

UCH-FC
MAG-B
L669
C.1



"BAX INHIBITOR-1" REGULA NEGATIVAMENTE AL SENSOR DE ESTRES IRE1 α .

Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de

Magister en Ciencias Biológicas



Facultad de Ciencias

Por

María Fernanda Lisbona Pizarro

Diciembre, 2009

Director de tesis: Dr. Claudio Hetz Flores

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

MARÍA FERNANDA LISBONA PIZARRO

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa de Privada de Tesis rendido el día 15 de Octubre 2009.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Hetz

Profesor patrocinante:

Dra. María Rosa Bono

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Octavio Monasterio

Dr. Marco Tulio Nuñez



The right side of the page contains three handwritten signatures in blue ink, each followed by a dotted line. The signatures are for Claudio Hetz, María Rosa Bono, and Octavio Monasterio. To the right of the signatures is a circular stamp from the 'BIBLIOTECA CENTRAL' of the 'UNIVERSIDAD DE CHILE'.



[Faint, illegible text covering the majority of the page, likely bleed-through from the reverse side.]



A mi mamá con cariño

[Faint, illegible text at the bottom of the page, possibly bleed-through.]

AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer al Laboratorio de Estrés Celular y Biomedicina por hacer de mis días de tesis, momentos lindos los cuales no olvidare.

A Claudio Hetz por darme la oportunidad de trabajar en este lugar tan agradable. Por invertir su tiempo en las revisiones de esta memoria, discusión de resultados y simplemente por el agrado de hacer ciencia con una persona que vibra con la investigación y que es capaz de reencantar a la gente con sus propios experimentos, mostrándole que un resultado fallido o no esperado más que un error es un desafío.

A Sebastián Zamorano, Gabriela Martínez, Diego Rojas, Danny Galleguillos, Peter Thielen y Alejandra Valdivia ya que sin su ayuda y amistad esta tesis no habría sido posible.

A la comisión revisora de esta tesis primero por ser excelentes profesores en la época de pregrado y segundo por su aguda revisión y buena disposición.

A las secretarias de Postgrado por su amabilidad y por preocuparse de todos los detalles.

A mi pololo Alfonso Artigas por su amistad, consejos y simplemente por hacer mas feliz mi vida.

Y por ultimo, a mi familia por su apoyo, cariño incondicional no solo en esta tesis sino en todos los aspectos de mi vida.

Índice



RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
ABREVIATURAS	VIII
INTRODUCCIÓN	1
Retículo endoplásmico y homeostasis celular	1
Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y sensores de estrés de plegamiento.	2
La compleja señalización de IRE1 α : el UPRosoma	7
Rol de las proteínas de la familia BCL-2 en la apoptosis y el estrés de RE	9
BAX y BAK como mediadores críticos en la UPR y la regulación de IRE1 α	10
“BAX inhibitor-1”	11
“BAX inhibitor-1” y la UPR.	14
HIPOTESIS:	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECIFICOS	15
MATERIALES Y MÉTODOS	16
Animales	16
Cultivo celular	16
Reactivos	16
Construcciones	17
Cultivo celular	18
Transfecciones	19
Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real	19
Ensayo de procesamiento del ARNm de XBP-1.	20
Co-Inmunoprecitaciones.	21
Análisis de Western Blot.	22

Inmunofluorescencia.	23
Modelo experimental	23
Inducción de estrés de RE en líneas celulares	23
Tratamientos con el péptido BI-1 ^{C-ter}	24
Generación de líneas estables de BI-1	24
Modelo de estrés de RE en ratones	25
Generación de moscas transgénicas para BI-1 y modelo de estrés de RE en larvas	25
RESULTADOS	26
Aumento del procesamiento del ARNm de XBP-1 en células deficientes para BI-1.	26
La deficiencia de BI-1 induce un aumento de XBP-1s bajo condiciones de estrés de RE.	29
BI-1 inhibe la señalización río abajo de IRE1α, sin afectar la vía dependiente de PERK.	31
Aumento en la expresión de los genes blanco de XBP-1s en células deficientes para BI-1.	31
La expresión de BI-1 es necesaria para la inactivación de la vía de IRE1α/XBP-1.	32
BAK y BI-1 interactúan con IRE a través de mecanismos relacionados.	38
BI-1 regula IRE1α a través de su región C-terminal	39
BI-1 regula negativamente a IRE1α en organismos multicelulares	44
DISCUSIÓN	48



Índice de figuras y tablas

Figura 1	Respuesta a proteínas mal plegadas en respuesta al estrés de RE y sensores de estrés implicados en esta respuesta.	4
Figura 2	Señalización de IRE1 α y ensayo de procesamiento.	6
Figura 3	BI-1 y sus funciones.	13
Figura 4	Aumento del procesamiento de XBP-1 en células deficientes para BI-1.	27
Figura 5	Los efectos inhibitorios de BI-1 dependen de las concentraciones de Tm.	28
Figura 6	BI-1 inhibe la señalización río abajo de IRE1 α , sin afectar la vía de PERK.	30
Figura 7	BI-1 controla la amplitud de la vía IRE1 α /XBP-1 y la producción de los genes blanco de XBP-1.	33
Figura 8	Inactivación retardada de la señalización IRE1 α /XBP-1 en células deficientes en BI-1.	35
Figura 9	BI-1 forma un complejo proteico con IRE1 α que no es afectado por el estrés de RE.	37
Figura 10	BAK y BI-1 interaccionan con IRE α a través de mecanismos relacionados	40
Figura 11	El dominio C-terminal de BI-1 es necesario para su interacción con IRE1 α .	41
Figura 12	BI-1 regula a IRE1 α mediante su región citosólica C-terminal.	43
Figura 13	BI-1 regula el procesamiento del ARNm de XBP-1 en ratón <i>in vivo</i> .	46
Figura 14	BI-1 regula el procesamiento del ARNm de XBP-1 en <i>Drosophila in vivo</i> .	47
Figura 15	El papel dual de BI-1 en la regulación de la UPR y la apoptosis.	53
Tabla 1	Partidores usados para PCR en tiempo real.	20



