

## Induction of ER-stress by Heat Shock in the Thyrocytes

Kisang Kwon<sup>1</sup>, O-Yu Kwon<sup>1</sup> and Young Mo Yang<sup>2,†</sup>

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

<sup>2</sup>Department of Emergency Medicine, School of Medicine, Eulji University, Taejon 302-799, Korea

In eukaryotes, ER stress induces UPR (unfolded protein response) via IRE1 activation which sends a molecular signal for XBP1 mRNA splicing in the cytosol. During this mRNA splicing, 23 nt removed in which contains PstI site and then resulting XBP1 product is not digested with PstI restriction enzyme. In this study, using this XBP1 mRNA splicing mechanism, the effect of heat shock on thyrocytes is studied, because heat shock response in the thyrocytes needs more study to understand thyroid physiology under alternative environments. ER inducible drugs (tunicamycin, DTT, Ca<sup>2+</sup> ionopore A23187, BFA) induce ER stress in the thyrocytes. From 3 hours after heat shock, ER stress is induced and which is reversible when heat shock is without. While Ca<sup>2+</sup> ionopore A23187 is reversible from ER stress by washing out the drug, thapsigargin is irreversible. Other ER inducible drugs are not so sensitive to ER stress repairing. XBP1 mRNA splicing in a cell is very available method to detect ER stress. It needs only a small quantity of total RNA and processing also very easy.

**Key Words:** ER stress, XBP1 mRNA splicing, Thyrocytes

진핵세포의 ER (endoplasmic reticulum; 소포체)은 신생 단백질의 번역 후 변형과정 (post-translational modification step)을 수행하는 세포내 소기관이다. mRNA에서 만들어진 분비/막단백질은 소포체 내에서 folding & assembly, glycosylation adding & trimming 과정을 거쳐 생리활성을 가질 수 있는 완전한 단백질이 된다 (Ma and Hendershot, 2004). 이와 같은 소포체 기능에 직접적으로 관여하는 소포체 단백질무리를 소포체 분자샤페론 (ER molecular chaperone)이라고 한다. 지금까지 보고된 대표적인 것으로는 Bip, GRP94, Erp72, PDI, calnexin, calreticulin, Erp29 등이 있다 (Kwon et al., 2000). 그러나 비정상적인 세포생리현상에 의해서 소포체 기능에 문제가 생기면 질병으로 나타난다. 이들을 총괄하여 ERSD (ER storage disease)라고 한다. 보고된 ERSD는 congenital hypothyroidism and related disorders, Diabetes insipidus and related disorders, Osteogenesis imperfecta and related disorders, Lipid disorders, Diabetes mellitus insulin receptor defect, Growth disorders에 관련된 40여종이 있다 (Kim and Arvan, 1998).

소포체는 적절한 번역 후 변형과정의 환경제공을 위하여 세포질에 비하여 10~100배 정도 높은 칼슘 농도가 SERCA (sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase)에 의해서 유지된다 (de

Meis, 2002). 소포체가 소포체 스트레스 (ER stress)를 받으면 비정상적으로 folding된 변성 단백질 (malformed/unfolded/misfolded protein)의 축적, 단백질 assembly의 결함 등이 나타난다. 이때에 소포체가 핵으로 소포체 신호전달 (ER signal pathway)을 통해서, 세포의 전체적인 단백질 대사를 억제하는 방법과 소포체 내에 축적되는 변성 단백질의 직접적인 억제, 보호 및 수복과 같은 일을 한다. 이것에 관련된 3종류의 소포체 막단백질이 알려져 있다 (IRE1, PERK, ATF6) (Lee et al., 2002; Trombetta et al., 2003). 첫째로, 외부로부터 ER stress가 세포에 가해지면 ER lumen의 Bip과 결합하고 있던 monomer 상태의 IRE1이 dimer가 된다. 위의 결과에 의해서 세포질 내의 XBP1 mRNA의 splicing이 일어나 XBP1 단백질이 생산되어 chaperone을 생합성한다 (Yoshida et al., 2001). 두번째로, monomer 상태의 ER 막관통 단백질의 PERK가 ER stress에 의해서 dimerization 되면서 핵전사인자인 eIF2 alpha가 인산화 되어 세포전체의 단백질 생합성을 억제한다 (DeGracia et al., 2002). 세번째, 역시 막 관통단백질인 ATF6이 ER stress를 받으면 세포질 쪽의 단편이 떨어져 ERSE (ER stress element)에 결합한다 (Benjamin, 2006).

