

## Expression of Endoplasmic Reticulum Membrane Kinases by Thyroid Stimulating Hormone in the FRTL-5 Cells

Cho-Yi Jin, Kisang Kwon, Song-Yi Han, Tae Won Goo<sup>1</sup> and O-Yu Kwon<sup>†</sup>

*Molecular Cell Biology Lab., Department of Anatomy, College of Medicine,  
Chungnam National University, Daejeon 301-747, Korea.*

<sup>1</sup>*Department of Sericulture and Entomology, National Institute of Agriculture Science and  
Technology, R.D.A, Suwon 441-100, Korea*

This experiment was performed to study the effect of TSH (thyroid-stimulating hormone) on the expression of endoplasmic reticulum (ER) chaperones in the rat thyrocytes FRTL-5 cells. Although the expressions of ER membrane kinases (ATF6, IRE1 and PERK) were specially enhanced under absence of TSH, no remarkable up- or down regulations of ER chaperones (BiP, CHOP and Calnexin) were detected by TSH. We firstly report here that TSH by dose up-regulated expression of ER membrane kinases in FRTL-5 culture thyrocytes.

**Key Words:** Endoplasmic reticulum (ER), ER molecular chaperone, Thyroid-stimulating hormone (TSH), ER membrane kinases, FRTL-5 cells

TSH (thyroid-stimulating hormone)은 뇌하수체전엽의 호르몬성세포에서 생산, 분비되는 당단백질호르몬으로  $\alpha$ ,  $\beta$  2개의 peptide 사슬로 되어 있다. TSH 방출인자 (TSH releasing factor)에 의해 분비가 촉진되며 갑상선호르몬 (thyroxine)은 negative feedback 기구로 분비를 억제한다. TSH의 중요한 기능은 갑상선 특이적인 기능조절과 세포 분화 및 증식에 관여하는 것이다 (Terra et al., 2003), 그리고 갑상선호르몬의 합성을 강하게 촉진하며, 소포체 스트레스 (ER; endoplasmic reticulum stress)에 의한 단백질 발현 조절이다 (Kwon, 2000).

세포가 비정상적인 생리상태 혹은 유전적 결함으로 인하여 ER내에 비정상적인 폴딩 (folding)이 일어나면 세포는 unfolding protein response (UPR)이라는 일련의 신호 전달과정이 일어나 소포체 샤페론 (ER chaperone)의 발현이 증가한다 (Harding et al., 1999; Kaufman et al., 2002; Kopito et al., 2000; Mori, 2000; Ng et al., 2000; Oyadomari et al., 2002; Ma and Hendershot, 2004). 대표적인 것은 BiP (immunoglobulin binding protein), GRP94 (ER resident-94 kDa glucose-regulated protein), protein disulfide isomerase (PDI),

calnexin, ERp72, Erp29 등이 있다 (Kwon, 2000). 신생단백질이 ER내로 translocation을 시작하면 가장 먼저 BiP이 결합하여 일정한 도메인구조를 가지게 되면 순차적으로 다른 ER chaperone들이 결합하였다가 일정한 시간이 지나 안정적인 도메인을 만들어지면 분리반응을 반복하면서 고차구조의 단백질이 만들어진다 (Gething, 1999; High et al., 2000). 비정상적으로 folding된 변성단백질의 축적 정보가 ER 막을 통하여 핵으로 특정신호를 전달 (ER signaling pathway)하여 세포의 전체적인 단백질 대사를 억제하고 ER chaperone의 전사를 촉진하여 ER내의 변성단백질을 직접적으로 억제, 파괴, 수복을 한다. ER signaling pathway에 관여하는 3종류의 ER 막단백질 (PERK, IRE1, ATF6)이 알려져 있다 (Harding et al., 2002; Ng et al., 2000).