Resumen

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo esencial para el plegamiento y secreción de proteínas. Diferentes condiciones alteran el funcionamiento del RE, promoviendo la acumulación de proteínas mal plegadas en su lumen, un estado llamado "estrés de RE". La adaptación celular frente al estrés del RE esta mediada por la activación de una compleja vía de transducción de señales conocida como respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Uno de los sensores de estrés de RE mas conservado es IRE1 α , el cual controla la expresión del factor de transcripción "X-Box binding protein-1" (XBP-1), componente esencial para gatillar procesos adaptativos. Cuando el estrés de RE daña irreversiblemente a la célula y la UPR no es suficiente para reestablecer la homeostasis, esta vía desencadena apoptosis por mecanismos aun no bien conocidos.

"Bax inhibitor-1" (BI-1) es una proteína residente del RE, conservada en la evolución, capaz de suprimir la muerte celular en diferentes especies. En mamíferos BI-1 regula la apoptosis mediada por diferentes estímulos intrínsecos. Estudios recientes sugieren una sobre-activación de la UPR en ratones deficientes para BI-1 bajo condiciones de isquemia y reperfusión. Sin embargo, el mecanismo que explica estas observaciones aun se desconoce. En esta tesis investigamos el posible rol de BI-1 en la UPR. Células deficientes en BI-1 muestran hiperactivación de IRE1 α , asociado a un aumento en los niveles de sus blancos río abajo, como es la expresión de XBP-1 y una sobre-expresión de los genes blanco dependientes de XBP-1. Este fenotipo puede ser explicado por un marcado retraso en la desactivación de la señalización de IRE1 α observada en la ausencia de BI-1. Los efectos inhibitorios de BI-1 en la UPR están asociados con la formación de un complejo proteico estable con el dominio citosólico de IRE1 α , el cual es dependiente de la región C-terminal de BI-1, un dominio previamente asociado a su actividad anti-apoptótica. Análisis filogenéticos revelaron que este dominio se encuentra conservado en *Drosophila melanogaster* y *Mus musculus*, entre otras especies. Con el objeto de validar nuestros resultados *in vivo*, analizamos los niveles de activación de IRE1 α en ratones deficientes para BI-1 o en una cepa de *D. melanogaster* que sobreexpresa BI-1. En ambos modelos se observó que BI-1 suprime la actividad de IRE1 α al ser sometidos estos animales a estrés de RE experimental. Nuestros resultados sugieren un nuevo papel para BI-1 en procesos adaptativos contra el estrés de RE, función que contrasta con su conocido efecto inhibidor de la apoptosis gatillada por diversos estímulos de muerte celular intrínsecos.

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is an essential organelle for protein folding and secretion. Different conditions alter its functioning promoting the accumulation of misfolded proteins at its lumen, a condition referred as "ER stress". Adaptation to ER stress is mediated by the activation of a complex signal transduction pathway known as the unfolded protein response (UPR). One of the most conserved ER stress sensors is IRE1 α , which controls the expression of the transcription factor X-Box binding protein-1 (XBP-1), an essential component for adaptive processes. When ER stress becomes irreversible and UPR is not enough to re-establish homeostasis, prolonged ER stress leads to apoptosis by mechanisms not well understood.

Bax inhibitor -1 (BI-1) is an evolutionary conserved ER-resident protein, capable of suppress cell death. In mammals BI-1 regulates apoptosis initiated by a variety of intrinsic death stimuli. Recent studies suggest a hyperactivation of the UPR, under ischemic and reperfusion conditions in BI-1 deficient mice. Nonetheless the mechanism which explains these observations is unknown. In this thesis we investigated the role of BI-1 in UPR. BI-1 deficient cells show hyperactivation of IRE1 α , producing an increase of the downstream targets, such as the expression of XBP-1 and over-expression of XBP-1-dependent target genes. This phenotype can be explained by a marked delay of IRE1 signalling deactivation observed in absence of BI-1. The inhibitory effects of BI-1 in UPR are associated with the formation of a stable protein complex with IRE-1 cytosolic domain, which is dependent of C-terminal region of BI-1 a domain previously linked to its anti-apoptotic activity. Phylogenetic analysis of BI-1 sequence revealed that this domain is conserved in *Drosophila Melanogaster* and *Mus musculus* among other species. With the aim of validating our results *in vivo*, we analyzed the levels of activation of IRE1 α in BI-1 deficient mice or in a *D. Melanogaster* strain that over-express BI-1. In both models, it was possible to observe that BI-1 suppresses IRE1 α activity, when these animals where under ER stress conditions. These results suggest a new role for BI-1 in adaptive processes against ER stress, a function that contrasts with its inhibitory effect of apoptosis.

