

Up-regulation of Early Growth Response-1 Expression by Endoplasmic Reticulum Stress

Song-Yi Han, 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

Endoplasmic reticulum (ER) plays formation of disulfide bonds and proper folding of secretory proteins. Cellular responses to ER stress enhances the stress-activated kinase pathway and the induces a lot of immediate-early genes. Among of them, the early growth response-1 (Egr-1), a transcription factor, which plays an important role in cell growth, development, differentiation, apoptosis and various types of injury. For that reason, we have tested the expression of Egr-1 against ER stress inducible drugs (tunicamycin, DTT, A23187 and BFA) to understand what kind of aspect occurred by ER stresses.

Key Words: TSH (thyroid-stimulating hormone), Egr-1 (early growth response-1 gene), ER (endoplasmic reticulum) stress, UPR (unfolded protein response)

Endoplasmic reticulum (ER)은 post-translational modification과 신생 분비 단백질의 접힘, 운반, 세포내 calcium 저장 등을 포함하는 여러 중요한 기능을 하고 있는 세포 소기관이다. 다양한 외부환경들은 ER의 기능을 방해하여 단백질 glycosylation 저해, disulfide bond 형성의 저하, ER에서 Golgi complex로의 중요 단백질 운반불량, 불완전하게 접힌 단백질의 발현 등의 현상을 나타내게 된다. 이런 변형된 ER의 기능으로 인하여 비정상적인 폴딩(folding)이 일어나 중요한 분비 단백질이 표적기관에 작용을 못하게 되면, 접히지 않은 단백질의 축적을 야기하여 unfolded protein response (UPR)라고 하는 일련의 신호전달과정이 일어나 샤페론(chaperone)의 발현이 증가한다 (Harding et al., 1999; Kaufman et al., 2002; Kopito et al., 2000; Mori, 2000; Ng et al., 2000; Oyadomari et al., 2002; Ma and Handershot, 2004). ER stress 상태에서 살아남기 위해, 세포는 ER stress response라는 소포체 스트레스(ER stress)로부터 자가 보호 메커니즘을 갖고 있다. 그 메커니즘의 첫 번째는 단백질 접힘 활성을 증가시키고 단백질 영감을 방지하기 위해서 Bip/GRP74와 GRP94를 포함하는 ER chaperone 단백질을 코딩하는 유전자를 up-regulation하는 것이다. 두 번째 반응은 새로운 단백질 생산의 감소와 접히지 않은 단백질의 축

적을 먼저 방지하기 위한 번역과정의 축소이다. 세 번째 반응은 ER-associated degradation (ERAD)로 ER에서 접히지 않은 단백질을 분해 하는 것으로, ER 품질관리 시스템에서 감지하여 ER로부터 세포질로 역수송되어 26S proteasome에 의해 분해되는 과정이다. 네 번째 반응은 극심하거나 계속 이어지는 소포체 스트레스가 일어날 때, 광범위하게 ER의 기능을 감소시키는 과정인 apoptosis이다. 이것은 생물체의 보전을 위협하는 상황에서 세포를 제거하는 것 뿐 만 아니라, 성장과 분화에 있어서도 필요하다 (Araki et al., 2003).

Egr-1은 immediate-early gene에 속하고 (Wung et al., 1999), 분비되는 발현, signaling 등을 조절하는 핵심 인자로 nerve growth factor induced-A (NGFI-A), Krox-24, ZIF268, ETR103, TIS8로 알려져 있다. 또한 이 유전자는 growth factor와 산화제를 포함하는 다양한 자극에 노출되었을 때 유전자 수준의 유도가 되기 위하여 부분인 serum 유도적인 zinc finger nuclear phosphoprotein을 암호화 하고 있어 (Watanabe et al., 2003), growth factor, cytokine와 같이 큰 수의 스트레스적인 자극에 빠르고 일시적으로 유도된다 (Baoan et al., 2003). Egr-1의 전사는 vascular injury에서 Ras-Raf-MEK-ERK1/2 pathway signaling에 의존적이고, Egr-1 mitogen-activated protein kinase와 SRE-dependent transcription을 포함하는 병리학적 자극에 의하여 또는 다양한 스트레스에 의해 유도되는 apoptosis의 과정 중, ERK의 활성을 통해 활성화 된다고 알려져 있지만 이 과정에 대한 상세한 기전은 아직 잘 알려져 있지 않다 (Khachigian, 2006; Zeng et al., 2005). 이런 결과들은

*논문 접수: 2007년 4월 27일

수정재접수: 2007년 5월 17일

[†]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

Egr-1이 소포체 스트레스로 인한 apoptosis 및 그 밖의 stress response 과정에 깊은 역할을 한다는 것을 뒷받침 해 준다.

