Journal of Life Science 2007 Vol. 17. No. 6. 847~858 ©JLS / ISSN 1225-9918

- 총 설 -

재조합 단백질 생산을 위한 소포체 신호전달

구태원 · 윤은영 · 강석우 · 권기상[1] · 권오유[1]*

농업과학기술원 농업생물부, [1]충남대학교 의과대학 해부학교실

Received April 24, 2007 / Accepted May 17, 2007

Endoplasmic Reticulum Signaling for Recombinant-protein Production. Tae Won Goo, Eun Young Yun, Seok Woo Kang, Ki sang Kwon[1] and O-Yu Kwon[1]*. *Department of Agricultural Biology, Rural Development Administration, Suwon 441-853, Korea.* [1]*Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-747, Korea* – The endoplasmic reticulum (ER) is an important intracellular organelle for folding and maturation of newly synthesized transmembrane and secretory proteins. The ER provides stringent quality control systems to ensure that only correctly folded proteins exit the ER and unfolded or misfolded proteins are retained and ultimately degraded. The ER has evolved stress response both signaling pathways the unfolded protein response (UPR) to cope with the accumulation of unfolded or misfolded proteins and ER overload response (EOR). Accumulating evidence suggests that, in addition to responsibility for protein processing, ER is also an important signaling compartment and a sensor of cellular stress. In this respect, production of biofunctional recombinant-proteins requires efficient functioning of the ER secretory pathway in host cells. This review briefly summarizes our understanding of the ER signaling developed in the recent years to help of the secretion capacities of recombinant cells.

Key words – Endoplasmic reticulum (ER) stress, recombinant-protein, unfolded protein response (UPR), ER overload response (EOR), chaperone, ER quality control (ERQC), glycosylation

서 론

생명공학의 발달에 의해서 인간에게 사용할 수 있는 생체활성물질이 배양세포에서 재조합단백질 형태로 생산되어 단백질 치료제 및 진단시약으로 사용되고 있다 (표 1). 배양세포를 이용할 경우 이들 생체활성물질이 기대했던 것과 달리 대부분이 생체활성을 나타내지 못함으로써 극히 적은 양의 생체활성물질만을 생산한다. 생체활성물질의 직접적인 대량생산이란 측면과 함께 단백질의 구조, 기능 및 각종 질병에서의 역할, 농약 연구, 진단 시약, 백신, 약리 연구 및 유전자 치료등과 같은 분야에서 급증하는 재조합단백질의 수요에 대응하기 위하여 완전하게 생체활성을 가진 재조합단백질을 지속적으로 대량생산할 수 있는 곤충 생체공장화의 연구가 시급히 요구되어서 최근에 곤충 생체공장화가 주목을 받고 있는 실정이다. 생체공장이란 유용하게 이용할 수 있는 생체활성물질을 안정적으로 생명체로부터 대량으로 생산할 수 있는 일종의 생물반응기를 의미한다. 또한, 생체공장을 광의적으로 해석할 경우에는 단일세포 자체도 복잡한 대사경로를 거쳐 유용대사산물을 생산하므로 마이크로 규모의 생체공장으로 볼 수도 있다. 물론 *in vitro*의 생물반응기를 이용하여 생체활성물질을 생산할 수도 있으나 그것은 너무나 제한적인 종류의 생체활성물질 생산과 복잡하고 고가의 시설을 필요로 한다. 더욱이 생체활성을 가진 물질 생산을 위한 공업적인 최적화는 생체활성물질의 종류에 따라서 많은 차이가 있어서 미래의 생체공장으로 하기에는 많은 어려움이 있다.

곤충을 이용한 생체공장화는 최근에 발현벡터 (BEVS: baculovirus expression vector system)의 꾸준한 연구결과에 힘입어 급속하게 발전되어 각종 분비단백질과 kinase, melanotransferrin, glutamate transporter등과 같은 많은 종류의 생체활성물질이 곤충배양세포에서 생산되고 있다. 이들 생체물질의 경우 대부분이 치료제 및 진단제로서 인류의 보건에 밀접한 관계가 있으며, 또한 대부분의 생체분자소재는 그 자체가 환경친화성 제품일 뿐만 아니라 생산 공정도 환경오염물질을 유발하지 않는 청정공정에 의해서 생산된다. 생체공장화에 있어서 생산 단가와 최종 생산물의 품질은 가장 중요하게 고려할 요소다. 그러한 면에서도 곤충 생체 (누에)를 이용한 생체활성물질 생산의 최대 장점은 낮은 제조비용으로 고품질의 생체활성물질을 대량 생산할 수 있다는데 있다.

표 1과 같이, 단백질 치료제로서 시장성이 높은 재조합단백질의 대부분은 분비당단백질이며, 따라서 이들 단백질들은 숙주세포의 secretory process에 의해서 생합성 된다. 재조합단백질 생산자들은 발현을 위한 숙주로써 포유동물세포에 초점을 맞추었는데, 왜냐하면 유일하게 포유동물세포만이 정확한 번역 후 변형과정 (post-translational modification step)을 수행할 수 있음으로써 치료적 가치가 높은 대부분의 단백질에 대하여 고유의 생체활성을 나타내게 할 수 있다고 판단하였다. 그러나 포유동물세포를 재조합단백질 생산을 위한 숙

*Corresponding author
Tel : +82-42-580-8206, Fax : +82-42-586-4800
E-mail : oykwon@cnu.ac.kr

Table 1. Examples of therapeutic proteins in mammalian cells that are currently on the market (taken from http://www.fda.gov)

Product	Host cell	Application
NovoSeven (Factor VII)	BHK (baby hamster kidney)	Hemophilia
Follistim (FSH, follicle -stimulating factor)	CHO (Chinese hamster ovary)	Infertility
Neorecormon (EPO, erythropoietin)	CHO	Anemia
Rebif (interferon-β1a)	CHO	Multiple sclerosis
Pulmozyme (dornase-α)	CHO	Cystic fibrosis
Synagis (humanized antibody)	NS0 myeloma	Respiratory tract disease
Zenapax (humanized antibody)	NS0 myeloma	Kidney transplant rejection
VAQTA	Human NCR-5 diploid fibroblasts	Hepatitis A vaccine

주로 사용할 경우에는 포유동물세포를 배양하고 유지하기 위하여 포유동물 유래의 각종 호르몬과 생장조절물질이 다량으로 필요하므로 상당 비용이 요구된다. 따라서 포유동물세포와 유사한 번역 후 변형과정을 가지면서 저비용으로 재조합단백질을 생산할 수 있는 새로운 생산 시스템이 탐색되었는데, 최근에 곤충생체 및 곤충세포가 주목을 받고 있다.

BEVS 이용에 의해서 곤충생체 또는 곤충세포에서 재조합단백질을 생산할 경우 포유동물세포에 비해서 훨씬 저렴한 비용으로 생산할 수 있지만, 생산된 재조합단백질들은 포유동물세포에서와 마찬가지로 재조합단백질의 제한된 분비효율이라는 한계에 직면한다. 비록, BEVS에 의해서 재조합단백질이 세포 내에서는 과량으로 만들어지지만 그 대부분이 비수용성의 aggregate를 형성함으로써 극히 적은 양만이 세포 외로 분비되거나 혹 분비된다고 하더라도 생체활성을 가지지 못하는 등의 문제점을 가진다. 이러한 문제점이 발생하는 원인은 첫 번째, 세포질에서 과량의 전사체를 만들면서 ER (endoplasmic reticulum) 내로 운반된 과량의 재조합단백질이 생체활성을 가지는 재조합단백질 생산을 위한 rate-limiting factor로서 작용할 수 있으며, 두 번째, 재조합단백질 생산의 과정에서 야기되는 이러한 rate-limiting step이 세포 기능에 있어서 변화와 깊게 연관될 수 있기 때문이다. 특히, ER를 통한 단백질의 이동 및 ER 품질관리 (ER quality control; ERQC) 기작은 단백질의 번역 저해, 세포성장 억제 또는 apoptosis의 활성에 의한 세포수를 감소시킬 수 있기 때문이다.

따라서 여기에서는 재조합단백질의 생산과 밀접한 관련이 있는 ER의 기능과 ER stress response에 대한 최근 연구동향을 분자 수준에서 언급할 것이며, 또한 곤충생체 또는 곤충세포로부터 재조합단백질의 안정적 대량 생산과 분비능력 개선을 위한 방안으로써 ER signaling과 재조합단백질 생산과의 관련성에 관하여 언급할 것이다.

