

Brefeldin A-induced Endoplasmic Reticulum Stress Leads to Different CHOP Expression in Primary Astrocyte Cells and C6 Glioma Cells

Eun Jung Park and Taeg Kyu Kwon*

Department of Immunology, School of Medicine, Keimyung University, 2800 Dalgubeoldae-ro, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea

Received March 18, 2016 / Revised April 4, 2016 / Accepted April 14, 2016

Brefeldin A (BFA), a lactone antibiotic isolated from the fungus *Eupenicillium brefeldianum*, inhibits the transport of secreted and membrane proteins from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus. BFA disrupts Golgi function, the accumulation of unfolded proteins in ER, and the induction of ER stress. Prolonged ER stress induces apoptosis at least in part through the transcription factor C/EBP (CCAAT/enhancer binding protein) homologous protein (CHOP), which is activated by the unfolded protein response (UPR). In this paper, we demonstrate that BFA-induced endoplasmic reticulum stress leads to different CHOP expression in primary astrocyte cells and C6 glioma cells. BFA induced lower CHOP expression levels in primary astrocyte cells than in C6 glioma cells; however, other ER stress inducers (thapsigargin and tunicamycin) resulted in similar expression patterns in these two cell types. Interestingly, the three different ER stress inducers (BFA, thapsigargin, and tunicamycin) induced similar levels of CHOP mRNA expression in primary astrocyte cells. The ubiquitin-proteasome inhibitor MG132 also markedly up-regulated the BFA-mediated CHOP protein expression in primary astrocyte cells. BFA also induced higher proteasome activity in primary astrocyte cells than in C6 glioma cells. Taken together, our results suggest that higher proteasomal activity might down-regulate BFA-induced CHOP expression in primary astrocyte cells.

Key words : Astrocyte cells, Brefeldin A, C6 glioma cells, CHOP, proteasome

서 론

소포체(endoplasmic reticulum; ER)는 ribosome에서 합성된 단백질의 폴딩/조립(folding/assembly), 당화(glycosylation), 이황화결합(disulfide bonds)과 같은 post-translational modification 과정이 일어나는 중요한 장소이다[8, 9]. ER에서 과도한 단백질 합성, 미성숙된 단백질 축적, 산화적 환경, 칼슘 항상성 변화 등의 환경으로 인한 ER에 기능 장애가 발생하는데 이를 소포체 스트레스(ER stress)라고 한다[10, 14, 15]. ER stress가 야기되면 세포는 소포체 막에 존재하는 세가지의 신호전달체계인 pancreatic ER kinase (PERK), inositol-requiring 1a (IRE-1a)/X-box binding protein 1(XBP-1) 및 activating transcription factor (ATF6)에 의해 신호전달이 매개된다[12].

ER stress 초기 혹은 미약한 상태에서는 세포를 보호하기 위한 Grp78 (BiP) 및 Grp94 등과 같은 ER chaperone 단백질,

protein disulfide isomerase (PDI), peptidyl-propyl isomerase 등과 같은 단백질들을 유도 하지만, ER stress가 제거되지 않거나 너무 과도할 경우 세포는 세포사멸 과정이 작동한다[19]. ER stress 매개의 세포 사멸에 C/EBP family 단백질인 C/EBP homologous protein (CHOP) 유전자의 활성이 중요한 역할을 한다[16]. CHOP 유전자가 knock out 된 세포에서는 ER stress 매개의 세포 사멸이 억제되었으며[13, 25], 하지만 CHOP 유전자의 과발현 발때는 세포 사멸이 촉진되었다[17]. ER stress 존재 시 CHOP 단백질의 발현조절은 PERK, ATF7 및 IRE-1a의 신호전달계에 의하여 조절 된다[23-25].

BFA는 *Eupenicillium brefeldianum* 곰팡이으로부터 분리한 lactone계열의 항생제이다 [20]. BFA는 ER에서 Golgi apparatus로의 분비 또는 막 단백질의 수송을 억제하여 ER stress를 야기한다[4, 11]. 따라서 BFA처리 시 multiple myeloma, HeLa, colon cancer, prostate cancer 등 다양한 암세포주에서 세포사멸을 유도한다[1, 3, 6, 22].