실제로 소포체 스트레스에서, UPR의 major inducer (ATF4, ATF6, XBP-1)에 의해 chop이 발현할 때, Egr-1이 두드러지게 증대되는 반응을 보였다 (Reimertz et al., 2003). 또, Human melanoama cell에서 ER의 Ca²⁺ pump인 SERCAs의 활성을 억제하는 thapsigargin을 처리하여 소포체 스트레스를 유도한 결과 apoptosis의 과정에서 Egr-1이 growth factor인 p53의 억제제로 growth pathway를 차단하고 apoptosis로 가는 과정에 역할을 한다는 결과를 얻었다 (Nair et al., 1997). 이런 사실들에 주목하여, 본 연구에서는 Egr-1이 FRTL-5 cell에서 소포체 스트레스를 유도한 후, Egr-1을 발현의 TSH (thyroid stimulating hormone) 의존도, 소포체 스트레스 유도물질의 시간별 활성화도, 소포체 스트레스 유도물질 농도별 Egr-1 발현 정도를 실험하였다.

FRTL-5 cell를 5% calf serum을 포함한 coon's modified media로 6 well plate에서 배양하였고, 배양기는 37°C, CO₂ 5%, 충분히 습한 조건으로 하였다. TSH- media (TSH와 serum이 포함되지 않은 media), TSH+ media (모든 serum을 제외하고 TSH만 포함된 media), Normal media (coon's modified media)에서의 ER stress 유도 실험은 충분히 배양한 FRTL-5 세포를 각 well의 배지를 제거 후, 처음에 배양한 배지와 같은 5% calf serum을 포함한 coon's modified media (Normal media)와 normal media에서 calf serum을 제외시킨 TSH+ media, calf serum과 TSH 모두 제외한 TSH- media 2 ml 각각에 tunicamycin, DTT, BFA, A23187 등의 소포체 스트레스 유도 약물을 처리하여 37°C에 4시간 동안 배양하였다. Total RNA는

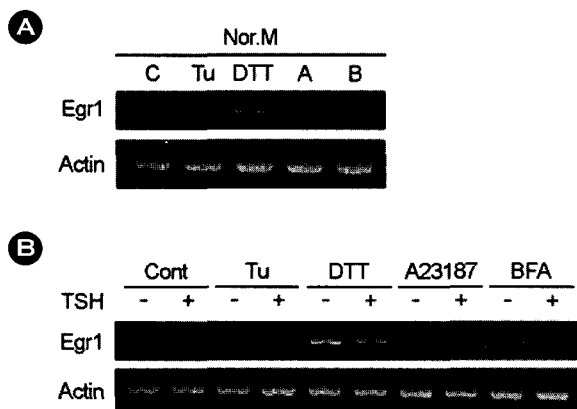


Fig. 1. Expressions of Egr-1 gene against to ER stress inducible drugs (Tunicamycin 2 g/ml, 3 mM DTT, 7 μM A23187 and BFA 10 g/ml) in FRTL-5. **(A)** In normal media, the expression of Egr-1 was induced by ER stress inducible drugs and the resulting RT-PCR products was shown on the 2% gel. **(B)** Both media of serum-free media (-) and TSH + serum-free media (+) was used for the expression of Egr-1 under ER stresses. C; control, Tu; tunicamycin, A; A23187, B; BFA, TSH; thyroid stimulating hormone.

easy-BLUE™ Total RNA kit (iNtRON Biotechnology, Inc.)를 사용하였다. Total RNA는 spectrophotometer로 정량하였다. 얻은 RNA는 DEPC (diethylpyrocarbonate)로 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 PCR에 2 μl씩 사용하였다. PCR primer는 Egr-1의 coding region 중 RCP product가 777 bp가 만들어 지도록 forward primer (24 mer); 5'-TTTCAGCCTAGTC-AGTGGCCTTGT-3', reverse primer (24 mer); 5'-TTGCGTTCATCACTCCTGGCAAAC-3'로 제작하였다. 이들 primer를 이용하여 94°C에서 5분, 94°C에서 30초, 58.5°C에서 30초, 72°C에서 1분, 72°C에서 5분으로 30회 반복하여 PCR을 수행하였다. 또, 어느 상황에서도 같은 정도의 발현을 하는 housekeeping 유전자인 β-actin (rat)을 대조군으로 하여 같은 조건으로 PCR을 수행하였다.

