

Development of Rapid Detection Method for Unfolded Protein Response in the Mammalian Cells

Kisang Kwon¹, Tae Won Goo² and O-Yu Kwon^{1†}

¹Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-747, Korea.

²Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agricultural Science and Technology, Suwon 441-744, Korea

The mammalian unfolded protein response (UPR) protects the cell against the stress of unfolded or misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER). It has recently demonstrated that IRE1, PERK, ATF6, and X-box protein 1 (XBP-1) directly or indirectly participate in this process. Upon accumulation of unfolded/misfolded proteins in the ER lumen, release of BiP from Ire1p permits dimerization and autophosphorylation to activate its kinase and endoribonuclease activities to initiate XBP-1 mRNA splicing. Spliced XBP-1 mRNA removed middle part of 23 bp and encodes a potent transcription factor, XBP-1 protein that binds to the unfolded protein response element (UPRE) or endoplasmic reticulum stress element (ERSE) sequence of many UPR target genes and produces several kind of ER chaperones. In this study, we described both the result and the detailed experimental procedures of XBP-1 mRNA splicing induced by ER stress, this result might help to elucidate the roles of the UPR and early diagnosis in a number of human diseases involving endoplasmic reticulum storage disease (ERSD).

Key Words: Unfolded protein response (UPR), Endoplasmic reticulum (ER), X-box protein 1 (XBP-1), Endoplasmic reticulum storage disease (ERSD)

진핵생물의 mRNA에서 번역된 일차구조의 폴리펩타이드가 소포체 (endoplasmic reticulum; ER)에서 고차구조를 가지게 된다. 이때 소포체샤페론 (ER molecular chaperone)의 도움을 받아 생리적인 기능을 가질 수 있도록 번역 후 변형과정 (post-translational modification step)을 거치면서 완성된 단백질이 된다 (Kaufman, 1999; Leitzgen and Hass, 1998). 지금까지 보고된 소포체샤페론 중에서 대표적인 것으로 Bip, GRP94, PDI, calnexin, ERp72 등이 있으며, 이들은 기본적으로 단백질 폴딩 (folding)을 돕는 역할을 수행하지만 이중 일부는 폴딩되지 않은 단백질들의 분해에도 관여한다 (Liu et al., 1999; Biederer et al., 1997; Brodsky et al., 1999). 신생단백질이 소포체내로 translocation을 시작하면 가장 먼저 Bip (immunoglobulin binding protein)이 결합하여 일정한 도메인구조를 가지게 되면, 순차적으로 다른 소포체샤페론들이 결합하였다가 분리되는 반응을 반복하면서 고차구조의 단백질이 만들어진다 (High et al., 2000; Gething, 1999). 그러나 유전적, 생리적인

요인으로 비정상적인 폴딩이 일어나 중요한 분비단백질이 표적기관에 작용을 못하게 되면 unfolded protein response (UPR)라고 하는 일련의 신호전달과정이 일어나 샤페론의 발현이 증가한다. 한편 소포체내에 잘못 폴딩된 단백질이 분비되지 못하고 ER내에 과도하게 축적됨으로 세포손상을 일으키는 질병을 통칭하여 ERSD (ER storage disease)라고 한다.

세포의 소포체가 소포체스트레스 (ER stress)를 받으면 비정상적으로 폴딩된 변성단백질의 축적되고, 단백질의 조합에 결함 등이 나타난다. 이 자체가 신호전달의 정보원이 되어 소포체 막을 통하여 핵으로 특정 신호를 전달 (ER signal pathway)하여 세포의 전체적인 단백질 대사율을 억제하고, 소포체샤페론의 전사를 촉진하여 소포체내의 변성단백질을 직접적으로 억제·보호·수복한다. 이러한 UPR에서 핵으로 신호를 전달하기 위한 3종류의 소포체 막단백질 분자가 알려져 있는데 Ire1, PERK, ATF6이다 (Harding et al., 2002; Ng et al., 2000).