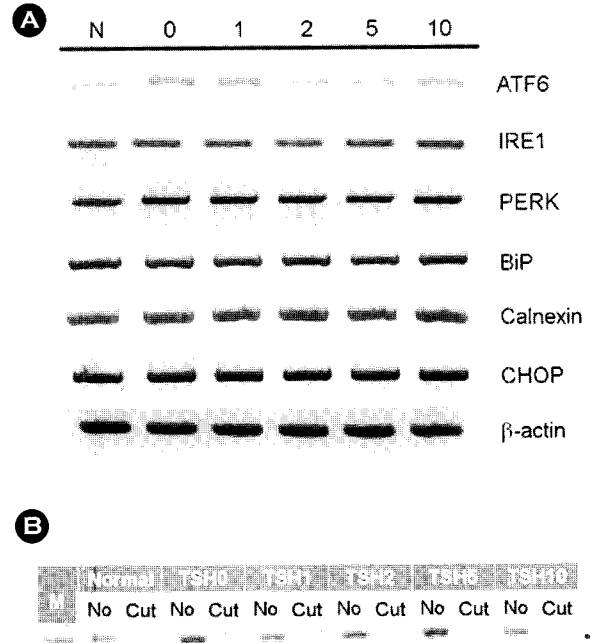
세포가 ER stress를 받으면 ER lumen에서 BiP과 결합하고 있던 IRE1이 monomer에서 인산화된 dimer가 되어, 세포질의 XBP-1 mRNA의 splicing이 일어나 XBP-1 (X-box protein 1) 단백질이 생산되어 chaperone의 생합성을 촉진한다 (Yosida et al., 2001). ER stress에 의해서 monomer인 막통과단백질 PERK가 인산화된 dimer가 되면서 핵전사인자인 eIF2 $\alpha$ 가 인산화 되어 세포 전체의 단백질 합성을 저해한다 (De Gracia et al., 2002). 그러나 ATF4의 번역은 허락하고 마침내 CHOP, GADD34 그리고 ERO1의 전사적 발현촉진을 야기한다. 역시 막통과단백질인 ATF6이 ER stress를 받으면 세포질 쪽의 단편이 떨어져 나가 ERSE

\*논문 접수: 2008년 3월 3일  
수정재접수: 2008년 3월 15일

<sup>†</sup>교신저자: 권오유, (우) 301-747 대전광역시 중구 문화동 6, 충남대학교 의과대학 해부학교실 분자세포생물학연구실  
Tel: 82-42-589-8206, Fax: 82-42-586-4800  
e-mail: oykwon@cnu.ac.kr

(ER stress element)와 결합한다 (Benjamin, 2006). 세포가 외부의 ER stress에 의해 영향을 받는 것을 간편하고 정확하게 검출하기 위해서 ER stress에 아주 민감한 단백질인 IRE1을 통해서 세포질의 XBP-1 mRNA가 splicing이 일어나는 현상을 이용하였다 (Kwon et al., 2005). XBP-1 mRNA splicing이 일어나면서 제거되는 23 nt 단편에 제한효소 *PstI* site가 존재하기 때문에 ER stress를 받아 23 nt가 제거된 RT-PCR 산물은 제한효소 *PstI*을 처리하여도 절단되지 않는다.

