

## 글루타치온 의존성 Selenoprotein W의 생물학적 활성

고려대학교 생명과학대학/생명공학원

김 익 영

### Biological Function of Selenoprotein W: a Glutathione-Dependent Antioxidant

Ick Young Kim

School of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Anam-dong,  
Seongbuk-gu, Seoul 136-701, Korea

The function of selenoprotein W (Se-W) was investigated by cloning the corresponding cDNA from mouse brain and expressing it in CHO cells and H1299 human lung cancer cells. Overexpression of Se-W markedly reduced the sensitivity of both cell lines to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cytotoxicity. The intracellular peroxide concentration of the transfected cells was lower than that of the parental cells in the absence or presence of extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The resistance to oxidative stress conferred by Se-W was dependent on glutathione. Expression of Se-W mutants in which selenocysteine-13 or cysteine-37 was replaced by serine did not confer resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, implicating these residues in the antioxidant activity of Se-W *in vivo*.

**Key Words:** Selenium, Selenoprotein W, GSH, Antioxidant

### 서 론

과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)나 superoxide, 그리고 hydroxyl radical같은 활성산소종은 세포내에서 산소 대사 과정 중 부산물로 생성되며 세포사멸이나 노화, 암 유발 등에 중요한 요인으로 작용한다.<sup>1~3)</sup> 체내에서는 활성산소종에 대한 방어기전으로 여러 항산화 효소가 존재하며, 이 중에서 glutathione peroxidase (GPx)와 thioredoxin reductase의 경우 활성화 자리에 셀레노시스테인(selenocysteine)잔기를 지니는 셀레늄단백질(selenoprotein)들이다.<sup>4~6)</sup> 이들

중 그 기능이 명확히 밝혀진 단백질들이 있으나 아직 그 기능을 잘 모르는 예도 많이 있는 실정이다.

Selenoprotein W는 10 kDa 정도의 크기로 13번째 아미노산에 selenocysteine이 존재하며 37번째 시스테인 잔기에는 글루타치온이 결합한다고 알려져 있다.<sup>7,8)</sup> Se-W는 주로 세포질에 존재하며 소량은 세포막에 위치하고 있다.<sup>9,10)</sup> 그리고 거의 모든 동물조직에서 Se-W가 존재하는 것으로 현재 보고가 되고 있으며,<sup>11-13)</sup> 셀레늄의 충분한 공급 시에는 그 양이 증가된다. 한 가지 흥미로운 사실은 셀레늄 결핍 시에도 brain에서의 Se-W양은 항상 일정하게 유지가 된다는 점이다.<sup>12)</sup> 앞선 연구

책임저자 : 김익영, ☎ 136-701, 서울시 성북구 안암동 5가 1, 고려대학교 생명과학대학/생명공학원

Tel: 02-3290-3449, Fax: 02-3290-3449, E-mail: ickkim@korea.co.kr

접수일 : 2003년 2월 28일, 게재승인일 : 2003년 3월 1일

결과에 의하여 Se-W에 글루타치온 결합 부위가 존재한다는 사실로 미루어 보아 아마도 산화-환원 촉매제로서 역할을 할 것으로 추정된다.<sup>14)</sup>

