

Endoplasmic Reticulum Stress Response and Apoptosis via the CoCl₂-Induced Hypoxia in Neuronal CellsSeon-Hwan Kim, Hyon-Jo Kwon, Hyeon Song Koh, Shi-Hun Song, Kisang Kwon¹, O-Yu Kwon¹ and Seung Won Choi**Departments of Neurosurgery & ¹Anatomy, Chungnam National University School of Medicine, Daejeon 301-721, Korea*

Received August 23, 2010 / Accepted October 23, 2010

Cobalt(II) chloride, a chemical compound with the formula CoCl₂, has been widely used in the treatment of anemia, as a chemical agent for the induction of hypoxia in cell cultures, and is known to activate hypoxic signaling. However, excessive exposure to cobalt is associated with several clinical conditions, including asthma, pneumonia, and hematological abnormalities, and can lead to tissue and cellular toxicity. It is also known to induce apoptosis. One of the questions was that of whether CoCl₂ might induce apoptosis via endoplasmic reticulum (ER) stress in neurons. To address this question, first, the level of DNA fragmentation was measured for assay of apoptotic rates using CoCl₂ with neuron PC12 cells. After confirmation of apoptosis inductions, under the same conditions, the expression levels of ER stress associated factors [ER chaperones Bip, calnexin, ERp72, ERp29, PDI, and ER membrane kinases (IRE1, ATF6, PERK)] were examined by RT-PCR and Western blotting. These results indicated that apoptosis is induced through activation of ER membrane kinases via ER stress. In conclusion, during induction of apoptosis through CoCl₂-induced hypoxia in neuron PC12 cells, ER membrane kinase of IRE1 was dominantly up-expressed, and, consecutively, TRAF2, which has been suggested to be one of the links connecting apoptosis and ER stress, was strongly up-expressed.

Key words : CoCl₂, apoptosis, hypoxia, endoplasmic reticulum (ER)

서 론

진핵세포(eukaryotic cell)는 외부로부터 각종 자극을 받으면 세포질의 단백질 대사를 조절하여 급격한 환경변화에 순응하는 한편, 특정 유전자산물을 대량생산하여 대응함으로써 세포의 생존을 지속시킨다. 최근에 세포질의 응답기전과는 다른 양상을 보이는 소포체(endoplasmic reticulum, ER)가 외부의 급격한 환경변화의 순응에 중요한 역할을 하는 것이 알려지고 있다. 세포생리의 관점에서 가장 중요한 ER의 역할은 단백질의 번역 후 변형과정(post-translational modification step)을 수행하는 것이다[7,15,23]. 즉, mRNA에서 만들어진 분비/막단백질은 ER를 거치면서 생리활성을 가질 수 있는 입체구조를 가지게 되는 것이다. 이런 현상을 protein folding이라고 하며, ER lumen에서 protein folding을 도와 주는 단백질 무리를 소포체 샤페론(ER molecular chaperone)이라고 부른다. 지금까지 잘 알려진 것들로는 각각 고유 역할을 담당하는 Bip, GRP94, ERp72, PDI, ERp29, calnexin, calreticulin 등이 보고되어 있다[10,14,24]. 또한 ER membrane에는 IRE1, PERK, ATF6 등 3종류의 ER 막관통 단백질이 있어 ER stress signal에 관여하는 것으로 알려지고 있다[19,26]. 생명체의 기본 단위인

세포는 발생분화를 시작한 조직이나 기관의 특징에 따라 일정한 시기 동안 정상적인 생리현상을 수행하다가 노화 혹은 외부의 환경변화를 겪게 되어 결국에는 죽게 된다. 세포의 죽음은 크게 apoptosis와 necrosis로 구분된다. Apoptosis는 관련 유전자에 의해 이루어지며, 조절이 가능한 능동적 세포 죽음 과정이다. 세포의 형태적 변화는 세포막의 파괴, 염색체의 응축 등과 더불어 세포내부의 물질들이 apoptotic body를 형성하고 macrophage에 의해서 포식 당하기 때문에 염증반응이 일어나지 않는다[21]. 그러나 necrosis는 직접적으로 독성이 있거나, 물리화학적 상해 등과 같이 갑작스런 외부환경의 변화에 의해 유발되는 수동적 과정으로 염증반응을 수반한다[11]. 특히 apoptosis는 어떤 경우에는 정상적인 생리현상을 위하여 일어나며, 어떤 기능이 더 이상 신체에 이롭지 않다고 판단되는 경우에 자살을 한다. 그런 이유에서 apoptosis는 cell death mechanism 혹은 cellular suicide 등으로도 불린다.

퇴행성 신경계질환은 신경세포 손상과 소실로 이어지는 apoptosis가 그 궁극적 원인이다. Alzheimer's disease의 경우, 기억, 인지 등에 관여하는 대뇌피질, 해마 등에서 신경세포의 apoptosis 때문에 기억 상실을 포함한 증상들이 나타나는 것으로 보고되고 있으며[27], Parkinson's disease는 중뇌의 substantia nigra에 있는 도파민계 신경세포들의 apoptosis 때문에 운동 기능 조절에 관여하는 기저핵의 기능 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다[20]. Brain ischemia는 뇌경색 주위의

***Corresponding author**Tel : +82-42-280-8096, Fax : +82-42-280-7364
E-mail : swchoi@cnu.ac.kr

경계(ischemic penumbra)에서 서서히 진행되는 apoptosis가 매우 늦게 나타나는 세포죽음을 초래한다는 것이 보고되고 있다[2]. Seizures는 간질발작 중에 해마에서 일어나는 세포죽음이 DNA fragmentation을 수반하는 apoptosis라는 보고들이 있으며[6], Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)는 apoptosis를 차단하는 신경성 apoptosis 저해 단백질(NAIP)의 유전자 결함이 주된 원인으로 apoptosis가 깊이 관여하는 것이 증명되었다[16]. 이 같은 중추신경세포의 손상은 glutamate의 과다한 방출 또는 glutamate receptor의 과다한 흥분에 의하여, 비교적 짧은 시간에 신경세포의 비가역적 손상이 초래되는 것이다[12]. 중추 신경세포들은 현재까지는 한번 소실되면 다시 재생이 불가능한 것으로 알려져 있어 apoptosis의 분자적 기전을 이해하고 이를 예방하는 방법을 모색하는 것이 더욱 중요한 의학적 숙제이다. 이 같은 apoptosis가 신경세포에서 일어날 때 어떤 pathway를 거치는지를 이해하는 것은 가장 필요한 연구일 것이다. 본 연구에서는 ER stress에 과다하게 노출된 신경세포들이 어떤 ER 관련 인자를 통하여 apoptosis를 유발하는지를 알기 위하여 초기 apoptosis상태에서 ER 관련 인자들의 발현변화를 연구하였다.