Abreviaturas

ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF6	<i>“Activating transcription factor 6”</i>
BI-1	<i>“Bax inhibitor-1”</i>
BI-1^{C9A}	Mutante de BI-1 que tiene los últimos 9 aminoácidos del carboxilo terminal sustituidos por alaninas
BI-1^{Cter}	Péptido de 21 aminoácidos que representa el carboxilo terminal de BI-1
Bref A	Brefeldina A
Co-IP	Co-inmunoprecipitación
cLD	Dominio luminal de IRE1 α
dBI-1	BI-1 de <i>Drosophila Melanogaster</i>
DKO	Tejidos o células doble deficientes
eIF2α	Factor de inicio de la traducción eucarionte 2 alfa
ERAD	Degradación Asociada al RE
ERSE	Elementos de Respuesta a Stress de RE
GFP	Proteína fluorescente verde
hBI-1	BI-1 humano
IRE1α	<i>“Inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease”</i>
IP	Inmunoprecipitación
kDa	Kilo Dalton

MEFs	Fibroblastos embrionarios de ratón
ORF	Marco de lectura abierto
pb	Pares de bases
PCR	Reacción de la polimerasa en cadena
PERK	" <i>PKR-like ER kinase</i> "
RE	Retículo endoplásmico
RT-PCR	Reacción de la polimerasa en cadena en Transcripción Reversa
Tm	Tunicamicina
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas
WB	" <i>Western Blot</i> "
WT	"Wild type" o silvestre
XBP-1	" <i>X-Box binding protein-1</i> "
XBP-1s	" <i>X-Box binding protein-1</i> " procesada
XBP-1u	" <i>X-Box binding protein-1</i> " no procesada
YNL305	Proteína putativa para Bi-1 de levaduras

Introducción

Retículo endoplásmico y homeostasis celular

La viabilidad de una célula depende estrictamente de una integración funcional y estructural entre sus compartimientos subcelulares. El Retículo Endoplásmico (RE) es un compartimiento subcelular con múltiples funciones que controla procesos esenciales para el funcionamiento de la célula. Este organelo posee una regulada maquinaria que participa en la maduración de proteínas sintetizadas a través de la vía secretora, empleando un eficiente sistema de proteínas chaperonas que promueven el correcto plegamiento y previenen la agregación de las proteínas sintetizadas (Schroder and Kaufman, 2005).

Las proteínas sintetizadas en el RE son primero translocadas co-traduccionalmente hacia el lumen del RE adquiriendo luego diversas modificaciones post-traduccionales que son críticas para asegurar la función correcta de las proteínas y facilitar la formación de complejos proteicos. Algunas modificaciones, como las glicosilaciones, continúan en el Aparato de Golgi, organelo por el que trafican las proteínas para su destinación final cuando estas han sido plegadas correctamente. Cuando una proteína es plegada incorrectamente, es reconocida por los mecanismos de control de calidad del RE y luego retrotranslocada al citoplasma para finalmente ser degradada por el sistema ubiquitina-proteosoma. Este proceso es conocido como Degradación Asociada al RE (ERAD) (Travers et al., 2000).

Otras funciones del RE incluyen la biosíntesis de esteroides, colesterol y lípidos, cumpliendo por esto el RE un rol crucial en la biosíntesis de organelos y en la señalización intracelular mediada por la generación de segundos mensajeros

lipídicos (Schroder and Kaufman, 2005). Finalmente, este compartimiento es bien conocido por su función como uno de los reservorios de calcio más importantes para la célula, afectando por esta razón muchos procesos celulares dependientes de la liberación regulada de calcio, que incluyen proliferación, muerte celular y diferenciación (Brostrom and Brostrom, 2003).

Ciertas condiciones patológicas y fisiológicas pueden interferir con la función de este organelo, llevando a la alteración en su capacidad de plegamiento. Estas perturbaciones fomentan la acumulación de proteínas mal plegadas, condición celular conocida como "estrés de RE". Dentro de las condiciones fisiológicas que generan estrés de RE, esta por ejemplo, la alta demanda de producción y secreción de proteínas en los linfocitos B y en las células beta del páncreas (Hetz and Glimcher, 2008). Experimentalmente, el estrés de RE puede ser generado a través del uso de compuestos que alteran su homeostasis, como Brefeldina A (inhibe el tráfico de RE a Golgi), Tapsigargina (inhibe la bomba calcio ATPasa del RE) o Tunicamicina (inhibe la N-glicosilación de proteínas), entre otros.

Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) y sensores de estrés de plegamiento.

Bajo condiciones de estrés de RE, una compleja vía de transducción de señales es activada la cual es conocida como "Respuesta a proteínas mal plegadas" (UPR del inglés "*Unfolding Protein Response*"). La UPR transmite la información sobre el estado de plegamiento de proteínas desde el lumen del RE hacia el núcleo y citosol, promoviendo así un aumento en la capacidad de plegamiento, recuperando la homeostasis celular (Schroder and Kaufman, 2005).

En primera instancia, la UPR consiste en una respuesta adaptativa y pro-sobrevivida frente a condiciones de estrés de RE. Sin embargo, si la acumulación de proteínas mal plegadas es persistente y el estrés celular no puede ser disminuido, la UPR comienza procesos pro-apoptóticos (Szegezdi et al., 2006). Muchos mecanismos han sido propuestos como vínculo entre el estrés de RE y la muerte celular, incluyendo la activación de proteasas de la familia de las caspasas, quinasas, factores de transcripción y proteínas de la familia Bcl-2 (revisión en Hetz 2007).

La UPR es mediada por lo menos por tres proteínas que detectan el estrés en el RE: “*PKR-like ER kinase*” (PERK), “*Activating transcription factor 6*” (ATF6) e “*Inositol-requiring transmembrane kinase/endonuclease*” (IRE1) (Ron and Walter, 2007). Cada una de estas proteínas posee un dominio de transmembrana, una región luminal y una citosólica. Bajo condiciones de estrés de RE estas proteínas sensoras se activan producto de una homo-dimerización, desencadenándose luego el proceso de transducción de señales de la UPR (Fig. 1).

