되었을 경우 superoxide를 scavenging 하는 *Sod1, 3*의 발현 감소와 superoxide를 생성하는 *Nox4*의 발현 및 XO/XDH의 ratio 증가와 같은 복합적인 요소에 의해 superoxide가 축적됨을 증명하였다. 이러한 점은 SEPHS1을 통한 산화-환원 항상성 조절의 경로가 다양한 pathway와 상호 작용을 통해 이루어짐을 암시하며 각 세포 종마다 SEPHS1에 의해 조절되는 산화-환원 항상성이 세포 특이적으로 일어날 가능성을 제시한다. 따라서 배아 암세포와 혈관 내피 암세포 외의 다른 종류의 세포에서 *Sephs1* KO을 유도하였을 경우 축적된 ROS와 산화-환원 항상성 조절에 관여하는 유전자의 발현, 산화-환원 항상성 조절 관련 pathway 등의 요소들을 비교 분석한다면 SEPHS1의 세포학적 기능 및 역할을 규명할 수 있을

것이라 기대된다.

Sephs1 KO 세포에서는 주로 superoxide가 축적된 양상을 보였다. 이러한 결과는 XO와 *Nox4*의 activity가 증가했기 때문이라고 추측되는데, 앞서 언급했듯 superoxide가 생성되는 경로는 이외에도 미토콘드리아 내 전자전달계 (electron transfer chain) 및 nitric oxide synthase uncoupling, cytochrome p450 (CYP450)의 산화, cyclooxygenase, lipoxygenase[Brand, 2010; Snezhkina *et al.*, 2019]가 있다. 이 경로들 중 *Sephs1* KO로 인해 주로 XO와 *Nox4*가 영향을 받는 것인데, 이 두 가지 요소들의 조절 기전에서 SEPHS1의 역할을 규명하는 것이 SEPHS1의 기능을 밝히는 일에 필요하다고 생각된다.

Superoxide 축적의 또다른 주요 원인으로 *Sod1*과 *Sod3*의 유전자 발현 감소가 있는데 이들은 각각 cytoplasm과 extracellular space에 존재하는 superoxide를 제거하는 scavenger이다. 흥미롭게도 mitochondria 내부의 superoxide를 제거하는 *Sod2*의 발현은 변화하지 않았는데, 이는 superoxide 생성의 주요 원인인 미토콘드리아 전자전달계는 *Sephs1* KO로 인한 영향을 받지 않았다는 것을 시사한다. 즉 XO와 NOX4로 인해 과다하게 생성된 superoxide를 SOD1과 SOD3가 부족하여 이를 제대로 scavenge하지 못한 것이 *Sephs1* KO 세포에서 나타난 phenotype의 주요 원인이 되었을 것이라 추측된다. 또한 이번 연구에서 미처 확인하지 못한 superoxide 축적 원인으로 NOS3 uncoupling가 있다. 정상적인 NOS3는 cofactor인 (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-biopterin (BH_4)과 기질로 작용하는 L-arginine이 존재하는 상황에서 dimerization이 되어 NO를 생성하지만, stress 상황에서 ROS 증가로 인해 BH_4의 level이 감소하여 결국 효소의 dimerization이 억제되는 NOS3 uncoupling이 일어나게 되고,

이는 곧 효소 반응의 부반응 산물로 superoxide를 발생시킨다[Förstermann *et al.*, 2006]. 특히 본 연구에서 조사한 *Nos3*의 mRNA 발현이 감소한 데 이어 protein level에서 NOS3의 uncoupling 여부를 조사하는 것이 *Sephs1* KO 혈관 내피 암세포에서 나타난 ROS/RNS 항상성 변화의 중요한 단서가 될 것으로 기대되며, 이는 향후 연구를 통해 조사해야 할 필요가 있다.

일반적으로 낮은 양의 ROS가 세포 내에 존재할 경우 NRF2 pathway 등과 같은 cell survival signaling pathway가 활성화되지만, 과도한 양의 ROS가 세포 내에 축적되면 apoptosis와 necroptosis를 통한 cell death가 유도된다[Redza-Dutordoir *et al.*, 2016]. 그러나 *Sephs1* KO 세포의 경우 많은 양의 ROS가 세포 내에서 관찰되었지만 apoptosis와 같은 cell death는 나타나지 않았다. 이는 본 연구에 사용된 2H11 세포가 암세포이기 때문에 생긴 결과일 수 있는데, 실제로 암세포는 apoptosis가 잘 일어나지 않아 이를 회피할 수 있는 기작이 있을 것이라 여겨지는 세포이다[Wong, 2011]. 따라서 *Sephs1* KO 세포에서 과도하게 축적된 ROS로 인해 세포 성장은 원활하게 일어나지 않더라도 apoptosis는 관찰되지 않았을 수 있다. 결국 SEPHS1의 deficiency가 cell death로까지 미치는 영향을 연구하기 위해서는 암세포가 아닌 일반 세포로 연구해야 할 것이며, 앞으로는 혈관 내피 암세포의 일반 세포인 혈관 세포, 대표적으로 human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)을 이용하여 ROS 축적과 세포 성장의 둔화 여부, 혈관 신생 능력 저하 여부, 그리고 더 나아가 apoptosis가 일어나는지 확인하는 실험들을 진행해야 할 필요가 있다.