재료 및 방법

세포 배양

PC12 cell를 10% 마혈청과 5% 우혈청(GIBCO)을 포함하고 있는 RPMI 1640 (JBI)배지 내에서 배양하였다. 배양조에서 37°C, 5% 이산화탄소, 그리고 충분한 습한 조건으로 2-3일 간격으로 배지를 교체하며 배양하였고, 1주일에 한 번씩 계대배양 하였다. 실험에 사용한 세포는 현미경 하에서 70-80% 정도의 세포 충실도를 보이는 것을 사용하였다[9].

Hypoxia 및 ER stress 유도

Hypoxia 유도약물 처리는 각각의 CoCl_2 (0.1 mM, Sigma), DFA (0.4 mM, Sigma)를 12시간 배양세포에 처리하였으며, ER stress 유도약물은 3시간 동안 tunicamycin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$; N-당쇄형성 억제, Sigma)을 배양세포에 처리함으로써 유도하였다.

Total RNA 분리

각각의 실험 별로 처리된 PC12 세포를 cold PBS로 한번 세척해 낸 후, RNA isolation reagent (TRI-REAGENT)을 500 μl 넣고 2-3분 지난 후 scrapper로 긁어 모아 1.5 ml tube에 넣고 100 μl 의 chloroform을 첨가하여 충분히 섞어 준 다음 12,000 rpm, 4°C에서 15분 동안 원심분리 하였다. 500 μl 의 상등액을 취하여 새로운 tube로 옮기고 동량의 isopropanol 넣고 상온에서 10분 정도 처리한 후 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고 tube의 바닥에 얻어 진 pellet에 75% ethanol을 초기 RNA isolation reagent 양과 동일한 500 μl 넣고 12,000

rpm으로 5분 동안 원심분리하여 최종적으로 total RNA를 얻었다. Total RNA는 DEPC가 처리된 sterilized distilled water에 녹여서 자외선 분광계로 정량하여 이후의 실험에 사용할 때까지 -80°C에 보존하였다.

RT-PCR

Total RNA (3 μg)를 65°C에서 5분간 가열하여 변성시킨 후, ice에서 5분 이상 급랭하였다. 3 μl 의 5× RT buffer, 2.5 μl 의 dNTP mixture (2.5 mM each), 0.6 μl 의 oligo-dT (300 ng), 1.6 U의 RNase inhibitor, 200 U의 reverse transcriptase (M-MLV)를 가하고, 총 반응액이 15 μg 가 되도록 조절한 후 42°C에서 1시간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 그리고 30 μl 의 DEPC가 처리된 증류수를 첨가하여 95°C에서 10분 반응하여 spin down하였다. 이렇게 얻은 cDNA에 35 μl 의 DEPC가 처리된 증류수를 가하여 최종 50 μl 를 만들고, cDNA를 증폭하기 위하여 2x Dyemix (Enztnomics)를 이용하여 94°C에서 30초 denaturation, 57°C에서 30초 annealing, 72°C에서 40초 extension한 다음 마지막으로 72°C에서 5분 final extension하여 30회 반복시키는 PCR을 수행하였다. 각각의 PCR을 수행한 primer는 table 1로 정리하였다. PCR 산물 3~5 μl 를 2% agarose gel 상에서 전기영동 시킨 후 밴드를 확인한 후, TOMORO ScopeEye 3.5 프로그램을 이용하여 PCR band를 정량화하여 그래프로 나타내었다. XBP1의 PCR 증폭 조건은 94°C에서 1분 denaturation, 68°C에서 1분 annealing, 72°C에서 1분 extension한 다음 마지막으로 72°C에서 5분 final extension하여 35회 반복시켰다. 이 후 PCR 산물 중에 5 μl 를 취하여 1 μl 의 10× restriction buffer와 5 U의 *Pst*I 제한효소(Takara, Japan)를 가하여 총 반응액 10 μg 가 되도록 하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후, 2% agarose gel에서 전기영동 시키고 UV 상에서 밴드를 확인하였다.

Western blot

Protein electrophoresis kit (ATTO Co., Japan)를 사용하여 12% SDS-PAGE에 준비된 sample을 전기영동 하였다. 전기영동이 끝난 후 transfer kit (Bio-RAD, USA)를 사용하여 gel의 protein을 PVDF cell membrane (PALL corporation, USA)에 transfer buffer (20 mM Tris-HCl, 150 mM glycine, 20% methanol, pH 8.3)를 사용하여 transfer하였다. Transfer가 끝난 후 membrane을 PBST (PBS, 0.05% Tween 20)와 5% skim milk를 사용하여 상온에서 1시간 동안 blocking하였다. Blocking이 끝난 후 1차 반응 시킬 때에는 PBST와 5% skim milk에 1:500~1:2,000의 비율로 희석하여 4°C에서 3시간 동안 반응시켰다. 1차 항체 반응이 끝난 후 membrane을 PBST로 10분씩 5회 상온에서 shaker를 사용하여 세척하였다. 세척이 끝난 후 2차 항체를 반응 시킬 때에는 PBST에 1:2,000의 비율로 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응 시켰으며, 반응이 끝난 후 mem-

Table 1. Primers used for RT-PCR

PCR primer		Sequence
AFT6	sense	5'-TCAGCTGATGGCTGTCCAGT
	antisense	5'-TGATGTGGAGGATCCTGGTG
beta-Actin	sense	5'-AAGCTGTGCTATGTTGCCCT
	antisense	5'-AAGCATTTGCGGTGCACGAT
BIP	sense	5'-TTGGGGACCACCTATTCCTG
	antisense	5'-CACAACCTGCATGGGTGACCT
CANX	sense	5'-GCACTCCTCCATCTCCAAAG
	antisense	5'-TGGCCTCTTCATCTGGAATC
CHOP	sense	5'-GCAGCTGAGTCTCTGCCTTT
	antisense	5'-AGCTGTGCCACTTTCCTCTC
ERp29	sense	5'-CTCCTCTCTGTCCTCATGG
	antisense	5'-TCCTCTGCAGCTCTTCCTTC
ERp72	sense	5'-TGATTGGACACCTCCACCTG
	antisense	5'-GGTCACCGACTCCCTGAAAG
IRE1	sense	5'-CCCATCACCTTGCTTCATCA
	antisense	5'-CCTCGTGCTTGTCTGAGTGG
PDI	sense	5'-CCAAAGCTGCTGCAAAACTG
	antisense	5'-AAAGAGGACCACCCCATCCT
PERK	sense	5'-CCGAAGCCACCTTGTCTACC
	antisense	5'-TTCATCCTGGTCCATTGCAG
XBP1	sense	5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC
	antisense	5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG
Rpn1	sense	5'-TTGCTGTGGAAGAGAACGTG
	antisense	5'-CCCGGGACTGCTTGTATCCA

brane을 PBST로 10분씩 5회 상온에서 shaker를 사용하여 세척하였다. 세척이 끝난 후 West save (Lab Frontier, Korea)을 사용하여 발색반응을 유도한 후 X-ray film에 감광하여 결과를 분석하였다.