본 연구에서는 정상 astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에서의 BFA처리 시 ER stress marker 단백질인 CHOP 발현 양상을 비교 분석하였다. C6 glioma 세포와 정상 astrocyte 세포에서 BFA 처리 시 CHOP 발현이 정상 astrocyte 세포에서 현저히 낮은 발현을 확인하였다. 또한 BFA 처리 시 astrocyte 세포에서 CHOP 단백질의 낮은 발현에 대한 기전을 연구하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-53-580-3882, Fax : +82-53-580-3795

E-mail : kwontk@dsmc.or.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

세포 배양 및 시약

본 연구에 사용한 신경교 세포주인 C6 glioma 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포주 배양을 위한 배지는 10% 태아 우혈청(fetal bovine serum, Hyclone laboratories, Lagan, Utah, USA)과 1% antibiotics, 0.2% Gentamycin을 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)을 사용하였으며 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기를 이용하여 배양하였다. 실험에 사용된 약제인 Brefeldin A (BFA)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

Primary astrocyte 세포 분리 및 배양

Astrocyte세포 분리는 Giulian [5]의 방법에 따라 1~3일령 쥐 (rat)의 피질을 분리하여 사용하였다. 대뇌 피질을 파스투르 피펫을 이용하여 10% FBS가 포함된 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배양배지에서 단일 세포로 만든 후 75-cm² T-flasks 에서 2-3주 동안 배양하였다. Microglia를 포함한 non-astrocyte 세포를 shaking을 통하여 제거하고, astrocyte 세포는 0.1% trypsin을 이용하여 탈착 한 후 실험을 위하여 분주하여 사용하였다. 본 연구는 계명대학교의 IRB 심의(심의번호 KM-2010-41)를 거쳐 승인을 획득하였다.

RNA isolation and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

BFA에 의해 증가한 CHOP의 mRNA발현 정도를 확인하기 위해서 RT-PCR을 이용하여 CHOP의 mRNA 발현을 분석하였다. 시료를 처리한 세포에 Trizol reagent (Invitrogen Co.,

Carlsbad, CA, USA)를 처리하여 total RNA를 분리 한 후, M-MLV 역전사효소(Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, USA)를 이용하여 cDNA를 합성 하였다. 합성된 cDNA를 CHOP primer를 이용하여 유전자를 증폭시켰다. PCR에 사용한 CHOP primer sequence는 forward: 5'-CAA CTG CAG AGA ATT CAG CTG A-3', reverse: 5'-ACT GAT GCT CTA GAT TGT TCA T-3'이고, actin 의 primer sequence는 forward: 5'- GGC ATC GTC ACC AAC TGG GAC-3', reverse: 5'- CGA TTT CCC GCT CG GCC GTG G -3'이다. 그 양적 차이를 비교하기 위해서 1.5% agarose gel에 각각의 PCR 산물을 loading 하여 전기영동을 한 다음 ethidium bromide (EtBr)로 염색 한 후 UV 상에서 발현의 정도를 확인하였다.

Western Blotting

BFA처리에 의해 증가하는 CHOP 단백질 발현 정도를 확인 하기 위하여 Western blotting을 실시하였다. 세포를 0.4×10⁶ cells/well로 12시간 배양 후에, FBS를 첨가하지 않은 무혈청 배지로 교체하여 BFA를 12시간 처리하여, 세포를 모아 40 µl lysis buffer (137 mM NaCl, 15 mM EGTA, 0.1 mM sodium orthovanadate, 15 mM MgCl₂, 0.1% Triton X-100, 25 mM MOPS, 100 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 20 mM leupeptin, pH 7.2)를 첨가하고 5분 간격으로 15초 동안 3번 vortex하여 세포를 파쇄한 후 13,000 rpm, 4°C, 15분간 원심 분리하여 시료를 준비하였다. 시료는 BCA 단백질 정량 kit를 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정하여 단백질을 정량 하였으며, 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)에서 단백질을 분리한 후, immobilon membrane (Milipore, Bedford, MA)으로 transfer하였다. Membrane은 5% milk/TBST (20 mM Tris-HCL, 137 mM NaCl, 0.1%Tween 20, pH 7.4)로 실온에서 1시간 유지한 후,