### 셀레늄의 생물학적 중요성

미량원소중의 미량원소로 알려져 있는 셀레늄(selenium, Se)은 원자량이 78.76으로 이들의 화학적 성질은 원소 주기율표상 같은 족에 속한 황(sulfur, S)과 비슷하며, H<sub>2</sub>Se, H<sub>2</sub>Se<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>SeO<sub>4</sub> 등 다양한 무기화합물 형태로 존재한다. 이러한 셀레늄은 1950년대 초반까지 우리 인간에게 있어 매우 유독한 독성 원소로만 알려져 왔으나, 1957년, 쥐의 경우 vitamin E 결핍에 의하여 유도되는 간의 손상이 셀레늄 공급으로 저해된다는 결과가 보고되면서 이 원소에 대한 유용성이 인식되기 시작하여,<sup>15)</sup> 이 원소가 우리 생체의 성장과 번식에 없어서는 안 되는 필수원소로 밝혀졌다.<sup>16)</sup> 또한 셀레늄 결핍 혹은 셀레늄과 vitamin E의 복합 결핍에 의한 각종 질병에 대한 많은 연구가 보고되고 있다.<sup>16,17)</sup> 동물의 여러 조직들 가운데에서 골격근육과 심장근육이 셀레늄 결핍에 가장 민감한 영향을 받으며, 이외에도 적혈구, 눈, 간, 신장, 췌장, 피부, 정자, 그리고 고환 등에도 영향을 받는 것으로 보고되고 있다. 사람의 경우, 셀레늄 결핍 지역에서 발생하는 풍토성 심근증(cardiomyopathy)과 근육질환이 대표적인 셀레늄 결핍에서 오는 질병이다.<sup>18)</sup> 셀레늄의 결핍뿐만 아니라 과도한 섭취 역시 각종 질병의 원인이 될 수 있는데 'alkali disease'와 'blind staggers'가 그 중 대표적인 예로써 alkali disease에 시달리는 동물의 경우 탈모, 발굽 등의 심한 손상, 관절이 굳어지는 증세, 무기력 등의 증세를 보이게 된다. 그러나 경우에 따라서는 이 보다 훨씬 심한 증세의 신경성 질환을 보이기도 하고 심할 경우 죽음에 이르게 된다.

### 셀레늄의 항암작용

Selenocysteine을 함유한 여러 가지 selenoprotein들이 미생물, 동물 등으로부터 발견되고 있는데 그중의 한 가지가 항산화 효소로 잘 알려진 glutathione peroxidase이다. 항산화제들은 여러 가지 활

성산소종(reactive oxygen species, ROS)들로부터 세포를 보호하는 역할을 하는데, 이러한 항산화성은 암의 발생과 진행을 조절한다는 보고들이 있다.<sup>19)</sup> 또한 Medina<sup>20)</sup>는 셀레늄이 세포의 증식을 억제한다는 보고를 함으로써 또 다른 항암기작을 보고하였으며, 다양한 동물을 모델의 연구로부터 과량의 셀레늄의 공급으로 종양의 발생빈도가 감소함이 보고되었다.<sup>21)</sup> 셀레늄 공급에 의한 항암효과는 간, 유선, 대장, 피부 등 다양한 부위에서 작용하는데 몇 가지 경우 vitamin A 와 vitamin E의 공급으로 상승효과를 보이기도 한다. Clark 등<sup>22)</sup>은 매일 200µg의 셀레늄 투여로 폐암, 대장암, 직장암, 전립선암 환자들에 대하여 매우 좋은 효과를 보았는데 평균 4.5년의 투여기간 동안 셀레늄의 독성은 전혀 없었다고 보고하였다. Combs과 Grey는 셀레늄의 항암기작이 처리 농도에 따라 셀레늄의 항산화성, 셀레늄의 면역력 증강, 발암물질 대사에 대한 셀레늄의 영향, 세포성장 주기조절, 항암성 셀레늄 대사물의 형성 등 다양할 것으로 보고하였다.<sup>23)</sup>

### 셀레늄에 의한 세포사멸과 미토콘드리아의 손상

셀레늄에 의한 암 예방과 치료에 관한 가설은 크게 두 가지로 나눌 수 있는데 첫 번째는 위에서 언급했던 바와 마찬가지로 셀레늄 단백질의 항산화적 기능에 의한 암 발생 억제에 관한 견해와 두 번째는 셀레늄 화합물 자체의 화학적 특성으로 인해 세포 내에 산화적 스트레스로 작용하여 암 세포 사멸을 일으킬 수 있다는 견해이다. 이와 같은 산화적 스트레스에 의한 세포 사멸 기전은 미토콘드리아가 중요한 역할을 담당하고 있다. 세포 내에 산화-환원계의 변화나 산화적 스트레스 등에 의해 미토콘드리아의 막 투과에 비정상화를 유도하여 미토콘드리아 내막의 팽창과 막 전위차의 붕괴, 그리고 cytochrome c와 AIF (apoptosis inducing factor)와 같은 세포 사멸 인자를 세포질로 방출시켜 일련의 apoptosis 과정을 활성화 시킨다. Shen 등은 간암 세포인 HepG2에서 셀레늄이 글루타치온과 반응하여 superoxide를 생성하여 미토콘드리아의 막 투과에 비정상화를 유도되어 세