Hoechst 33342 staining

각각의 실험 별로 처리된 PC12 세포를 찬 PBS로 세 번 세척해 낸 후, 4% paraformaldehyde로 실온에서 30분간 고정하였다. 다시 PBS로 10분씩 세 번 세척해 낸 후, 10 mg/ml의 Hoechst 33342 solution (Invitrogen)을 PBS에 1:1,000으로 희석하여 실온에서 10분간 암처리하여 염색하였다. 염색이 끝난 후 PBS로 10분씩 세 번 세척한 후에 형광현미경(Olympus IX71)을 이용하여 핵의 파편화를 관찰하였다[5].

결 과

CoCl₂를 처리할 때에 신경세포(PC12)가 hypoxia 상태가 되는 것을 확인하기 위하여 HIF1 alpha의 발현을 관찰하였다. CoCl₂를 처리하였을 때에 control에 비교하여 약 1.5배 HIF1 alpha가 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 1). CoCl₂가 apoptosis를 유도하는 지를 확인하고, apoptosis를 유도하는 CoCl₂의 농도와 처리시간을 결정하기 위하여 DNA fragmentation 실험

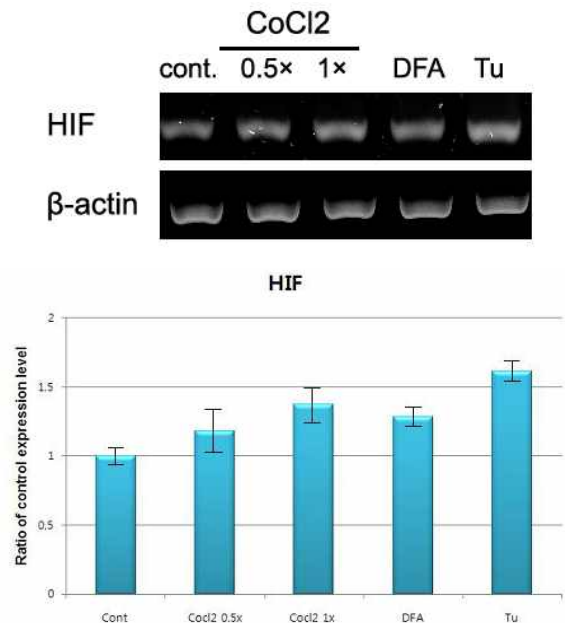


Fig. 1. Expression of HIF1 alpha by CoCl₂. PC12 cells were incubated with 0.5× (0.05 mM) CoCl₂, 1× (0.1 mM) CoCl₂, 0.4 mM DFA for 12 hr and 2 μg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. Quantitative HIF1 alpha mRNA expression was estimated by RT-PCR, and the p<0.05 control vs treated samples.

을 하였다. 아무것도 처리하지 않은 control의 genomic DNA는 fragmentation이 나타나지 않았다. 또 다른 positive control로 chemical hypoxia inducible drug인 DFA와 ER stress inducible drug인 tunicamycin을 처리한 경우는 모두 처리 2일째에 DNA fragmentation이 나타났다. CoCl₂의 경우는 0.5× (0.05 mM), 1× (0.1 mM), 2× (0.2 mM)의 농도로 처리한 1일째는 관찰되지 않지만 처리 2일째는 모두 DNA fragmentation이 관찰되었다. 이후의 실험은 0.5×, 1× 농도로 2일 동안 처리하였다(Fig. 2). 위와 같이 적절한 CoCl₂을 처리하였을 때에 apoptosis 현상에서 나타나는 또 다른 전형적인 현상인 apoptotic body를 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경에서 관찰하였다. Fig. 3에서 화살표가 나타내는 것과 같이 정상세포 핵과는

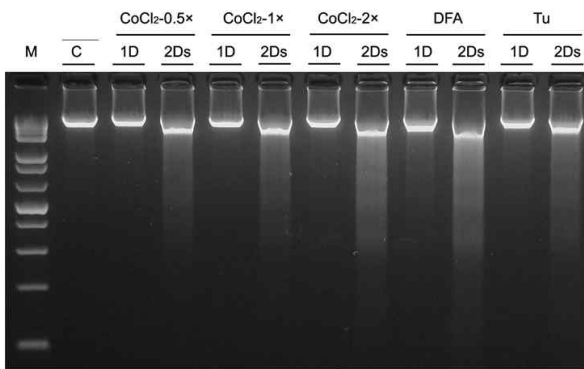


Fig. 2. DNA fragmentation for apoptosis in PC12 cells. After the incubation with CoCl₂-0.5× (1D & 2Ds), 1× (1D & 2Ds), 2× (1D & 2Ds), DFA (1D & 2Ds) and tunicamycin (1D & 2Ds) for indicated days, respectively. Total genomic DNA was precipitated with 1/2 vol. 10 M ammonium acetate and 2.5 vol. ethanol, dissolved in loading buffer, separated by electrophoresis in 1.5% agarose gel containing 0.5 μg/ml ethidium bromide, and visualized under UV light.

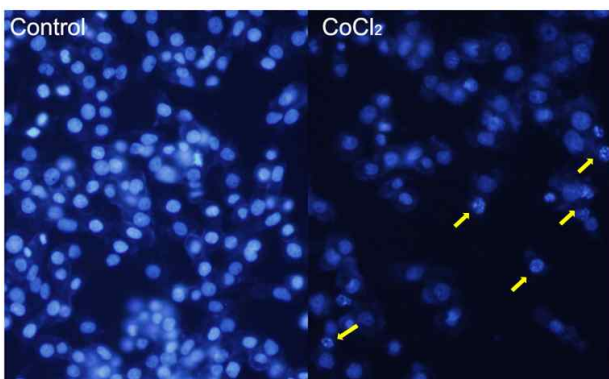


Fig. 3. CoCl₂ induced apoptosis was detected by Hoechst 33342 staining. The nuclei were stained with hoechst 33342 solution for 10 min after fixation of 4% paraformaldehyde, and observed by fluorescence microscopy, ×200. Arrows indicate cells that show apoptotic body.