PERK, es una quinasa que bajo condiciones de estrés de RE dimeriza, promoviendo su autofosforilación y activación. Una vez activado, PERK fosforila a eIF2 α (Factor de inicio de la traducción eucarionte 2 alfa), lo cual lleva a la inhibición de la traducción general de proteínas, fomentando la sobrevivencia de la célula por una disminución de la sobrecarga de proteínas nacientes que arriban al RE. Sin embargo, esta atenuación de la traducción es selectiva dado que la fosforilación de eIF2 α activa la traducción específica de ATF4. ATF4 un factor de transcripción que induce la expresión de genes envueltos en el metabolismo de aminoácidos, plegamiento, respuesta antioxidante y apoptosis. Por otra parte, bajo condiciones de

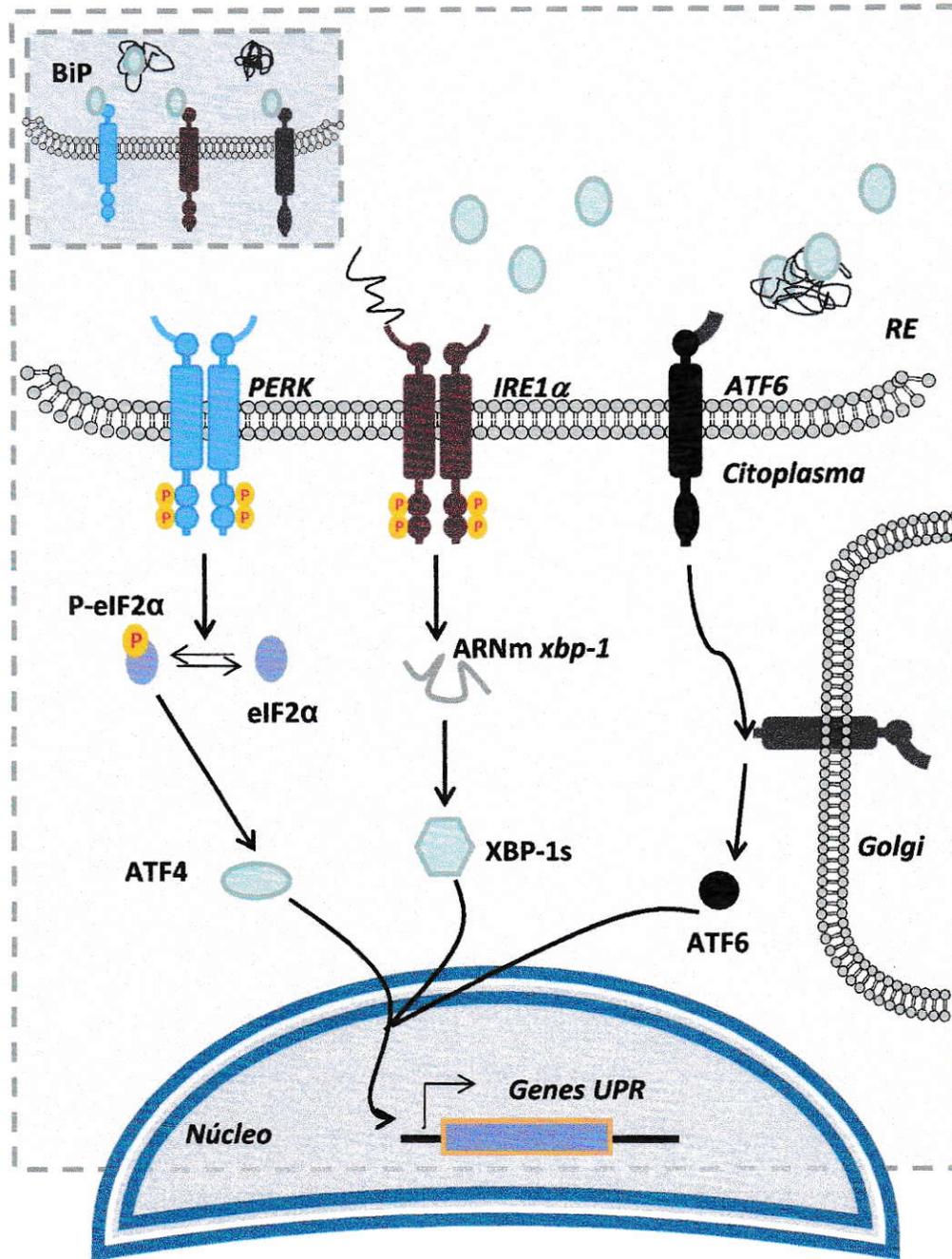


Figura 1: Respuesta a proteínas mal plegadas en respuesta al estrés de RE y sensores de estrés implicados en esta respuesta.

La chaperona BIP/Grp78 se disocia de los sensores de estrés cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el RE (estrés de RE) y se activan secuencialmente las proteínas sensoras: PERK, ATF6 e IRE1 α . PERK inhibe la síntesis de proteínas por fosforilación de eIF2 α e induce la traducción del factor de transcripción ATF4. ATF6 es activado por proteólisis, previa traslocación al aparato de Golgi. IRE1 α procesa el ARNm de XBP-1, la proteína resultante XBP-1s al igual que ATF6 y ATF4 translocan al núcleo y actúan como factores de transcripción induciendo la expresión de genes UPR.

estrés del RE, ATF6 al dimerizar es transportado al aparato de Golgi donde es procesado por las proteasas S1 y S2, liberándose al citoplasma el fragmento que funciona como un factor de transcripción activo, el cual posteriormente se transloca al núcleo induciendo la expresión de genes que poseen secuencias ERSE (Elementos de Respuesta a Stress del RE) en sus promotores, tales como algunas chaperonas del RE y el factor de transcripción XBP-1 (*"X-Box binding protein-1"*).