세포가 ER stress를 받았는지 알 수 있는 방법은 항체를 사용하는 Western blotting 방법이 있지만, 본 연구팀은 진핵 세포가 외부의 ER stress를 받았는지를 정확하며 간편하게 검출하기 위하여 ER stress에 아주 민감하게 소포체 막단백질인 IRE1을 통해서 세포질의 XBP1 mRNA가 splicing이 일

\*논문 접수: 2006년 10월 9일

수정재접수: 2006년 11월 25일

†교신저자: 양영모, (우) 302-799 대전광역시 서구 둔산2동, 을지외과대학병원 응급의학과

Tel: 042-611-32544, e-mail: emdyang@eulji.ac.kr

어나는 현상에 이용하였다 (Kwon et al., 2005). XBP1 mRNA splicing이 일어나면서 제거되는 23 nt 단편에 제한효소 PstI site가 존재하기 때문에 ER stress를 받아서 23 nt가 분리된 상태의 RT-PCR 산물은 제한효소 PstI을 처리하여도 절단되지 않는다. 그러나 ER stress를 받지 않은 XBP1 mRNA에는 PstI site를 가지고 있기 때문에, 이것의 RT-PCR 산물에 제한효소 PstI을 처리하면 중간이 절단된다. 즉 ER stress를 받으면 450 bp (-23 nt)가 나타나지만 ER stress를 받지 않으면 473 bp (+23 nt)와 473 bp 단편의 중앙에 PstI으로 절단된 2개의 단편 (290 bp, 183 bp)이 나타난다. 이처럼 제한효소 PstI 처리에 따라서 각각 다른 길이로 절단되는 특성을 이용하여 외부환경이 세포에 어느 정도의 ER stress로 작용하는지를 구별할 수 있는 system이다. 일반적으로 각종 ER stress 중에서 열 충격은 최초로 보고된 세포자극원이지만 세포에 따라서 그 반응은 큰 차이를 보이고 있다 (Bolte, 2003). 특히, 갑상선세포에 대한 열 충격 연구는 아주 미미한 수준이다.

갑상선 배양세포인 FRTL-5는 5% 우혈청을 포함한 Coon's 배지에서 배양한다. 배양기의 조건은 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 이상의 습한 조건이다. Total RNA의 분리에는 RNAzol-B Kit (TEL-TEST, Inc. TX, USA)를 사용하였다. 충분히 자란 FRTL-5 세포를 여러 시약을 처리한 후 차가운 phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척 후 긁어 모은 후 RNAzol-B 1 ml에 homogenization 시켰다. 그 다음 chloroform 200 µl을 첨가하여 잘 섞어주고 12,000 rpm (4°C)에서 15분간 원심 분리하여 얻은 500 µl의 상층액에 500 µl의 isopropanol을 첨가하여 4°C에서 15분간 방치 후 다시 12,000 rpm (4°C)에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물에 75% ethanol 1 ml을 첨가하고 잘 교반하여 10,000 rpm (4°C)에서 5분간

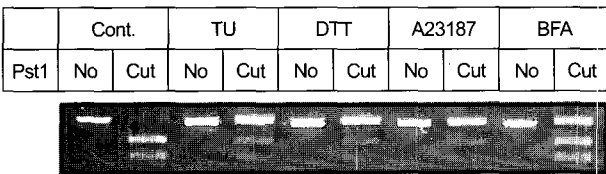


Fig. 1.

원심 분리하여 RNA를 얻었다. RT-PCR은 세포에서 추출한 mRNA의 poly A에 oligo dT primer를 결합시켜 역전사 효소를 이용해 cDNA를 합성한다. 그리고 주형 cDNA에 대한 DNA primer, dNTP, 내열성 DNA polymerase를 함유하는 반응액 중에 목적으로 하는 double strand DNA를 열 변성한다 (94°C, 30 sec). 열 변성에 의해 생긴 single strand DNA에 primer를 annealing 한다 (55°C, 30 sec). 그리고 DNA polymerase에 의한 상보성 DNA를 합성한다. 열 변성부터 상보성 DNA 합성까지 25~30 cycle을 반복하는데, 목적 DNA 단편에 따라 최대효율을 얻을 수 있는 조건이 달라서 적당하게 설정조건을 조절할 필요가 있다.

PCR의 template로 사용하기 위해 M-MLV (Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 분리한 3 µg의 RNA를 oligo d(T), Nuclease-Free Water와 함께 1.5 ml tube에 넣고 70°C에서 5분간 가열하여 denature 시킨 다음 즉시 얼음에 차게 식힌 후, M-MLV 5X Reaction Buffer 6 µl, dNTP mixture (2.5 mM) 4 µl, M-MLV RT 200 units, 재조합 RNasin® Ribonuclease Inhibitor 25 unit를 첨가하고 Nuclease-Free Water로 최종 반응량을 30 µl로 맞추는 다음 42°C에서 90분간 반응시켰다. 반응 후에는 95°C에서 2분간 M-MLV RT를 inactivation 시킨

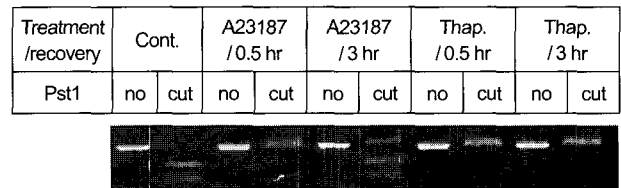


Fig. 2.

