

## Expressional Variation of Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Factors in Mouse Tissues by Aging

Song-Yi Han, Cho-Yi Jin, Kisang Kwon, Eun Young Yun<sup>1</sup>, Tae Won Goo<sup>1</sup>,  
Seungwhan Kim<sup>2</sup> and O-Yu Kwon<sup>†</sup>

*Department of Anatomy, School of Medicine, Chungnam National University, Taejon 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*

<sup>2</sup>*Department of Emergency Medicine, Chungnam National University Hospital Taejon 301-721, Korea*

The endoplasmic reticulum (ER) is a multifunctional intercellular organelle in which several posttranslational modification steps occurred such as protein folding, lipid biosynthesis, calcium storage and release. Perturbations that disrupt ER homeostasis lead to the misfolding of proteins in the ER lumen and up-regulation of ER signaling pathway called the unfolded protein response (UPR). Here, we have demonstrated that ageing changes the expression of ER chaperone and associated ER membrane kinases of IRE1, ATF6 and PERK.

**Key Words:** Endoplasmic reticulum (ER) stress, ER chaperone, Aging

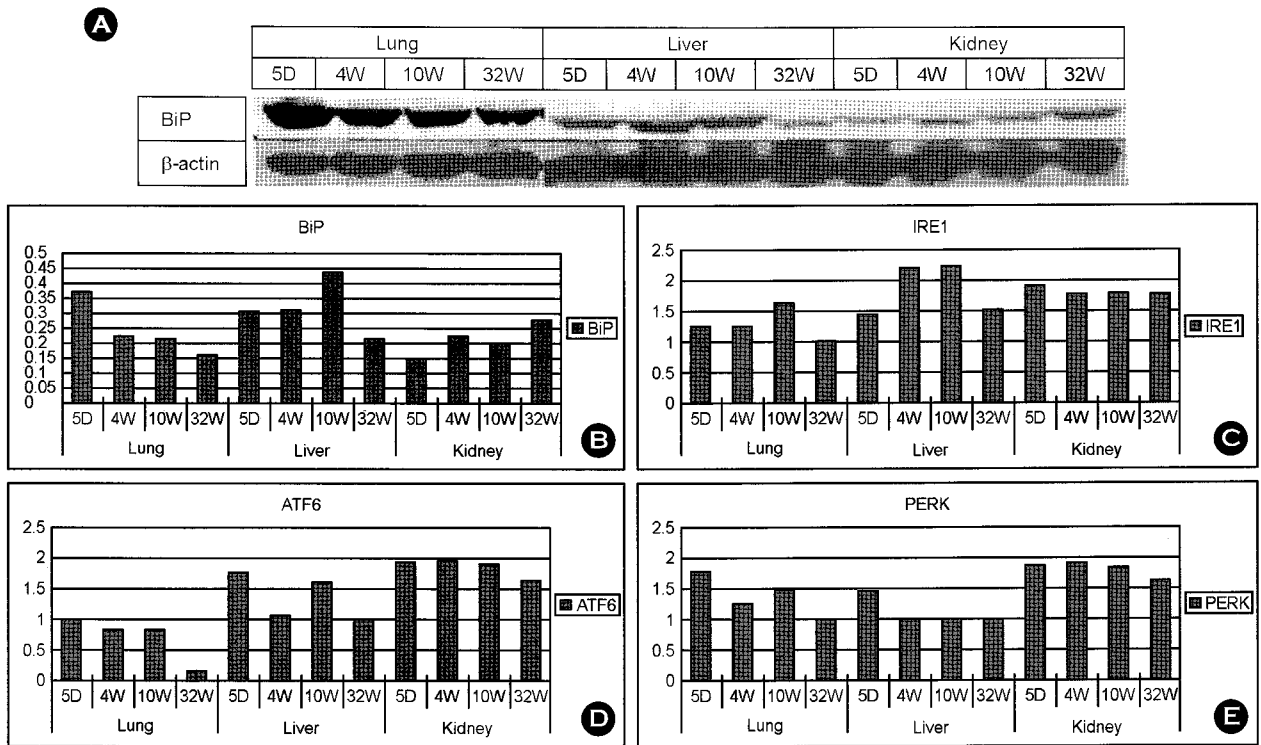
Endoplasmic reticulum (ER; 소포체)은 대부분의 분비단백질이 거치면서 posttranslational modification이 일어나는 중요한 세포내 소기관이다 (Kapoor & Sanyal, 2009). 소포체내에서 신생 분비단백질은 당화 (glycosylation), 이황화결합 (disulfide bonds), 폴딩 (folding)과 조립 (assembly)과 같은 단백질수식을 통해서 정상적인 단백질활성을 가지게 한다 (Los, 2009). 소포체내에서 malformed (unfolded & misfolded)된 단백질은 소포체품질관리 (ER quality control; ERQC) system에 의해서 골지체로 운반될 수 없다 (Vembar & Brodsky, 2008). 세포는 산화적 환경, 칼슘 항상성 변화, 산화적 환경, 바이러스에 의한 분비 단백질의 증가, 비정상적으로 폴딩된 단백질의 축적, glucose 결핍, 당쇄의 변화, 콜레스테롤의 과부하 등과 같은 비정상적인 생리상태 혹은 외부환경변화에 의해서 소포체 스트레스 (ER stress)를 받으면 소포체 내에 비정상적으로 폴딩된 단백질이 축적되어 질병으로 나타난다 (Kohno, 2010). 그러나 아직 직접적인 노화 (aging)에 의해서 소포체 스트레스에 관련된 인자와 ER chaperone의 발현에 관