본 론

재조합단백질의 발현 : ER-Golgi secretory pathway

단백질의 고차구조 및 번역 후 수식과정 (post-translational modification step)은 생체 내에서 단백질의 trafficking, immunogenicity 또는 분비능력등에 결정적으로 영향을 줄 수 있다[7,25,28,29,91]. 특히 단백질의 작은 변형은 아주 특이적으로 단백질특성에 극적인 변화를 초래할 수 있다. 만약 배양세포로부터 얻은 재조합단백질이 진단약, 예방약 또는 치료제와 같은 의약용으로 사용될 목적이라면, 그들 고유특성에 가장 근접하는 것이 매우 중요하다. 재조합단백질이 고유한 특성을 잘 유지하기 위해서는 정확한 단백질생합성 과정이 유지되는 것과 함께 외부 인자에 의한 심한 교란이 생기지 말아야한다. 단백질 치료제와 같이 재조합 형태로 생산되는 대부분의 단백질은 분비당단백질이며, 이들의 folding, assembly와 당쇄부가 (glycosylation)는 ER lumen에서 일어난다 (그림 1). ER lumen 단백질의 *translocation*은 co-translation하게 일어나며, core glycan의 부가 역시 동시에 일어난다[6,49]. 단백질이 ER lumen에서 정확한 구조를 가지고 정확한 생물활성을 가진 단백질이 되기 위해서 ER lumen은 산화상태의 환경과 ER에 존재하는 효소들과 여러 종류의 chaperone를 제공한다.

ER에서 단백질의 3차구조형성을 촉매하여 기본골격형성에 가장 중요한 역할을 담당하는 protein disulfide isomerase (PDI)와 같은 효소와 GRP (glucose-regulated protein) family와 같은 chaperone은 고농도의 단백질의 존재 하에서 단백질의 folding 촉진과 함께 unfolded protein chain에 결합하여 비정상적인 단백질의 aggregation을 저지한다[31,35,46]. 그리고 calreticulin과 calnexin과 같은 chaperone은 당단백질의 중간산물에 일시적으로 결합하여 당쇄형성의 품질관리 기전을 제공하여 정확하게 folding된 단백질만이 세포외의 분비를 허용한다[39,104]. 실제로 ER lumen에서 N-linked glycosylation은 membrane-bound dolichol glycan carrier의 assembly를 요구하며, 완전한 core oligosaccharide는 이 carrier로부터 성장하는 polypeptide에 운송되고 N- glycosidic bond를 통하여 asparagine잔기의 side chain에 연결된다[6,55]. ER glycosylation을 위한 당 기질 (sugar substrates)의 대부분은 sugar nucleotide의 형태로 세포질로부터 공급된다[47]. 분비단백질은 세포외로 분비되는 도중에 ER에서 core glycan이 절단되고 새로운 carbohydrate의 부가가 일어나는

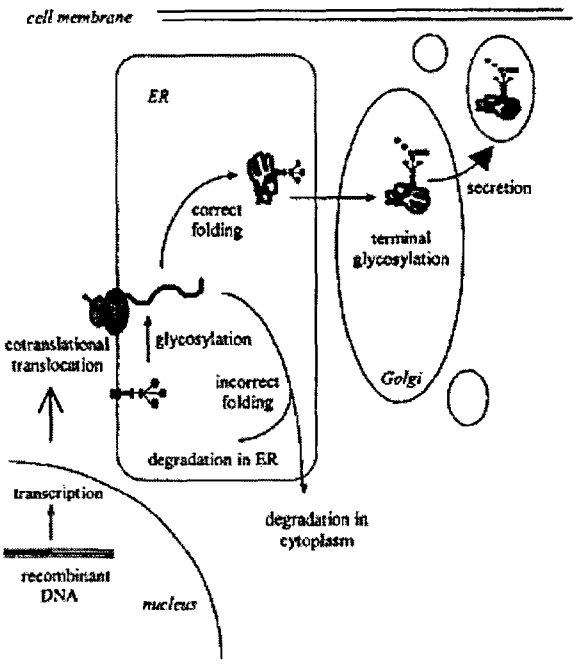

Fig. 1. ER-Golgi secretory pathway. During the co-translational translocation into the ER lumen, proteins are subjected to folding and ER-specific glycosylation (the oligosaccharide residues are transferred onto the polypeptide chain from a dolichol phosphate donor anchored in the ER membrane). Both processes are integrated since the folding quality control system relies on identifying correct glycoforms of proteins. Proteins that pass the quality control proceed to the Golgi apparatus, where further trimmings and additions of sugar residues are performed, and are subsequently transported to their final destinations. Misfolded and incorrectly assembled proteins are retained and degraded either in the ER or in the cytosol.

골지체를 통과한다. ER과는 달리, 골지체는 lipid-linked intermediate를 사용하지 않고, 특이적인 transporter를 이용하여 세포질로부터 sugar nucleotide와 같은 glycosylation 전구체를 사용한다[47]. 세포외로 misfold되었거나 부정확하게 glycosylation된 단백질이 운송되는 것을 저지하기 위하여 ER 내에 이들 단백질들은 머물게 되며 이들의 일부 단백질은 결국 ER 내에서 분해되거나, 다른 일부 보류 단백질은 세포질로 운송된 다음 proteasome 기작에 의해서 분해된다[77].

재조합단백질 발현과 ER signaling의 관계

ER은 단백질의 합성 기전에 직접적인 영향을 미칠 뿐만 아니라, 세포의 신호 전달 면에서도 중요한 역할을 수행하며 ER signaling은 생체활성을 가지는 재조합단백질의 분비 비율에 영향을 미칠 수 있다. ER signaling은 ER overload response (EOR)와 unfolded protein response (UPR) 두 가지 종류로 ER 내에 혼란을 신속하고 적절하게 제거한다[56,75]. 산업적 규모의 재조합단백질 생산과 관련하여, ER은 강력한 발현 시스템의 사용으로부터 야기되는 과량의 재조합단백질의 합성 때문에 매우 불리한 상황에 노출될 수 있다. 즉, 재조합단백질 발현을 극대화하기 위한 시도는 ER 혼란을 야기시키고 EOR 및 UPR의 작동을 위한 계기를 제공한다.

UPR과 EOR를 구별하기는 어려운데, 왜냐하면 ER 내에 단백질의 과축적으로 인한 triggering factor가 UPR과 EOR 신호 둘 다에 관계하기 때문이다. ER lumen에 단백질의 과축적으로 인한 EOR은 칼슘이온의 삼투성을 증가시킬 수 있는 반면에, UPR은 ER lumen에 unfolded protein이나 misfolded protein의 과축적에 의해서 활성화 된다고 알려져 있다[56,65,72]. EOR 및 UPR 둘 다는 일정 수준의 protein kinase와 전사인자를 요구하고 유전자 발현에 있어서 변화를 일으킨다. 그러나 UPR과 EOR은 signaling에 있어서 각각 다른 mediator를 사용하며 response를 생산하기 위해서도 각각 다른 유전자를 target으로 한다 (그림 2).

EOR은 IKK (inhibitor of κB kinase)를 활성화하며, 활성화된 IKK는 I-κB (inhibitor of κB)의 분해를 유도한다[1,92]. 이러한 과정은 생명의 생/사결정과 염증반응 (inflammatory response)에 관여하는 여러 가지 단백질을 암호화는 유전자의 발현을 유도하는 transcription factor인 NF-κB (nuclear factor-κB)를 활성화 시킨다[2,61]. UPR은 ER membrane kinase인 IRE1 (high inositol-requiring)의 α와 β isoform과 PERK (PKR-like ER kinase)가 cytoplasmic effector domain의 oligomerization과 trans-autophosphorylation에 의해서 활성화될 때 개시된다[8,85]. 부가적으로 IRE1 kinase domain

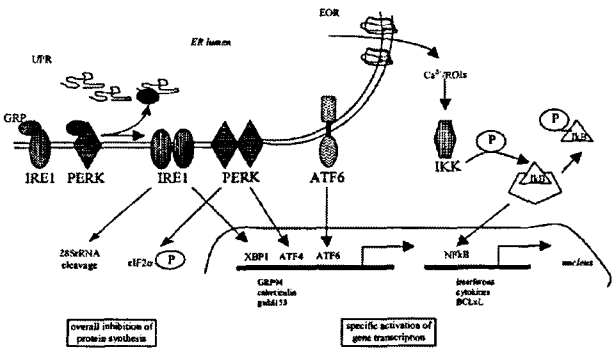

Fig. 2. ER stress responses: UPR and EOR. Under normal conditions IRE1 and PERK are bound to GRP78 and inactive. Accumulation of unfolded proteins leads to the release of GRP78, which is recruited to facilitate folding, and subsequent activation of IRE1 and PERK. As a result, the UPR is initiated, which involves both transcriptional activation of the ER stress-responsive genes and overall translational repression. In EOR, the release of calcium from the ER and subsequent activation of ROIs initiate IKK-dependent phosphorylation and degradation of I-κB. Consequently, NF-κB is released and activates downstream target genes.

