

Hypothermia Regulates Endoplasmic Reticulum (ER) Stress through the X-box Binding Protein-1 (XBP1) Gene Expression in PC12 Cells

Bo-Kyung Yoo^{1,§}, Kisang Kwon^{2,§}, Eun Ryeong Lee² and O-Yu Kwon^{1,†}

¹Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea

²Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health & Welfare, Kyungwoon University, Gumi 39160, Korea

Endoplasmic reticulum (ER) stress induces unfolded protein response (UPR) via inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) activation, which sends a molecular signal for X box-binding protein 1 (XBP1) mRNA splicing in the cytosol. IRE1 endoribonuclease activity induces cleavage of XBP1 mRNA. The XBP1 mRNA is then ligated by an uncharacterized RNA ligase and translated to produce spliced XBP1 by 23 nt removed in which contains the *Pst*I restriction enzyme site. The splicing of XBP1 mRNA can be detected by semiquantitative RT-PCR, and then splicing of XBP1 is a useful tool to measure the genetic variability in ER stress. In this study, we have estimated IRE1-dependent splicing of XBP1 mRNA under conditions of various hypothermia. The results indicated that hypothermia regulated ER stress. This study demonstrated that hypothermia is closely related to ER stress and may be useful for early diagnosis of ER-associated disease.

Key Words: Hypothermia, Endoplasmic Reticulum (ER) Stress, X-box Binding Protein-1 (XBP1)

진핵세포에서 소포체(endoplasmic reticulum: ER)의 주된 생물학적 기능은 신생 단백질의 번역 후 변형 과정(post-translational modification step)을 수행하는 것이다. 즉, 소포체는 mRNA에서 새롭게 만들어진 미완성의 polypeptide가 정상적인 기능을 가진 분비막 단백질이 되기 위하여 folding & assembly, glycosylation adding & trimming 등의 과정을 정확하게 수행할 수 있도록 최적의 조건을 제공하는 세포내 소기관이다(Schwarz and Blower, 2016). 이와 같은 기능을 중추적으로 수행하는 ER lumen에 존재하는 단백질무리를 소포체 분자샤페론(ER molecular chaperone)이라고 한다. 지금까지 보고된 대표적인 것으로는 binding immunoglobulin protein (BiP), glucose-regulated protein 94 (GRP94), endoplasmic reticulum protein (Erp72), protein disul-

fide isomerase (PDI), calnexin, calreticulin, endoplasmic reticulum 29 (Erp29) 등이 있다(Hebert and Molinari, 2007; Sontag et al., 2017). 그리고 소포체가 정상적인 post-translational modification step의 환경을 제공을 위하여서는 세포질에 비하여 10~100배 정도 높은 칼슘 농도가 sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase (SERCA)에 의해서 유지되어야 한다(Periasamy and Kalyanasundaram, 2007). 세포의 정상적인 기능 수행에 역행하는 비정상적인 세포생리현상이 소포체에 직접적으로 문제를 발생시키면 질병으로 나타난다, 이들을 총괄하여 ER storage disease (ERSD)라고 한다(Kim and Arvan, 1998). 지금까지 보고된 대표적인 ERSD는 선천성 갑상선 기능 저하증(congenital hypothyroidism), 요붕증(diabetes insipidus), 골형성부전증(osteogenesis imperfect),

*Received: October 20, 2017 / Revised: November 25, 2017 / Accepted: December 8, 2017

§ Authors contributed equally to this work.

† Corresponding author: O-Yu Kwon, Department of Anatomy & Cell Biology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 35015, Korea. Tel: +82-42-580-8206, Fax: +82-42-586-4800, e-mail: oykwon@cnu.ac.kr

©The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences. All rights reserved.

©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.