포 사멸을 일으킨다고 보고하였다.<sup>24)</sup> 또한 미토콘드리아의 막 투과의 비정상화는 산화적 스트레스에 의해서 뿐만 아니라 막 투과를 담당하고 있는 막 단백질인 adenine nucleotide translocator (ANT) 단백질의 thiol기들의 산화에 의한 cross-linking에 의해서도 유도가 될 수 있다. Kim 등은 셀레늄이 이 같은 thiol기의 cross-linking시킴으로써 막 투과의 비정상화를 유도하여 세포 사멸을 일으킬 수 있다고 보고하였다.<sup>25)</sup>

### Selenoproteins: 셀레노시스테인 함유 단백질들

셀레늄은 생체 내에서 다양한 형태로 존재하는데 여러 가지 존재 형태의 셀레늄 화합물들 중에서 흥미로운 것은 이 원소가 단백질과 일부 tRNA 변형된 염기로서 존재한다는 사실이다.<sup>26)</sup> 더욱이 셀레늄을 지닌 단백질인 셀레늄 단백질(selenoprotein)의 경우, 셀레늄이 현재 21번째 아미노산으로 불리우는 셀레노시스테인(selenocysteine)의 형태로 단백질 내에 존재하는데, 매우 특이하게 일반적으로 단백질 합성 중지 신호인 UGA codon을 중지 신호로 인식하지 아니하고 이곳에 매우 특이적인 작용기작에 의하여 셀레노시스테인이 단백질 내로 삽입되게 된다.<sup>27)</sup> 미생물의 경우, 현재까지 formate dehydrogenase, hydrogenase, glycine reductase 등 산화 환원 관련 효소들이 selenoprotein으로 보고되고 있다. 동물의 경우, glutathione peroxidase, iodothyronine-5'-deiodinase, selenoprotein P, selenoprotein W, thioredoxin reductase 등이 셀레노시스테인을 함유한 단백질이다.<sup>28)</sup> 최근 미국 네브라스카 대학의 Gladyshev 그룹이 식물계에서의 셀레늄 단백질들이 존재한다는 것을 보고하였다.<sup>29)</sup> Glutathione peroxidase의 경우, 주로 간이나 적혈구에 존재하는 전형적인 tetrameric glutathione peroxidase (GPX1) 이외에도 gastrointestinal track의 glutathione peroxidase (GPX2)와 plasma glutathione peroxidase (GPX3)들도 selenocysteine을 가지고 있다.<sup>30,31)</sup> 이외에도 phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPX4) 역시 selenocysteine을 함유한 효소이다.