다르게 핵의 응축이 일어나 apoptotic body를 형성하려는 세포가 관찰되었다. CoCl₂의 처리에 따른 ER luminal chaperone의 발현을 알기 위하여 가장 대표적으로 잘 연구되어 있는 Bip의 발현을 관찰하였다(Fig. 4A). 당쇄형성저해에 의한 ER stress 유도제인 tunicamycin보다는 약하지만 분명하게 상승된 Bip 유전자의 발현이 1×에서 관찰되었다. 그리고 ER membranous chaperone인 calnexin의 유전자 발현 역시 1.5배정도 control에 비하여 강한 발현이 확인되었다(Fig. 4B). ER lumen에서 단백질의 redoxin chaperone으로 작용하는 ERp72, ERp29, PDI는 의미 있는 변화가 없거나 오히려 내려가는 경향을 보였다(Fig. 4D). ER membrane을 구성하는 단백질로서 proteasome의 ubiquitin-like domain에 결합하는 Ribophorin I (Rpn1)의 발현은 control에 비해서 증가하였다(Fig. 4C). ER stress signal에 관여하는 ER membrane kinase인 IRE1, PERK, ATF6의 발현을 조사하였다. ATF6은 미미한 상승발현의 변화가 관찰되었고 PERK는 1.5배 강한 발현을 보였다. 그러나 IRE1의 경우는 1×에서 약 2.5배 정도 증가한 발현을 보였다(Fig. 5). ATF6의 mRNA 발현이 아닌 ATF6 단백질의 발현변화를 Western blotting으로 관찰하였다. ATF6 단백질의 발현 역시 아주 약한 상승 발현만이 관찰되었다(Fig. 6). IRE1의 하부 정보단체인 XBP1 mRNA splicing을 실험하였다. Tunicamycin을 처리한 세포에서는 아주 강한 XBP1 mRNA splicing이 관찰되었으나 CoCl₂를 처리한 세포군에서 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 7). PERK 단백질 자체의 발현변화를 Western blotting으로 관찰하였다. Control에 비하여 높은 발현을 보였다(Fig. 8). 한편 eIF2 α의 인산화 정도를 관찰한 결과 eIF2 α 인산화형이 PERK 단백질 자체의 발현 변화보다 훨씬 강한 발현을 보였다(Fig. 9). IRE1과 결합하여 하부 신호를 조절하는 TRAF2의 발현을 Western blotting으로 관찰하였다. CoCl₂를 처리한 세포군에서 유일하게 강한 발현이 관찰되었다(Fig. 10). CHOP의 발현은 아주 약한 발현양상을 보였다(Fig. 11).

고 찰

ER stress 상황을 유도하는 방법은 여러 가지가 있으며, 그 중 조직 손상을 초래하는 대표적 원인인 hypoxia를 통해 ER stress를 유도할 수 있다. Hypoxia에 노출된 세포를 얻기 위하여 경동맥, 추골동맥 등의 혈관을 직접 결찰하여 hypoxia를 초래한 후 세포를 추출할 수 있으며, *in vitro*에서 5% CO₂, 1~2% 이하의 O₂, 나머지는 N₂로 채운 저산소 상태의 chamber에 배양된 세포를 보존하는 방법을 이용할 수도 있고, 본 연구에서와 같이 화학적으로 hypoxia 상태를 유도하는 것으로 알려진 CoCl₂나 Deferoxanine (DFA) 등의 물질로 세포를 처리하여 얻기도 한다[1,25]. CoCl₂의 cobalt ions는 ferrous ions의 antagonist로서 heme 내 철 이온을 치환하여 heme protein

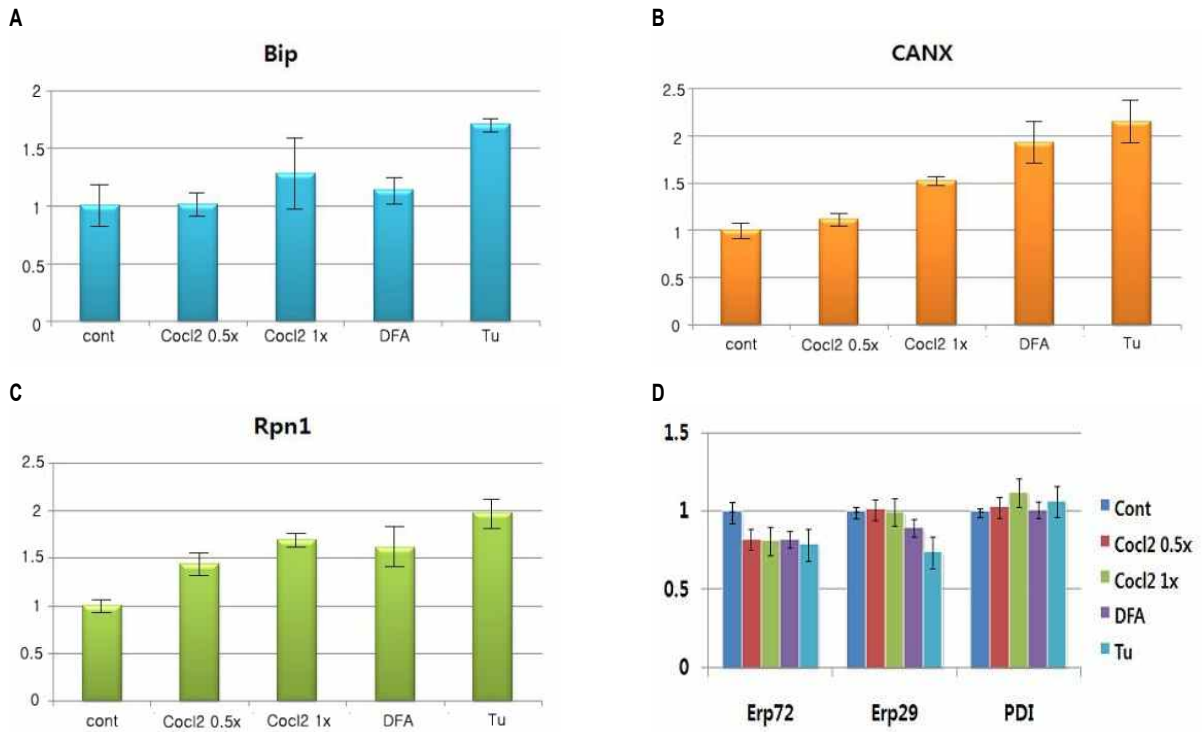


Fig. 4. Expression of ER chaperones and ER redoxin family by CoCl₂. PC12 cells were incubated with 0.4 mM DFA, 0.5× (0.05 mM) CoCl₂ 1× (0.1 mM) CoCl₂ for 12 hr and 2 µg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. Quantitative mRNA expression (A; Bip, B; calnexin, C; Ribophorin I, D; ERp29, ERp72 & PDI) was estimated by RT-PCR, and the *p*<0.05 control vs treated samples.