FRTL-5 세포에 아무런 처리도 하지 않은 대조군과 여러 종류의 소포체 스트레스를 유도하는 약물 [tunicamycin: N-당쇄형성 억제하여 단백질 접힘 방해, DTT: 강력한 환원제로 신생 단백질의 thiol기 (-SH)가 이황화결합 (-S-S-)으로의 형성을 방해, A23187: Ca²⁺이온운반체로서 소포체 내의 칼슘을 교란시켜 단백질의 정상적인 접힘을 방해, BFA: 소포체에서 Golgi complex로 신생 분비 단백질의 이동을 차단]을 처리하여 얻은 산물을 2% agarose gel에 전기영동하여 RT-PCR 산물을 확인해 보았다. 다른 ER 스트레스 요인 보다 강력한 환원제 (DTT)가 가장 강한 Egr-1의 발현을 유도하였

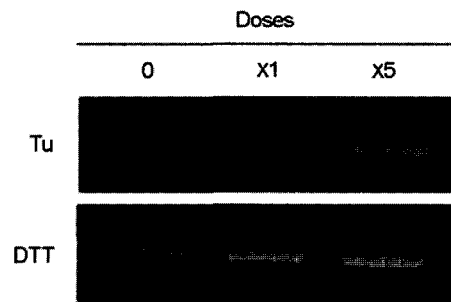


Fig. 2. Expression of Egr-1 gene against different doses of ER stress inducible drugs (tunicamycin and DTT). × 1 DTT (3 mM), × 1 Tunicamycin (2 g/ml).

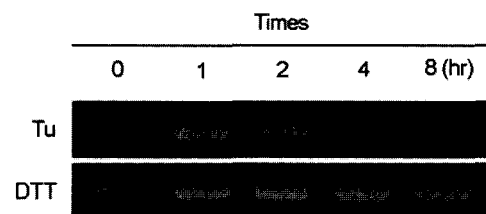


Fig. 3. Expression of Egr-1 gene against different times of ER stress inducible drugs (2 g/ml tunicamycin and 3 mM DTT).

다 (Fig. 1A). 소포체 스트레스에 대하여 TSH/+ 조건에서 실험을 해 본 결과, TSH와 그 밖의 호르몬들이 존재하는 배지에서 처리한 sample의 band를 보면, 대조군과 비교해 보아 더 많이 발현이 되었다. 그리고 소포체 스트레스 유도 약물 중에서 DTT를 처리하였을 때에 제일 큰 발현을 보였다. 또, serum과 TSH가 모두 없는 배지 (TSH-)와 serum이 없고 TSH만 있는 배지 (TSH+)에서 처리한 band를 보면, TSH가 없는 상태에서 Egr-1이 더 큰 발현을 나타낸 것을 볼 수 있다 (Fig. 1B).

소포체 스트레스 유도 약물 농도와 시간에 따라서 Egr-1의 발현에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해, 소포체 스트레스 유도 약물 중에서 Egr-1의 스트레스에 대한 발현이 뚜렷이 나타는 tunicamycin과 DTT에 의한 1배 (3 mM), 5배의 농도를 처리하였다. DTT 농도에 따른 tunicamycin의 처리에서 농도가 control일 때 1배일 때와 비슷한 발현을 보였지만, 5배 농도에서는 훨씬 많은 발현을 보였다. DTT의 처리에서는 1배의 농도에서부터 발현이 증가되기 시작하여 5배 농도에서는 아주 큰 발현량을 보였다 (Fig. 2).

DTT 처리 시간별 Egr-1의 발현을 살펴보면, tunicamycin을 처리하고 1시간이 경과 했을 때에 강한 발현을 하고, 2, 4시간 경과 했을 때에는 점점 발현이 줄어들고 8시간 경과 했을 때 4시간제와 비슷한 발현을 하는 것을 볼 수 있다. 또 이와 반면 DTT를 처리 했을 때는 1시간이 지났을 때부터 8시간 후 까지 강한 발현을 나타내지만 특히 4시간이 지났을 때 가장 많은 발현을 나타낸다 (Fig. 3).

FRTL-5 cell에서 소포체 스트레스 유도 약물 중에서 DTT에서 큰 발현이 나타난 것은 Egr-1이 신생 단백질의 thiol기에서 이황화결합으로의 형성을 방해함으로써 유도되는 소포체 스트레스를 더욱 강하게 받는다는 것으로 볼 수 있다. 또한, 호르몬과 TSH가 모두 없는 배지 (TSH-)와 호르몬이 없고 TSH만 있는 배지 (TSH+)에서 처리한 band를 보면, TSH가 없는 상태에서 더 많은 스트레스를 받는 것을 볼 수 있다 (Fig. 1B). 이들 결과는 FRTL-5 cell에서 Egr-1은 소포체 스트레스 유도 약물 중 DTT에 가장 많은 소포체 스트레스를 받고, Egr-1의 발현이 TSH에 의존적으로 negative하게 나타난다는 것을 시사한다.