### 셀레늄 단백질의 역할

현재까지 알려진 셀레늄 단백질들 중 셀레노시스테인의 역할이 밝혀진 것은 극히 일부이다. 가장 잘 알려진 예로는 환원된 상태의 glutathione peroxidase 분자 내 이온화된 selenol (Enz-Se<sup>-</sup>)이 organic peroxide 혹은 과산화수소와 반응하여 enzyme-selenenic acid (Enz-SeOH)으로 전환되는 반응이다. 환원상태의 효소로 재생되기 위하여서는 두 단계를 거치게 되는데 환원상태의 글루타치온 (GSH)와 반응하여 selenylsulfide (Enz-SeS-G)중간체가 우선 만들어지고 이 중간체는 또다른 한분자의 GSH와 반응하여 환원 상태의 Enz-SeH로 재생된다.<sup>32,33)</sup> 위에서 이미 언급한 바처럼 glutathione peroxidase는 네 가지 이성체가 존재하는데 이중 세포막내의 phospholipid hydroperoxide를 직접 환원시키는 것으로 알려진 GPX4가 주요 항산화 효소로서 vitamin E와 함께 lipid peroxidation을 저해작용을 한다.<sup>34)</sup> 최근 Yant 등<sup>35)</sup>은 GPX4 결손 쥐를 이용하여 GPX4가 쥐의 발생에 필수적이며 radiation과 산화적 손상으로부터 보호한다고 보고하였다. Thyroxine (T<sub>4</sub>)에서 iodine을 제거하여 생물학적으로 더 활성이 있는 triiodothyronine (T<sub>3</sub>)로 전환시킴으로 갑상선 호르몬 대사에서 매우 중요한 selenium-dependent deiodinase의 경우, 효소내의 selenol group이 RSeI 형태로 전환 된다(Enz-Se<sup>-</sup>+RI<sub>4</sub> → Enz-SeI+RI<sub>3</sub>).<sup>32)</sup> 환원 상태의 효소로서의 재생은 *in vitro*의 경우 DTT와 같은 thiol로 가능하지만 *in vivo*에서의 환원제에 대하여서는 불확실하다. Thioredoxin reductase의 경우 이 효소의 기능은 이미 오래 전부터 잘 알려져 왔으나 이들 분자 내 selenocysteine의 기능에 대하여서는 아직 잘 알지 못하고 있는 실정이다. 미생물에서 발견된 glycine reductase의 한 component인 selenoprotein A의 경우 위에서 설명한 반응들과는 다른 새로운 형태의 촉매 기능을 보이는데, selenocysteine의 selenol이 glycine 잔기와 반응하여 glycine의 carbon-nitrogen bond를 절단하여 Se-carboxymethyl 변형체로 된다(Enz-Se<sup>-</sup>+glycine-R → Enz-Se-CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>+NH<sub>2</sub>=C-R).<sup>30)</sup>

이상에 소개한 바처럼 셀레노시스테인의 생체

내 역할이 알려진 것은 고등생물의 glutathione peroxidase, 5'-deiodinase, thioredoxin reductase 그리고 하등생물의 glycine reductase 경우 이외는 아직 알려진 바가 없다. 하지만 혈장 내에 존재하는 selenoprotein P의 경우 이들이 자유 라디칼(free radical)에 대한 보호기능을 할 것으로 추정되고 있다.<sup>36)</sup> 최근 Hill 등은 selenoprotein P가 생체내 셀레늄의 분배에 관여한다고 보고하였다.<sup>37)</sup> 또한 동물의 정자 내 mitochondria capsule selenoprotein내 selenocysteine은 sperm mitochondria의 바깥막을 안정화시키는 구조적 기능을 할 것으로 추정되고 있다. Kim 등은 고등생물의 경우 selenocysteine 합성에 필요한 selenophosphate synthetase 역시 selenocysteine을 가진 셀레늄단백질을 보고하였는데,<sup>38)</sup> 초파리의 selenophosphate synthetase를 비롯한 셀레늄 단백질들이 RAS/MAPK 신호전달 체계를 조절한다는 최근 보고가 있다.<sup>39)</sup>