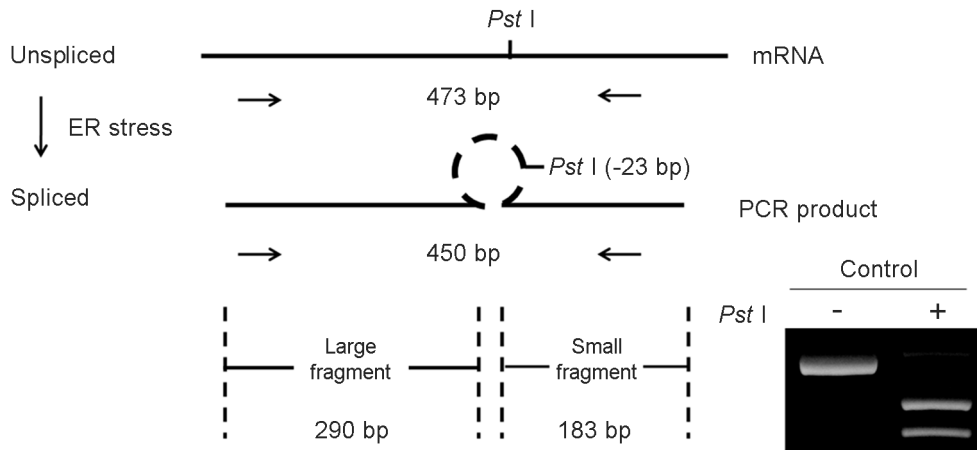


Fig. 1. Schematic representation of XBP1 mRNA splicing detection by RT-PCR. RT-PCR analysis of total RNA was performed to simultaneously detect both spliced and unspliced XBP1 mRNA, which is 473 bp without ER stress, but when ER stress is applied, 450 bp, which is 23 bp away, is detected. The removed 23 bp contains the restriction enzyme *Pst*I. When PCR product was digested with restriction enzyme *Pst*I, mRNA under ER stress condition was 473 bp, but mRNA without ER stress was cleaved, resulting in 183 bp and 290 bp on the 2% agarose gel, respectively.

지질대사이상(disorders of lipid metabolism, 당뇨병(diabetes mellitus)에 관련된 40여종이 있다. ERSD와 같이 비정상적으로 folding된 변성 단백질(malfolded/unfolded/misfolded protein)의 축적 및 단백질 assembly가 나타나면, 세포는 소포체 스트레스(ER stress)를 받는다. 소포체가 핵으로 소포체 신호전달(ER signal pathway)을 통해서, 세포의 전체적인 단백질 대사를 억제하는 방법과 소포체 내에 축적되는 변성 단백질의 직접적인 억제, 보호 및 수복과 같은 일을 함으로서 세포의 homeostasis를 유지하려고 한다. ER signal pathway는 3종류의 소포체 막 단백질(IRE1: inositol-requiring enzyme 1, PERK: PKR-like ER kinase, ATF6: activating transcription factor 6)에 의해서 조절된다(Back and Kaufman, 2012; Plaquet et al., 2015; Navid and Colbert, 2017). 세포가 ER stress를 받게 되면 ER lumen의 BiP과 결합하고 있던 monomer 상태의 IRE1이 dimmer가 되면서 X-box binding protein-1 (XBP1) mRNA의 splicing이 일어나 XBP1 단백질이 생산되어 ER chaperone을 생합성을 촉진한다. PERK 역시 monomer 상태에서 ER stress에 의해서 dimerization 되면서 핵전사인자인 eIF2 α (eukaryotic initiation factor 2 α)가 인산화가 일어나 세포 전체의 단백질 생합성을 억제한다. ATF6은 ER stress를 받으면 세포질 쪽의 단편이 떨어져 ER stress element (ERSE)에 결합하여 ER chaperone의 생합성을 촉진한다.

인체에 적용하는 저체온법(hypothermia treatment)은 체온

을 35°C 이하(일반적으로 32°C)로 유지하여 발병의 진행 속도를 억제하는 것과 좋은 임상적인 예후를 얻기 위한 수단으로 사용되고 있다(Lee et al., 2017). 가장 효과적인 저체온법을 American Heart Association의 therapeutic hypothermia 가이드라인에서는 32~34°C에서 12~24시간으로 규정하였다(Brooks and Morrison, 2008). 실제로 refractory intracranial hypertension과 malignant cerebral edema의 경우는 아주 유의적인 결과를 얻었다(Imataka and Arisaka, 2015). 비록 저체온법이 neurocritical care와 patient rehabilitation에 많은 장점이 알려지고 있지만 정확한 분자수준의 기전은 명확하게 규명되어 있지 않다(Kwon et al., 2008; Kuroda, 2016). 그러나 아포토시스(apoptosis), mitochondrial dysfunction, 염증(inflammation), blood-brain barrier disruption, 자유라디칼 생성(free radical production), rescue of the RNA-binding motif protein 3 gene 등이 보고되고 있다(Yenari and Zhao, 2003; Yenari and Han, 2012; Guo et al., 2016). 본 연구에서는 저체온법 과정이 세포에 어떤 영향을 미치는지를 알기 위하여 ER stress의 정도를 XBP1 mRNA splicing을 이용한 RT-PCR로 확인하였다(Kwon et al., 2005). Fig. 1의 모식도에서 보는 것과 같이, ER stress에 의해서 IRE1 dimerization을 통해서 XBP1 mRNA splicing이 일어나면 가운데 부분의 23 nt 단편이 제거된다. 이 단편속에 제한효소 *Pst*I site가 존재하기 때문에 ER stress를 받아서 23 nt가 분리된 상태의 RT-PCR 산물은 제한효소 *Pst*I를 처리하여도 절단