IRE1 es el sensor de estrés de RE más conservado en la evolución y posee un dominio serina-treonina quinasa seguido por un dominio con actividad endorribonucleasa en su región citosólica (Cox and Walter, 1996; Gonzalez and Walter, 2001; Shamu and Walter, 1996; Shamu and Walter, 1996; Sidrauski and Walter, 1997). Se han descrito dos isoformas de IRE, denominadas IRE1 alfa (IRE1 α) expresada en forma ubicua e IRE1 beta (IRE1 β) expresada en el epitelio intestinal, siendo IRE1 α la más estudiada. La activación de IRE1 α también depende de su dimerización y fosforilación. Este evento de fosforilación gatilla su actividad endorribonucleasa, iniciando el procesamiento no convencional del ARNm que codifica para el factor de transcripción XBP-1 (Calfon et al., 2002). En células de mamífero, la remoción de 26 nucleótidos de un intrón del ARNm de XBP-1 cambia el marco de lectura que convierte la proteína traducida inicialmente de 267 aminoácidos (XBP-1u) en la forma procesada de XBP-1 (XBP-1s), de 371 aminoácidos y que posee el dominio original de unión a ADN, mas un potente dominio de transactivación en extremo C-terminal del ARNm de XBP-1. XBP-1s es un factor de transcripción bZIP que regula múltiples genes de la UPR (Fig. 2) (Lee et al., 2003). Algunos blancos transcripcionales de XBP-1s incluyen chaperonas del RE (Erdj4), genes de la degradación de proteínas en el RE (EDE1) y genes envueltos

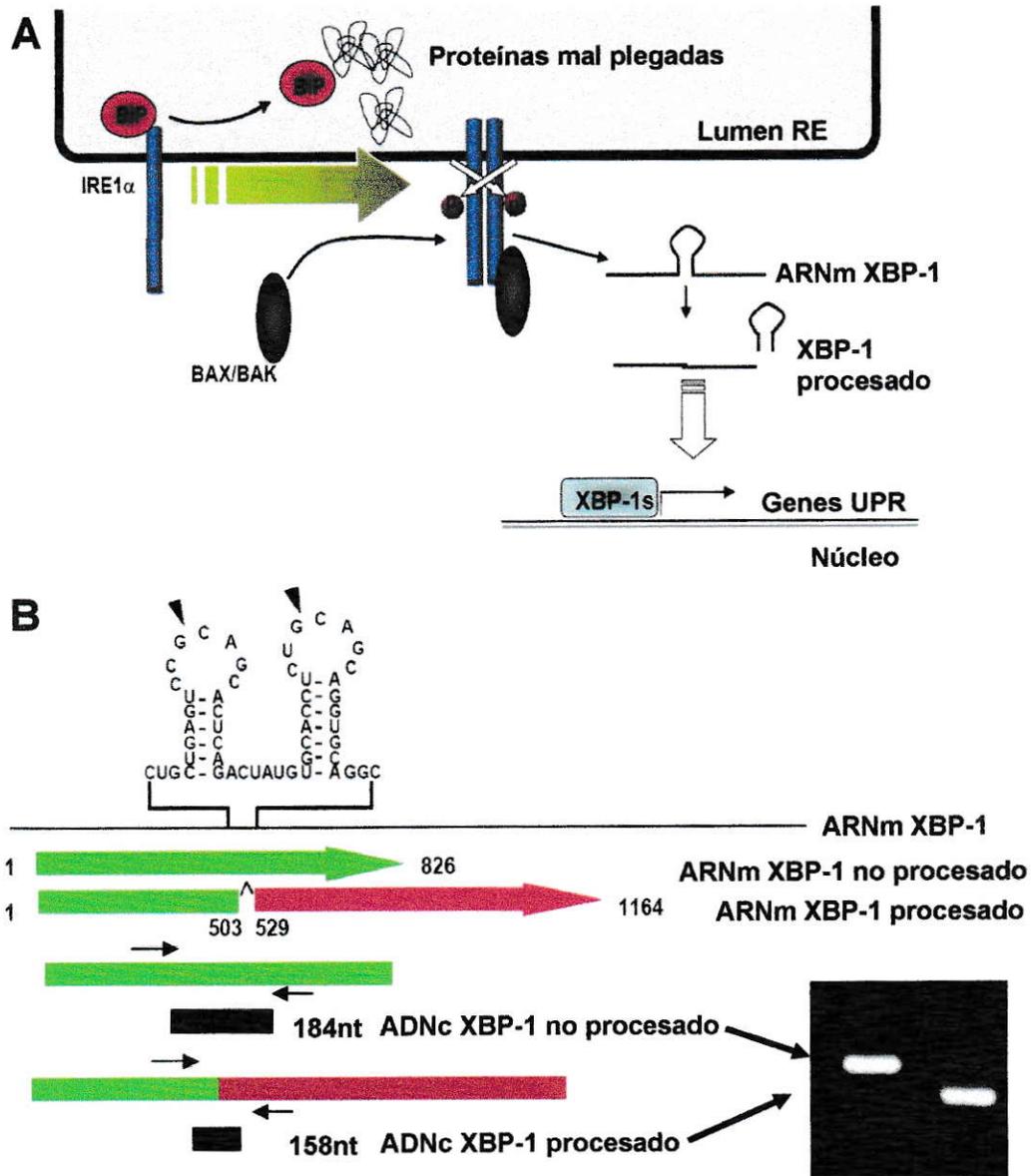


Figura 2: Señalización de IRE1 α y ensayo de procesamiento.

A) Durante la respuesta al estrés de RE, BIP une preferentemente las proteínas mal plegadas liberando el efecto inhibitorio sobre IRE1 α . IRE1 α se dimeriza y autofosforila. La fosforilación de IRE1 α gatilla la actividad endorribonucleasa la cual media el procesamiento del ARNm que codifica para XBP-1. La activación de IRE1 α requiere la unión de las proteínas accesorias BAX y BAK, las cuales pueden estabilizar la forma activa de IRE1 α fomentando las señales de supervivencia. B) Ensayo de procesamiento, para el ARNm de XBP-1 consiste en utilizar partidores que flanquean la zona del procesamiento no convencional de 26 nt de un intrón del ARNm de XBP-1. En la figura se muestra las diferencias de tamaños en nucleótidos de la forma no procesada 184 nt y procesada 158 nt para el ADNc de *Mus musculus*.

en la translocación proteica hacia el RE (sec61) (Fig. 2). Estudios recientes han propuesto que la activación prolongada de las vías de PERK promoverían la apoptosis, mientras que la activación de ATF6 e IRE1 α conducirían más que nada a adaptación celular y supervivencia (Wu et al., 2007; Lin et al., 2007).