의 활성은 IRE1의 endonuclease domain의 활성을 유도하며, 이들 kinase들이 전사인자 (ATF4, ATF6의 α 및 β isoform, XBP-1)를 조절하는데 작용하고, 이들 전사인자는 GRP78, GRP94, calreticulin, growth arrest gene 및 DNA damage gene인 gadd153과 같은 ER stress responsive gene을 활성화 시킨다[41,100,102]. 또한, IRE1과 PERK은 단백질 번역을 전반적으로 저해하는 신호를 보낸다[40,51]. 그러나 Yeast와 *C. elegans*에 있어서는 단지 IRE1만이 UPR signaling의 필수 mediator로서 정의되었다는 것을 주목해야한다[16,87,93]. 포유동물 세포에서는 IRE1의 역할은 완전하게 규명되어있지 않다[94]. IRE1 signaling은 다른 UPR signaling pathway에 의해서 충분히 보상될 수 있어서 IRE1 분자가 충분하게 발현되지 못해도 ER stress responsive 유전자들은 유도될 수 있다[66]. 또한, 최근 연구에 의하면 포유동물 세포에서 IRE1은 ER 팽창을 요구하는 세포 분화에 있어서도 중요한 역할을 수행하는 기능을 가진다[16].

비록 UPR의 주요한 기능이 ER의 혼란을 완화시킴으로써 정상적인 기능을 복구하는 것이지만, 아래의 기작에서 기술한 것처럼, 전반적인 세포 상태에 영향을 줄 수도 있다. 포유동물 세포의 viral infection에 응답함으로써 전개된다고 알려져 있는 EOR은 ER에서 지시된 기작을 이용할 뿐 만 아니라 세포 전반에도 영향을 미친다[74]. 결론적으로, UPR이나 EOR의 결과는 완전한 cell regeneration과 apoptosis에 의한 생존의 제거까지에도 영향을 미친다. 이처럼 세포를 위하여 유익한 기작의 수단이 때때로 배양세포로부터 재조합단백질 생산을 위한 중대한 한정을 나타낼 수도 있다. 따라서 ER stress signaling의 상호작용에 대한 충분한 이해는 훨씬 많은 양의 활성 재조합단백질 생산을 안정적으로 생산할 수 있는 중요한 실마리를 제공할 것이다.

ER 내에서 조절되는 신호전달 : 세포의 생존과 사멸

ER stress signaling에 의해서 개시되는 주요한 pro-survival mechanism은 chaperone 발현의 up-regulation과 단백질 합성의 억제이다[14,56,59]. Chaperone의 overexpression은 단백질의 folding과정을 촉진한다. UPR은 ATF4, ATF6 및 XBP-1 transcription factor를 통하여 chaperone을 encoding하는 유전자에게 신호를 보낸다. ATF4 mRNA는 eIF2α의 phosphorylation의 결과로써 특별하게 번역되는 것 외에는 constitutively하게 발현된다. 이 translational activation은 ATF4 mRNA의 5′ untranslated region 내 short unread open reading frame (uORF)이 존재하기 때문에 일어난다. uORF는 non-stress 조건에서 translational repression을 나타내는 배열로 되어있지만 eIF2α가 PERK에 의해서 인산화 될 때는 번역을 개시가 용이해 진다 (그림 3)[42].

ATF6은 ER-associated transmembrane protein이다. ER stress 하에서 ATF6은 cleavage를 겪게 됨으로써, ATF6의

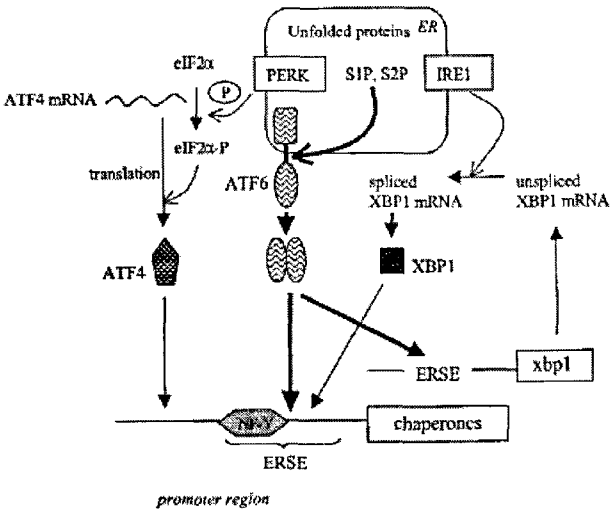

Fig. 3. Activation of transcription by ATF4, ATF6, and XBP-1 in UPR. PERK-mediated phosphorylation of eIF2 results in selective translation of ATF4 mRNA. S1P/S2P-dependent ATF6 cleavage leads to the release of cytosolic domains of ATF6, which are translocated into the nucleus. Once in the nucleus, ATF4 and ATF6 drive the transcription of the ER stress-responsive genes. Additionally, ATF6 enhances the transcription of XBP-1. XBP-1 is further activated due to the IRE1-mediated splicing of one of its introns.

soluble N-terminal DNA binding 도메인이 해리되어 그들의 유전자 발현이 활성화되는 핵에 translocation된다[45]. 이전에 SREBP (sterol regulatory element binding protein) family transcription factor의 processing을 위해서 필요한 효소로 정의되었던 Site-1 protease (S1P)와 Site-2 protease (S2P)가 ATF6을 절단하는 기능을 가진다 (그림 3)[99]. 핵 내에서 ATF6은 일단, UPR-responsive 유전자 프로모터의 ERSE (ER-responsive stress element) 서열에 결합한다 (그림 3). 효과적인 transcriptional activation을 위해서, ATF6은 homo- 또는 heterodimer로써 ERSE site에 결합해야 하며, 또한 ERSE의 다른 영역에 constitutively하게 결합하는 transcription factor NF-Y와 상호작용해야 한다[101]. ATF6은 ER chaperone 그룹의 ERSE site에 결합하여 전사수준에서 조절함으로써 ER chaperone 유전자의 통합된 활성을 작동시킨다.

XBP-1은 최근에 IRE1 endonuclease 활성에 대한 target으로써 정의된 transcription factor이다[86,102]. ATF6는 XBP-1 전사를 활성화하며, XBP1 mRNA의 small intron이 IRE1에 의해서 제거된다 (그림 3). 비록 non-spliced XBP-1이 활성화되더라도, XBP-1이 unconventional splicing을 겪을 때만이 효율적으로 UPR-responsive gene을 활성화할 수 있다[102].

단백질의 번역 억제와 같은 또 다른 ER signaling의 adaptive component는 folding process로 들어가는 단백질을 감소시킴으로써 stress에 대하여 ER cope를 돕는다. 또한, 단백

질 합성의 억제가 cell cycle progression에 관여하는 cyclin과 같이 신속한 turnover로 단백질에 영향을 끼치는 것처럼, cell cycle arrest를 초래함으로써, ER의 불리한 상황에 대항하기위한 cell time을 제공한다[11,12]. PERK와 IRE1β의 활성은 ER stress에 대응하여 단백질 번역의 억제를 초래하지만, 이들 kinase들은 뚜렷한 기작에 의해서 번역 기구와 충돌한다 (그림 2). PERK는 eukaryotic initiation factor 2 (eIF2)의 α subunit를 인산화 시키며, 인산화된 eIF2α는 43S translation initiation complex의 assembly를 감소시킨다[40,41]. 이와는 반대로, IRE1β는 그것의 특별한 endoribonuclease 활성 때문에 28S rRNA를 절단한다[51]. 28S rRNA가 ribosome의 exit site의 형성에 관여하기 때문에[13,26], 28S rRNA의 절단은 ribosome으로부터 tRNA의 해리에 영향을 줌으로써 단백질번역을 억제시킨다. 비록, 단백질 합성의 억제가 보호적 기작이라고 생각할 수도 있지만, 만약 기간이 너무 연장된다면 apoptosis를 유도할 수 있다는 사실에 주목해야만 한다[22,89].

Pro-apoptotic pathway와 관련하여, ER-specific caspase인 caspase-12가 최근에 발견되었으며, 이것은 ER stress에 응답하여 apoptosis의 실행에 필수적인 인자로 보고되었다[68]. DNA와 다양한 단백질의 대규모 절단에 관여하는 apoptotic effector molecule인 caspase는 zymogen으로 합성된 후 inhibitory domain의 proteolysis에 의해서 활성화 된다[27]. 이 cleavage는 apoptosome이라고 불리는 mutimolecular complex 환경 내에서 일어난다. ER apoptosome은 ER 막에서 adapter protein인 TRAF2 (tumor necrosis factor receptor-associated factor 2)를 연결하는 IRE1에 의해서 형성된다고 제안되었으며, 이 TRAF2는 caspase-12의 oligomerization과 cleavage를 고려하여 차례로 caspase-12를 도입한다 (그림 4) [103]. Caspase-12는 caspase-7에 의해서 절단되어 활성화될 수도 있다[79]. Caspase-12의 정확한 molecular action은 아직까지 밝혀지지 않았지만, caspase-12가 세포질로 translocatione된 후에 apoptosis의 중요한 mediator인 caspase-9과 상호작용을 하는 것이 알려져 있다[79]. IRE1은 caspase-12 활성 이외에 TRAF2를 통하여 JNK (c-Jun N-terminal kinase)에 신호를 보내기도 한다[94]. JNK의 TRAF2 활성화는 IRE1α binding partner이며 TRAF2 phosphorylation에 영향을 미치는 JIK (JNK inhibitory kinase)에 의해서 조절된다 (그림 4)[103]. JNK는 stress-activated protein kinase에 속하고 많은 cell type에서 다양한 stress 상황에 응답하여 apoptosis를 유도한다[4,43,106].