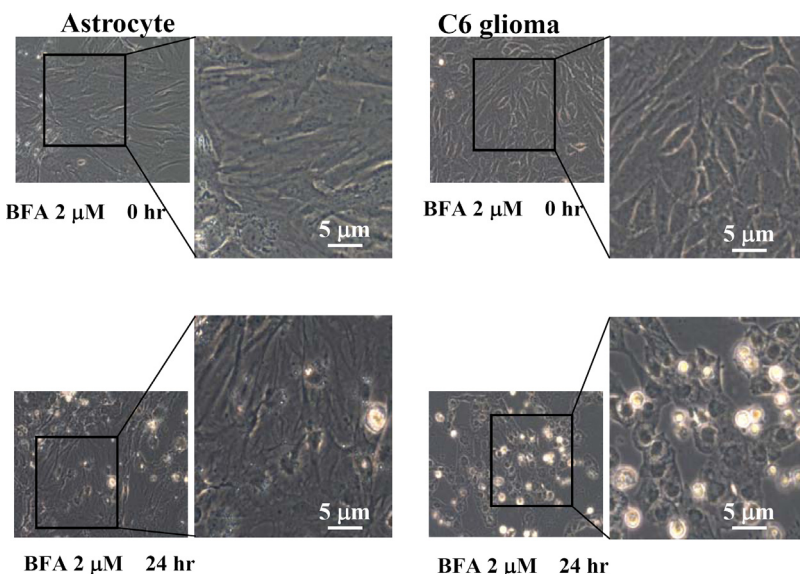


Fig. 1. Effect of BFA on cell morphology of astrocyte and C6 glioma cells. Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with 2 µM BFA for 24 hr. Cell morphology was observed under a microscope.

CHOP (Santa Cruz, CA, USA)과 actin (Sigma, Louis, MO)을 희석한 5% milk/TBST로 실온에서 12시간 유지하였다. Anti-mouse 또는 rabbit Ig horseradish peroxidase/TBST (Amersham Buckinghamshire, England)로 1시간 반응 후 Enhanced Chemiluminescence (ECL, Pierce, IL, USA)용액을 가하여 발색시켜서 단백질을 확인하였다.

Proteasome activity assay

Chymotryptic proteasome 활성은 Suc-LLVY-AMC (chymotryptic substrate; Biomol International, Plymouth Meeting, PA)을 사용하여 측정하였다. 세포를 0.4×10^6 cells/well로 12시간 배양 후에, FBS를 첨가하지 않은 무혈청 배지로 교체하여 BFA를 12시간 처리하여, 세포를 모아 40 μ l lysis buffer를 첨가하여 lysis후 5 μ g 단백질을 반응 buffer (100 mM Tris - HCl (pH 8.0), 10 mM MgCl₂, 50 μ M Suc-LLVY-AMC, 2 mM ATP)에 첨가 한 후 37°C에서 30분간 반응 하였다. 반응 후 380 nm에서 흡광도를 측정하여 proteasome활성을 측정하였

다.

결 과

BFA에 의한 세포 형태 조사

본 실험에서는 BFA가 primary astrocyte 세포와 C6 glioma 세포의 형태에 미치는 영향을 조사하였다. Primary astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에 2 μ M BFA를 24시간 처리 후 형태를 조사한 결과 primary astrocyte 세포에서는 큰 변화를 관찰 할 수 없었다. C6 glioma 세포에서는 표면에 떨어진 둥근 세포를 관찰 할 수 있었다(Fig. 1).