La compleja señalización de IRE1 α : el UPRosoma

La regulación de la activación de IRE1 α depende de la carga de proteínas mal plegadas en el RE. En condiciones normales la chaperona BiP se une a IRE1 α en su dominio luminal manteniendo a este sensor en una forma monomérica inactiva (Bertolotti et al., 2000; Kimata et al., 2003). Cuando se produce estrés de RE esta chaperona se une preferentemente a las proteínas mal plegadas, liberando la inhibición de IRE1 α , lo que fomenta su dimerización y autofosforilación. Recientemente, se ha propuesto otro mecanismo de detección y activación de UPR basado en la resolución de la estructura tridimensional de IRE1 α . Mediante una región conservada en el dominio luminal de IRE1 α (cLD), la cual posee similitud estructural con el dominio de unión a péptidos de MHC-I, IRE1 α posiblemente interactúa directamente con las proteínas mal plegadas, promoviendo luego su dimerización y activación (Credle et al., 2005; Zhou et al., 2006). Estudios *in vitro* recientemente validaron ambos modelos para explicar el mecanismo de la activación de IRE1 α donde la disociación del complejo BiP- IRE1 α permite la formación de homodímeros de IRE1 α como primer paso y como segundo paso la unión directa de las proteínas mal plegadas al dominio luminal del sensor (Kimata et al., 2007).

Por otra parte, IRE1 α está regulado por múltiples factores, entre ellos la fosfatasa PTB-1B (Gu et al., 2004), donde la ausencia de PTB-1B afecta negativamente el procesamiento de XBP-1 y la expresión de los genes blancos de este sensor. Otro factor que regula a IRE1 α es “ASK-1 interacting protein 1” (AIP1). La asociación de AIP1 con IRE1 α facilita la dimerización de este sensor, paso clave en su activación. Estudios *in vivo* en ratones deficientes en AIP1, expuestos a estrés de RE, demostraron que la ausencia de AIP1 afecta específicamente la señalización de IRE1 α y no de PERK (Luo et al., 2008). Finalmente, nuestro laboratorio describió recientemente que algunos miembros de la familia BCL-2, como BAX y BAK, regulan específicamente la vía de IRE1 α mediante la formación de un complejo proteico entre ambas proteínas (Hetz et al., 2006).

Los niveles de XBP-1u también regulan negativamente la vía de IRE1 α . Como mencionamos anteriormente, bajo condiciones normales XBP-1u es rápidamente degradada por el proteosoma (Calfon et al., 2002). Sin embargo, bajo condiciones de estrés prolongado o crónico, la forma no procesada de XBP-1 es acumulada en el citosol heterodimerizando con XBP-1s. Este complejo proteico inhibe la translocación de XBP-1s hacia el núcleo, promoviendo además su ubiquitinación y degradación mediada por el proteosoma (Yoshida et al., 2006).

Adicionalmente, IRE1 α puede activar otras vías de señalización dependientes de su actividad quinasa, a través de la unión de varias proteínas adaptadoras y moduladoras. Por ejemplo, IRE1 α activa recluta a la proteína adaptadora TRAF2 (proteína que se une al receptor TNF), activando a la quinasa ASK1 (serina/treonina quinasa de la familia de las MAPKKK). Eso gatilla la activación de la MAP-quinasa río abajo “cJun-N terminal kinase” (JNK) (Urano et al., 2000; Nishitoh et al., 2002).

Por otro lado, el complejo IRE1 α -TRAF2 secuestra IKK el inhibidor de NF- κ B induciendo su señalización y la producción de TNF- α (Hu et al., 2006).

Basado en las evidencias descritas anteriormente, es posible observar que la regulación y señalización de IRE1 α es muy compleja y depende de su interacción con proteínas adaptadoras y moduladoras. Nuestro laboratorio recientemente postuló el concepto del “UPRosoma” para referirse a este complejo transduccional regulador de la UPR (Hetz and Glimcher, 2008).

Rol de las proteínas de la familia BCL-2 en la apoptosis y el estrés de RE

La familia BCL-2 es un grupo conservado de reguladores de la muerte celular, compuesto de miembros pro- y anti-apoptóticos. Estas proteínas operan principalmente en la membrana mitocondrial controlando la activación de las caspasas, cisteína-proteasas ejecutoras de la apoptosis (Danial and Korsmeyer, 2004).

Las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 están definidas por la presencia de 4 dominios conservados denominados BH1, BH2, BH3 y BH4 (del inglés “*BCL-2 homology*”). Las proteínas pro-apoptóticas pueden ser sub-divididas en aquellas que presentan multidominios homólogos a BH1, BH2 y BH3 (BAX y BAX), y miembros que poseen solo el dominio BH3, denominados “BH3-*only*” (BIK, BIM, PUMA, NOXA, etc). La expresión de las proteínas BAX y BAK es esencial para gatillar la apoptosis, ya que en ellas convergen múltiples estímulos pro-apoptóticos intrínsecos. Las proteínas “BH3-*only*” actúan río arriba de BAX y BAK, controlando su activación conformacional, fenómeno que es inhibido por proteínas anti-apoptóticas como BCL-2 y BCL-X_L (Wei et al., 2001). La activación de BAX y BAK

resulta en la permeabilización de la membrana mitocondrial y la posterior liberación de proteínas mitocondriales, como citocromo c, la cual gatilla la activación de caspasas, provocando la muerte celular (Danial and Korsmeyer, 2004).