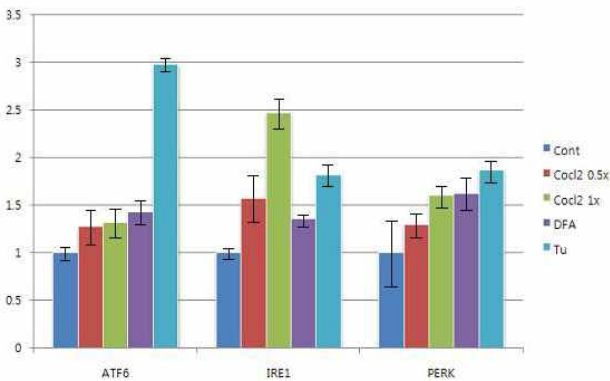


Fig. 5. Expression of ER membrane kinase (ATF6, IRE1, PERK) by CoCl₂. PC12 cells were incubated with 0.4 mM DFA, 0.5× (0.05 mM) CoCl₂ 1× (0.1 mM) CoCl₂ for 12 hr and 2 µg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. Quantitative mRNA expression (ATF6, IRE1 and PERK) was estimated by RT-PCR, and the *p*<0.05 control vs treated samples.

O₂ sensor 내에 구조적 변화를 일으킴으로써 hypoxia를 유도한다고 알려져 있다[4]. 본 연구에서는 신경세포(PC12)를 CoCl₂로 처리하여 hypoxia를 유도한 후 apoptosis를 통해 세포가 사멸 되는 초기 과정에서의 ER 반응을 알아보았다. 따라

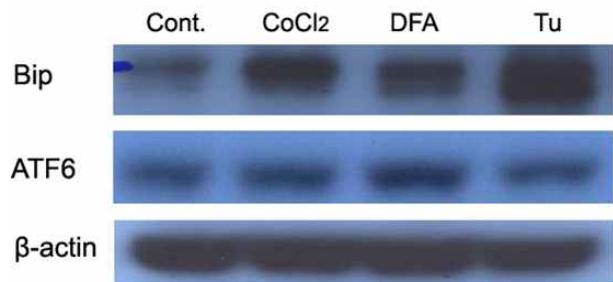


Fig. 6. Result of Western blotting for Bip and ATF6. PC12 cells were incubated with 0.4 mM DFA, 1× (0.1 mM) CoCl₂ for 12 hr and 2 µg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. Total protein was extracted and separated on 12% SDS-PAGE. Following detail steps were accorded to standard methods, which is described in *Materials & Methods*.

서 우선 신경세포가 CoCl₂에 의해서 hypoxia 상태가 만들어지는지를 확인하기 위해 저산소증에 대한 대사과정에서의 전사인자의 일종으로 hypoxia에 특이적으로 발현되는 hypoxia-inducible factors (HIF)의 발현을 관찰하였다. Hypoxia 상태에서 HIF1 alpha는 mRNA의 expression이 증가하는 것이 아니라 p300과 같은 인자와 결합해서 핵내로 translocation하

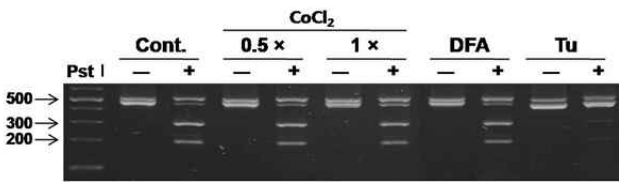


Fig. 7. Result of *Pst* I digestion for XBP1 splicing. PC12 cells were incubated with 0.4 mM DFA, 0.5× (0.05 mM) CoCl₂, 1× (0.1 mM) CoCl₂ for 12 hr and 2 μg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. XBP1 mRNA amplified by RT-PCR, the resulting RT-PCR product was digested with *Pst* I, and separated on 2% agarose gel.

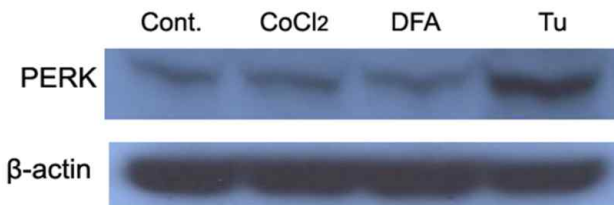


Fig. 8. Result of Western blotting for PERK. PC12 cells were incubated with 0.4 mM DFA, 1× (0.1 mM) CoCl₂ for 12 hr and 2 μg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. Total protein was extracted and separated on 12% SDS-PAGE. Following detail experimental steps were accorded to standard methods, which is described in *Materials & Methods*.

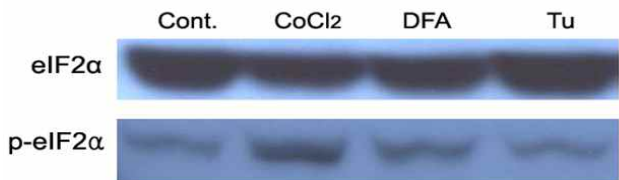


Fig. 9. Result of Western blotting for eIF2 α phosphorylation. PC12 cells were incubated with 0.4 mM DFA, 1× (0.1 mM) CoCl₂ for 12 hr and 2 μg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. Total protein was extracted and separated on 12% SDS-PAGE. Following steps were accorded to standard methods, which is described in *Materials & Methods*.

여 post-transcription에서 중요한 역할을 하지만, 초기 hypoxia상태에서도 control보다는 전사발현 수준이 증가하는 것이 알려져 있어서, 본 실험에서는 CoCl₂에 의한 HIF1 alpha의 발현을 hypoxia 유도로 간주하고 관찰하였다. CoCl₂를 처리한 세포군에서는 control에 비교하여 현격한 차이는 아니지만 약 1.5배 정도의 HIF1 alpha 발현증가를 확인하였다(Fig. 1). 결국, DFA와 함께 신경세포에서도 hypoxia 유도물질로 CoCl₂를 사용하는 것이 가능하다는 것을 말한다.

최근 CoCl₂는 hypoxia를 유도할 뿐만 아니라 DNA 손상을

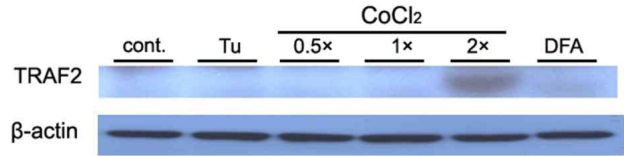


Fig. 10. Result of Western blotting for TRAF2. PC12 cells were incubated with 0.4 mM DFA, 0.5× (0.05 mM) CoCl₂, 1× (0.1 mM) CoCl₂, 2× (0.2 mM) CoCl₂ for 12 hr and 2 μg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. Total protein was extracted and separated on 12% SDS-PAGE. Following steps were accorded to standard methods, which is described in *Materials & Methods*.