Sephs1 KO 세포에서 혈관 신생 능력이 감소한 것을 관찰했다. [그림 17]로 보아 이는 ROS와 NO의 영향을 받아 일어났다고 추측된다.

실제로 앞서 언급했듯 적절한 양의 ROS는 혈관 신생을 촉진시킬 수 있으며, NO 역시 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 신호를 받으면 release되어 혈관 신생을 활성화시킨다[Cooke *et al.*, 2002]. *Sephs1* KO로 인해 감소한 *Nos2*, *Nos3*의 발현이 NO의 level을 감소시켰고 이것이 혈관 신생 능력을 떨어뜨렸을 것이라 추측되는데, 이러한 혈관 신생 능력과 *Sephs1*의 관계를 알아보기 위해서는 VEGF 또는 VEGF receptor 등의 발현 및 인산화 패턴 변화를 조사함으로써 관련 기전을 더 구체적으로 규명한다면 혈관 신생을 조절하는 SEPHS1의 역할을 보다 더 명확하게 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

선행연구[Tobe *et al.*, 2016]에서 SEPHS1의 deficiency로 인해 저해된 cell proliferation, cell invasion은 cancer cell의 malignancy를 나타내는 대표적인 능력이다. 본 연구에서 역시 *Sephs1* KO은 2H11 세포에서 cell proliferation과 혈관 신생 능력을 감소시켰다. 이러한 결과는 혈관 내피 암세포 특이적으로 *Sephs1*을 KO 시켰을 경우 암세포의 성장과 malignancy가 감소하여 암세포를 치료할 수 있는 가능성을 시사한다. 즉 *Sephs1*이 암세포 유전자 치료의 중요한 표적으로서 작용하여 미래의 암 치료 발전에 큰 기여를 할 수 있기 때문에 *Sephs1* 연구가 보다 더 활발하게 이루어져야 할 것이다.

제 5 장 참고 문헌

Bang J, Huh JH, Na JW, Lu Q, Carlson BA, Tobe R, Tsuji PA, Gladyshev VN, Hatfield DL, Lee BJ (2015) Cell proliferation and motility are inhibited by G1 phase arrest in 15-kDa selenoprotein-deficient Chang liver cells. *Mol. Cells* 38:457-65.

Barrington JW, Lindsay P, James D, Smith S, Roberts A (1996) Selenium deficiency and miscarriage: a possible link? *Br. J. Obstet. Gynaecol.* 103(2):130-2

Bartosz G (2009) Reactive oxygen species: Destroyers or messengers? *Biochem. Pharmacol.* 77(8):1303-15

Beckman JS, Koppenol WH (1996) Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am. J. Physiol.* 271(5 Pt 1):C1424-37

Bigarella CL, Liang R, Ghaffari (2014) Stem cells and the impact of ROS signaling. Development 141(22):4206-18

Brand MD (2010) The sites and topology of mitochondrial superoxide production. *Exp. Gerontol.* 45(7-8):466-72

Cai H, Harrison DG (2000) Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.* 87(10):840-4

Cao J, Liu X, Yang Y, Wei B, Li Q, Mao G, He Y, Li Y, Zheng L, Zhang Q (2020) Decylubiquinone suppresses breast cancer growth and metastasis by inhibiting angiogenesis via the ROS/p53/BAI1 signaling pathway. *Angiogenesis* 23:325-38

Cooke JP, Losordo DW (2002) Nitric oxide and angiogenesis. *Circulation* 105(18):2133-35

Davalli P, Mitic T, Caporali A, Lauriola A, D' Arca D (2016) ROS,

cell senescence, and novel molecular mechanisms in aging and age-related diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016: Article 3565127

dela Paz NG, D'Amore PA (2014) Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissues Res.* 335(1):5-16

DeNicola GM, Karreth FA, Humpton TJ, Gopinathan A, Wei C, Frese K, Mangal D, Yu KH, Yeo CJ, Calhoun ES, Scrimieri F, Winter JM, Hruban RH, lacobuzio-Donahue C, Kern SE, Blair IA, Tuveson DA (2011) Oncogene-induced Nrf2 transcription promotes ROS detoxification and tumorigenesis. *Nature* 475:106-9

Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, Leaper D, Georgopoulos NT (2017) Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int. Wound J.* 14(1):89-96