되지 않는다. 그러나 ER stress를 받지 않은 XBPI mRNA에는 *PstI* site를 가지고 있기 때문에, 이것의 RT-PCR 산물에 제한효소 *PstI*를 처리하면 중간이 절단된다. 즉 ER stress를 받으면 450 bp (-23 nt)가 나타나지만 ER stress를 받지 않으면 473 bp (+23 nt)와 473 bp 단편의 중앙에 *PstI*으로 절단된 2개의 단편(290 bp, 183 bp)이 나타난다. 이처럼 제한효소 *PstI* 처리에 따라서 각각 다른 길이로 절단되는 특성을 이용하여 hypothermia가 세포에 어느 정도의 ER stress로 작용하는지를 구별할 수 있다.

PC12 세포는 collagen-coated flask에서 85% RPMI 1640 배지(25 mM HEPES buffer, 10% heat inactivated horse serum, 5% heat-inactivated fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 1 g/l D-(+)-glucose, 25 µg/ml streptomycin, 25 U/ml penicillin을 포함)사용하여 37°C/5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포의 hypothermia 처리 온도는 32°C였다. RNAzol-B Kit (TEL-TEST, Inc. TX, USA)를 사용 total RNA를 분리하였다. 총실도 80%의 PC12 세포를 여러 조건의 hypothermia 처리한 후 4°C phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척 후 RNAzol-B 1 ml에 homogenization 하였다. Chloroform 200 µl을 첨가하여 잘 섞어주고 12,000 rpm (4°C)에서 15분간 원심 분리하여 얻은 500 µl의 상층액에 500 µl의 isopropanol을 첨가하여 12,000 rpm (4°C)에서 10분간 원심 분리하여 침전물을 얻었다. 침전물을 75% ethanol (4°C) 0.1 ml로 세척 후 공기중에 건조하여 DW에 녹인 후 NanoDrop Lite UV-spectrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)로 정량하였다. 세포에서 추출한 mRNA의 poly A에 oligo d(T) primer를 결합시켜 역전사 효소를 이용해 cDNA를 합성하였다. 주형 cDNA에 대한 DNA primer, dNTP, 내열성 DNA polymerase를 함유하는 반응액 중에 목적으로 하는 double strand DNA를 열 변성하였다(94°C, 30 sec). 열 변성에 의해 생긴 single strand DNA에 primer를 annealing 하였다(55°C, 30 sec). DNA polymerase에 의한 상보성 DNA를 합성하였다. 열 변성부터 상보성 DNA 합성까지 25~30 cycle을 반복하는데, 목적 DNA 단편에 따라 최대 효율을 얻을 수 있는 조건이 달라서 적당하게 설정 조건을 조절할 필요가 있다. PCR의 template로 사용하기 위해 M-MLV (Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 분리한 3 µg의 RNA를 oligo d(T), nuclease-free water와 함께 1.5 ml tube에 넣고 70°C에서 5분간 가열하여 denature 시킨 다음 얼음에서 차게 식힌 후, M-MLV 5X reaction buffer 6 µl, dNTP mixture (2.5 mM) 4 µl, M-MLV RT 200 units, 재조합 RNasin® Ribonuclease