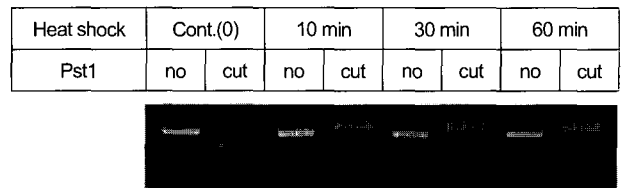


Fig. 3.

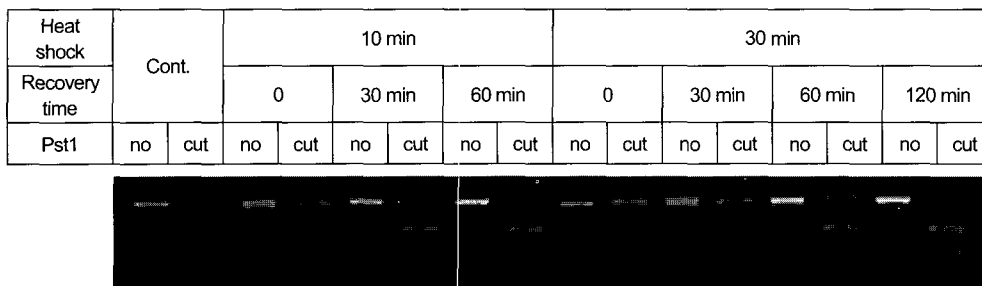


Fig. 4.

후 Nuclease-Free Water 70  $\mu$ l을 더하여 최종적으로 100  $\mu$ l로 맞추어 다음 PCR에 2  $\mu$ l씩 사용하였다. PCR 반응액 50  $\mu$ l에 F-primer (5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC-3')와 R-primer (5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3')를 94 $^{\circ}$ C~30초, 68 $^{\circ}$ C~30초, 72 $^{\circ}$ C~1분으로 30회 반복하고 XBP1임을 DNA sequencing 하여 확인하였다. PCR 산물 8  $\mu$ l을 PstI 제한효소로 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 처리한 다음에 2% agarose gel에서 전기영동하여 UV상에서 밴드를 관찰하였다.

각종 ER stress에 대한 XBP1 mRNA의 splicing을 확인하기 위한 실험을 하였다 (Fig. 1). 대조군으로 아무런 처리도 하지 않은 세포의 RT-PCR 산물과 각종 ER stress를 유도 (tunicamycin; N-당쇄형성 억제, DTT; 이황화 결합억제, Ca<sup>2+</sup> ionopore A23187; 세포내 칼슘교란, BFA; 분비단백질이 소포체에서 Golgi complex로의 이동 방해)하여 얻은 RT-PCR 산물을 PstI로 절단하여 2% agarose gel에 전기영동 하였다. Control의 RT-PCR 산물은 중간부위가 절단되어 2개의 밴드가 확인되었다. 그러나 ER stress 유도약물 (ER stress inducible drugs)로 ER stress가 유도된 RT-PCR 산물은 XBP1 mRNA의 중간부위의 23 nt가 splicing에 의해서 제거되어서 PstI 인식부위가 없어졌다. 그래서 절단된 2개의 밴드보다 절단되지 않은 1개의 밴드가 더 진하게 확인되었다.

ER stress 의한 세포의 회복능력을 알기 위하여 각각 다른 스트레스 시간과 각각 다른 chase 시간에 따른 XBP1 mRNA splicing을 조사하였다. Ca<sup>2+</sup> ionopore A23187과 thapsigagin을 처리하여 각각의 XBP1 mRNA 산물과 PstI로 절단한 것을 전기영동하면 A23187의 경우에 0.5시간에 회복되기 시작하여 3시간의 회복 시간이 주어진 경우에는 거의 회복되었음을 관찰하였으나 thapsigagin 경우에는 3시간 경과 후에도 전혀 회복되지 않음을 관찰하였다 (Fig. 2). 이 실험결과는 Ca<sup>2+</sup> ionopore A23187에 의한 ER stress는 가역적이거나 thapsigagin에 의한 스트레스는 비가역적인 것을 의미한다. 열 충격을 포함한 세포의 자극에 대응하여 세포내 기능을 정상적으로 회복시킬 수 있는 것은 chaperone들의 역할중의 하나이다.