효모의 UPR 연구에서 소포체에서 핵으로 신호를 전달하기 위한 분자 중 대표적인 분자가 Ire1이다 (Wang et al., 1998). 이 단백질은 폴딩되지 않은 단백질들이 소포체에 쌓이면 그들을 인식하여 소포체 막과 핵사이의 신호전달에서 중요한 역할을 한다. Ire1은 효모의 UPR에서 가장 상위에 존

*논문 접수: 2005년 5월 4일

수정재접수: 2005년 5월 30일

†교신저자: 권오유, (우) 301-747 대전광역시 중구 문화동 6번지,

충남대학교 의과대학 해부학교실

Tel: 042-580-8206, Fax: 042-586-4800

e-mail: oykwon@cnu.ac.kr

제한 소포체 막단백질인 transmembrane serine/threonine kinase 로써 3개의 기능적인 domain을 가지고 있다. 소포체 내강부분의 N-말단 부분은 소포체내에 비정상적으로 쌓여있는 단백질을 인식하는 domain이다. 여러 소포체스트레스 처리에 의해서 Ire1은 동형이합체를 이루며 autophosphorylation되어 C-말단의 endoribonuclease domain이 활성화된다 (Tirasophon et al., 1998). 활성화된 endoribonuclease에 의해 기질에는 HAC1 mRNA가 밝혀져 있으며, HAC mRNA에서 이 번역을 강하게 억제하고 있는 intron이 제거 되면서 활성화되어 전사인자로 작용하여 유전자의 상류부위에 존재하는 ERSE (ER stress element)에 결합하여 목적 유전자를 발현시킨다. 포유동물의 경우 여러 조직에서 광범위하게 발현하는 Ire1 α 와 소화기계통 특이적인 Ire1 β 가 존재하여 UPR에 관여하는 것으로 알려져 있으나 (Wang et al., 1998; Sood et al., 2000), 소포체스트레스 전사유도에 있어서 Ire1 경로의 중요성은 명확하지 않으며, 필요한 전사인자도 아직 밝혀지지 않고 있다. 최근 포유동물에서 XBP-1 mRNA splicing이 소포체스트레스에 의해서 효모의 HAC1 mRNA splicing과 같이 unconventional mRNA splicing이 일어나는 것이 증명되었다 (Lee et al., 2002). XBP-1 (X-box protein 1)은 MHC III의 프로모터에 존재하는 cis-배열인 X box에 결합하는 단백질로 처음 분리되었다. 세포가 정상상태에서는 소포체사페론 Bip과 소포체 막단백질인 Ire1에 결합되어 정상적인 단백질을 유지하고 소포체스트레스를 받으면 Bip은 Ire1에서 떨어져 나와 변성단백질과 결합하며 Ire1은 동형이합체를 이룬다. 그 결과 세포질내의 XBP-1 mRNA의 중간에 23 bp가 제거되어 XBP-1 단백질이 만들어진다. 이렇게 만들어진 XBP-1 단백질은 ERSE에 결합하여 소포체 사페론의 전사를 조절한다 (Lee et al., 2002; Yoshida et al., 2001).

또 다른 ER kinase는 Ire1과 N-말단 부분과 높은 유사성을 가진 PERK (RNA-dependent protein kinase-like ER eIF2 α kinase)가 소포체 막에서 발견되었다 (Harding et al., 2000; Harding et al., 1999). 이는 kinase domain은 가지고 있으나 endoribonuclease domain은 가지고 있지 않다 (Zhang et al., 2002). PERK 역시 UPR에 반응하여 Ire1처럼 동형이합체를 형성하며 autophosphorylation을 일으킨다. 활성화된 PERK는 eIF2의 α subunit를 인산화하여 번역이 일어나지 못하게 한다. 정확한 기전은 알 수 없으나, 이때 ATF4 mRNA의 발현이 상승하여 만들어진 ATF4도 ERSE에 결합하는 것이 알려져 있다 (Harding et al., 2001; Liu et al., 2003).

소포체스트레스에 의해 전사가 유도된 단백질의 프로모터에는 cis-배열로 ERSE가 존재하며 ERSE의 CCAAT 염기에는 많은 종류의 유전자 전사에 관련되는 일반적인 전사인자 NF-Y가 소포체스트레스에 상관없이 결합하고 있고, CCACG 염기에는 소포체스트레스를 받았을 때에만 ATF6이 결합한다.