본 연구에서는 Rat의 갑상선세포 (FRTL-5)를 calf serum 5%를 포함한 Coon's modified media 내에서 37°C, 5% 이산화탄소, 충분히 습한 조건으로 배양하였다 (Normal cell로 사용). 신선한 배지를 2~3일 간격으로 교체하며 배양하였고 1주일에 한 번씩 계대 배양하였다. 실험에는 세포가 70~90% 정도의 세포 증식도를 보이는 것을 사용하였고 TSH를 처리하기 적 24시간 동안 TSH를 포함한 4종류의 호르몬 (4 H; 5 µg/ml Transferrin, 1 µg/ml Insulin, 10 nM Hydrocortison, 10<sup>-9</sup> M TSH)과 serum이 없는 starvation 시간을 가졌다. Total RNA는 RNA-Bee (TEL-TEST) 시약을 500 µl 넣고 2~3분 지난 후 scrapper로 긁어모아 1.5 ml tube에 넣고 100 µl의 chloroform을 첨가하여 충분히 섞어준 다음 12,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리하였다. 약 500 µl의 상등액을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropanol 넣고 상온에서 10분 정도 처리한 후 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고 tube의 바닥에 얻어진 pellet에 75% ethanol을 초기 RNA-Bee 양과 동일한 500 µl 넣고 12,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 최종적으로 total RNA를 얻었다. DEPC가 처리된 증류수에 녹여 UV spectrophotometer로 정량하였다. 그 다음으로 수행한 RT-PCR은 RNA (2 µl)를 80°C에서 3분간 가열하여 denaturation시킨 후 바로 ice에 담가둔다. 5× buffer 6 µl, dNTP 4 µl, 1 µl의 oligo-dT (300 ng), 10,000 U의 reverse transcriptase와 RNase inhibitor를 첨가하고 총 30 µl가 되게 한 후 42°C에서 1시간 30분간 반응시켜 cDNA를 합성한다. 반응이 끝난 후 94°C에서 2분간 반응시켜 reverse transcriptase를 inactivation시킨 다음 최종 100 µl로 맞춘다. 그 다음 단계로 cDNA를 증폭하기 위해서 PCR을 수행하였다. PCR 반응액 20 µl에 ATF6, IRE1, PERK, BiP, calnexin, CHOP의 F primer와 R primer를 94°C 30초, 57.5°C 30초, 72°C 40초로 29회 반복하여 전기영동으로 확인하였다. XBP-1 F primer, R primer를 94°C 1분, 68°C 1분, 72°C 1분으로 34회 반복하여 전기영동으로 확인하였다. ATF6 F



**Fig. 1.** TSH by dose regulates expression of several molecular chaperones. **(A)** The expression of several molecular chaperones was specially regulated by TSH dose. Actin was used as a control expression. N, normal cell (treated by 4 H & serum); 0, without TSH & Serum, X1, X2, X5, X10, (X1=1×10<sup>-9</sup> M). **(B)** Activation of XBP-1 mRNA splicing by TSH doses. RT-PCR products of XBP-1 were digested with *PstI* restriction enzyme and shown on the gel. A bar (upper right) indicates the undigested XBP-1 RT-PCR products by *PstI*.

5'-CAG CTG ATG GCT GTC CAG TA-3' R 5'-TGC ATC ATC ACT GTG CTC AA-3', IRE1 F 5'-CCG AGC CAT GAG GAA TAA GA-3' R 5'-TGG CTC GGT AGG TGT GAG A-3', PERK F 5'-CTG CTG CTT CTG TTC CTG CT-3' R 5'-TGG AAG AGG TCT CCA TCC AG-3', BiP F 5'-TCT TTT GTC AGG GGT CGT TC-3' R 5'-ATC GAG TTC ACC GAG CAG AC-3', calnexin F 5'-GCA CTC CTC CAT CTC CAA AG-3' R 5'-TGG CCT CTT CAT CTG GAA TC-3', CHOP F 5'-GCA GCT GAG TCT CTG CCT TT-3' R 5'-AGC TGT GCC ACT TTC CTC TC-3', XBP-1 F 5'-AAA CAG AGT AGC AGC TCA GAC TGC-3' R 5'-TCC TCC TGG GTA GAC CTC TGG GAG-3'.