### Selenoprotein W

지금까지 selenoprotein W는 white muscle disease에 관여를 하고 13째 아미노산이 셀레노시스테인이 함유된 10 kDa의 단백질로 알려져 있다. 또한 이 단백질의 36번째 시스테인에 GSH가 결합하는 것으로 알려져 있다. 위의 결과로부터 selenoprotein W의 기능이 세포내의 항산화 조절에 관여할 것으로 판단되었다. 우리는 이미 mouse brain으로부터 selenoprotein W를 클로닝하였고(GenBank accession #: AF241527) 동물세포내로 이 유전자를 도입한 후 산화적 스트레스에 대한 저항성 정도를 확인하였다. Selenoprotein W가 정상적으로 발현되는 두 세포주(CHO *dhfr*, H1299)에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였을 때 wild type 세포 보다 훨씬 저항성을 가지는 것으로 나타났다. 이런 산화적 스트레스에 대한 세포의 저항성 획득이 GSH에 의존적인지를 알아 보기 위해서 GSH 합성에 관여하는 glutamylcysteinyl synthetase의 inhibitor인 BSO를 전처리 한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하였다. 세포내의 GSH가 결여된 상태에서의 산화적 스트레스에 대한 저항성은 사라졌다. 이 결과는 selenoprotein W의 항산화 능력은 GSH에 의존적이라는 사실을 의미한다.

많은 selenoprotein들은 catalytic site에서 selenocystine이 중요한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다. 또한 selenoprotein W의 항산화 기능에서 37번째의 cystine 이 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 selenoprotein W가 항산화 능력을 가지는데 있어서 이 두 부위의 역할을 알아보기 위하여 site direct mutation을 실행하였다. 현재 selenoprotein W의 각 부위가 Sec13Cys와 Cys37Sec로 치환된 single mutation된 clone들을 확보하여 H1299와 CHO *dhfr* 세포에 도입하여 발현시킨 후 wild type의 selenoprotein W와의 mutant protein간에 활성을 비교하였다. Wild type과 Mutant protein의 발현은 각각의 세포주에서 자체 제작한 monoclonal 항체를 사용하여 확인하였다. Selenoprotein W의 세포내에서 활성을 확인하고자 각 세포에 산화적 스트레스, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 항산화적인 활성을 cell viability를 측정하여 비교하였다. 이와 같은 실험을 통하여 wild type의 selenoprotein W가 발현된 세포에서는 항산화적인 특징이 뚜렷하게 나타나는 반면 mutant selenoprotein W의 경우에는 parental cell에서 산화적 스트레스에 의해 세포 성장이 억제되는 것과 같은 현상을 관찰할 수 있었다. 따라서 selenoprotein의 13번째 selenocystine과 37번째 cystine이 항산화적 활성을 나타내는데 중요한 역할을 할 것이라 사료된다. 결론적으로 selenoprotein W의 항산화성은 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는데 있어 glutathione peroxidase 등 다른 selenoprotein들과 더불어 selenoprotein W가 매우 중요하다는 것을 의미하며 이는 산화적 스트레스에 의해 유도되는 각종 질병의 예방과 치료에 매우 중요하다는 것을 의미한다.

### 고 찰

필수미량원소인 셀레늄은 다양한 형태로 세포 내에 존재하는데 그 중의 하나는 단백질 내에 셀레노시스테인이라고 하는 아미노산의 형태로 단백질 내에 존재한다. Selenocysteine을 함유한 여러 가지 selenoprotein들이 미생물, 동물 등으로부터 발견되고 있는데 그 중의 한 가지가 항산화 효소로 잘 알려진 glutathione peroxidase이다. 항산화제들은 여러 가지 활성 산소종들로부터 세포를 보

호하는 역할을 하는데, 이러한 항산화성은 암의 발생과 진행을 조절하는 것으로 알려지고 있다. 이 외에도 여러 가지 selenoprotein들에 대한 항산화작용이 알려져 있으며 동물의 white muscle disease에 관여하는 것으로 알려진 selenoprotein W의 기능 역시 glutathione에 의존적으로 세포내 항산화 작용을 하는 것으로 밝혀졌으며 특히 selenocysteine잔기가 그 기능에 절대적으로 중요하는 것으로 보고됨으로써 셀레늄 특히 셀레늄 단백질들의 생체 내 중요성이 더하게 되었다. 이는 과산화수소를 포함한 각종 활성산소종이 암을 비롯한 각종 질병의 원인이 된다는 점을 고려하여 볼 때 암의 예방에 있어 셀레늄 단백질들의 세포 내 역할을 매우 중요할 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 암의 치료라는 관점에서 볼 때 셀레늄 처리에 의한 미토콘드리아 손상과 세포사멸의 유도는 셀레늄의 항암제로서의 가능성을 보여주는 것이다. 따라서 다양한 형태의 셀레늄 화합물들은 세포를 산화적 스트레스로부터 보호함으로써 암을 비롯한 각종 질병에 대한 예방에 매우 중요하다고 생각된다.

