

Endoplasmic Reticulum Stress Up-regulates Ferritin Heavy Chain 1 Expression

Cho-Yi Jin, Kisang Kwon, Eun Young Yun¹, Tae Won Goo¹ and O-Yu Kwon[†]

Department of Anatomy, College of Medicine, Chungnam National University, Taejon 301-747, Korea.

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

Ferritin heavy chain 1 (FTH1) is an ubiquitous and highly conserved protein which plays a major role in iron homeostasis. The expression of FTH1 was specifically enhanced under various condition of endoplasmic reticulum (ER) stresses drugs such as Brefeldin A (BFA), DTT (Dithiothreitol), calcium ionophore A23187 and tunicamycin. We firstly report here that ER-stress induces up-regulated expression of FTH1 in FRTL-5 culture thyrocytes.

Key Words: Endoplasmic reticulum (ER), Ferritin heavy chain 1 (FTH1), ER-stress inducible drugs

진핵생물의 mRNA에서 번역된 일차구조의 polypeptide가 소포체 (endoplasmic reticulum: ER)에서 생체활성을 가진 고차구조를 가지게 된다. 이때 소포체 샤페론 (ER molecular chaperone)의 도움으로 번역 후 변형과정 (post-translational modification step)을 거치면서 완성된 단백질이 된다 (Kauffman et al., 1999; Lawson et al., 1989). 대표적인 소포체 샤페론은 Bip, GRP94, PDI, calnexin, ERp72 등이 있다 (Kwon., 2000). 신생단백질이 소포체내로 translocation을 시작하면 가장 먼저 Bip (immunoglobulin binding protein)이 결합하여 일정한 도메인구조를 가지게 되면 순차적으로 다른 소포체 샤페론들이 결합하였다가 분리되는 반응을 반복하면서 고차구조의 단백질이 만들어진다 (Gething, 1999; High et al., 2000). 세포가 비정상적인 생리상태 혹은 유전적 결함으로 인하여 비정상적인 폴딩 (folding)이 일어나면 세포는 unfolding protein response (UPR)라는 반응을 통해서 세포를 보호한다. 이때에 비정상적으로 폴딩된 변성단백질의 축적의 정보가 소포체 막을 통하여 핵으로 특정신호를 전달 (ER signal pathway)하여 세포의 전체적인 단백질 대사를 억제하고 소포체 샤페론의 전사를 촉진하여 소포체내의 변성단백질을 직접적으로 억제, 보호, 수복한다. ER signal pathway에 관여하는 3종류의 소포체 막단백질 (IRE1, PERK, ATF6)이 알려있다 (Harding et al., 2002; Ng et al., 2000).

세포가 소포체 스트레스 (ER stress)를 받으면 ER lumen

에서 Bip과 결합하고 있던 IRE1이 monomer에서 인산화된 dimer가 되어, 세포질의 XBP-1 mRNA의 splicing이 일어나 XBP-1 (X-box protein 1) 단백질이 생산되어 샤페론을 생합성을 촉진한다 (Yosida et al., 2001). ER stress에 의해서 monomer인 막관통단백질 PERK가 인산화된 dimer가 되면서 핵전사 인자인 eIF2a가 인산화되어 세포전체의 단백질 합성을 저해한다 (DeGracia et al., 2002). 역시 막통과 단백질인 ATF6이 ER stress를 받으면 세포질 쪽의 단편이 떨어져 ERSE (ER stress element)와 결합한다 (Benjamin, 2006).

이런 세포생화학적 변화를 이용하여, 세포가 외부의 ER stress에 의해 영향을 받는 것을 간편하고 정확하게 검출하기 위해서 ER stress에 아주 민감한 소포체단백질인 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 받아서 23 nt가 제거된 RT-PCR산물은 제한효소 *PstI*을 처리하여도 절단되지 않는다. 이런 원리로 세포에 대한 ER stress의 민감한 반응을 구별할 수 있는 system이다.