본 실험을 통하여 내분비세포인 FRTL-5 cell에서 ER stress에 중요한 역할을 하는 Egr-1의 발현이 TSH에 의존적이라는 것을 알았다. prostate cancer cell의 transcriptional regulation 실험에서 serum에 의한 Egr-1 DNA의 binding activity가 증가하는 결과를 얻은 사실이 있다 (Renate and Darren, 2003). 이 사실로 보아 FRTL-5 cell도 Egr-1의 구조적인 특징인 zinc finger 부분에 있는 EBS에 apoptosis signal element binding activity가 커져 TSH에 의존적인 Egr-1의 발현이 나타나는 것으로 생각한다. 또 DTT가 Egr-1의 발현에 큰 영향을 끼친

다는 사실과 tunicamycin과 DTT가 유도한 소포체 스트레스에 Egr-1의 발현이 매우 다른 양상으로 나타남을 이용해 앞으로 밝혀지지 않은 내분비계에서 소포체 스트레스에 따른 apoptosis pathway의 Egr-1에 관련된 signaling 메커니즘을 자세히 규명해 내는 데에 도움이 될 것이라고 사료되며, 이와 더불어 Egr-1이 관련되어 있는 저산소증, 전립선 암, 심장 혈관 질병의 치료에 관련한 연구의 중요한 정보로 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

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

REFERENCES

- Araki E, Oyadomari S, Mori M. Impact of endoplasmic reticulum stress pathway on pancreatic beta-cells and diabetes mellitus. *Exp Biol Med*. 2003. 10: 1213-1217.
- Baek SJ, Wilson LC, Hsi LC, Eling TE. Troglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) ligand, selectively induces the early growth response-1 gene independently of ppar γ : A novel mechanism for its anti-tumorigenic activity. *Mol Biol*. 2003. 278: 5845-5853.
- Baoan J, Xue-qing C, David EM, Rork K, Samir H, Steve E, Rebecca N, Craig DL. Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. *Physiol Genomics* 2003. 14: 59-72.
- Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* 1999. 397: 271-274.
- Kaufman RJ, Scheuner D, Schroder M, Shen X, Lee K, Liu CY, Arnold SM. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002. 6: 411-421.
- Khachigian LM. Early growth response-1 in Cardiovascular pathology. *Circ Res*. 2006. 2: 186-191.
- Kopito RR. Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol*. 2000. 12: 524-530.
- Ma Y, Handershot LM. ER chaperone functions during normal and stress conditions. *J chem Neuronat*. 2004. 28: 51-65.
- Mori K. Tripartite management of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Cell* 2000. 5: 451-454.
- Nair P, Muthukkumar S, Sells SF, Han SS, Sukhatme VP, Rangnekar VM. Early growth response-1-dependent apoptosis is mediated by p53. *J Biol Chem*. 1997. 32: 20131-20138.
- 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.
- Oyadomari S, Araki E, Mori M. Endoplasmic reticulum stress mediated apoptosis in pancreatic beta-cells. *Apoptosis* 2002. 4: 335-345.
- Reimertz C, Kogel D, Rami A, Chittenden T, Prehn JH. Gene expression during ER stress-induced apoptosis in neurons: induction of the BH3-only protein. *J Cell Biol.* 2003. 4: 587-597.
- Renate BP, Darren EC. Regulation of gene expression by Cyclic GMP. *Circ Res.* 2003. 93: 1034-1046.
- Watanabe H, Suzuki A, Kobayashi M, Takahashi E, Itamoto M, Lubahn DB, Handa H, Iguchi T. Analysis of temporal changes in the expression of estrogen-regulated genes in the uterus. *Mol Endocrinol.* 2003. 30: 347-358.
- Wung BS, Cheng JJ, Chao YJ, Hsieh HJ, Wang DL. Modulation of Ras/Raf/extracellular signal-regulated kinase pathway by reactive oxygen species is involved in cyclic strain-induced early growth response-1 gene expression in endothelial cells. *Circ Res.* 1999. 7: 804-812.
- Zeng Q, Chu L, Wang T, Jiang H, Hu Y. In vivo and in vitro silica induces nuclear factor Egr-1 activation mediated by ERK 1/2 in RAW264.7 cell line. *Toxicol Mech Meth.* 2005. 15: 93-99.
-