Faraci FM (2006) Reactive oxygen species: influence on cerebral vascular tone. *J. Appl. Physiol.* 100(2):739-43

Filippin LI, Vercelino R, Marroni NP, Xavier RM (2008) Redox signaling and the inflammatory response in rheumatoid arthritis. *Clin. Exp. Immunol.* 152(3):415-22

Förstermann U, Münzel T (2006) Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease. *Circulation* 113(13):1708-14

Ge K, Yang G (1993) The epidemiology of selenium deficiency in the etiological study of endemic diseases in China. *Am. J. Clin. Nutr.* 57(2 Suppl):259S-63S

Glass RS, Singh WP, Jung W, Veres Z, Scholz TD, Stadtman TC (1993) Monoselenophosphate: Synthesis, Characterization, and Identity with the Prokaryotic Biological Selenium Donor,

Compound SePX. *Biochemistry* 32, 12555-9

Gutscher M, Pauleau AL, Marty L, Brach T, Wabnitz GH, Samstag Y, Meyer AJ, Dick TP (2008) Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nat. Methods* 5:553-9

Harrison DG, Gongora MC, Guzik TJ, Widder J (2007) Oxidative stress and hypertension. *Med. Clin. North. Am.* 93(3):621-35

Hoesel B, Schmid JA (2013) The complexity of NF-kB signaling in inflammation and cancer. *Mol. Cancer* 12:86

Jung J, Kim Y, Na J, Qiao L, Bang J, Kwon D, Yoo T-J, Kang D, Kim LK, Carlson BA, Hatfield DL, Kim J-H, Lee BJ (2021) Constitutive oxidative stress by SEPHS1 deficiency induces endothelial cell dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* 22(21):11646

Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN (2003) Characterization of mammalian selenoproteins. *Science* 300(5624):1439-43

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.* 264:9724-27

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

Logsdon EA, Finley SD, Popel AS, Mac Gabhann F (2014) A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J. Cell Mol. Med.* 18(8):1491-508

Maulik N, Das DK (2002) Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic. Biol. Med.* 33(8):1047-60

Merksamer PI, Liu Y, He W, Hirschey MD, Chen D, Verdin E (2013)

The sirtuins, oxidative stress and aging: an emerging link. Aging (Albany NY) 5(3):144-50

Morgan B, Sobotta MC, Dick TP (2011) Measuring E(GSH) and H_2O_2 with roGFP2-based redox probes. *Free Radic. Biol. Med.* 51:1943-51

Murphy MP, Holmgren A, Larsson NG, Halliwell B, Chang CJ, Kalyanaraman B, Rhee SG, Thornalley PJ, Partridge L, Gems D, Nyström T, Belousov V, Schumacker PT, Winterbourn CC (2011) Unraveling the biological roles of reactive oxygen species. *Cell Metab.* 13(4):361-6

Nishino T, Okamoto K, Eger BT, Pai EF, Nishino T (2008) Mammalian xanthine oxidoreductase - mechanism of transition from xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *The FEBS* 275(13):3278-89

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

Pelican H, Carney D, Huang P (2004) ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug Resist. Updat.* 7(2):97-110

Peng A, Yang CL (1991) Examination of the roles of selenium in the Kaschin-Beck disease. Cartilage cell test and model studies. *Biol. Trace Elem. Res.* 28:1-9

Ran FA, Hus PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 8:2281-2308

Redza-Dutordoir M, Averill-Bates DA (2016) Activation of apoptosis signaling pathways by reactive oxygen species. *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell Res.* 1863(12):2977-92

Scandalios JG (2002) The rise of ROS. *Trends Biochem. Sci.*

27(9):483-6

Scott R, MacPherson A, Yates RW, Hussain B, Dixon J (1998) The effect of oral selenium supplementation on human sperm motility. *Br. J. Urol.* 82(1):76-80

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):32881-894

Sies H (1991) Role of reactive oxygen species in biological processes. *Klin. Wochenschr.* 69:965-8

Simon HU, Haj-Yehia A, Levi-Schaffer F (2000) *Apoptosis* 5: 415-8

Snezhkina AV, Kudryavtseva AV, Kardymon OL, Savvateeva MV, Melnikova NV, Krasnov GS, Dmitriev AA (2019) ROS generation and antioxidant defense systems in normal and malignant cells. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019:6175804

Tamura T, Yamamoto S, Takahata M, Sakaguch H, Tanaka H, Stadtman T, Inagaki K (2004) Selenophosphate synthetase genes from lung adenocarcinoma cells: Sps1 for recycling L-selenosysteine and Sps2 for selenite assimilation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101(46):16162-167