Ferritin은 진핵생물에서 주요한 Fe를 저장하는 단백질이다 (Aisen et al., 1980; Munro et al., 1978). Ferritin은 간, 비장, 골수에서 발현하며 ferritin heavy chain 1 (FTH1)은 iron의 항상성에 주요한 역할을 한다. FTH1은 light chain에는 찾아 볼 수 없는 촉매의 ferroxidase를 포함하는데 이것은 iron의 산화와 uptake/release를 허용을 담당한다 (Lawson et al., 1989). FTH1 gene의 발현은 reductive condition과 ER stress inducing drugs 존재 하에서 증가한다. FTH1의 발현은 다른 ER stress (Tunicamycin: N-당쇄형성억제, DTT: 이황화결합억제, Ca²⁺ ionophore

*논문 접수: 2007년 4월 27일

수정재접수: 2007년 5월 18일

[†]교신저자: 권오유, (우) 301-747 대전광역시 중구 문화동 6,

충남대학교 의과대학 해부학교실

Tel: +82-42-580-8206, Fax: +82-42-586-4800

e-mail: oykwon@cnu.ac.kr

A23187: 세포내 칼슘교란, BFA: 분비단백질이 소포체에서 골지체로 가는 이동을 방해)에서도 영향을 받는다 (Kwon et al., 2003). 그리고 세포내의 free iron이 감소하게 되면 ferritin은 iron을 축적하는 fenton reaction을 통해 독성의 hydroxyl radical의 형성에 영향을 받고 이를 방해한다. 즉, vertebrate system에서 oxidative stress의 피해에 의해 mitochondrial damage를 입게 되는데 이것에 저항하고 방해하는 주요한 역할을 한다 (Orino et al., 2001).

쥐의 갑상선세포 (FRTL-5)를 calf serum 5%를 포함한 Coon's modified media에서 37°C, 5% CO₂, 충분히 습한 조건으로 배양하였다. 신선한 배지를 2~3일 간격으로 교체하며 배양하였고 1주일에 한번씩 계대 배양하였다. 실험에 쓰이는 세포는 70~90% 정도의 세포 충실도를 보이는 것을 사용하였고 전처리 후 차가운 PBS (phosphate-buffered saline)로 한번 세척한 후, 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. 500 µl의 상등액을 취하여 새로운 tube에 동량의 isopropanol 넣고 상온에서 10분 정도 처리한 후 12,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하고 tube의 바닥에 얻어진 pellet에 75% ethanol을 초기 RNA-Bee양과 동일한 500 µl넣고 12,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하여 최종적으로 total RNA를 얻었다. DEPC-DW에 녹여 UV spectrophotometer로 정량하였다. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)은 RNA (2 µl)를 80°C에서 3분간 가열하여 denaturation시킨 후 바로 ice에 담가둔다. 5X 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 F-primer (5'-ATCAA CCGC CAGA TCAACCT-3')와 R-primer (5'-TCCTTCTGGGTAGACCTCTGGAG-3')를 94°C 30초, 57.5°C 30초, 72°C 40초로 29회 반복하여 전기영동으로 확인하였다.

대조군으로 아무것도 처리하지 않은 세포의 RT-PCR 산물과 각종 ER stress를 유도하는 약물을 처리하여 얻은 RT-PCR 산물을 2% agarose gel에 전기영동하였다. FTH1의 발현은 대조군의 발현보다 ER stress 유도 약물 처리한 RT-PCR 산물의 발현이 더 강하다 (Fig. 1A). 이는 대조군보다 ER stress 유도하는 약품을 처리했을 때 FTH1의 발현이 더 활발하다는 것을 보여준다. ER에서 막단백질인 IRE1, PERK, ATF6도 FTH1과 비슷한 발현양상을 보인다. Tunicamycin과 DTT의 dose에 따른 발현양상을 알기 위하여 각각 0, 0.1, 1, 5배 농