위에서 언급한 기작과 더불어, ER stress response는 gadd153과 NF-κB 두 개의 전사인자를 활성화하는데, 아직까지 stress response에 있어서 gadd153과 NF-κB의 기능은 완전히 해명되지는 않고 있다. Gadd153은 UV 처리에 응답하는 유전자를 선발하기 위한 screening에서 처음으로 분리

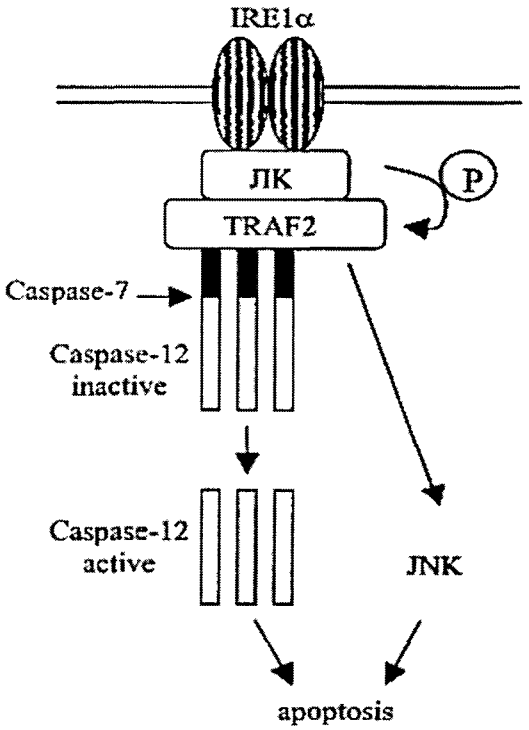

Fig. 4. Mechanism of the activation of caspase-12 and JNK as a result of the ER stress response. Activated IRE1 can bind JIK and TRAF2 to its cytosolic domains. JIK controls phosphorylation status of TRAF2, and in this way influences activation of JNK. Additionally, TRAF2 acts as an adapter molecule for caspase-12 clustering, which allows for the cleavage and activation of this caspase by caspase-7.

되었지만, 계속적인 연구를 통하여 전사인자인 gadd153이 UPR에서 ER 정점에 달하는 변화에 가장 민감하다는 것을 인식하게 되었다[15,17,30,78,97]. Gadd153의 발현은 ER chaperone 및 chaperone과 유사한 분자들을 up-regulate 하는 모든 agent에 의해서 활성화되며, ATF6 및 ATF4 전사인자에 의해서 유도된다[42,100]. 세포 성장과 분화의 negative regulation에서 gadd153에 대한 역할에 대하여 많은 연구들이 보고됨으로써, Gadd153이 apoptosis 유도와도 밀접한 관련임이 밝혀졌다[3,5,62,67,105,107]. gadd153이 Bcl-2의 down-regulation과 reactive oxygene intermediate의 생산을 증가시키는 glutathion의 결핍에 의한 ER stress에 대하여 세포를 민감하게 반응시킨다[63]. 그러나 gadd153은 직접적인 apoptosis의 mediator가 아니라 apoptosis 쪽으로의 progression에 관여함으로써 작동한다. 아마 gadd153이 up-regulation되게 되면, cell cycle arrest가 초래되어 unfavorable condition 하에서 세포가 대항할 수 있는 세포 시간을 가지게 될 것이다. 지금까지 gadd153의 많은 downstream transcriptional target가 규명되었지만, 그들이 어떻게 apoptosis에 관여하는지는 분명하지 않다[88,98].

EOR에 의해서 활성화된 NF-κB 또한 세포 운명과 밀접한 관련을 가지고 있다. 정상적인 조건에서 NF-κB는 I-κB와 복합체를 형성하여 비활성 heterodimer로서 cytoplasm에서 존재한다[1,92]. 지금까지, 5개의 NF-κB subunit와 7개의 κB inhibitor가 규명되었다. NF-κB는 그것의 inhibitor인 I-κB의 phosphorylation과 순차적인 degradation에 의해서 직접적인 활성을 가지게 된다. EOR과의 관계에 있어서, I-κB의 인산화는 ER lumen으로부터 해리된 칼슘이 ROIs (reactive oxygen intermediates) signaling을 활성화할 때 개시된다 (그림 2)[73]. NF-κB는 gadd153과 달리 일반적으로 anti-apoptotic 기능을 가진다고 인정되는데, 왜냐하면 NF-κB는 superoxide dismutase인 IAP (inhibitor of apoptosis) family나 Bcl-xl과 같은 survival-promoting 유전자를 활성화하기 때문이다[19,53,96]. 또한, NF-κB가 gadd153의 억제에 의한 ER-stress-induced death에 대항하여 세포를 보호할 수 있다는 결과도 있다[69].

재조합단백질 생산을 위한 ER stress signaling의 중요성

재조합단백질의 높은 수준의 발현은 단백질의 성숙과 분비를 약화시켜 세포 내 과량의 단백질 aggregate의 형성을 초래한다[84]. 또한, 단백질 축적의 결과로써 작동하는 EOR 및 UPR의 활성은 culture productivity에 불리한 영향을 줄 수 있다는 사실이 위에서 언급한 ER stress response의 관련 기작으로부터 명확하게 제시되었다. 우선, ER stress 조건 하에서 총체적으로 단백질 합성은 억제된다. 더욱이, ER은 분비단백질 뿐 만 아니라 막단백질에 대하여 1차 품질관리 (ER quality-control)를 제공함으로써 ER 내에 보류된 단백질들은 degradation pathway로 보내질 수 있다. 또한, bioreator내 세포 밀도도 영향을 받을 수 있다. 그 이유는 UPR이 ER 교란에 대항하기 위한 세포 시간을 주기 위해서 세포 성장과 증식을 중단하기 때문이다. 결국, ER stress가 회복할 수 없을 정도로 심각해지면, 세포는 apoptotic pathway로 보내진다. Apoptosis는 culture lifespan에 제한을 나타내기도 하지만, cell debris에 의해서 생산물을 오염시키거나 해리된 protease와 glycosidase에 의해서 생산물을 분해를 시킬 수도 있다. ER stress signaling의 환경 내에서 재조합단백질 생산의 최적화를 위한 두 가지 접근 방법이 고려될 수 있는데, 첫 번째로는 ER 내 malfolded protein 및 unfolded protein의 과도한 축적을 막는 것이고 두 번째로는, ER stress의 인지와 실행을 조작하는 것이다.

ER 내 비정상 단백질의 축적 저해

ER folding 능력은 숙주 세포와 배양조건에 의해서 크게 영향을 받는데, 이들 두 factor는 ER folding의 최적화를 위해서 potential site를 제공한다. 본래 효율적인 protein-processing machinery를 가지는 세포를 찾는 것이 합리적인데, 예를 들어, antibody-producing cell로부터 유래된 cell line은 높은 수준에서 단백질의 분비를 처리하도록 프로그램 되어 있다. 단백질 축적을 막는 또 다른 수단으로는 세포 분비 효율을 개선하기 위해서 ER folding machinery를 조작하는 것이다. ER 기능에 관한 초기 세포공학은 재조합단백질 발현과 ER chaperone up-regulation 사이의 관계에 초점을 맞추었다. 이들 연구들은 분비 단백질들이 processing을 위해서는 ER chaperone을 요구한다는 것을 제시하였다. 특히, 단백질 분비경로에 있어서 GRP78의 over-expression이 실험되어졌다. 재조합단백질 folding의 촉진자로서, GRP78이 ER 내 혼란을 개선을 위한 유망한 후보자로 대두되었다. 그러나 과발현된 GRP78은 일시적으로 결합하는 분비단백질에 대하여 오히려 분비 효율을 감소시켰다[23,24]. 따라서 GRP78은 ER 내 선택적인 단백질에 대한 보류에 관여하며, 그것의 over-expression이 모든 재조합단백질에 대하여 발현을 향상시키지는 않는다고 생각된다.