열 충격 처리 시간에 따른 XBP1 mRNA splicing의 효과를 알기하기 위하여 열 충격을 45 $^{\circ}$ C에서 10, 30, 60분 동안 각각 처리하였다. 각각의 XBP1 mRNA 산물과 PstI로 절단한 것을 전기영동하면 10분에서 splicing된 것이 나타나기 시작하여, 30분에서는 더욱 분명하게 60분에서는 완전하게 splicing 되었다 (Fig. 3).

열 충격에 의한 세포의 회복능력을 알기 위하여 각각 다른 열 충격 시간과 각각 다른 chase 시간에 따른 XBP1 mRNA splicing을 조사하였다. 각각 10분과 30분 동안 열 충격을 준 뒤에 정상적인 배양조건 (37 $^{\circ}$ C)에서 30, 60, 120분간 보낸 것 (Fig. 4)과 120분 동안 열 충격을 준 뒤에 30, 60, 120분 동안 정상 배양조건에서 보낸 뒤에 얻은 각각의

Heat shock	Cont.		60 min							
			0		30 min		60 min		120 min	
Recovery time	no	cut	no	cut	no	cut	no	cut	no	cut
Pst1										



Fig. 5.

XBP1 mRNA 산물을 PstI digestion 산물을 전기영동 하였다 (Fig. 5). 열 충격 시간이 10분과 30분일 때는 각각 60분과 120분에 정상조건으로의 회복 시간에 splicing이 약해져 절단된 밴드가 control과 비슷해졌고, 120분의 열 충격에는 30분부터 회복이 보이긴 하나 120분에도 control 수준까지 회복되지는 못했다. 그러나 이는 열 충격에 의해서 즉시 발현된 인자 혹은 나중에 발현된 인자가 적극적으로 세포의 정상적인 회복에 깊이 참여하는 것으로 사료된다.

갑상선 배양세포는 쉽게 열 충격을 받으나 이는 열 충격에 의해서 즉시 발현된 인자 혹은 나중에 발현된 인자가 적극적으로 세포의 정상적인 회복에 깊이 참여하여 세포보호 및 기능 회복에 긍정적으로 작용하는 것으로 사료된다. 갑상선 배양세포는 45 $^{\circ}$ C의 열 충격에 예민하게 반응하였으나, 정상수준까지의 회복도 가능하다. 이는 열 충격에 의해서 즉시 발현된 인자 혹은 나중에 발현된 인자가 적극적으로 세포의 정상적인 회복에 깊이 참여하여 세포보호 및 기능 회복에 긍정적으로 작용하는 것으로 사료된다. ERSD의 분자생물학적 이해와 함께 진단 및 치료제의 개발을 위한 유용한 정보를 얻을 수 있다. 특히, 약물요법과 병행하여 갑상선 질환을 포함하는 내분비질환의 온열치료 (hyperthermia)를 위한 실험동물을 제공할 수 있을 것이다 (Kilgore, 2004). 더불어 수술이 불가능한 국소 진행암, 방사선저항성종양, 수술 후의 재발암, 주위조직과 유착된 림프절 전이와 같은 난치성 종양에 대하여 방사선 및 화학요법을 병행한 온열치료의 가능성을 제시한다.

감사의 글

본 연구는 2005년도 범석학술연구비 지원에 의해서 수행되었습니다.

REFERENCES

Benjamin IJ. Viewing a stressful episode of ER: is ATF6 the triage nurse? *Circ Res.* 2006. 98: 1120-1122.  
 Bolte C, Schneider-Stock R, Roessner A, Quednow C, Hoang-Vu C. Function of HSP90 and p23 in the telomerase complex of

- thyroid tumors. *Path Res Pract.* 2003. 199: 573-579.
- DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC. Molecular pathways of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implications for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002. 22: 127-141.
- de Meis L. Ca<sup>2+</sup>-ATPases (SERCA): energy transduction and heat production in transport ATPases. *J Membr Biol.* 2002. 188: 1-9.
- Kilgore JL. Severity of viral infection is promoted by hyperthermic pretreatment. *J Sci Med Sport.* 2004. 7: 259-263.
- Kim PS, Arvan P. Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocr Rev.* 1998. 19: 173-202.
- Kwon K, Goo TW, Kwon OY. Development of rapid detection method for unfolded protein response in the mammalian cells. *J Exp Biomed Sci.* 2005. 11: 249-252.
- Kwon OY, Park S, Lee W, You KH, Kim H, Shong M. TSH regulates a gene expression encoding ERp29, an endoplasmic reticulum stress protein, in the thyrocytes of FRTL-5 cells. *FEBS Lett.* 2000. 475: 27-30.
- 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.
- Ma Y, Hendershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J Chem Neuroanat.* 2004. 28: 51-65.
- Trombetta ES, Parodi AJ. Quality control and protein folding in the secretory pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2003. 19: 649-676.
- 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.