다양한 ER stress 유도 물질 처리 시 primary astrocyte 세포와 C6 glioma세포에서의 CHOP 단백질의 발현 양상 비교

ER stress 유도 물질인 BFA, thapsigargin(sarco/endoplasmic Ca²⁺-ATPases 저해제), tunicamycin (N-glycosylation 저해제)을 primary astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에 처리 후 CHOP 단백질 발현 정도를 측정하였다. BFA 처리 시 primary astrocyte 세포에서는 CHOP 발현을 확인 할 수 없었으나 C6

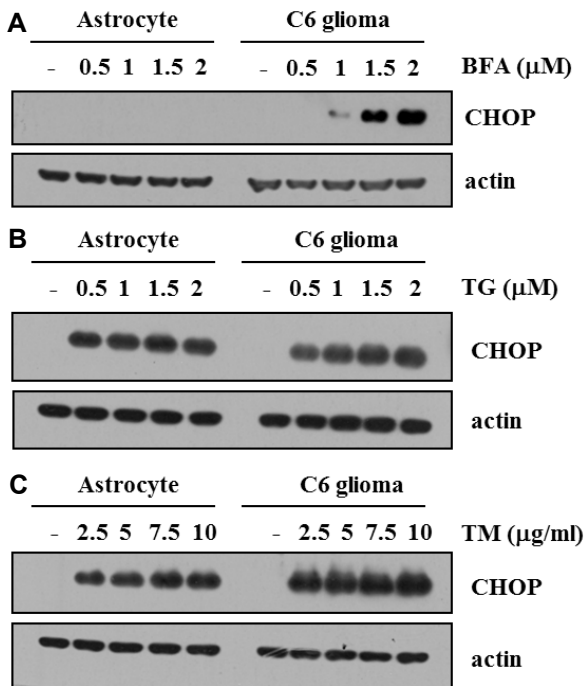


Fig. 2. Effect of ER stress inducers on CHOP protein expression. (A) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with the indicated concentrations of BFA for 12 hr. (B) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with the indicated concentrations of thapsigargin(TG) for 12 hr. (C) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with the indicated concentrations of tunicamycin(TM) for 12 hr. The protein expression levels of CHOP and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as a loading control.

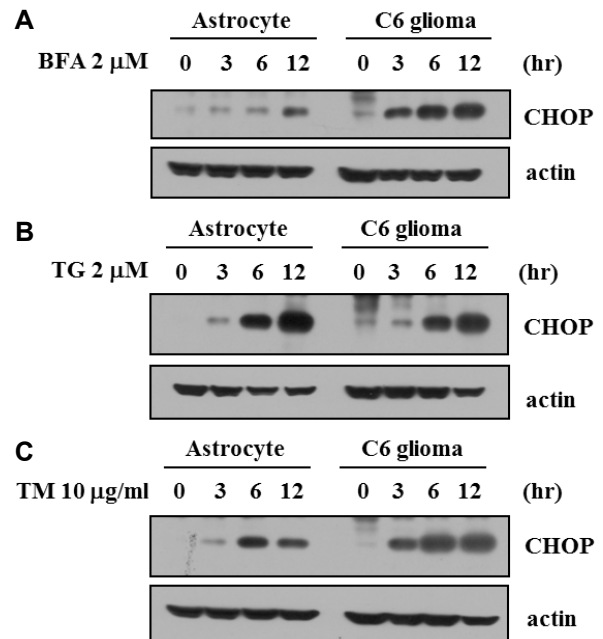


Fig. 3. Time kinetics of CHOP protein expression in various ER stress inducers treated cells. (A) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with 2 μ M BFA for the indicated time points. (B) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with 2 μ M TG for the indicated time points. (C) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with 10 μ g/ml TM for the indicated time points. The protein expression levels of CHOP and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as a loading control.