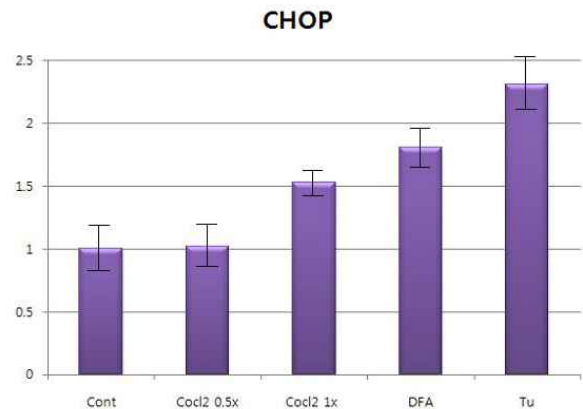


Fig. 11. Expression of apoptic transcriptional factor (CHOP) by CoCl₂. PC12 cells were incubated with 0.4 mM DFA, 0.5× (0.05 mM) CoCl₂, 1× (0.1 mM) CoCl₂ for 12 hr and 2 μg/ml tunicamycin for 3 hr, respectively. Quantitative mRNA expression of CHOP was estimated by RT-PCR, and the *p*<0.05 control vs treated samples.

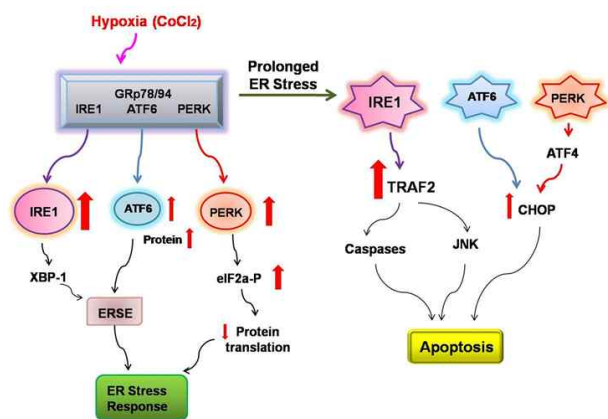


Fig. 12. Schematic presentation of ER stress signaling & apoptosis induction by CoCl₂. During the induction of ER stress response and apoptosis in neuron PC12 cells, ER membrane kinase of IRE1 is dominantly up-expressed and consecutively TRAF2 that is suggested one of linkers connecting apoptosis and ER stress was strongly up-expressed.

유도하고, DNA손상 반응을 활성화시킨다고 보고되었다[22]. CoCl₂처리에 의해서 PC12 세포는 hypoxia 상태에 이르는 것을 확인하였으나, apoptosis의 증거를 얻기 위해, 그리고 apoptosis를 유도하는 CoCl₂의 농도와 처리시간을 결정하기 위하여, apoptosis 특이적으로 관찰되는 DNA fragmentation 실험을 하였다(Fig. 2). 무 처리된 control의 genomic DNA는 fragmentation이 나타나지 않았다. 그러나 positive control로 사용한 chemical hypoxia inducible drug인 DFA와 ER stress inducible drug인 tunicamycin의 경우는 처리 2일째에 DNA fragmentation이 관찰된다. CoCl₂를 처리한 경우는 처리 dose에 관계없이 1일째는 DNA fragmentation이 관찰되지 않지만 CoCl₂ 처리 2일째는 모두 DNA fragmentation이 관찰되었고 농도를 높이 할수록 더욱 강한 DNA fragmentation이 관찰되었다. 이 실험은 CoCl₂를 처리함으로써 PC12 세포에서 apoptosis를 유도할 수 있다는 것을 증명하였으나, 이 결과를 다시 한 번 확인하기 위하여, 또 다른 apoptosis 특이적인 세포변화, 즉 apoptotic body를 CoCl₂를 처리한 다음 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경에서 관찰하였고, Fig. 3에서 CoCl₂를 처리한 세포에서 정상세포 핵과는 다르게 핵의 응축이 일어나 세포 조각으로 나뉘 지려는 초기 단계의 apoptotic body (화살표)가 형성되는 것을 관찰할 수 있다.

이상에서 PC12 세포에 CoCl₂를 처리함으로써 hypoxia 유도과 함께 apoptosis가 유도된다는 것이 증명되었다. 그렇다면 이때에 ER stress mechanism은 어떻게 response하는지를 알기 위하여 ER stress 관련 인자들의 발현을 실험하였다. 먼저 CoCl₂ 처리에 따른 ER luminal chaperone의 발현변화를 알기 위하여 ER lumen에서 chaperone으로 작용하는 Bip의 발현을 관찰하였다(Fig. 4A). Tunicamycin에 의한 ER stress 유도보다는 약하지만 발현변화가 관찰될 정도로 Bip 유전자의 발현이 관찰되었다. 그리고 ER 막을 관통하는 ER membranous chaperone인 calnexin 유전자의 발현 역시 상승(약 1.5배)하는 것이 확인되었다(Fig. 4B). PC12 세포에서 CoCl₂를 처리하였을 때에는 ER inducible drug를 처리할 때만큼은 ER stress chaperone이 상승 발현 하지는 않지만, 약한 발현상승은 분명하게 관찰되었다. 이 결과는 PC12 세포에 CoCl₂ 처리에 의한 hypoxia/apoptosis 유도 시에 ER stress mechanism이 관련되어 있다는 것을 말하는 것이다. 한편, ER lumen에서 신생단백질의 구조결정시 산화환원반응에 깊이 관여하는 ERp72, ERp29, PDI의 발현양이 증가하지 않았다. 오히려 이들의 발현이 하강하였다(Fig. 4D). 이는 CoCl₂ 처리에 의한 세포생리적 변화는 신생단백질의 과정에는 관여하지 않는다는 것을 의미한다. ER membrane을 구성하는 대표적인 단백질로서, 세포질에 존재하는 proteasome의 ubiquitin-like domain에 결합하는 Ribophorin I (Rpn1)의 발현은 control에 비해서 1.5배 이상 증가하였다. 이 결과는 CoCl₂ 처리에 의해서 ER이 형태적으로 증가한 것을 말한다. 즉, PC12 세포에 CoCl₂ 처리

함으로 인하여 ER stress response를 수행하기 위하여 혹은 초기 단계의 apoptosis 유도로 인한 ER chaperone의 증가로 말미암아 ER의 용적이 커진 것으로 사려 된다(Fig. 4C).

