

## 사람의 Serine palmitoyl transferase II 및 ceramidase의 promoter에 대한 연구

김희숙, 송성관, 이은열, 이상도, Steve Linn\*, Alfred H. Merrill\*

경성대학교 식품공학과, Department of Biochemistry, Emory University, Georgia\*

전화 (051) 620-4713, Fax (051) 622-4986

### Abstract

Serine palmitoyl transferase(SPT) and ceramidase are the key enzymes in sphingolipid biosynthesis. To study sphingolipid metabolism, we have got the 5'-upstream regions of human serine palmitoyl transferase subunit II and acid ceramidase gene by using GenomeWalker kits(Clontech Co.). Human genomic DNA was purified from HT29, human colon cancer cell line by using DNAzol. We got several bands after secondary PCR and subcloned them to T7blue vector. Human SPTII promoter which we got was 2690bp but we cut it with Bgl II and vector with Bgl II and BamH I, and subcloned 1782bp to pGL2-enhancer vector and pGL2-basic vector with luciferase reporter gene. Human acid ceramidase promoter which we got were 2028bp and 1034bp and subcloned to pGL2-enhancer vector and pGL2-basic vector. We transfected these promoters to HT29 cell and assayed luciferase activity. For measuring transfection efficiency, pRL-TK vector with seapancy luciferase reprotor gene was cotransfected with these promoters.

Serine palmitoyl transferase(SPT)는 sphingolipid 대사에 있어 초기단계의 율속효소로 sphingolipid 대사조절에 있어 중요한 역할을 할 것이라고 생각되고 있으며 acid ceramidase 역시 세포의 apoptosis나 신호전달에 있어 switch역할을 한다고 발표되고 있다. SPT는 세포질에 있는 serine과 palmitoyl CoA를 endoplasmic reticulum의 막에서 반응시켜 ketosphinganine을 합성하며 빠른 속도로 sphinganine으로 변환시키는 것으로 알려져 있다. Sphinganine은 낮은 농도에서는 mitogenesis를, 높은 농도에서는 세포의 apoptosis를 유도하며, 세포의 신호전달 및 생명유지에 관여하는 ceramide, sphingomyelin, sphingosine 또는 sphingosine 1-phosphate의 원료가 된다<sup>1)</sup>. 또한 TNF- $\alpha$ 나 interleukin 1- $\beta$ 를 배양하는 암세포에 처리하였을 때 ceramide가 증가하며 세포는 apoptosis를 일으키는 경향을 보인다고 하였으며<sup>2)</sup> sodium butyrate를 HT29 cell에 처리하였을 때 ceramide가 증가하는 경향을 보였으며 acidic ceramidase의 활성이 감소하였다고 하였다<sup>3)</sup>. 이러한 관점에서 볼 때 serine palmitoyl trasferase나 ceramidase의 promoter의 연구는 중요하다고 생각된다. 본 연구는 인간의 SPT II과 acid ceramidase의 5'-upstream을 Genomewalker kit의 adaptor primer들을 사용하여 PCR로 증폭하고

luciferase를 reporter gene으로 가지는 vector에 subcloning하고 동물세포에 transfection 시킨 후 luciferase 활성을 측정하였다<sup>4)</sup>.

#### 재료 및 방법

GenomeWalker kit는 Clontech사 제품을 사용하였으며 DNA polymerase는 Takara사의 LA Tag polymerase를 사용하였다. 사용한 genomic DNA는 사람의 대장암세포인 HT29 cell로부터 얻었으며 secondary PCR로부터 얻은 promoter fragment들을 T7Blue vector에 subclone하였다. T7/hSPTIIpro와 T7/hCerpro를 T7 promoter와 M13 primer를 사용하여 sequencing을 하였으며 gene의 upstream임을 확인하고 2690bp의 hSPTII promoter와 2028bp 및 1034bp의 human ceramidase promoter를 얻었다. Human SPTII promoter의 경우 SmaI으로 digestion했을 때 T7Blue vector와 promoter의 크기가 비슷하여 Bgl II를 이용하여 1782bp의 promoter fragment를 얻고 pGL2 vector는 Bgl II와 BamHI으로 자른 다음 subclone하였다. 동물세포에 과발현시키기 위하여 subcloning vector로는 firefly luciferase를 reporter gene으로 하는 pGL2-enhancer vector와 pGL2-basic vector(Promega Co.)를 사용하였고 transfection efficiency를 알기 위하여 seapancy luciferase를 reporter gene으로 하는 pRL-TK vector를 cotransfection시켰으며 transfection 시약은 Superfect를 사용하였다. GenomeWalker에서 사용했던 primer들로는 Blast Search를 통하여 human SPTII gene과 human acid ceramidase gene의 시작 codon을 포함한 sequence와 시작 codon의 약간 upstream의 sequence의 정보를 얻고 primer를 제작하였으며 그들은 Table 1과 같았다.