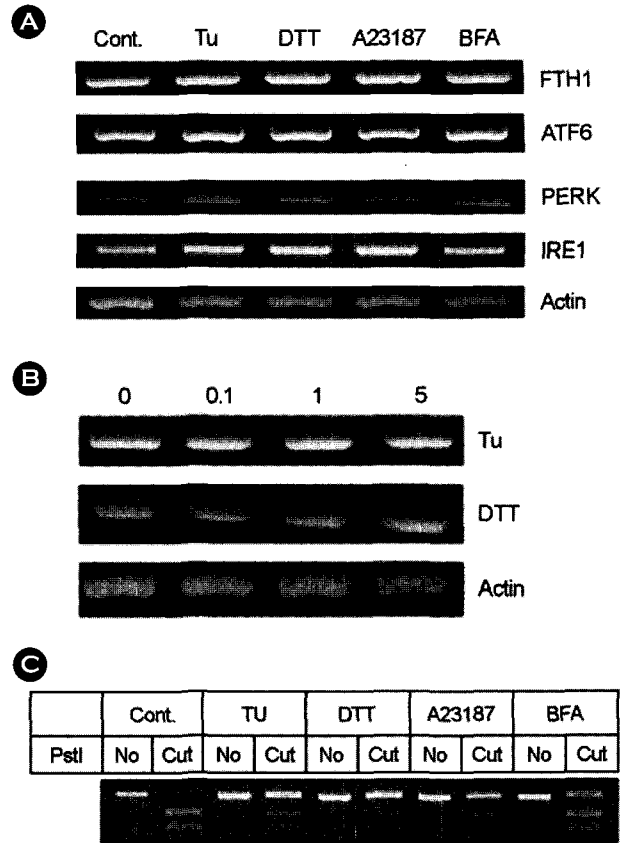


Fig. 1. ER-stress induces up-regulated expression of ferritin heavy chain 1 (FTH1). (A) Expression pattern of FTH1, ATF6, PERK, and IRE1 by ER-stress inducible drugs (tunicamycin, DTT, A23187 and BFA). Actin was used as a control. (B) Induction of FTH1 by different doses (0, 0.1, 1, 5 X) of tunicamycin and DTT for 16 h. (C) Activation of XBP-1 mRNA splicing by ER-stress inducible drugs. RT-PCR products of XBP-1 were digested with *PstI* restriction enzyme and shown on the gel.

도로 16시간 처리하였다. Tunicamycin과 DTT 모두 농도가 높을수록 FTH1의 발현이 증가하였다 (Fig. 1B). 특히 IRE1의 하류정보인자인 XBP-1의 발현양상을 확인하였다. Control의 RT-PCR 산물은 중간부위가 절단되어 2개의 밴드가 확인되었다 (Fig. 1C). 반면에 ER stress 유도 약물이 처리된 RT-PCR 산물은 XBP-1 mRNA의 중간부위 23 nt가 splicing되어 *PstI* 인식부위가 없어서 절단되지 않는 1개의 큰 밴드가 더 진하게 확인되었다.

FRTL-5에 ER stress inducible drugs를 처리하여 FTH1의 발현양상을 알아보았다. Cytosol에 존재하고 있는 FTH1은 ER stress inducible drugs에 영향을 받아 발현이 상승하였다. ER 막통과 단백질인 ATF6, IRE1 그리고 PERK도 FTH1의 발현양상과 유사함을 보여줌으로서 FTH1이 cytosol에 존재하지만 ER stress 의존적으로 발현이 조절되는 것을 알 수 있다. 정확한 메커니즘과 관련된 인자에 대한 연구는 부족하지만, FTH1의 발현이 tunicamycin과 DTT의 dose에 따라 발현의

정도가 다르다는 것은 더욱 ER stress 의존적으로 발현이 조절되는 것을 뒷받침하는 증거이다. ER stress에 의해서 XBP-1 mRNA splicing이 확인된 것은 ER stress signal이 IRE1→XBP-1로 전달된다는 것을 알 수 있다. 특히, ER과 Golgi complex에 영향을 주는 ER stress가 mitochondrial damage에 의해서 과발형되는 FTH1의 결과에 비추어 봤을 때 ER stress와 mitochondria간에 어떠한 긴밀한 관계가 존재하여 cytosol에서 활성이 있는 것으로 생각된다.

감사의 글

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

REFERENCES

- Aisen P, Llstowsky I. Iron transport and storage proteins. *Annu Rev Biol chem.* 1980. 49: 357-393.
- 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 Meta.* 2002. 22: 127-141.
- Gething MJ. Role and regulation of ER chaperon Bip. *Semin Cell Dev Biol.* 1999. 10: 465-472.
- Harding H, Calfon 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.
- 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.
- Kauffman RJ. Stress signaling from the luman of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational control. *Genes Dev.* 1999. 13: 1211-1233.
- Kwon K, Goo TW, 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.
- Lawson DM, Treffry A, Artymiuk PJ, Yewdall SJ, Luzzago A, Cesareni G, Levi S, Arosio P. Identification of the ferroxidase center in ferritin. *FEBS Lett.* 1989. 254: 207-210.
- Munro HN, Linder MC. Ferritin: structure, biosynthesis, and role in iron metabolism. *Physiol Rev.* 1978. 58: 317-396.
- 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.
- Orino K, Lehman L, Tsuji Y, Ayaki H, Torti SV, Torti FM. Ferritin and the response to oxidative stress. *Biochem J.* 2001. 375: 241-247.
- 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.