Tobe R, Carlson BA, Huh JH, Castro NP, Xu XM, Tsuji PA, Lee SG, Bang J, Na JW, Kong YY, Beaglehole D, Southon E, Seifried H, Tessarollo L, Salomon DS, Schweizer U, Gladyshev VN, Hatfield DL, Lee BJ (2016) Selenophosphate synthetase 1 is an essential protein with roles in regulation of redox homeostasis in mammals. *Biochem. J.* 473(14): 2141-54

Veres Z, Kim IY, Scholz TD, Stadtman TC (1994) Selenophosphate

synthetase. Enzyme properties and catalytic reaction. *J. Biol. Chem.* 269(14):10597-603

West AP, Shadel GS, Ghosh S (2011) Mitochondria in innate immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 11(6):389-402

Wong RS (2011) Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 31(1):87

Xu XM, Carlson BA, Irons R, Mix H, Zhong N, Gladyshev VN, Hatfield DL (2007) Selenophosphate synthetase 2 is essential for selenoprotein biosynthesis. *Biochem. J.* 404(Pt 1): 115-20

Abstract

Study on the function of *Sephs1* in regulating redox homeostasis in mammalian endothelial cancer cells

Yoomin Kim

School of Biological Science

The Graduate School

Seoul National University

Selenophosphate synthetase (SEPHS) is an enzyme that synthesizes selenophosphate which functions as a donor of selenium when synthesizing selenocysteine. There are two isoforms of SEPHS (SEPHS1 and SEPHS2) in eukaryotes. Out of these two isoforms, only SEPHS2 has synthesis activity. *Sephs1* is a crucial gene for maintaining cell functions, and it has been reported that *Sephs1* is involved in regulating redox homeostasis.

In this study, frameshift mutation was introduced to *Sephs1* by CRISPR-Cas9 to investigate the function of SEPHS1. The deficiency of SEPHS1 in 2H11 cells led to the accumulation of superoxide and lipid peroxide, and the reduction of nitric oxide. This was due to the activation of xanthine oxidase and NADPH oxidase 4, which resulted in elevated superoxide generation. Also, the decreased expression of superoxide dismutase 1 and 3 which are in charge of scavenging superoxide caused accumulation of superoxide. The accumulated ROS due to SEPHS1 deficiency caused DNA damage, and finally induced G2/M phase arrest and inhibition of cell proliferation. Furthermore, the angiogenic ability of 2H11 cells was inhibited by the increase of ROS and the decrease of nitric oxide.

This study has a significance in that *Sephs1*-knockout 2H11 cells showed the accumulation of superoxide leading to cell dysfunction such as cell proliferation and angiogenesis.

Keywords : selenium, selenoprotein, selenocysteine, selenophosphate

synthetase 1, reactive oxygen species, endothelial cell
Student Number : 2019-21185

감사의 글

2년 반이라는 길다면 길고 짧다면 짧은 석사 과정 동안 저에게 평생 도움이 될 많은 것들을 배울 수 있었고, 그 덕분에 무사히 이 논문을 쓸 수 있었습니다. 아무것도 모르던 저에게 많은 것을 가르쳐주신 여러 교수님들과 선배님들과 동기 덕분에 힘들지만 항상 행복하게 학위 과정을 마무리할 수 있었습니다.

항상 염려 어린 마음으로 저를 지켜봐주시고 더 좋은 연구를 할 수 있도록 지도해주신 이병재 교수님께 진심으로 감사드립니다. 제가 부족한 모습을 보여도 올바른 방향으로 나아갈 수 있도록 길을 제시해주셨고, 한편으로는 따뜻하게 대해주신 덕분에 제가 이렇게 좋은 결과로 학위 과정을 마무리 지을 수 있었습니다. 그리고 논문을 심사해주시며 제가 부족한 부분을 수정·보완할 수 있도록 큰 도움을 주신 김진홍 교수님과 김종서 교수님께도 깊은 감사를 표합니다.

실험을 알려주고 또 2년 반 동안 즐겁게 실험실 생활을 할 수 있게 해준 지영 언니, 택진 오빠, 민국 오빠, 교로 언니, 지운 오빠, 종은 언니, 동인 씨께 감사드립니다. 그리고 누구보다 실험을 많이 도와주고 또 곁에서 힘을 주고 응원해 준 지수 오빠에게 고맙다는 말을 전하고 싶습니다.

일을 마치고 집에 들어가면 언제나 따뜻하게 맞아주고 더 많은 것을 해주지 못해 하시는 우리 부모님께도 진심으로 감사드립니다. 또한 멀리 떨어져있지만 항상 응원해주는 오빠에게도 고맙다는 말을 전하고 싶고, 힘들 때마다 기운을 북돋아준 친구들에게도 고마움을 전합니다. 아직도 많이 부족하지만 그런 저를 따뜻한 시선을 바라보며 도와주는 모든 분들께 정말 진심으로 감사드립니다.