한 연관성에 대한 연구는 미미한 상태이다. 이에 본 연구자는 aging이 소포체 스트레스에 밀접하게 관련되어 여러 질병의 원인이 될 것을 판단되어 소포체 스트레스 관련 인자의 발현을 알아보았다.

실험동물사육시설에서 5일, 4주, 10주, 32주 동안 사육한 C57 mouse에서 각각 35 mg의 폐, 간, 신장 조직을 분리하여 차가운 PBS에 세척하였다. 분리한 조직을 easy-BLUE™ Total RNA kit (iNtRON Biotechnology, Inc.)의 solution을 포함한 상태에서 homogenizer를 이용하여 분쇄한 후 Total RNA를 정제하였다. Total RNA는 spectrophotometer로 정량하였고, DEPC로 처리된 물 50 µl로 녹여서 사용하였다. PCR의 template로 사용하기 위해 M-MLV를 이용하여 cDNA 합성을 하고, DEPC가 첨가된 물을 70 µl 넣어 총 100 µl로 맞추어 PCR반응에는 2 µl씩 사용하였다. 5일, 4주, 10주, 32주에 해당하는 각 조직의 cDNA를 ATF6, IRE1, PERK의 primer로 94°C에서 30초, 57.5°C에서 30초, 72°C에서 40초로 29회 반복하여 PCR을 수행하였다. BiP의 primer로 94°C에서 30초, 59°C에서 1분, 72°C에서 1분으로 29회 반복하여 PCR을 수행하였다. hPDI primer로 40°C에서 30초, 72°C에서 1분 후, 94°C에서 30초, 56°C에서 30초, 72°C에서 1분으로 29회 반복하여 PCR을 수행하였다. 단백질은 2× Sample buffer 250 µl를 포함한 상태에서, homogenizer를 이용하여 조직을

\*접수일: 2010년 1월 22일 / 수정일: 2010년 2월 13일  
채택일: 2010년 2월 14일

†교신저자: 권오유, (우) 대전광역시 중구 문화동 6,  
충남대학교 의학전문대학원 해부학교실  
Tel: 042-580-8206, Fax: 042-586-4800  
e-mail: oykwon@cnu.ac.kr