### 요 약

마우스 뇌조직으로부터 클로닝을 한 selenoprotein W (Se-W)를 동물세포주인 CHO와 H1299 상에 과량 발현을 시켜 그 기능에 관한 연구를 하였다. Se-W의 과량 발현 시에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 산화적 스트레스에 저항성을 나타내었고 세포내 활성산소종 농도도 감소시킬 수 있음을 관찰할 수 있었다. 이 같은 Se-W의 산화적 스트레스에 대한 저항성은 세포내 항산화작용에 중요한 대사물질인 글루타치온에 의존적이라는 사실을 밝혔다. 그리고 이 같은 Se-W의 활성화에 있어서 selenocysteine 잔기가 중요한 역할을 한다는 사실을 규명하였다.

### 참 고 문 헌

- 1) Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997; 272: 20313-20316.
- 2) Stadtman ER. Protein oxidation and aging. *Science*

- 1992; 257: 1220-1224.
- 3) Alsina B, Corominas M, Berry MJ, Baguna J, Serras F. Disruption of selenoprotein biosynthesis affects cell proliferation in the imaginal discs and brain of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Sci* 1999; 112: 2875-2884.
- 4) Epp O, Ladenstein R, Wendel A. The refined structure of the selenoenzyme glutathione peroxidase at 0.2-nm resolution. *Eur J Biochem* 1983; 133: 51-69.
- 5) Bai J, Rodriguez AM, Melendez JA, Cederbaum AI. Overexpression of catalase in cytosolic or mitochondrial compartment protects HepG2 cells against oxidative injury. *J Biol Chem* 1999; 274: 26217-26224.
- 6) Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272: 18515-18517.
- 7) Beilstein MA, Vendeland SC, Barofsky E, Jensen ON, Whanger PD. Selenoprotein W of rat muscle binds glutathione and an unknown small molecular weight moiety. *J Inorg Biochem* 1996; 61: 117-124.
- 8) Gu QP, Beilstein MA, Barofsky E, Ream W, Whanger PD. Purification, characterization, and glutathione binding to selenoprotein W from monkey muscle. *Arch Biochem Biophys* 1999; 361: 25-33.
- 9) Vendeland SC, Beilstein MA, Chen CL, Jensen ON, Barofsky E, Whanger PD. Purification and properties of selenoprotein W from rat muscle. *J Biol Chem* 1993; 268: 17103-17107.
- 10) Yeh JY, Beilstein MA, Andrews JS, Whanger PD. Tissue distribution and influence of selenium status on levels of selenoprotein W. *FASEB J* 1995; 9: 392-396.
- 11) Yeh JY, Gu QP, Beilstein MA, Forsberg NE, Whanger PD. Selenium influences tissue levels of selenoprotein W in sheep. *J Nutr* 1997; 127: 394-402.
- 12) Yeh JY, Vendeland SC, Gu Q, Butler JA, Ou BR, Whanger PD. Dietary selenium increases selenoprotein W levels in rat tissues. *J Nutr* 1997; 127: 2165-2172.
- 13) Allan CB, Lacourciere GM, Stadtman TC. Responsiveness of selenoproteins to dietary selenium. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 1-16.
- 14) Sun Y, Gu QP, Whanger PD. Antioxidant function of selenoprotein W using overexpressed and underexpressed cultured rat glial cells. *FASEB J* 1998; 12: A824.
- 15) Schwarz K. Biological potency of organic selenium compounds. I. Aliphatic monoseleno- and diselenodicarboxylic acids. *J Biol Chem* 1969; 244: 2103-2110.