단백질 glycosylation은 단백질 processing의 또 다른 중요한 결정자인자이다. Oligosaccharide 그룹이 단백질의 folding과 sorting 및 분비 효율에 영향을 주기 때문이다[28,38]. 부정확하게 glycosylation된 단백질은 집합체를 형성하고 ER lumen에서 보류된다[48,60]. Glycosylation machinery의 engineering은 EOR이나 UPR 영향을 미치지 않고도 훨씬 많은 양의 생체활성을 나타내는 재조합 당단백질을 생산하기 위한 가능성 있는 대안을 제공한다[37]. 단백질 processing은 saccharide 그룹의 부재나 당이 절단됨으로써 다양한 수준에서 손상될 수 있다. Glycosylation process의 효율성과 정확성은 enzymatic machinery의 활성과 lipid-linked oligosaccharide donor의 유효성에 의해서 결정된다[20,80,95]. 결론적으로, glycosylation을 개선하기 위한 접근 방법은 ER glycan assembly apparatus 효소의 과발현과 dolichol이나 nucleotide-sugar precursor와 같은 glycan chain 형성을 위한 기질의 공급을 조절하는 것을 포함하고 있다[44,52,82,90]. Nucleotide-sugar의 농도는 nucleotide와 amino-sugar pool에 의존하며, 이 nucleotide와 amino-sugar pool은 각각 glucose와 glutamine의 유효성에 의해서 영향을 받는다. Glucose limitation 조건에서, carbon source가 에너지 생산성을 위해서 우선적으로 사용되고 nucleotide가 RNA 합성을 위해서 소비될 때 nucleotide는 고갈된다[18,70]. 이러한 과정은 절단된 dolichol-linked sugar precursor를 합성함으로써, 단백질 folding에 역효과를 나타낸다[18]. 결론적으로, nucleotide feeding은 매우 중요하며, 또한 glucose feeding보다는 좀 더 효과적일 수가 있다[58]. Amino-sugar의 유효성은 암모니아의 1차 공여체가 되는 glutamine의 공급에 의해서 결정될 수 있으며, 또한 glucosamine 혹은 galactosamine의 직접적인 feeding에 의해서도 결정될 수 있다[70].

위에서 언급된 media supplementation과는 별개로, 다른

배양조건 (산소 농도, serum content, 암모니아 존재)이나 배양 시스템은 배양세포의 대사와 재조합단백질에 영향을 미치는 ER stress로 작용할 수도 있다[32,33,57]. 따라서 각 세포주에 대한 적정 조건을 규정하고 배양 기간 동안 세포주를 homogenous distribution하는 것이 필수적이다. 배양세포의 대사 상태는 숙주 세포의 primary metabolism을 공정함으로써 조절될 수도 있다. 예로써 GRP78로부터 단백질의 해리와 같은 proses의 몇몇 단계들이 에너지 의존적이기 때문에 [10,23], 재조합단백질의 높은 수준의 발현은 좀 더 많은 ATP 생산을 요구를 한다. 그러나 대부분 포유동물세포에서 glucose는 pyruvate를 위하여 산화되어 최종적으로 lactate로 되어[36,76], tricarboxylic acid (TCA) cycle를 통한 완전한 산화보다 훨씬 적은 ATP 생산하고 결국은 media가 산패된다 [71]. 심지어 높은 에너지 요구 조건 하에서도, 숙주세포는 CO_2와 H_2O를 위하여 glucose의 산화 보다는 오히려 glutamine의 산화에 의해서 부가적으로 요구되는 에너지를 생산할 수 있다[81,84]. 이러한 관점에서, 새로운 유전자의 발현을 위해서 TCA 회로와 같은 high-ATP-yielding metabolic pathway를 사용하는 directing cell은 세포 분비 효율을 개선하기 위한 중요한 요소가 될 수 있다. 숙주 세포 내 cytoplasmic pyruvate carboxylase (PYC)의 도입은 glycolysis와 TCA 회로 사이의 결실된 연결을 재구성 한다[50]. 즉, PYC를 발현하는 세포는 glucose와 glutamine으로부터 좀 더 효율적인 에너지를 생산한다. 결론적으로, 이들 carbon source의 소비가 좀 더 낮아짐으로써 lactate와 ammonia의 생산을 감소시킴으로서 배양수명과 생산성이 확장된다. 또한, ammonia가 단백질 glycosylation에 역효과를 나타내므로[9,33, 34], medium 내에 ammonia 농도의 감소는 재조합단백질의 품질과 양을 향상시킨다. 게다가 TCA 회로는 nucleotide 합성을 위한 aspartate를 공급할 수 있으므로[21], glycosylation process를 위해서는 nucleotide 유용성이 매우 중요하다는 결론에 도달하게 된다.

ER stress signaling의 인지 및 작용의 조작

재조합단백질을 안정적으로 대량발현하기 위한 두 번째 접근 가능한 방법은 ER stress를 받지 않도록 함으로써 과축적 단백질과 ER stress signaling 사이의 상호작용에 대한 perception 또는 execution을 교란하는 것이다. 그러나 stress 인지 과정을 조작하는 것은 현시점에서는 불가능한 것 같다. GRP78은 ER 내에 과축적 되어 있는 단백질을 인지하는 가장 대표적인 센서로 알려져 있으며 또한 IRE1과 PERK의 inhibitor로도 작용한다[8]. GRP78이 과발현 되어 IRE1과 PERK의 lumenal domain 부위와 결합하게 되면 이들 kinase의 활성이 없어진다. 따라서 앞서 언급한 것과 같이 GRP78의 발현이 증가하면 단백질 분비가 저해되게 된다.

Stress signaling의 실행에 관련되어 있는 분자의 억제에 관해서 가장 큰 문제점은 ER의 반응에 관련되어 있는 분자가 동일하게 pro-survival 신호와 pro-apoptotic 신호에 이용된다는 것이다. 예를 들면, folding-facilitating chaperone의 활성에 필수적인 ATF6과 ATF4는 동시에 세포 제거에 관여할 것으로 보이는 gadd153의 발현을 증가시킨다. 더욱이, 재조합 단백질의 생산을 감소시키는 일부 스트레스 반응 경로의 억제는 세포 배양시 부정적인 영향을 끼칠 수도 있다. 예를 들면, PERK에 의해 전달되는 전반적인 단백질의 번역 억제는 스트레스를 받은 세포의 생존 능력을 약화시킬 수 있다 [41]. Gadd153이나 NF-kB와 같이 ER stress에 의해 활성을 갖는 전사 인자들의 다방면적인 영향 때문에 더욱더 그들의 조작이 제한된다. Apoptosis를 조절하기 위해서 어떠한 조작이 필요한지를 알기 위한 gadd153의 활동에 영향을 받는 downstream target와 기작에 대해서는 거의 알려져 있지 않다. 또한 NF-kB의 다양한 target들이 밝혀져 있지만 이들 유전자도 세포나 신호 전달 영역에 한정되어있다[64]. 따라서 이러한 인자들에 대한 자세한 연구를 위해는 관련 cell line의 개발이 절대적으로 필요하다.

ER stress response에서 upstream signaling molecule의 조작 또한 매우 난해해 보이기 때문에, 이들 response에 대하여 얼마의 effector mechanism의 targeting은 해결책을 제시해 줄 수도 있을 것이다. Apoptosis는 대량 세포 배양 시 생산량의 한계를 가지게 하는 ER stress 중 하나로 오래 전부터 알려져 왔다. 따라서 apoptosis 단계로 들어가게 하는 불가역적인 단계에 참여하는 세포 신호를 규명하는 것은 상당한 경제적 파급효과를 나타낼 것이다. Caspase 활성이 이와 같은 역할을 할 것으로 생각되고 있다. ER에서만 발현되며 ER stress에 반응하여 apoptosis를 일으키는데 필수적인 caspase-12는 실마리를 제공할 수 있는 기회를 줄지도 모른다. Caspase-12와 JNK 활성 모두에 관련이 있는 TRAF2의 억제는 또 다른 대안이 될지도 모른다. 그러나 apoptotic stress signal이 억제되어 있는 상황에선 세포가 바로 necrotic pathway로 진행될지도 모르기 때문에 apoptotic effector의 억제만으로는 충분하지 않는다[54,83].

금후 연구계획

곤충 생체 및 세포부터 재조합단백질 대량 생산을 위하여 BEVS이 매우 유용하게 이용되지만, BEVS에 의한 재조합단백질 생산의 최대 단점은 포유동물세포에서 일어나는 post-translational modification과는 다소 다른 과정을 거친 재조합단백질이 생산된다는 것이며, 이러한 재조합단백질은 ER 내에서 집합체를 형성하게 되어 저활성 및 저분비의 원인이 된다. 따라서 이러한 원인은 곤충 생체 및 세포를 이용하여 생체활성을 가진 재조합단백질을 대량생산을 하고자할시 반드시 해결되어야할 필수과제이다. 해결방안으로 고려할 수 있는 것은 다음과 같다.

① Signal-sequence processing (SP) : signal peptidase와 chaperone의 복합체 형성, signal peptide의 교환 및 co-/overexpression으로 분비촉진 유도, 세포질에 존재하는 hsp (heat shock protein)의 발현 촉진에 의한 translation효율의 극대화, SP와 관련된 세포질/ER chaperone의 연구가 필요.