Estudios recientes indican que proteínas de los tres subgrupos de la familia BCL-2 están localizadas en la membrana del RE. Se ha propuesto que la familia BCL-2 regula en este organelo distintas respuestas a condiciones de estrés (Hetz and Glimcher, 2008). Proteínas pro-apoptóticas “BH3-only” son fuertemente inducidas bajo condiciones de estrés de RE, lo que esclarece en parte el mecanismo por el cual la apoptosis es iniciada bajo condiciones de daño al RE (Puthalakath et al., 2007; Li et al., 2006). Una de las funciones principales descrita para la familia BCL-2 en el RE es la regulación de la homeostasis del Calcio (Ca^{2+}) (Rong and Distelhorst, 2008), lo cual modula directamente la muerte celular iniciada por estímulos que dependen de la liberación de calcio del RE.

BAX y BAK como mediadores críticos en la UPR y la regulación de IRE1 α

Se ha descrito recientemente una nueva función para las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK en el RE donde regulan la amplitud de señalización de IRE1 α . Esta regulación esta dada por el control de su autofosforilación y estado de oligomerización. (Hetz et al., 2006). Tejidos y células doble deficientes (DKO) para BAX y BAK en ratones, mostraron una disminución clara en la expresión de XBP-1s bajo condiciones experimentales de estrés de RE. Este efecto regulatorio es mediado por la interacción física entre BAX/BAK e IRE1 α (Hetz et al., 2006). Basado en estos antecedentes se postuló que la activación de IRE1 α requiere de la unión de proteínas accesorias como BAX y BAK, las cuales posiblemente estabilizan la

forma activa de IRE1 α , fomentando la señalización de la UPR. Por otro lado, estudios recientes sugieren indirectamente la existencia de un nuevo modulador de IRE1 α , la proteína “*BAX inhibitor -1*” (BI-1) (Bailly-Maitre et al., 2006). Sin embargo, la posible regulación directa de IRE1 α por BI-1 no ha sido aún analizada y es objeto de estudio de esta tesis.

“*BAX inhibitor-1*”

BI-1 se describió inicialmente como “*Testis Enhanced Gene Transcript*” (TEGT) (Walter et al., 1995) y posteriormente identificada en una pesquisa de genes capaces de inhibir la muerte de levaduras mediada por la sobre expresión de BAX utilizando una librería de ADNc humana. El análisis filogenético de la secuencia de BI-1 establece que esta proteína está altamente conservada en diferentes especies; incluyendo levaduras, plantas, mamíferos e insectos (Fig.3) (Chae et al., 2003; Huckelhoven, 2004), sugiriendo que su efecto inhibitorio de la muerte celular frente a condiciones de estrés celular podrían estar conservadas en la evolución, desde organismos unicelulares a complejos organismos multicelulares. De hecho, ha sido demostrado que BI-1 inhibe la muerte celular inducida por la sobreexpresión de BAX en animales y plantas, además de levaduras (Bailly-Maitre et al., 2006; Xu and Reed, 1998). Estudios en células humanas demostró que la sobreexpresión de BI-1, al igual que BCL-2, protege frente a muerte celular inducida por privación de nutrientes, daño a DNA y estrés oxidativo (vías intrínsecas). Sin embargo, BI-1 no afecta la apoptosis gatillada por la estimulación de receptores de muerte como Fas y TNF-R (Xu and Reed, 1998) (Fig.3). Asimismo, células deficientes para BI-1 son más sensibles a la apoptosis inducida por diferentes estímulos de muerte intrínsecas

(Chae et al., 2004). Por ejemplo, líneas celulares de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes para BI-1 presentaron una mayor susceptibilidad frente a la apoptosis provocada por agentes que inducen estrés del RE (Tunicamicina, Brefeldina A y Tapsigargina). El efecto anti-apoptótico de BI-1 correlaciona con la inhibición de la activación de BAX y la supresión de la activación de caspasas (Chae et al., 2004). Estudios con ratones deficientes para BI-1 también demostraron que esta proteína es un importante regulador de la apoptosis iniciada bajo condiciones de estrés en el RE *in vivo* (Bailly-Maitre et al., 2006)

Otras analogías existen entre la función de BI-1 y BCL-2. La sobreexpresión de BI-1 también disminuye los niveles de calcio (Ca^{2+}) luminal del RE (Fig.3) (Xu et al., 2008), así como la cantidad de Ca^{2+} liberado desde el RE en respuesta a diversos estímulos (Chae et al., 2004; Westphalen et al., 2005; Xu et al., 2008). Por otra parte, ha sido demostrado que el efecto de BI-1 en la permeabilidad del Ca^{2+} del RE es dependiente del pH celular. Esta actividad depende del dominio citosólico C-terminal de BI-1 (Kim et al., 2008).

El análisis de la secuencia del ADNc de BI-1 permitió identificar un ORF que predice una proteína de 237 aminoácidos (25-27kDa), la cual contiene varios segmentos putativos de transmembrana (6 a 7 dominios hipotéticos) (Fig.3). BI-1 está localizado en membranas intracelulares, principalmente en la membrana del RE (Xu and Reed, 1998). Por otro lado, estudios de co-inmunoprecipitación sugieren que BI-1 interactúa con BCL-2 y BCL-X_L, pero no con BAX. La regulación de la apoptosis por BI-1 depende de su región c-terminal, la cual consiste en 10 a 14 aminoácidos cargados positivamente expuestos hacia el citoplasma (Kawai-Yamada et al., 2004).