Inhibitor 25 unit를 첨가하고 nuclease-free water로 최종 반응량을 30 µl로 맞추는 다음 42°C에서 90분간 반응시켰다. 반응 후에는 95°C에서 2분간 M-MLV RT를 inactivation 시킨 후 Nuclease-Free Water 70 µl을 더하여 최종적으로 100 µl로 맞추는 다음 PCR에 2 µl씩 사용하였다. PCR 반응액 50 µl에 F-primer (5'-AAACAGAGTAGCAGCTCAGACTGC-3')와 R-primer (5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGGAG-3')를 94°C~30초, 68°C~30초, 72°C~1분으로 30회 반복하였다. PCR 최종 산물 8 µl을 *PstI* 제한효소로 37°C에서 2시간 동안 처리한 다음에 2% agarose gel에서 전기영동하여 UV상에서 밴드를 관찰하였다.

PC12 세포를 32°C에서 각각 정해진 시간 동안 저온 처리하였다(Fig. 2A). 정상적 세포 배양 온도(37°C)에서 배양한 대조군의 세포에 비교하여 1, 3, 7시간 저온 처리된 세포가 ER stress를 덜 받는 경향을 보였다. 이는 저온에서 세포의 전체적인 대사가 떨어지는 것과의 관계가 있는 것 같다. 그러나 저온 처리를 3일 동안 할 경우에는 오히려 세포가 ER stress를 정상세포의 2배 정도 받았다(Fig. 2B). 결국 세포에 미치는 저온의 영향은, 단기간에는 저 대사 상태로 ER stress가 일시적으로 약해지지만 긴 시간에서는 ER stress로 작용하였다. 1일 동안 저온 처리에서는 ER stress를 거의 받지 않았으나, 1일 저온 처리 다음에 1시간에서 3시간 정도 37°C 처리를 하면 대조군보다 약 2배 가까이 ER stress를 받으며 5시간 처리에서는 대조군 수준으로 내려왔다(Fig. 2C). 2일간 저온 처리 후 Fig. 1과 같이 37°C 처리를 1, 3, 5시간 처리한 결과의 형태는 Fig. 1C와 유사하였다(Fig. 2D). 이 결과는 비록 1~2일의 저온 처리 후에 1~3시간 정도의 37°C 처리에 의해서 ER stress를 많이 받는 상태가 되지만 5시간 정도에서는 대조군 수준으로 돌아오는 것을 알 수 있다. Fig. 2D에서와 같이 2시간 저온 처리 후 37°C 처리하면 ER stress를 받는다. 이 상태에서 다시 32°C 처리한 결과 ER stress가 미미하지만 상승하는 반면 다시 37°C 처리에 의해서 ER stress를 덜 받았다(Fig. 2E). 이 결과는 32°C와 37°C 처리를 반복함으로써 ER stress를 줄일 수 있다, 만약에 저온 처리법을 치료로 사용할 경우에 일정한 간격으로 37°C 처리를 함으로서 원하지 않는 ER stress를 줄일 수 있는 가능성을 보인다. 저온 처리세포에서 LiCl 처리와 관계없이 GSK-3β pS9가 증가되는 연구 결과가 보고되어 있다(Bretteville et al., 2012). 이는 Fig. 2B의 결과와 같이 저온 처리에 의해서 ER stress를 받는 것을 의미한다. 그리고 LiCl에 의한 GSK-3 저해가 저온 처리된 세포에서 저체온 유발 tau과 인산화를 감