② Heterologous protein processing : 여러 종류의 chaperone과 관련인자들이 heterologous protein complex형성에 관여하므로 ER chaperone의 co-/overexpression에 의한 재조합단백질의 분비촉진, 분비단백질의 ER내의 aggregation 방지에 의한 분비 촉진, 효율적인 기능을 위해서는 조절인자들의 탐색 필요, malfold 단백질은 ER내에서 분해 혹은 세포질내의 proteasome에 의해서 분해, 분해인자를 탐색함으로 ERSD의 진단 및 치료제 개발. 곤충의 glycosylation pathway가 mammalian에서와 차이점의 극복, 적절한 당쇄 관련 효소를 찾아서 co-/overexpression시켜서 곤충에서 완벽한 당쇄를 가진 재조합단백질 생산 유도, ER chaperone의 co-/overexpression에 의한 분비촉진, 효모에서 당쇄 관련된 효소기능은 조금씩 연구되기 시작했지만, 곤충에서의 기능연구는 아직 세계적으로도 미흡하며 국내에서는 전무한 실정, glycosylation관련 효소의 탐색 및 co-/overexpression으로 정상 당단백질 생산, 각 chaperone의 고유기능과 이들의 상호작용 규명, 각 chaperone과 co-/overexpression에 의한 단백질분비촉진 system 확립, 단백질 발현 및 생합성조절을 PEK를 중심으로 신호전달 기전의 확립.

③ Mammalian cell에서의 발현연구 : Mammalian세포에 baculovirus는 침입하지만 증식은 못함, 대부분의 mammalian 분비신호기작은 곤충세포에서 거의 동일, mammalian 세포와 곤충세포에서 동시 발현하는 BEVS는 없음, mammalian세포에 영향을 주지 않는 저수준의 발현을 조절할 수 있는 인자 탐색 (chaperone & folding효소를 중심으로), mammalian세포에서 BEVS를 이용한 재조합단백질 생산시스템 개발, 외부유전자를 이용한 유전자 치료의 vector로 이용.

④ 단백질의 대량생산을 위한 신호전달 연구 : eIF-2α와 pancreatic eIF-2α (PEK)를 중심으로 규명, 여러 종류의 외부스트레스에 의해서 eukaryotic 세포는 dramatic하게 eIF-2α의 phosphorylation에 의해서 protein synthesis이 감소, 최근에 분리된 PEK는 ER transmembrane 단백질로서 ER내에서 ER stress에 대응하여 정상적인 protein folding을 할 수 있도록 함, PEK는 거의 모든 조직에서 발현하지만 특히 secretory tissue에서 더욱 높은 발현을 나타냄, ER stress에 의한 분비단백질의 합성 감소는 misfolding된 신생단백질이 secretory pathway로 들어가는 것을 막기 때문에 이 기전을 이해하면 불량단백질의 제거와 함께 정상 분비단백질의 분비촉진을 기대할 수 있음.

요 약

ER-Golgi 분비 경로를 통해서 정확한 구조를 가지면서 post-translational modification 과정을 거친 재조합 단백질의 발현을 최대화하는 것은 ER stress 반응에 대한 연구의 중요한 계기가 된다. 세포가 스트레스를 받지 않는 상태라도 ER stress signaling은 재조합 단백질의 생산량을 제한하고 품질을 떨어뜨리는 여러 가지 조건을 만들게 된다. ER stress signaling을 막는 여러 가지 방법들이 제시되고 있으며 표 2는 이러한 방법들 중 일부를 나타내고 있다. 일반적으로는 pro-survival 경로에 관련되어 있는 인자를 촉진하고 pro-apoptosis에 관련되어 있는 인자를 억제하는 것들이다. 그러나 ER stress 반응은 매우 복잡하고 적응과 사멸 기작 (adaptation and elimination mechanism)의 중간 역할을 하기 때문에 ER stress에 관련된 주요 인자를 산업적으로 응용하기 위해선 이들의 기능에 대해 보다 깊은 연구가 이루어져야 한다. 현재까지 재조합단백질의 생산량을 최대한으로 높이는 방법은 ER stress 반응이 생기지 않도록 fed-batch process를 개선하고 세포 사멸 기작을 조절하며 단백질의 glycosylation 처리를 하는 것이다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 2007 0401034024)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참 고 문 헌

1. Baeuerle, P. A. and D. Baltimore. 1988. I-κB: a specific inhibitor of the NF-κB transcription factor. *Science* **242**, 540-546.
2. Baeuerle, P. A. and V. R. Baichwal. 1997. NF-κB as a frequent target for immunosuppressive and anti-inflammatory molecules. *Adv Immunol.* **65**, 111-137.

Table 2. ER stress and possible approaches to prevention of its initiation/execution.

Inducers of the ER stress	Cellular effects	Approach
Protein overexpression	Protein retention in the ER	Media optimisation
Glucose deprivation	Translation inhibition	Facilitation of protein glycosylation and folding
Glycosylation inhibitors	Cell growth arrest	Manipulation of ER stress pathways
ROIs	Apoptosis	Apoptotic machinery inhibition
		Use of antioxidants

3. Barone, M. V., A. Y. Crozat, A. Tabaee, L. Philipson and D. Ron. 1994. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. *Genes Dev.* **8**, 453-464.
4. Basu, S. and R. Kolesnick. 1998. Stress signals for apoptosis: ceramide and c-Jun kinase. *Oncogene* **17**, 3277-3285.
5. Batchvarova, N., X. -Z. Wang and D. Ron. 1995. Inhibition of adipogenesis by the stress-induced protein CHOP (Gadd153). *EMBO J.* **14**, 4654-4661.
6. Bause, E. 1983. Structural requirements of N-glycosylation of proteins. Studies with proline peptides as conformational probes. *Biochem J.* **209**, 331.
7. Berg, D. T., P. J. Burck, D. H. Berg and B. W. Grinnell. 1993. Kringle glycosylation in a modified human tissue plasminogen activator improves functional properties. *Blood* **81**, 1312-1322.
8. Bertolotti, A., Y. Zhang, L. M. Hendershot, H. P. Harding and D. Ron. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded protein response. *Nat Cell Biol.* **2**, 326-332.
9. Borys, M. C., D. I. H. Linzer and E. T. Papoustakis. 1994. Ammonia affects the glycosylation patterns of recombinant mouse placental lactogen-I by CHO cells in a pH-dependent manner. *Biotechnol Bioeng.* **43**, 505-514.
10. Braakman, I., J. Helenius and A. Helenius. 1992. Role of ATP and disulphide bonds during protein folding in the endoplasmic reticulum. *Nature* **356**, 260-262.
11. Brewer, J. W. and J. A. Diehl. 2000. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci USA.* **97**, 12625-12630.
12. Brewer, J. W., L. M. Hendershot, C. J. Sherr and J. A. Diehl. 1999. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. *Proc Natl Acad Sci USA.* **96**, 8505-8510.
13. Brimacombe, R. 1995. The structure of ribosomal RNA: a three-dimensional jigsaw puzzle. *Eur J Biochem.* **230**, 365-383.
14. Brostrom, C. O. and M. A. Brostrom. 1998. Regulation of translational initiation during cellular responses to stress. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* **58**, 79-125.
15. Bruhat, A, C. Jousse, X. -Z. Wang, D. Ron, M. Ferrara and P. Fafournox. 1997. Amino acid limitation induces expression of CHOP, a CCAAT/enhancer binding protein-related gene, at both transcriptional and post-transcriptional levels. *J Biol Chem.* **273**, 17588-17593.
16. Calfon, M., H. Zeng, F. Urano, J. H. Till, S. R. Hubbard, H. P. Harding, S. G. Clark and D. Ron. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature* **415**, 92-96.
17. Carlson, S. G., T. W. Fawcett, J. D. Bartlett, M. Bernier and N. J. Holbrook. 1993. Regulation of the C/EBP-related gene gadd153 by glucose deprivation. *Mol Cell Biol.* **13**, 4736-4744.
18. Chapman, A. E. and J. C. Calhoun. 1988. Effects of glucose starvation and puromycin treatment on lipid-linked oligosaccharide precursors and biosynthetic enzyme in CHO cells in vivo and in vitro. *Arch Biochem Biophys.* **260**, 320-333.
19. Chen, C., L. C. Edelstein and C. Gelinas. 2000. The Rel/NF-κB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-x(L). *Mol Cell Biol.* **20**, 2687-2695.
20. Crick, D. C. and C. J. Waechter. 1994. Long-chain cis-isoprenyltransferase activity is induced early in the developmental program for protein N-glycosylation in embryonic rat brain cells. *J Neurochem.* **62**, 247-256.
21. DeFrancesco, L., I. E. Scheffler and M. J. Bissell. 1976. A respirant-deficient Chinese hamster cell line with a defect in NADH-coenzyme Q reductase. *J Biol Chem.* **251**, 4588-4595.
22. DeGracia, D. J., J. M. Sullivan, R. W. Neumar, S. S. Alousi, K. R. Hikade, J. E. Pittman, B. C. White, J. A. Rafols and G. S. Krause . 1997. Effect of brain ischemia and reperfusion on the localization of phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Cereb Blood Flow Metab.* **17**, 1291-1302.
23. Dorner, A. J. and R. J. Kaufman. 1994. The levels of endoplasmic reticulum proteins and ATP affect folding and secretion of selective proteins. *Biologicals* **22**, 103-112.
24. Dorner, A. J., L. C. Wasley and R. J. Kaufman. 1992. Over-expression of GRP78 mitigates stress induction of glucose regulated proteins and blocks secretion of selective proteins in Chinese hamster ovary cells. *EMBO J.* **11**, 1563-1571.
25. Doyon, Y., W. Home, P. Daull and D. LeBel. 2002. Effect of C-domain Nglycosylation and deletion on rat pancreatic α-amylase secretion and activity. *Biochem J.* **15**, 259-264.
26. Dube, P., G. Bacher, H. Stark, F. Mueller, F. Zemlin, M. van Heel and R. Brimacombe. 1998. Correlation of the expansion segments in mammalian rRNA with the fine structure of the 80S ribosome; a cryoelectron microscopic reconstruction of the rabbit reticulocyte ribosome at 21 Å resolution. *J Mol Biol.* **279**, 403-421.
27. Earnshaw, W. C., L. M. Martins and S. H. Kaufmann. 1999. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu Rev Biochem.* **68**, 383-424.
28. Fiedler, K. and K. Simons. 1995. The role of N-glycans in the secretory pathway. *Cell* **81**, 309-312.
29. Flescher, A. R., J. Marzowski, W. -C. Wang. and H. V. Raff. 1995. Fluorophorelabeled carbohydrate analysis of immunoglobin fusion proteins: correlation of oligosaccharide content with in vivo clearance profile. *Biotechnol Bioeng.* **46**, 399-407.
30. Fornace, A. J. Jr., I. Jr. Alamo and M. C. Hollander. 1988. DNA damage-inducible transcripts in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **85**, 8800-8804.
31. Freedman, R. B., N. J. Bulleid, H. C. Hawkins and J. L. Paver. 1989. Role of protein disulphide-isomerase in the expression of native proteins. *Biochem Soc Symp.* **55**, 167-192.
32. Gawlitzek, M., U. Valley, M. Nimtz, R. Wagner and H. S.