glioma 세포에서는 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다 (Fig. 2A). Thapsigargin과 tunicamycin 처리 시에는 각각 두 세포 모두 CHOP 발현을 유도 하였다(Fig. 2B). Tunicamycin 처리 시 primary astrocyte 세포에서 C6 glioma 세포에 비해 다소 CHOP 발현이 약하게 발현 하였다(Fig. 2C). 시간 경과에 따른 ER stress 유도 물질에 대한 CHOP 발현을 조사 하였다. BFA 처리 시 C6 glioma 세포에서는 3시간부터 CHOP 발현을 유도하였다(Fig. 3A). 하지만 primary astrocyte 세포에서는 매우 약한 CHOP 발현을 시간 의존적으로 유도함을 확인하였다. Thapsigargin 처리 시 두 세포에서 비슷한 발현 정도와 시간 의존성을 보였다(Fig. 3B). Tunicamycin 처리 시 astrocyte 세포에서는 6시간에 최고의 발현정도를 보인 후 12시간에서는 감소 현상을 보였지만, C6 glioma 세포에서는 시간 의존적으로 증가 현상을 보였다(Fig. 3C).

다양한 ER stress 유도 물질 처리 시 primary astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에서의 CHOP mRNA 발현 양상 비교

ER stress 유도 물질인 2 μM BFA, 2 μM thapsigargin, 10 μg/ml tunicamycin을 primary astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에 12 시간 처리 후 CHOP mRNA 발현 정도를 측정하였다. 매우 흥미롭게 primary astrocyte 세포에서 ER stress 유도 물질 모두에서 CHOP mRNA 발현을 확인 할 수 있었다(Fig. 4A). C6 glioma 세포에서도 CHOP mRNA 발현 정도는 약하지만 모든 ER stress 유도 물질에서 CHOP mRNA 발현을 확인 할 수 있었다. 본 논문은 BFA 유도에 의한 astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에서의 CHOP 단백질의 발현 조절기전에 집중

하여 조사하였다. Astrocyte 세포에서 BFA 처리 시 CHOP 단백질의 발현량은 C6 glioma세포에 비하여 매우 적었지만 mRNA 발현 정도에서는 더 많은 발현 정도를 확인 하였다. CHOP mRNA의 발현 증가를 새로운 mRNA 합성을 저해하는 actinomycin D를 30분 전처리 후 2 μM BFA 처리 시 mRNA를 확인한 결과 억제됨을 확인 하였다(Fig. 4B).

Astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에서 BFA처리에 의한 proteasome activity 정도 차이 조사

Astrocyte 세포에서 BFA 처리 시 CHOP mRNA 발현은 확인되었으나 CHOP 단백질의 발현 정도가 C6 glioma 세포에 비해 현저히 적은 이유는 post-transcription 혹은 post-translation 단계에서 조절에 의해서 야기된다. 따라서 post-translation 단계의 조절을 확인하기 위하여 ubiquitin-proteasome 저해제인 MG132를 전처리 한 후 BFA를 처리하여 CHOP 발현 정도를 두 세포에서 비교하였다. BFA 처리 시 MG132 존재 시 astrocyte 세포에서 CHOP 단백질이 현저히 증가함을 확인 하였다(Fig. 5A). BFA 처리 시 astrocyte 세포에서 CHOP 단백질의 발현 정도가 C6 glioma 세포에 비해 적은 원인이 proteasome 효소 활성의 증가에 기인하는 것을 조사하였다. BFA 처리 시 두 세포에서의 proteasome 활성을 측정한 결과 astrocyte 세포가 C6 glioma 세포보다 더 높음을 확인 하였다 (Fig. 5B).

고 찰

본 실험에서는 ER stress 유도 물질인 BFA가 primary astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에서 CHOP 단백질 발현 정도의 차이와 차이의 원인에 대하여 규명하였다.