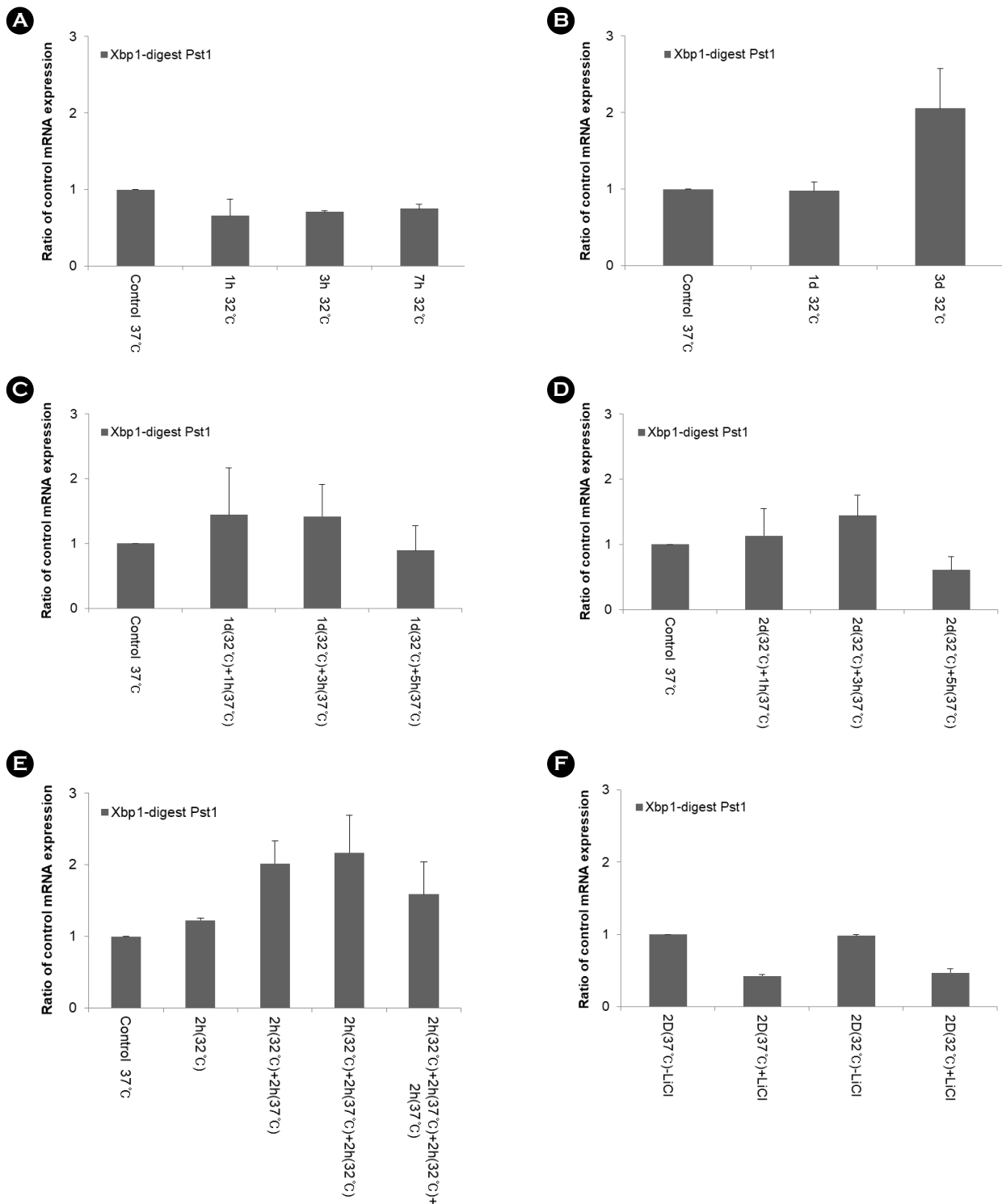


Fig. 2. The effects of hypothermia treatment for the ER stress detected by XBP1 mRNA splicing. (A) PC12 cells were exposed to hypothermia (32°C) for different time durations (1, 3 & 7 h). (B) PC12 cells were exposed to hypothermia for different time durations (1 day & 3 days). (C) & (D) PC12 cells under control after hypothermia treatment for different time durations. (E) PC12 cells were exposed to hypothermia for repeated processing of intervals. (F) PC12 cells were exposed to hypothermia conditions with 20 mM lithium chloride, respectively. The control treatment temperature for all experiments is 37°C. Total RNA was isolated from indicated cells after treatment hypothermia, and the expression levels of the indicated genes were determined by RT-PCR and *Pst1* digestion, the resulting undigested *Pst1* fragments were normalized against GAPDH expression. DNA bands were quantified using the ImageJ program (NIH, Bethesda, MD, USA). The experiment was carried out three times and the results are statistically processed.

소를 통해서 ER stress를 현저하게 감소시키는 것으로 추정할 수 있다(Rzechorzek et al., 2015). 그러나 본 실험 결과는 LiCl 처리세포에서 저온 처리와 관계없이 ER stress가 감소되었다(Fig. 2F). 저온 처리에 의한 GSK-3 저해와 tau의 발현과 인산화를 통한 ER stress를 조절기전을 분명하게 할 필요가 있다. 그 결과는 ER stress를 최소화한 저체온법 사용에 근본적인 문제해결에 실마리를 제공할 것이다.