TSH 농도에 따른 여러 chaperone의 발현 정도를 확인하였다. FRTL-5 세포를 starvation 상태에 TSH 농도 (X0, X1, X2, X5, X10, X1=1×10<sup>-9</sup> M)별로 처리하여 얻은 RT-PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동 하였다 (Fig. 1A). 이때에 control로 Normal cell 상태의 RNA를 사용하였다 (N으로 표시, Fig. 1A). Chaperone 발현에 전사인자로 각

용하는 CHOP, ER lumen에 존재하는 BiP, 그리고 ER 막에 존재한 calnexin은 TSH의 농도에 의한 up 혹은 down-regulation되는 변화는 관찰되지 않는다. 한편, ER signal pathway에 관여하는 ER membrane kinase (ATF6, IRE1, PERK)는 TSH의 높은 농도에 따라서 up-regulation하는 것이 확인되었다. 약하게 반응하는 IRE1의 발현을 재확인하기 위하여 IRE1의 down regulator인 XBP-1의 발현을 실험하였다 (Fig. 1B). TSH 농도 X0을 처리한 RT-PCR 산물은 중간부위 23 nt가 splicing되어 *Pst*I 인식부위가 없어서 절단되지 않은 1개의 큰 밴드가 더 진하게 확인되었다 (화살표로 표시). 정상 medium을 처리한 RT-PCR 산물은 중간부위가 절단되어 2개의 밴드가 더 진하게 확인되었다. 이는 TSH의 높은 농도에서는 ER stress가 IRE1 → XBP-1로 전달된다는 것을 의미한다.

이 같은 결과는 TSH 자체가 ER stress의 원인으로 작용하기 보다는 TSH 의존적인 갑상선 배양세포가 TSH 없는 동안 비정상적인 생리상태를 유지하다가, TSH에 의해서 정상적인 생리상태로 회복되는 단계에 많은 단백질의 생합성에 깊이 참여는 ER chaperone의 강한 발현을 요구하는 것으로 생각할 수 있다. 실제로 정상적인 세포 생리상태에서 TSH는 강한 ER chaperone을 보이며 많은 분비단백질을 세포외로 분비하는 것이 보고되어 있다 (Park et al., 2005).

#### 감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업 (과제번호: 20070401034024)의 지원에 의해 이루어진 것이다.

## REFERENCES

- Benjamin IJ. Viewing a stressful episode of ER. Is ATF6 the triage nurse? *Circ Res*. 2006. 98: 1120-1122.
- DeGracia DJ, Kumar R, Owen CR, Krause GS, White BC. Molecular pathway of protein synthesis inhibition during brain reperfusion: implication for neuronal survival or death. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2002. 22: 127-141.
- Del Terra E, Francesconi A, Donnini D, Curcio F, Ambesi-Impiombato FS. Thyrotropin Effects on Ultraviolet Radiation-Dependent Apoptosis in FRTL-5 cells. 1: *Thyroid* 2003. 13: 747-753.
- Gething MJ. Role and regulation of ER chaperon 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 H, Zang 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 folding in endoplasmic reticulum: a tale of three chaperon? *FEBS Lett*. 2000. 467: 38-41.
- Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. 6: 411-421.
- Kopito RR. Aggresome, inclusion bodies and protein aggregation. *Trend Cell Biol*. 2000. 12: 524-530.
- Kwon KS, Tae Win G, 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.
- Kwon OY, Park S, Hwang I, Shong M. Identification of genes in thyrocytes regulated by infolded protein response: Using disulfide bond reducing agent of dithiothreitol. *J Endocrinol Invest*. 2003. 26: 132-137.
- Maddalena de V, Claudia K, Eva S, Michael K, Gert KNE. Degradation of a Short-lived Glycoprotein from the Lumen of the Endoplasmic Reticulum: The Role of N-linked Glycans and the Unfolded Protein Response. *Mol Biol Cell*. 1999. 10: 4059-4073.
- Medina DLP. Santisteban. Thyrotropin-dependent proliferation of in vitro rat thyroid cell system. *Eur J Endocrinol*. 2000. 143: 161-178.
- Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000. 5: 451-454.
- 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.
- Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002. 4: 335-345.
- Park S, You KH, Shong M, Goo TW, Yun EY, Kang SW, Kwon OY. Overexpression of ERp29 in the thyrocytes of FRTL-5 cells. *Mol Biol Rep*. 2005. 32: 7-13.

Yosida 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.

---