CHOP 단백질은 정상적인 상태에서는 저농도로 발현되나, ER stress 상태에서는 전사 단계의 조절에 의하여 강하게 발현이 유도 된다. CHOP 유전자의 전사조절에는 4개의 ER stress-responsive transcriptional enhancer element가 ER stress 상태에서 조절한다[16]. CHOP 단백질의 발현 조절과정에 전사조절 뿐만 아니라 CHOP mRNA stability를 통하여 조절 할 수 있다[2, 21]. 본 연구에서는 정상세포인 astrocyte와 C6 glioma에서의 BFA에 의한 CHOP 단백질 발현 조절의 차이점을 확인하였다. 하지만 이 차이점은 다른 ER stress 유도 물질인 thapsigargin과 tunicamycin에 의해서는 CHOP 단백질 발현 차이점은 확인 할 수가 없었다(Fig. 2). 이 사실은 BFA에 유도되는 CHOP 단백질 발현 조절에 두 세포에서의 특이적인 현상이다. CHOP 단백질 발현 조절의 차이가 mRNA 발현 조절에서 기인 되는지를 확인한 결과 mRNA 발현 조절하고는 무관함을 RT-PCR 방법으로 확인 하였다(Fig. 4A). CHOP 발현 조절 기전에 전사 조절 및 전사 후 mRNA 안정화 조절 뿐만 아니라 단백질 합성 후 조절에 대한 보고도 있다[7, 18].

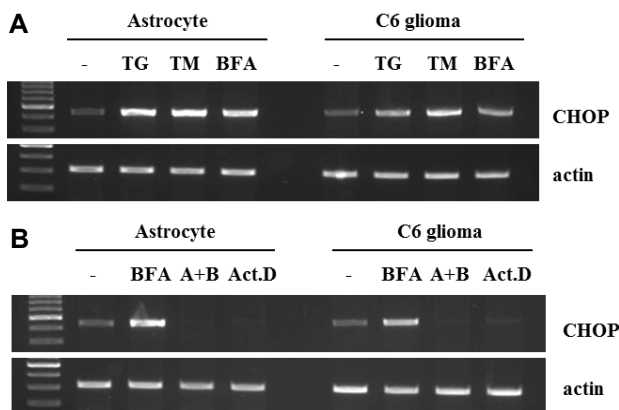


Fig. 4. Effect of ER stress inducers on CHOP mRNA expression. (A) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with BFA (2 μM), TG (2 μM) and TM(10 μg/ml) for 12 hr. CHOP mRNA expression was determined using RT-PCR. (B) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were pretreated with the 1 μg/ml actinomycin D (Act. D) for 30 min, and then treated with BFA (2 μM) for 12 hr. CHOP mRNA expression was determined using RT-PCR.

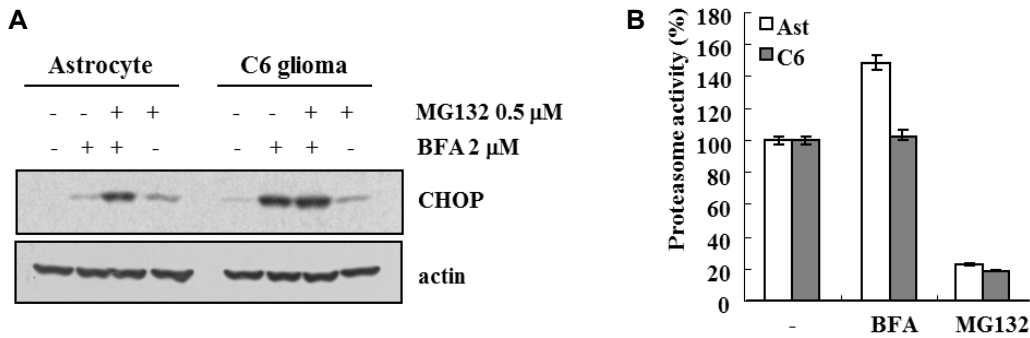


Fig. 5. MG132 enhanced BFA-induced CHOP expression in astrocyte cells. (A) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were pretreated with 0.5 μ M MG132, and then added 2 μ M BFA for 24 hr. The protein expression levels of CHOP and actin were determined by Western blotting. The level of actin was used as a loading control. (B) Primary astrocyte cells and C6 glioma cells were treated with 2 μ M BFA or 0.5 μ M MG132 for 24 hr. The cells were lysed, and proteasome activity was measured as described in the Materials and Methods section.