**Fig. 1.** Expression of ER signaling factors in mouse lung, liver and kidney with aging. **(A)** The result of western blotting. Aging was indicated by 5D, 4W, 10W and 32W. Detail experimental processing is described above. **(B)** is graphic result of western blotting above. **(C-E)** The results of RT-PCR. Total RNA isolation and detail experimental processing of RT-PCR is described above. RT-PCR using the forward primer (F) (5'-ACCACCAGTCCATCGCCATT-3') and reverse primer (R) (5'-CCACCCTGGACGGAAGTTT-3') for IRE1; F (5'-AGTGGTGGCCACTAATGGAG-3') and R (5'-TCTTTTGTGCGGGTTCGTT-3') for Bip; F (5'-CTAGGCCTGGAGGCCAGGTT-3') and R (5'-ACCCTGGAGTATGCGGGTTT-3') for ATF6; F (5'-GGTCTGGTTCCTGGTITCA-3') and R (5'-TTCGCTGGCTGTGTAACTTG-3') for PERK. RT-PCR primers were supplied from Bioneer Co. (Taejon, Korea). Unless otherwise noted, all other chemicals were purchased from Sigma (St. Louis, USA). Although the experiments were performed in triplicate, only a representative blot is shown in this Fig.

lysis 하였다. Lysis된 sample을 10 min boiling 후, SDS-PAGE를 수행하였다.

각 장기 (lung, liver, kidney)에서 aging에 따른 ER chaperone의 발현변화를 알기 위하여, 소포체내에 존재하는 대표적인 ER chaperone인 BiP의 발현을 western blotting으로 알아보았다 (Fig. 1A & B). Lung에서는 aging과 더불어 순차적으로 감소하는 발현양상을 보이는 반면에 kidney에서는 aging과 함께 증가하는 발현양상을 보였다. 그리고 liver에서는 10W에 가장 강한 발현을 보이고 aging과 함께 급격하게 발현이 감소하였다. mRNA level에서 소포체 막 신호 전달인자인 ATF6, IRE1, PERK의 발현양상을 알아보았다. IRE1의 발현양상은 lung과 liver에서는 10W까지 조금씩 상승하다가 32W에서 감소하였다. 그러나 kidney에서는 aging에 따른 발현의 변동이 관찰되지 않았다 (Fig. 1C). ATF6은 lung과 kidney에서는 aging과 동반하여 발현이 점진적으로 감소하지만 liver에서는 10W에 가장 강한 발현을 보인 다음에 32W째에

감소하는 발현양상을 보였다 (Fig. 1D). PERK의 발현은 liver와 kidney에서 aging과 함께 점차적으로 감소하는 발현양상을 보이는 것에 비하여 lung에서 10W째에 가장 강한 발현을 보인 다음에 감소하였다 (Fig. 1E). 이상과 같은 결과로 볼 때에 aging에 따라서 lung, liver, kidney과 같은 각 장기에서 ER chaperone을 포함한 소포체 막 신호 전달인자들의 발현변화가 확인되었다. 장기간의 각기 다른 발현양상을 나타내는 것은 aging에 의한 세포내 스트레스상태에 대한 각 조직간 특이적 반응 기작을 알 수 있는 중요한 정보가 된다. 이는 aging과 관련된 질병연구에 하나의 실마리를 제공할 것으로 기대한다.

#### 감사의 글

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

## REFERENCES

- Kapoor A, Sanyal AJ. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clin Liver Dis.* 2009. 13: 581-590.
- Kohno K. Stress-sensing mechanisms in the unfolded protein response: similarities and differences between yeast and mammals. *J Biochem.* 2010. 147: 27-33.
- Los M. New, exciting developments in experimental therapies in the early 21st century. *Eur J Pharmacol.* 2009. 625: 1-5.
- Vembar SS, Brodsky JL. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008. 9: 944-957.