Bip의 발현상승은 ER stress signal과 관련되어 있다고 알려져 있다. 즉, Bip이 ER lumen에서 ER membrane을 관통하고 있는 IRE1, PERK, ATF6과 각각 결합하고 있다가 ER stress를 받으면 그들로부터 떨어져 나와서 ER chaperone의 기능을 발휘한다. IRE1은 ER에 존재하는 I형의 막관통 단백질로서, ER lumen의 N-말단이 ER stress를 인식하면 dimer가 되고 세포질 쪽에 있는 kinase domain이 autophosphorylation함으로써 IRE1 단백질분자의 C-말단의 ribonuclease domain이 활성화된다. 그 결과 yeast의 UPR에 특이적인 전사인자 Hac1p를 코딩하고 있는 *Hac*유전자의 mRNA에서 이 번역을 강하게 억제하고 있는 intron이 제거되면서 Hac1p가 발현하여서 표적유전자의 전사가 촉진된다. 포유동물에도 yeast Ire1p와 상동성을 보이는 막관통형 단백질이 2종류(IRE1 α 와 IRE1 β) 존재하여 UPR에 관여하는 것으로 알려져 있다. 활성화된 IRE1 dimer는 XBP1 전사인자의 mRNA를 splicing하여 만들어 진 또 다른 mRNA가 번역된 단백질 XBP1만이 전사인자의 활성을 가진다[18].

PERK에 의한 번역억제는 일반적으로 번역 개시단계에서 제어된다. 특히, 진핵생물 개시인자2 eIF2의 α subunit의 51번째 serine이 인산화 되어서 번역이 전반적으로 억제되는 것이 알려져 있다. ER stress에 응답하여 일어나는 번역억제의 분자 기구는 PERK라고 이름 부쳐진 단백질이 분리됨으로 인하여 크게 진전되었다. PERK도 IRE1 α 와 IRE1 β 와 같이 ER의 막을 관통(I형)하는 protein kinase이다. ER lumen에 변성단백질이 축적되면 dimer가 되어 활성화된다. autophosphorylation를 통해서 활성화된 PERK의 세포질 측의 domain은 eIF2의 α subunit를 phosphorylation하여 translation을 억제한다[17]. ATF6은 II형의 막관통 단백질로서 DNA 결합 domain인 염기성 leucine zipper 영역은 세포질 쪽에 존재한다. ER lumen에 변성단백질이 축적되면 ATF6은 proteolysis를 받아서 활성화되고, protease의 작용을 받아서 ATF6의 세포질측의 1/2정도가 ER막에서 끊겨 나간다. 끊겨진 이 단편이 핵으로 이동하여 ERSE (ER stress element)의 CCACG염기부분에 결합함으로써 표적유전자의 transcription이 활성화된다. ATF6이 ERSE에 결합하기 위하여서는 CCACG염기와 NF-Y가 결합하고 있는 CCAAT염기가 정확하게 9염기가 떨어져 있는 것이 필수적으로 NF-Y와 ATF6은 전사복합체를 형성한다[13]. 이와 같이 IRE1, PERK, ATF6는 모두 ER stress에 의해 활성화되어 ER stress transducer의 역할을 수행한다[8]. 본 연구에서는 신경 세포에 CoCl₂를 처리하여 hypoxia를 유도하였을 때, 어떤 ER stress signal이 이용되는지 알기 위해 ER membrane kinase인 IRE1, PERK, ATF6의 발현을 조사하였으며, ATF6은 미미한 발현의 변화가 관찰되었고 PERK는 1.5배를 상회하는 발현을

보였다. 그러나 IRE1의 경우는 1x 농도에서 약 2.5배 정도 증가한 강한 발현을 보였다(Fig. 5). 즉 IRE1이 가장 강하게 활성화되며, 다음으로 PERK와 ATF6이 뒤를 잇는다. 이들 ER membrane kinase는 각각 고유한 하부 신호 전달 인자를 통해 ER stress response에 관여한다. 즉 IRE1은 XBP1 mRNA의 splicing을 통해, PERK는 eIF2 α 를 phosphorylation시킴으로써, 그리고 ATF6은 mRNA로부터 ATF6 protein을 translation하여 ER stress response를 일으킨다[3]. 본 연구에서는 CoCl₂에 의해 hypoxia로 유도된 신경세포에서 활성화된 ER membrane kinase가 어떤 하부 신호 전달 인자를 매개로 하여 ER stress response를 일으키는지 그 산물의 발현을 조사하였으며, ATF6 단백질의 발현변화 역시 ATF6의 mRNA의 변화와 같이 약한 상승발현이 관찰되었고, PERK 단백질 자체의 발현과 PERK의 하부 신호 전달 인자인 eIF2 α 의 인산화형이 강한 발현을 보여 ATF6과 PERK는 각각의 하부 신호 전달 인자를 통해 ER stress response에 관여하는 것으로 보인다. 그러나 IRE1의 하부 신호 전달 인자 인 XBP1 mRNA splicing을 관찰한 결과 IRE1 자체의 강한 발현이 있었음에도 XBP1 mRNA splicing이 전혀 관찰되지 않았다(Fig. 7). XBP1의 mRNA가 splicing되어 활성화된 XBP1의 mRNA는 *Pst* I에 의해 splicing되지 아니하나, 활성화되지 아니한 XBP1의 mRNA는 splicing된다. Tunicamycin을 처리한 세포에서는 splicing이 없다. 즉 아주 강한 XBP1 mRNA splicing이 관찰되었으나 CoCl₂를 처리한 세포에서는 *pst*I제한효소에 의한 splicing이 관찰되었으며, 이는 XBP1의 mRNA의 splicing은 전혀 발생하지 않았다는 의미다. 이들 결과로 볼 때 CoCl₂에 의한 ER stress에서 ATF6과 PERK는 비록 약하지만 하부로 고유한 신호를 전달하여 ER stress response에 역할을 하는 것으로 보이나 IRE1은 전혀 하부로 신호를 전달하지 않았다. 그렇다면 IRE1이 관여하는 apoptosis pathway에서의 하부 신호 전달 인자 인 TRAF2의 발현을 알아보았다(Fig. 10). 아주 강한 TRAF2의 발현이 CoCl₂를 처리한 세포군에서 유일하게 관찰되었다. 이는 CoCl₂처리에 의한 apoptosis유도에는 IRE1은 ER stress 과정의 하부 신호 전달 인자 인 XBP1을 작용시키지 않고 바로 TRAF2의 발현을 조절한다는 것을 말한다. 한편 ER stress와 관련하여 apoptosis를 유도하는 transcriptional factor로 알려진 C/EBP homologous protein (CHOP)의 발현은 아주 약한 발현양상을 보였고, 이 과정에 ATF6과 PERK가 일정한 역할을 담당하는 것으로 보인다.