최근에 Yanfei 등의 보고에 의하면, 과도한 유리 지방산은 pancreatic β -cells에서 lipotoxicity를 야기하여 세포 사멸을 유도 하는데 그 원인은 유리 지방산에 의하여 ER stress를 야기 하기 때문이다[18]. Palmitate는 CHOP 단백질의 ubiquitination과 분해를 촉진하는 E3 ligase인 cIAP의 발현 감소를 유도 하여 최종적으로 CHOP 단백질의 발현 증가를 통하여 세포 사멸을 유도한다[18]. Astrocyte 세포에서 ubiquitin-proteasome 저해제인 MG132가 존재하에서 BFA 처리한 경우 CHOP 단백질 발현이 현저히 증가 하였다(Fig. 5A). C6 glioma 세포에서도 MG132와 BFA의 동시 처리 시 CHOP 단백질의 발현 증가는 확인 하였으나 증가폭이 astrocyte 세포에 비 하여 현저히 작았다. 이 사실은 두 세포사이에 BFA 처리 시 CHOP 단백질의 발현 증가의 차이점은 ubiquitin-proteasome system의 차이에 기인 함을 유추 할 수 있다. 이를 확인 하고자 두 세포에서의 BFA 처리 시 proteasome 활성을 측정 한 결과 astrocyte세포에서 더 높은 활성을 확인 하였다.

최근 국내외에서도 CHOP 단백질의 ubiquitin-proteasome 조절 기전 연구가 진행 중이며, 그 중에서도 CHOP 에 대한 새로운 E3 ligase 동정 연구가 활발히 수행되고 있다. BFA에 의해서 CHOP 단백질의 발현 조절에 특이적인 E3 ligase의 규명 및 기전 연구가 더 필요할 것으로 생각된다. 정상세포와 암세포에서 ubiquitin-proteasome system의 총체적인 연구는 향후 ER stress 관련 질환인 당뇨병, 암등 치료제 개발의 새로운 target으로 활용가능성이 높을 것으로 생각된다.

References

- Boya, P., Cohen, I., Zamzami, N., Vieira, H. L. and Kroemer, G. 2002. Endoplasmic reticulum stress-induced cell death requires mitochondrial membrane permeabilization. *Cell Death Differ.* **9**, 465-467.
- Bruhat, A., Jousse, C., Wang, X. Z., Ron, D., Ferrara, M. and Fafournoux, P. 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.* **272**, 17588-17593.
- Carew, J. S., Nawrocki, S. T., Krupnik, Y. V., Dunner, K., McConkey, D. J. and Keating, M. J. 2006. Targeting endoplasmic reticulum protein transport: a novel strategy to kill malignant B cells and overcome fludarabine resistance in CLL. *Blood* **107**, 222-231.
- Donaldson, G., Cassel, D., Kahn, R. A. and Klausner, R. D. 1992. ADP-ribosylation factor, a small GTP-binding protein, is required for binding of the coatmer protein beta-COP to Golgi membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 6408-6412.
- Giulian, D. and Baker, T. J. 1986. Characterization of amoeboid microglia isolated from developing mammalian brain. *J. Neurosci.* **6**, 2163-2178.
- Guo, H., Tittle, T. V., Allen, H. and Marziarz, R. T. 1998. Brefeldin A-mediated apoptosis requires the activation of caspases and is inhibited by Bcl-2. *Exp. Cell Res.* **245**, 57-68.
- Jeong, K., Kim, H., Kim, K., Kim, S. J., Hahn, B. S., Jahng, G. H., Yoon, K. S., Kim, S. S., Ha, J., Kang, I. and Choe, W. 2014. Cyclophilin B is involved in p300-mediated degradation of CHOP in tumor cell adaptation to hypoxia. *Cell Death Differ.* **21**, 438-450.
- Kapoor, A. and Sanyal, A. J. 2009. Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response. *Clin. Liver Dis.* **13**, 581-590.
- Kaufman, R. J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**,1211-1233.
- Kaufman, R. J., Scheuner, D., Schroder, M., Shen, X., Lee, K., Liu, C. Y. and Arnold, S. M. 2002. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**,411-421.
- Klausner, R. D., Donaldson, J. G. and Lippincott-Schwartz, J. 1992. Brefeldin A: insights into the control of membrane traffic and organelle structure. *J. Cell. Biol.* **116**, 1071-1080.