- 16) Levander OA. Trace elements in human and animal nutrition, Vol. 2, p. 209-279, 1986.
- 17) Combs GFJ. The role of selenium in nutrition, p. 1-525: Academic Press.
- 18) Behne D, Weiss-Nowak C, Kalcklosch M, Westphal C, Gessner H, Kyriakopoulos A. Application of nuclear analytical methods in the investigation and identification of new selenoproteins. *Biol Trace Elem Res* 1994; 43: 287-297.
- 19) Trush MA, Kensler TW. An overview of the relationship between oxidative stress and chemical carcinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1991; 10: 201-209.
- 20) Medina D. Mechanisms of selenium inhibition of tumorigenesis. *Adv Exp Med Biol* 1986; 206: 465-472.
- 21) Combs GF Jr, Clark LC. Can dietary selenium modify cancer risk? *Nutr Rev* 1985; 43: 325-331.
- 22) Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Krongrad A, Lesher JL J., Park HK, Sanders BB Jr, Smith CL, Taylor JR. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA* 1996; 276: 1957-1963.
- 23) Combs GF Jr, Gray WP. Chemopreventive agents: selenium. *Pharmacol Ther* 1998; 79: 179-192.
- 24) Shen HM, Yang CF, Ding WX, Liu J, Ong CN. Superoxide radical-initiated apoptotic signalling pathway in selenite-treated HepG(2) cells: mitochondria serve as the main target. *Free Radic Biol Med* 2001; 30: 9-21.
- 25) Kim TS, Jeong DW, Yun BY, Kim IY. Dysfunction of rat liver mitochondria by selenite: induction of mitochondrial permeability transition through thiol-oxidation. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 1130-1137.
- 26) Stadtman TC. Selenium-dependent enzymes. *Annu Rev Biochem* 1980; 49: 93-110.
- 27) Böck A, Forchhammer K, Heider J, Leinfelder W, Sawers G, Veprek B, Zinoni F. Selenocysteine: the 21st amino acid. *Mol Microbiol* 1991; 5: 515-520.
- 28) Kim IY, Guimaraes MJ, Zlotnik A, Bazan JF, Stadtman TC. Fetal mouse selenophosphate synthetase 2 (SPS2): characterization of the cysteine mutant form overproduced in a baculovirus-insect cell system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 418-421.
- 29) Novoselov SV, Rao M, Onoshko NV, Zhi H, Kryukov GV, Xiang Y, Weeks DP, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoproteins and selenocysteine insertion system in the model plant cell system, *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO J* 2002; 21: 3681-3693.
- 30) Stadtman TC. Selenocysteine. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 83-100.
- 31) Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256: 677-686.
- 32) Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *J Biol Chem* 1993; 268: 2571-2576.
- 33) Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohe R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohe L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol* 1995; 252: 38-53.
- 34) Ursini F, Bindoli A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chem Phys Lipids* 1987; 44: 255-276.
- 35) Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, Motta L, Richardson A, Prolla TA. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic Biol Med* 2003; 34: 496-502.
- 36) Hondal RJ, Ma S, Caprioli RM, Hill KE, Burk RF. Heparin-binding histidine and lysine residues of rat selenoprotein P. *J Biol Chem* 2001; 276: 15823-15831.
- 37) Hill KE, Zhou J, McMahan WJ, Motley AK, Atkins JF, Gesteland RF, Burk RF. Deletion of selenoprotein P alters distribution of selenium in the mouse. *J Biol Chem* 2003. (In press)
- 38) Kim IY, Guimaraes MJ, Bazan JF, Zlotnik A, Stadtman TC. Fetal mouse selenophosphate synthetase 2 (SPS2): Characterization of the cysteine mutant from overproduced in a baculovirus-insect cell system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94: 418-421.
- 39) Morey M, Serras F, Baguna J, Hafen E, Corominas M. Modulation of the Ras/MAPK signalling pathway by the redox function of selenoproteins in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol* 2001; 238: 145-156.