ATF6은 세포질 쪽의 N-말단부위에 basic leucine zipper (b-ZIP) domain과 c-말단은 소포체 내강에 stress-sensing domain으로 구성된다 (Haze et al., 1999). 소포체내에 변성단백질이 축적되면 ATF6은 어떠한 protease에 의해 활성화된다. 그래서 ATF6의 세포질 쪽의 절반정도가 소포체 막에서 떨어져 나온다. 절단된 이 절편이 핵으로 이동하여 ERSE의 CCACG 염기 부분에 결합함으로써 표적유전자의 전사가 활성화된다 (Mori, 2004; Zhang et al., 2004).

본 연구는 스트레스를 받은 세포가 아주 민감하게 소포체 막단백질인 Ire1에 의해서 세포질의 XBP-1 mRNA가 splicing이 일어나는 현상을 착안하여 XBP-1 mRNA splicing이 일어나면서 제거되는 23 bp 단편에 제한효소 *PstI* site가 존재하는 것을 확인하고 RT-PCR을 통해 얻은 산물을 제한효소 *PstI*으로 처리하여 절단유무와 정도에 따라 스트레스의 여부 및 정도를 판단할 수 있음을 확인하였다. 소포체스트레스를 받아서 XBP-1 mRNA splicing이 일어나면 23 bp가 잘려져 나오므로, 이렇게 23 bp가 떨어져 나온 RT-PCR 산물 (450 bp)은 제한효소 *PstI*를 처리하여도 절단되지 않는다. 반대로 스트레스를 받지 않은 XBP-1 mRNA에는 *PstI* site를 가지고 있으므로 RT-PCR 산물 (473 bp)을 제한효소 *PstI*를 처리하면 중간이 절단되어 2개의 단편 (290, 183 bp)이 된다. 두 가지 비교적 간단한 방법인 RT-PCR과 *PstI* 처리로 세포의 외부에서 오는 스트레스에 대해 어느 정도 반응하는지를 구분할 수 있는 시스템을 확립하였다.

본 연구에 사용된 재료 및 방법은 아래와 같다. 쥐의 신경세포 (PC12 cell; pheochromocytoma 12 cell)를 10% 마혈청과 5% 우혈청을 포함한 RPMI 1640 (JBI) 배지 내에서 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소, 그리고 충분히 습한 조건으로 배양하였다. 신선한 배지를 2~3일 간격으로 교체하며 배양하였고, 1주일에 한 번씩 계대배양 하였다. 실험에 쓰이는 세포는 70~90% 정도의 세포 충실도를 보이는 것을 사용하였고 전처리 후 pre-colded PBS (phosphate-buffered saline)로 한번 세척한 후, RNA-Bee (TEL-TEST)시약을 1 ml 넣고 2~3분 지난 후 scrapper로 긁어모아 1.5 ml-tube에 넣고 200 μ l의 chloroform을 첨가하여 충분히 섞어준 다음 12,000 x g, 4 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 원심분리 하였다. 약 500 μ l의 상등액을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropanol 넣고 4 $^{\circ}$ C에서 15분 정도 처리한 후 12,000 x g로 10분 동안 원심분리 하여 tube의 바닥에 얻어진 pellet을 75%의 ethanol을 500 μ l 넣고 12,000 x g로 5분 동안 원심분리하여 최종적으로 total RNA를 얻었다. Total RNA는 DEPC가 처리된 증류수에 녹여서 자외선 분광계로 정량하여 이후의 실험에 사용할 때까지 -80 $^{\circ}$ C에 보존하였다.

RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)은 total RNA (2 μ g)를 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하여 변성시킨 후, ice에서 5분 이상 급랭하였다. 6 μ l의 5 \times RT buffer, 4 μ l의

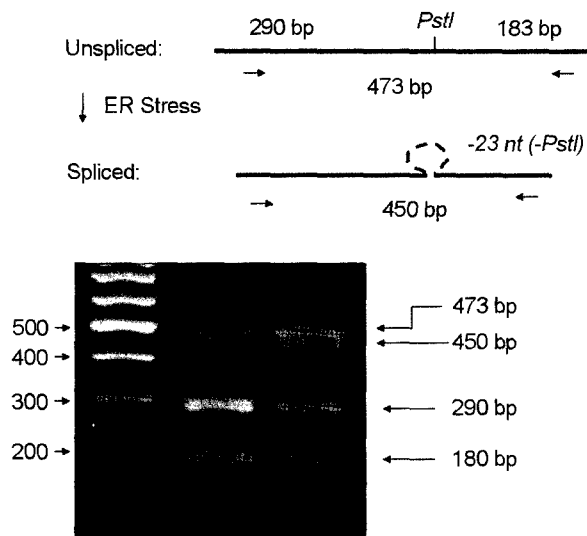


Fig. 1.

dNTP mixture (2.5 mM each), 0.6 μ l of oligo-dT (300 ng), 15 U of RNase inhibitor, 200 U of reverse transcriptase (M-MLV, Promega)를 가지고 총 반응액이 30 μ l가 되도록 조절한 후 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 후 95°C에서 10분 반응하여 reverse transcriptase를 inactivation 시킨 다음 DEPC가 처리된 증류수를 가하여 최종 50 μ l를 만들었다. cDNA를 증폭하기 위하여 이중 5 μ l에 25 pmol의 XBP-1 primer (24-mer sense primer 5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC-3', 24-mer antisense primer 5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3')와 2 \times Dyemix (BIOstream)를 가하여 총 반응액이 25 μ l가 되도록 하여 PCR를 시행하였다. XBP-1의 증폭조건은 94°C에서 40초 denaturation, 68°C에서 40초 annealing, 72°C에서 1분 extension한 다음 마지막으로 72°C에서 5분 final extension하여 35회 반복시켰다. 이 후 PCR 산물 3 μ l를 2% agarose gel 상에서 전기영동 시킨 후 밴드를 확인하였다. PCR 산물 중에 5 μ l를 취하여 1 μ l의 10 \times restriction buffer와 5 U의 *Pst*I 제한효소를 가하여 총 반응액 10 μ l가 되도록 하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 2% agarose gel에서 전기영동 시키고 UV 상에서 밴드를 확인하였다. 70~90%의 세포 충실도를 보일 때 소포체스트레스 유도제인 tunicamycin (20 μ g/ml; N-당쇄형성억제)을 시간별로 처리하였다.

특정 mRNA이나 단백질의 발현양을 알아 보기 위해서는 각각 Northern 또는 Western blotting 방법을 수행한다. 그러나 이보다 간단한 방법인 RT-PCR을 통해 세포가 외부로부터 소포체스트레스를 받았는지 여부를 쉽게 알 수 있었다. 이것은 세포가 소포체스트레스를 받으면 소포체 막단백질인 Ire1이 동형이합체가 되면서 세포질내의 XBP-1 mRNA의 중간부위

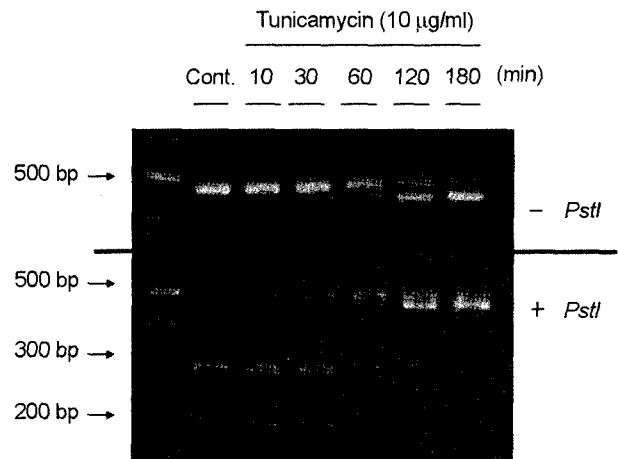


Fig. 2.