12. Lai, E., Teodoro, T. and Volchuk, A. 2007. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology* **22**, 193-201.
13. McCullough, K. D., Martindale, J. L., Klotz, L. O., Aw, T. Y. and Holbrook, N. J. 2001. Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1249-1259.
14. Mori, K. 2000. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* **101**, 451-454.
15. Oyadomari, S., Araki, E. and Mori, M. 2002. Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in pancreatic β -cell. *Apoptosis* **7**, 335-345.
16. Oyadomari, S. and Mori, M. 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death Differ.* **11**, 381-389.
17. Oyadomari, S., Takeda, K., Takiguchi, M., Gotoh, T., Matsumoto, M., Wada, I., Akira, S., Araki, E. and Mori, M. 2001. Nitric oxide-induced apoptosis in pancreatic β cells is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10845-10850.
18. Qi, Y. and Xia, P. 2012. Cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP1) plays a critical role in β -cell survival under endoplasmic reticulum stress: promoting ubiquitination and degradation of C/EBP homologous protein (CHOP). *J. Biol. Chem.* **287**, 32236-32245.
19. Sitia, R. and Braakman, I. 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory. *Nature* **426**, 891-894.
20. Tamura, G., Ando, K., Suzuki, S., Takatsuki, A. and Arima, K. 1968. Antiviral activity of brefeldin A and verrucarin A. *J. Antibiot.* **21**, 160-161.
21. Ubeda, M., Schmitt-Ney, M., Ferrer, J. and Habener, J. F. 1999. CHOP/GADD153 and methionyl-tRNA synthetase (MetRS) genes overlap in a conserved region that controls mRNA stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **262**, 31-38.
22. Wallen, E., Sellers, R. G. and Peehl, D. M. 2000. Brefeldin A induces p53-independent apoptosis in primary cultures of human prostatic cancer cells. *Urology* **164**, 836-841.
23. Wang, X. Z., Harding, H. P., Zhang, Y., Jolicoeur, E. M., Kuroda, M. and Ron, D. 1998. Cloning of mammalian Ire1 reveals diversity in the ER stress response. *EMBO J.* **19**, 5708-5717.
24. Yoshida, H., Okada, T., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T., Negishi, M. and Mori, K. 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.
25. Zinszner, H., Kuroda, M., Wang, X., Batchvarova, N., Lightfoot, R. T., Remotti, H., Stevens, J. L. and Ron, D. 1998. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. *Genes Dev.* **12**, 982-995.

초록 : Astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에서 ER stress 유도 물질 brefeldin A에 의한 CHOP 단백질의 발현 차이

박은정 · 권택규*

(계명대학교 의과대학 면역학교실)

Brefeldin A (BFA)는 *Eupenicillium brefeldianum*에서 분리한 lactone계열의 항생제이며 ER에서 Golgi로 단백질 이송/전달을 억제하는 기능이 있다. 따라서 BFA를 세포에 처리 시 Golgi 기능 장애와 ER에서 단백질의 폴딩/조립의 문제로 인하여 ER에 기능 장애가 발생하는데 이를 소포체 스트레스(ER stress)라고 한다. 본 연구에서는 정상 astrocyte 세포와 C6 glioma 세포에서의 BFA처리에 따라 ER stress marker 단백질인 CHOP 발현 차이를 확인하였다. BFA 처리 시 CHOP 발현이 정상 astrocyte 세포에서 C6 glioma 세포에 비해 현저히 낮은 발현을 확인하였다. 하지만 CHOP mRNA 발현에서는 astrocyte 세포에서 발현 됨을 RT-PCR로 확인하였다. C6 glioma 세포와 비교하여 astrocyte 세포에서 BFA유도의 CHOP 단백질 발현이 낮은 원인은 proteasome 활성이 높음으로 기인됨을 proteasome inhibitor 실험과 proteasome 활성 측정을 통하여 확인하였다.