Table 1. Primers for preparing 5'-upstream regions of human SPTII and acid ceramidase gene

	Primer	Oligomer sequence
Primary PCR	Adaptor primer 1	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3'
	SPT II	5'-GGCTCCGGCCGCATCTTCCTG-3'
	Acid ceramidase	5'-CGGCAGCCAGGAGGACTAAGG-3'
Secondary PCR	Adaptor primer 2	5'-ACTATAGGGCACGCGTGGT-3'
	SPT II	5'-CAGGCTCTGTAGGCGGTGGCA-3'
	Acid ceramidase	5'-CGGCATCGCTCTAGCCTCGTGC-3'

#### 결과 및 고찰

HT29 cell을 12 well에 80000cell/well되게 깔은 후 24시간 배양한 후 pGL2Basic/hSPTII promoter와 pGL2Enhancer/hSPTII promoter DNA과 pRL-TK vector DNA를 각각 2µg

씩 cotransfection시킨 다음, 6시간 후에 새로운 배지로 바꾸고 다시 24시간 배양하였다. 24시간 후의 firefly 및 seapancy의 luciferase activity를 측정한 결과는 Table 2와 같았다. Seapancy luciferase의 발현이 pGL2B나 pGL2B/hSPTII promoter나 pGL2En/hSPTII promoter의 firefly luciferase보다 각각 14,500~18,200배, 370~400배 및 83~108배 정도 높게 발현되었다. 또한 pGL2B/SPTII promoter와 pGL2En/hSPTII promoter가 pGL2B나 pGL2En보다 각각 30~41배 및 54~68배 정도 더 많이 발현되었다. pRL-TK vector의 TK promoter가 hSPTII promoter보다 더 강한 promoter임을 알 수 있었으나 세포마다 발현정도가 다를 것이다. 또한 pGL2 vector나 pGL2/hSPTII promoter와 pRL-TK vector를 HT29 cell에 함께 발현시킬 때 pRL-TK DNA양을 pGL2 DNA에 비하여 1/100 정도 낮추어 transfection시키는 경우 비슷하게 발현되는 것을 알 수 있었다.

Table 2. Transfection efficiency of pGL2/hSPTII promoter with pRK-TK cotransfection to HT29 cells

DNA	Amount/well	Luciferase activity	
		Firefly	Seapancy
pGL2Basic	2 $\mu$ g	92~108	1337332~1973607
pGL2B/hSPTII pro	2 $\mu$ g	2718~4527	1119024~1684898
pGL2Enhancer	2 $\mu$ g	192~251	1589455~2063065
pGL2En/hSPTII pro	2 $\mu$ g	10271~17179	1119622~1411950

Table 3. Transfection efficiency of pGL2En/hSPTII promoter(2  $\mu$ g) or pGL2En/hcer promoter(2  $\mu$ g) with pRL-TK vector(0.02  $\mu$ g) cotransfection for 6hours to HT29 cells and HepG2 cells.

Cell type	DNA	Luciferase activity	
		Firefly	Seapancy
HT29 cell	pGL2En/hSPTII promoter	4108~4698	6251~7729
	pGL2En/hcer promoter	2282~2459	5560~6029
HepG2 cell	pGL2En/hSPTII promoter	979776~1060293	51874~56632
	pGL2En/hcer promoter	408289~457008	49754~61754

pGL2En/hSPTII promoter 및 pGL2En/hcer promoter를  $2\mu\text{g}$ 씩을  $0.02\mu\text{g}$ 의 pRL-TK vector와 함께 사람의 대장암세포인 HT29 cell 및 사람 간암세포인 HepG2 cell에 cotransfection시킨 경우 발현된 luciferase activity는 Table 3과 같았다. 두가지 promoter 모두 HT29 cell보다 HepG2 cell에 높은 발현율을 보였으며 pRL-TK vector 역시 HepG2 cell에 발현이 잘 되는 것을 볼 수 있었고 두 가지 세포모두에서 hSPTII promoter가 human ceramidase promoter보다 더 높은 발현율을 보였다.

#### 요약

Sphingolipid 대사의 율속효소인 serine palmitoyl transferase(SPT)와 acid ceramidase의 연구를 위하여 인간의 SPTII 유전자와 acid ceramidase 유전자의 5'-upstream region을 얻었다. 사람의 대장암세포인 HT29 cell로부터 genomic DNA를 얻고 GenomeWalker kit를 이용하였으며 2690bp의 SPTII promoter와 2028bp 및 1034bp의 acid ceramidase promoter의 fragment들을 얻을 수 있었다. 이들 DNA 조각들을 T7Blue vector에 subcloning하여 sequencing하였으며 이들이 사람의 SPTII 및 acid ceramidase gene의 5'-upstream region임을 확인하였다. 동물세포에서의 promoter activity를 측정하기 위하여 firefly luciferase를 reporter gene으로 하는 pGL2-enhancer vector와 pGL2-basic vector에 subcloning하였으며 pRL-TK vector와 함께 HT29 cell 및 HepG2 cell에 cotransfection시킨 후 luciferase활성을 측정한 결과 같은 양의 DNA로는 사람의 SPTII promoter와 acid ceramidase promoter는 pRL-TK에 비하여 transfection efficiency가 아주 낮았으며 promoter 연구를 위하여는 pRL-TK vector의 양을 1/100으로 줄이는 것이 적당하였으며 HT29 cell보다는 HepG2 cell에 더 높은 발현율을 보였다.

#### 참고문헌

- 1) Williams, R. D., Wang, E., and Merrill, A. H. Jr. Enzymology of long-chain bases synthesis by liver: characterization of serine palmitoyltransferase in rat liver microsomes. Arch. Biochem. Biophys. 228, 282-291 (1984)
- 2) Weiss, B. and Stoffel, W. Human and murine serine-palmitoyl-CoA transferase cloning, expression and characterization of the key enzyme in shingolipid synthesis. Eur. J. Biochem. 249, 239-247(1997)
- 3) Kim, H. S. : Effects of sodium butyrate on the biosynthesis of sphingolipids in HT29, a human colon cancer cell line. Korean J. Life Sci., 9, 160-168(1999)
- 4) 송성광, 이은열, Linn, S., Merrill, A. H. Jr., 김희숙 : Murine serine palmitoyl transferase II 유전자의 promoter 연구, 한국생물공학회 1999년도 추계학술발표대회, 586-589(1999)