의 23 bp가 splicing 되어서 XBP-1 단백질이 만들어지고, 이렇게 만들어진 XBP-1 단백질은 ERSE에 결합하여 UPR에서 소포체사페론의 발현을 전사수준에서 조절함으로써 세포가 외부환경에 적응하는 것을 보여준다 (Lee et al., 2002). 이러한 방법을 도식화하여 Fig. 1에 나타내었다. 배양세포에 N-당쇄 결합억제제인 tunicamycin을 각각 0분, 10분, 30분, 60분, 120분, 180분 처리하여 얻은 total RNA를 XBP-1의 RT-PCR 산물을 *Pst*I 제한효소로 절단한 결과, 60분 이후부터 *Pst*I에 의해 뚜렷하게 절단된 2개의 밴드가 점점 감소되는 것을 Fig. 2에서 볼 수 있다. 이는 소포체스트레스에 의해서 유도된 *Pst*I site를 포함하지 않은 450 bp가 증가되는 것이 증명되었다. 이는 정확한 정량분석까지는 어려우나 세포가 외부로부터 받는 스트레스의 여부 및 정도를 알고자 하는데는 손쉬운 방법이 될 것이며, 여기에 소포체스트레스에 의해 ATF6의 절단, PERK에 의한 번역억제 등의 반응을 이해하고 스트레스를 받았는지의 여부에 대한 확인이 첨가된다면 더 정확한 스트레스 정도를 확인할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구 (R01-2003-000-10762-0) 지원으로 수행되었음.

REFERENCES

- Biederer T, Volkwein C, Sommer T. Role of Cue1P in Ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* 1997. 278: 1806-1809.
- Brodsky JL, Werner ED, Dubas ME, Goeckeler JL, Kruse KB, McCracken AA. The requirement for molecular chaperone during endoplasmic reticulum-associated protein degradation

- demonstrates that protein export and import are mechanically distinct. *J Biol Chem.* 1999. 74: 3453-3460.
- Gething MJ. Role and regulation of the ER chaperone Bip. *Semin Cell Dev Biol.* 1999. 10: 465-472.
- Harding H, Calton PM, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2002. 18: 575-599.
- Harding HP, Novoa I, Bertolotti A, Zeng H, Zhang Y, Urano F, Jousse C, Ron D. Translational regulation in the cellular response to biosynthetic load on the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 2001. 66: 499-508.
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D. Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* 2000. 5: 897-904.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999. 397: 271-274.
- High S, Lecomte FJ, Russell SJ, Abell BM, Oliver JD. Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperone? *FEBS Lett.* 2000. 476: 38-41.
- Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational control. *Genes Dev.* 1999. 13: 1211-1233.
- Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, Yoshida H, Mori K, Kaufman RJ. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* 2002. 16: 452-466.
- Leitzgen I, Haas GK. Protein Maturation in the Endoplasmic Reticulum. *Chemtracts-Biochemistry and Mol Biol.* 1998. 11: 423-445.
- Liu CY, Kaufman RJ. The unfolded protein response. *J Cell Sci.* 2003. 116: 1861-1862.
- Liu Y, Choudhury P, Cabral CM, Sifers RN. Oligosaccharide modification in the early secretory pathway directs the selection of a misfolded glycoprotein for degradation by the proteasome. *J Biol Chem.* 1999. 274: 5681-5867.
- Mori K. Unfolded protein response as a quality control mechanism of proteins. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* 2004. 49: 992-997.
- Ng DT, Spear ED, Walter P. The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol.* 2000. 150: 77-88.
- Sood R, Proter AC, Ma K, Quilliam LA, Wek RC. Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PER) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J.* 2000. 346: 281-293.
- Tirasophon W, Welihinda AA, Kaufman RJ. A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells. *Genes Dev.* 1998. 12: 1812-1824.
- Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* 2001. 107: 881-891.
- Wang XZ, Harding HP, Zhang Y, Jolicoeur EM, Kuroda M, Ron D. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress responses. *EMBO J.* 1998. 17: 5708-5717.
- Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem.* 2004. 279: 25935-25938.
- Zhang P, McGrath B, Li S, Frank A, Zambito F, Reinert J, Gannon M, Ma K, McNaughton K, Cavener DR. The PERK eukaryotic initiation factor 2 alpha kinase is required for the development of the skeletal system, postnatal growth, and the function and viability of the pancreas. *Mol Cell Biol.* 2002. 22: 3864-3874.