Hypoxia에 의해 유도되는 신경세포의 apoptosis 기전은 아직 밝혀 지지 아니한 부분이 많다. 본 연구에 의해서 신경세포가 hypoxia에 의한 ER stress에 과다하게 노출될 경우 apoptosis가 발생할 수 있으며, 이에 관여하는 ER chaperone의 발현을 증명하여 그 기전을 도출하였으나, 복잡한 apoptosis의 과정을 총체적으로 파악하기 위해선, 다른 신호 전달 기전과의 연관성에 대한 연구가 폭넓게 이루어져야 하겠다. 이러한 지

속적인 관심과 연구를 통해 그 기전과 관여 인자가 명백해진다면, hypoxia에 가장 취약한 조직인 중추신경계 질환의 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

감사의 글

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

References

1. Bartolome, S., N. K. Dhillon, S. Buch, A. J. Casillan, J. G. Wood, and A. R. O'Brien-Ladner. 2009. Deferoxamine mimics the pattern of hypoxia-related injury at the microvasculature. *Shock* **31**, 481-485.
2. Broughton, B. R., D. C. Reutens, and C. G. Sobey. 2009. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* **40**, 331-339.
3. Gjymishka, A., N. Su, and M. S. Kilberg. 2009. Transcriptional induction of the human asparagine synthetase gene during the unfolded protein response does not require the ATF6 and IRE1/XBP1 arms of the pathway. *Biochem J.* **417**, 695-703.
4. Goldberg, M. A., S. P. Dunning, and H. F. Bunn. 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. *Science* **242**, 1412-1415.
5. Gong, Y., J. Wu, Y. Huang, S. Shen, and X. Han. 2009. Nonylphenol induces apoptosis in rat testicular Sertoli cells via endoplasmic reticulum stress. *Toxicol. Lett.* **186**, 84-95.
6. Henshall, D. C. 2007. Apoptosis signalling pathways in seizure-induced neuronal death and epilepsy. *Biochem Soc. Trans.* **35**, 421-423.
7. Hirsch, C., R. Gauss, S. C. Horn, O. Neuber, and T. Sommer. 2009. The ubiquitylation machinery of the endoplasmic reticulum. *Nature* **458**, 453-460.
8. Kim, I., W. Xu, and J. C. Reed. 2008. Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **7**, 1013-1030.
9. Kim, S. W., S. P. Chung, S. H. Kim, J. S. Choi, K. Kwon, and O. Y. Kwon. 2007. Ischemia-responsive protein (irp94) gene expression in neurons. *Z. Naturforsch [C]* **62**, 592-596.
10. Lai, E., T. Teodoro, and A. Volchuk. 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* **22**, 193-201.
11. Loos, B., and A. M. Engelbrecht. 2009. Cell death: A dynamic response concept. *Autophagy* **5**, 590-603.
12. Mates, J. M., J. A. Segura, F. J. Alonso, and J. Marquez. 2006. Pathways from glutamine to apoptosis. *Front Biosci.* **11**, 3164-3180.
13. Mori, K. 2004. Unfolded protein response as a quality control mechanism of proteins. *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **49**, 992-997.
14. Ni, M. and A. S. Lee. 2007. ER chaperones in mammalian

- development and human diseases. *FEBS Lett.* **581**, 3641-3651.
15. Nishikawa, S., J. L. Brodsky, and K. Nakatsukasa. 2005. Roles of molecular chaperones in endoplasmic reticulum (ER) quality control and ER-associated degradation (ERAD). *J. Biochem.* **137**, 551-555.
 16. Przedborski, S. 2004. Programmed cell death in amyotrophic lateral sclerosis: a mechanism of pathogenic and therapeutic importance. *Neurologist* **10**, 1-7.
 17. Raven, J. F. and A. E. Koromilas. 2008. PERK and PKR: old kinases learn new tricks. *Cell Cycle* **7**, 1146-1150.
 18. Ron, D. and S. R. Hubbard. 2008. How IRE1 reacts to ER stress. *Cell* **132**, 24-26.
 19. Schroder, M. and R. J. Kaufman. 2006. Divergent roles of IRE1alpha and PERK in the unfolded protein response. *Curr. Mol. Med.* **6**, 35-36.
 20. Singh, S. and M. Dikshit. 2007. Apoptotic neuronal death in Parkinson's disease: involvement of nitric oxide. *Brain Res. Rev.* **54**, 233-250.
 21. Sun, Y. and Z. L. Peng. 2009. Programmed cell death and cancer. *Postgrad. Med. J.* **85**, 134-140.
 22. Wang, G., T. K. Hazra, S. Mitra, H. M. Lee, and E. W. Englander. 2000. Mitochondrial DNA damage and a hypoxic response are induced by CoCl₂ in rat neuronal PC12 cells. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2135-2140.
 23. Wang, Y., K. S. Lam, M. H. Yau, and A. Xu. 2008. Post-translational modifications of adiponectin: mechanisms and functional implications. *Biochem. J.* **409**, 623-633.
 24. Yoshida, H. 2007. ER stress and diseases. *FEBS J.* **274**, 630-658.
 25. Zeno, S., M. Zaaroor, S. Leschiner, L. Veenman, and M. Gavish. 2009. CoCl₂ Induces Apoptosis via the 18 kDa Translocator Protein in U118MG Human Glioblastoma Cells. *Biochemistry* **48**, 4652-4661.
 26. Zhao, L. and S. L. Ackerman. 2006. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **18**, 444-452.
 27. Zhu, X., A. K. Raina, G. Perry, and M. A. Smith. 2006. Apoptosis in Alzheimer disease: a mathematical improbability. *Curr. Alzheimer Res.* **3**, 393-396.

초록 : CoCl₂ 처리로 유도된 hypoxia상태에서 세포자살과 ER stress에 관련된 인자의 발현

김선환 · 권현조 · 고현승 · 송시현 · 권기상¹ · 권오유¹ · 최승원*

(충남대학교병원 신경외과학, ¹충남대학교 의학전문대학원 해부학교실)

PC12 세포에서 CoCl₂에 의한 hypoxia 유도는 HIF1 alpha의 상승 발현으로 확인하였다. 이때 apoptosis의 유도는 genomic DNA의 fragmentation과 apoptotic body는 Hoechst 염색으로 확인되었고, ER luminal chaperone의 발현 및 ER stress signal에 관여하는 ER membrane kinase인 IRE1, PERK, ATF6의 발현도 확인되었다. 이들이 apoptosis로 연결되는 고리 역할을 하는 IRE1-XBP1 mRNA splicing, PERK-eIF2 alpha, ATF6 protein cleavage도 반응하는 것으로 확인되었다. 위의 결과는 신경세포의 hypoxia상태는 ER stress signal pathway를 거쳐서 apoptosis가 된다는 것을 증명한 것으로 신경세포의 hypoxia치료를 위한 기초 자료가 될 것으로 생각한다.