ACKNOWLEDGEMENTS

이 연구는 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflicts of interest to disclose.

REFERENCES

- Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress and type 2 diabetes. *Annual Review of Biochemistry*. 2012. 81: 767-793.
- Bretteville A, Marcouiller F, Julien C, El Khoury NB, Petry FR, Poitras I, Mougino D, Lévesque G, Hébert SS, Planel E. Hypothermia-induced hyperphosphorylation: a new model to study tau kinase inhibitors. *Scientific Reports*. 2012. 2: 480.
- Brooks SC, Morrison LJ. Implementation of therapeutic hypothermia guidelines for post-cardiac arrest syndrome at a glacial pace: seeking guidance from the knowledge translation literature. *Resuscitation*. 2008. 77: 286-292.
- Guo C, Geng Y, Song F, Huo Y, Wu X, Lv J, Ge A, Fan W. Mild hypothermia protects rat neuronal injury after intracerebral hemorrhage via attenuating endoplasmic reticulum response induced neuron apoptosis. *Neuroscience Letters*. 2016. 635: 17-23.
- Hebert DN, Molinari M. In and out of the ER: protein folding, quality control, degradation, and related human diseases. *Physiological Reviews*. 2007. 87: 1377-1408.
- Imataka G, Arisaka O. Brain hypothermia therapy for childhood acute encephalopathy based on clinical evidence. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2015. 10: 1624-1626.
- Kim PS, Arvan P. Endocrinopathies in the family of endoplasmic reticulum (ER) storage diseases: disorders of protein trafficking and the role of ER molecular chaperones. *Endocrine Reviews*. 1998. 19: 173-202.
- Kuroda Y. Neurocritical care update. *Journal of Intensive Care*. 2016. 4: 36.
- Kwon BK, Mann C, Sohn HM, Hilibrand AS, Phillips FM, Wang JC, Fehlings MG. Hypothermia for spinal cord injury. *Spine Journal*. 2008. 8: 859-874.
- Kwon K, Goo TW, Kwon OY. Development of rapid detection method for unfolded protein response in the mammalian cells. *Journal of Experimental and Biomedical Sciences*. 2005. 11: 249-252.
- Lee JH, Zhang J, Yu SP. Neuroprotective mechanisms and translational potential of therapeutic hypothermia in the treatment of ischemic stroke. *Neural Regeneration Research*. 2017. 12: 341-350.
- Navid F, Colbert RA. Causes and consequences of endoplasmic reticulum stress in rheumatic disease. *Nature Reviews. Rheumatology*. 2017. 13: 25-40.
- Periasamy M, Kalyanasundaram A. SERCA pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*. 2007. 35: 430-442.
- Plaquet O, Pourtier A, Abbadie C. The unfolded protein response and cellular senescence. A review in the theme: cellular mechanisms of endoplasmic reticulum stress signaling in health and disease. *Cell Physiology*. 2015. 308: 415-425.
- Rzechorzek NM, Connick P, Livesey MR, Borooah S, Patani R, Burr K, Story D, Wyllie DJ, Hardingham GE, Chandran S. Hypothermic preconditioning reverses Tau ontogenesis in human cortical neurons and is mimicked by protein phosphatase 2A inhibition. *EBio Medicine*. 2015. 3: 141-154.
- Schwarz DS, Blower MD. The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016. 73: 79-94.
- Sontag EM, Samant RS, Frydman J. Mechanisms and functions of spatial protein quality control. *Annual Review of Biochemistry*. 2017. 86: 97-122.
- Yenari MA, Zhao H, Giffard RG, Sobel RA, Sapolsky RM, Steinberg GK. Therapy and hypothermia for stroke treatment. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2003. 993: 54-68.
- Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nature Reviews. Neuroscience*. 2012. 13: 267-278.

<https://doi.org/10.15616/BSL.2017.23.4.416>

Cite this article as: BK Yoo, K Kwon, ER Lee, OY Kwon. Hypothermia Regulates Endoplasmic Reticulum (ER) Stress through the X-box Binding Protein-1 (XBP1) Gene Expression in PC12 Cells. *Biomedical Science Letters*. 2017. 23: 416-420.