Conradt. 1995. Characterisation of changes in the glycosylation pattern of recombinant proteins from BHK-21 cells due to different culture conditions. *J Biotechnol.* **42**, 117-131.
33. Gawlitzek, M., U. Valleeey and R. Wagner. 1998. Ammonium ion and glucosamine dependent increase of oligosaccharide complexity in recombinant glycoproteins secreted from cultivated BHK-21 cells. *Biotechnol Bioeng.* **57**, 518-528.
34. Gawlitzek, M., T. Ryll, J. Lofgren and M. B. Sliwkowski. 2000. Ammonium alters N-glycan structures of recombinant TNFR-IgG: degradative versus biosynthetic mechanisms. *Biotechnol Bioeng.* **68**, 637-646.
35. Gething, M. J. and J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. *Nature* **355**:, 33-45.
36. Glacken, M. W. 1988. Catabolic control of mammalian cell culture. *Bio/Technology* **6**, 1041-1050.
37. Grabenhorst, E., P. Schlenke, S. Pohl, M. Nimtz and H. S. Conradt. 1999. Genetic engineering of recombinant glycoproteins and the glycosylation pathway in mammalian host cells. *Glycoconjugate J.* **16**, 81-97.
38. Gut, A., F. Kappeler, N. Hyka, M. S. Balda, H. P. Hauri and K. Matter. 1998. Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J.* **17**, 1919-1929.
39. Hammond, C. and A. Helenius. 1994. Quality control in the secretory pathway:retention of a misfolded viral membrane glycoprotein involves cycling between the ER, intermediate compartment, and Golgi apparatus. *J Cell Biol.* **126**, 41-52.
40. Harding, H. P., Y. Zhang and D. Ron. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**, 271-274.
41. Harding, H. P., Y. Zhang, A. Bertoloth, H. Zeng and D. Ron. 2000a. PERK is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell* **5**, 897-904.
42. Harding, H. P., I. I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira and D. Ron. 2000b. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* **6**, 1099-1108.
43. Harrington, A. W., J. Y. Kim and S. O. Yoon. 2002. Activation of Rac GTPase by p75 is necessary for c-jun N-terminal kinase-mediated apoptosis. *J Neurosci.* **22**, 156-166.
44. Hayter, P. M., E. M. Curling, M. L. Gould, A. J. Baines, N. Jenkins, I. Salmon, P. G. Strange and A. T. Bull. 1993. The effect of dilution rate on CHO cell physiology and recombinant interferon-γ production in glucoselimited chemostat cultures. *Biotechnol Bioeng.* **39**, 327-335.
45. Haze, K., H. Yoshida, H. Yanagi, T. Yura and K. Mori. 1999 Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell.* **10**, 3787-3799.
46. Hendrick, J. P. and F. U. Hartl. 1993. Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Annu Rev Biochem.* **62**, 349-384.
47. Hirschberg, C. B., P. W. Robbins and C. Abeijon. 1998. Transporters of nucleotide sugars, ATP, and nucleotide sulfate in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *Annu Rev Biochem.* **67**, 49-69.
48. Hooker, A. D., N. H. Green, A. J. Baines, A. T. Bull, N. Jenkins, P. G. Strange and D. C. James. 1999. Constraints on the transport and glycosylation of recombinant IFN-in CHO and insect cells. *Biotechnol Bioeng.* **63**, 559-572.
49. Imperiali, B. and K. W. Rickert. 1995. Conformational implications of asparagine-linked glycosylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* **92**, 597.
50. Irani, N., M. Wirth, J. van den Heuvel and R. Wagner. 1999. Improvement of the primary metabolism of cell culture by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnol Bioeng.* 66, 238-246.
51. Iwawaki, T., A. Hosoda, T. Okuda, Y. Kamigori, C. Nomura-Furuwatari, Y. Kimata, A. Tsuru and K. Kohno. 2001. Translational control by the ER transmembrane kinase/ribonuclease IRE1 under ER stress. *Nat Cell Biol.* **3**, 158-164.
52. Jenkins, N., P. Castro, S. Menon, A. Ison and A. Bull. 1994. Effect of lipid supplements on the production and glycosylation of recombinant interferon-γ expressed in CHO cells. *Cytotechnology* **15**, 209-215.
53. Jones, P. L., D. Ping and J. M. Boss. 1997. Tumor necrosis factor α and interleukin-1 regulate the murine manganese superoxide dismutase gene through a complex intronic enhancer involving C/EBP-β and NF-κB. *Mol Cell Biol.* **17**, 6970-6981.
54. Kawahara, A., Y. Ohsawa, H. Matsumura, Y. Uchiyama and S. Nagata. 1998. Caspase-independent cell killing by Fas-associated protein with death domain. *J Cell Biol.* **143**, 1353-1360.
55. Kornfeld, R. and S. Kornfeld. 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides. *Annual Rev Biochem.* **54**, 631-634.
56. Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M. J. Gething and J. F. Sambrook. 1988. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins. *Nature* **332**, 462-464.
57. Kunkel, J. P., D. C. H. Jan, J. C. Jamieson and M. Butler. 1998. Dissolved oxygen concentration in serum-free culture affects N-linked glycosylation of monoclonal antibody. *J Biotechnol.* **62**, 55-71.
58. Lanks, K. W., J. -P. Gao and E. J. Kasambalides. 1988. Nucleoside restoration of heat resistance and suppression of glucose-regulated protein synthesis by glucose-deprived L929 cells. *Cancer Res.* **48**, 1442-1445.
59. Lee, A. S. 1992. Mammalian stress response: induction of the glucoseregulated protein family. *Curr Opin Cell Biol.* **4**, 267-273.
60. Marquardt, T. and A. Helenius. 1992. Misfolding and aggregation of newly synthesized proteins in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* **177**, 505-513.

61. May, M. J. and S. Ghosh. 1998. Signal transduction through NF-κB. *Immunol Today* **19**, 80-88.
62. Matsumoto, M., M. Miniami, K. Takeda, Y. Sakao and S. Akira. 1996. Ectopic expression of CHOP (GADD153) induces apoptosis in M1 myeloblastic leukemia cells. *FEBS Lett.* **395**, 143-147.
63. McCullough, K. D., J. L. Martindale, L. O. Klotz, T. Y. Aw and N. J. Holbrook. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by downregulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol Cell Biol.* **21**, 1249-1259.
64. Mercurio, F. and A. M. Manning. 1999. NF-κB as a primary regulator of the stress response. *Oncogene* **18**, 6163-6171.
65. Meyer, M., W. H. Caselmann, V. Schluter, R. Schreck, P. H. Hofschneider and P. A. Baeuerle. 1992. Hepatitis B virus transactivator MHBst: activation of NF-κB, selective inhibition by antioxidants and integral membrane localization. *EMBO J.* **11**, 2991-3001.
66. Mori, K. 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**, 451-454.
67. Murphy, T. C., N. R. Woods and A. J. Dickson. 2001. Expression of the transcription factor GADD153 is an indicator of apoptosis for recombinant Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Biotechnol Bioeng.* **75**, 621-629.
68. Nakagawa, T., H. Zhu, N. Morishima, E. Li, J. Xu, B. A. Yankner and J. Yuan. 2000. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid. *Nature* **403**, 98-103.
69. Nozaki, S., G. W. Jr. Sledge and H. Nakshatri. 2001. Repression of GADD153/CHOP by NF-κB: a possible cellular defense against endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *Oncogene* **20**, 2178-2185.
70. Nyberg, G. B., R. R. Balcarcel, B. D. Follstad, G. Stephanopoulos and D. I. C. Wang. 1999. Metabolic effects on recombinant interferon-glycosylation in continuous culture of CHO cells. *Biotechnol Bioeng.* **62**, 336-347.
71. Ozturk, S. S., M. R. Riley and B. O. Palsson. 1992. Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism and antibody production. *Biotechnol Bioeng.* **39**, 418-431.
72. Pahl, H. L. and P. A. Baeuerle. 1995. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-κB. *EMBO J.* **14**, 2580-2588.
73. Pahl, H. L. and P. A. Baeuerle. 1996. Activation of NF-κB by ER stress requires both Ca2+ and reactive oxygen intermediates as messengers. *FEBS Lett.* **392**, 129-136.
74. Pahl, H. L. and P. A. Baeuerle. 1997. The ER-overload response: activation of NF-κB. *Trends Biochem Sci.* **22**, 63-67.
75. Pahl, H. L., M. Sester, H. G. Burgert and P. A. Baeuerle. 1996. Activation of transcription factor NF-κB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J Cell Biol.* **132**, 511-522.
76. Petch, D. and M. Butler. 1994. Profile of energy metabolism in a murine hybridoma: glucose and glutamine utilisation. *J Cell Physiol.* **161**, 71-76.
77. Plemper, R. K. and D. H. Wolf. 1999. Endoplasmic reticulum degradation. Reverse protein transport and its end in the proteasome. *Mol Biol Rep.* **26**, 125-130.
78. Price, B. and C. Calderwood. 1992. Gadd45 and Gadd153 messenger RNA levels are increased during hypoxia and after exposure of cells to agents which elevate the levels of the glucose-regulated proteins. *Cancer Res.* **52**, 3814-3817.
79. Rao, R. V., E. Hermel, S. Castro-Obregon, G. del Rio, L. M. Ellerby, H. M. Ellerby and D. E. Bredesen. 2001. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *J Biol Chem.* **276**, 33869-33874.
80. Rearick, J. I., A, Chapman and S. Kornfeld. 1981. Glucose starvation alters lipidlinked oligosaccharide biosynthesis in CHO cells. *J Biol Chem.* **256**, 6255-6261.
81. Reitzer, L. J., B. M. Wice and D. Kennell. 1979. Evidence that glutamine, not sugar, is the major source for cultured HeLa cells. *J Biol Chem.* **254**, 2669-2676.
82. Rijcken, W. R., B. Overdijk, D. H. Van den Eijnden and W. Ferwerda. 1995. The effect of increasing nucleotide-sugar concentrations on the incorporation of sugars into glycoconjugates in rat hepatocytes. *Biochem J.* **305**, 865-870.
83. Samali, A., H. Nordgren, B. Zhivotovsky, E. Peterson and S. Orrenius. 1999. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cells: oxidantinduced caspase inactivation leads to necrosis. *Biochem Biophys Res Commun.* **255**, 6-11.
84. Schroder, M. and P. Friedl. 1997. Over-expression of recombinant human antithrombin III in CHO cells results in malformation and decreased secretion of recombinant protein. *Biotechnol Bioeng.* **53**, 547-559.
85. Shamu, C. E. and P. Walter. 1996. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* **15**, 3028-3039.
86. Shen, X., R. E. Ellis, K. Lee, C. Y. Liu, K. Yang, A. Solomon, H. Yoshida, R. Morimoto, D. M. D. M. Kurnit, K. Mori and R. J. Kaufman. 2001. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for C. elegans development. *Cell* **107**, 893-903.
87. Sidrauski, C. and P. Walter. 1997. The transmembrane kinase Ire1p is a sitespecific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* **90**, 1031-1039.
88. Sok, J., X. Z. Wang, N. Batchvarova, M. Kuroda, H. Harding and D. Ron. 1999. CHOP-dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI. *Mol Cell Biol.* **19**, 495-504.
89. Srivastava, S. P., K. U. Kumar and R. J. Kaufman. 1998 Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 mediates apoptosis in response to activation of the double-stranded RNA-dependent protein kinase. *J Biol Chem.* **273**, 2416-2423.
90. Tachibana, H., K. Taniguchi, Y. Ushio, K. Teruya, K.

Osada and H. Murakami. 1994. Changes of monosaccharide availability of human hybridoma lead to alteration of biological properties of human monoclonal antibody. *Cytotechnology* **16**, 151-157.

91. Tang, B., T. M. Chiang, D. D. Brand, M. L. Gumanovskaya, J. M. Stuart, A. H. Kang and L. K. Myers. 1999. Molecular definition and characterization of recombinant bovine CB8 and CB10: immunogenicity and arthritogenicity. *Clin Immunol.* **92**, 256-264.
92. Traenckner, E. B., H. L. Pahl, T. Henkel, K. N. Schmidt, S. Wilk and P. A. Baeuerle. 1995. Phosphorylation of human I-B-on serines 32 and 36 controls I-B-proteolysis and NF-κB activation in response to diverse stimuli. *EMBO J.* **14**, 2876-2883.
93. Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman and P. Walter. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* **101**, 249-258.
94. Urano, F., X. Wang, A. Bertolotti, Y. Zhang, P. Chung, H. P. Harding and D. Ron. 2000. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **287**, 664-666.
95. Waldman, B. C., C. Oliver and S. S. Krag. 1987. A clonal derivative of tunicamycin-resistant CHO cells with increased N-acetylglucosamine-phosphate transferase activity has altered asparagine-linked glycosylation. *J Cell Physiol.* **131**, 302-317.
96. Wang, C. Y., M. W. Mayo, R. G. Korneluk, D. V. Goeddel and A. S. Jr. Baldwin. 1998. NF-κB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* **281**, 1680-1683.
97. Wang, X. -Z., B. Lawson, J. W. Brewer, H. Zinszner, A. Sanjay, L. J. Mi, R. Boorstein, G. Kreibich, L. M. Hendershot and D. Ron. 1996. Signals from the stressed endoplasmic reticulum induce C/EBP-homologous protein (CHOP/GADD153). *Mol Cell Biol.* **16**, 4273-4280.
98. Wang, X. Z., M. Kuroda, J. Sok, N. Batchvarova, R. Kimmel, P. Chung, H. Zinszner and D. Ron. 1998. Identification of novel stress-induced genes downstream of CHOP. *EMBO J.* **17**, 3619-3630.
99. Ye, J., R. B. Rawson, R. Komuro, X. Chen, U. P. Dave, R. Prywes, M. S. Brown and J. L. Goldstein. 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* **6**. 1355-1364.
100. Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi and K. Mori. 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* **20**, 6755-6767.
101. Yoshida, H., T. Okada, K. Haze, H. Yanagi, T. Yura, M. Negishi and K. Mori. 2001a. Endoplasmic reticulum stress-induced formation of transcription factor complex ERSF including NF-Y (CBF) and activating transcription factors 6α and 6β that activates the mammalian unfolded protein response. *Mol Cell Biol.* **21**, 1239-1248.
102. Yoshida, H., T. Matsui, A. Yamamoto, T. Okada and K. Mori. 2001b. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**, 881-891.
103. Yoneda, T., K. Imaizumi, K. Oono, D. Yui, F. Gomi, T. Katayama and M. Tohyama. 2001. Activation of caspase-12, an endoplastic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *J Biol Chem.* **276**, 13935-13940.
107. Zapun, A., C. A. Jakob, D. Y. Thomas and J. J. Bergeron. 1999 Protein folding in a specialized compartment: the endoplasmic reticulum. *Struct Fold Des.* **7**, R173-R182.
105. Zhan, Q., S. Fan, M. L. Smith, I. Bae, K. Yu, I. Jr. Alamo, P. M. O'Connor and A. J. Jr. Fornace. 1996. Abrogation of p53 function affects gadd153 gene responses to DNA base-damaging agents and starvation DNA. *Cell Biol.* **15**, 806-815.
106. Zhang, C., J. Kawauchi, M. T. Adachi, Y. Hashimoto, S. Oshiro, T. Aso and S. Kitajima. 2001. Activation of JNK and transcriptional repressor ATF3/LRF1 through the IRE1/TRAF2 pathway is implicated in human vascular endothelial cell death by homocysteine. *Biochem Biophys Res Commun.* **289**, 718-724.
107. Zinszner, H., M. Kuroda, X. Z. Wang, N. Batchvarova, R. Lighfoot, H. Remotti, J. Stevens and D. Ron. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**, 892-995.