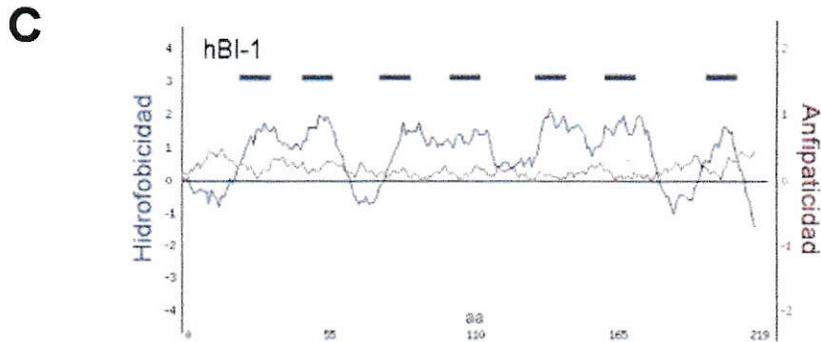
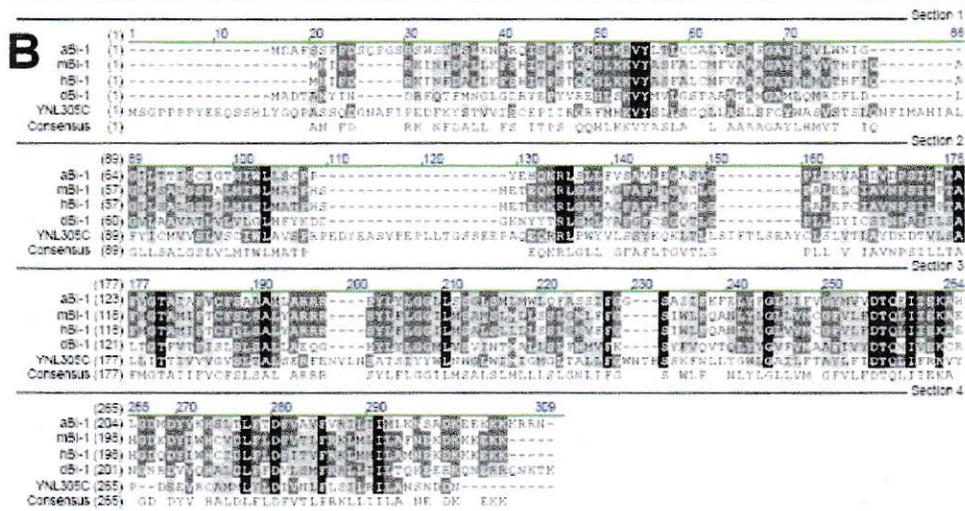
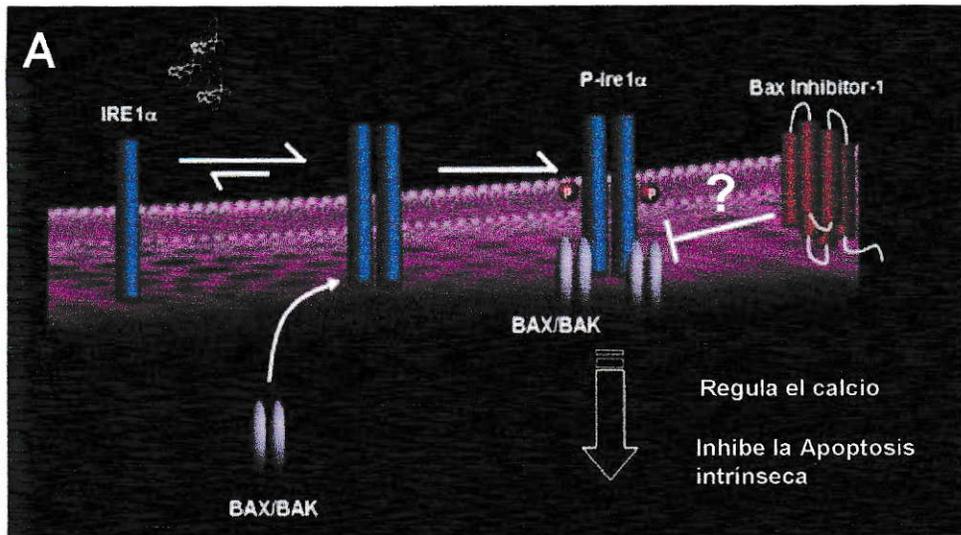


Figura 3: BI-1 y sus funciones.

A) Esquema de las funciones de BI-1: Regula el calcio, inhibe la apoptosis intrínseca y regula negativamente la actividad de IRE1 α . B) Alineamiento de la secuencia aminoacídica de BI-1 de distintas especies: *Homo Sapiens* (hBI-1), *Mus musculus* (mBI-1), *Arabidopsis thaliana* (aBI-1), *Drosophila melanogaster* (dBI-1) y *Saccharomyces cerevisiae* (YNL305C). En negro se muestran los aminoácidos idénticos, gris oscuro conservados y gris similares. C) Perfil de hidrofobicidad de BI-1 humano: la línea roja representa la puntuación para anfipaticidad y la azul para hidrofobicidad según los criterios de análisis de Kyte-Doolittle para hidrofobicidad. Los segmentos azules representan dominios hipotéticos para transmembrana.

“BAX inhibitor-1” y la UPR.

Estudios recientes indican que ratones deficientes en BI-1 presentan una hiperactivación de la vía de IRE1 α frente a modelos de isquemia y reperfusión en el hígado y riñones (Bailly-Maitre et al., 2006; Xu et al., 2008; Bailly-Maitre et al., 2006). Por otro lado se ha descrito que el daño generado por isquemia-reperfusión induce fuertemente el incremento de los niveles de XBP-1s, ATF6 y fosfo-JNK en ratones deficientes para BI-1 probablemente producto del daño oxidativo a las proteínas. Estos resultados sugieren indirectamente que BI-1 podría poseer una actividad inhibitoria sobre IRE1 α (Bailly-Maitre et al., 2006).

Basado en los antecedentes descritos, en este proyecto decidimos caracterizar en detalle las respuestas a estrés de RE en células MEFs deficientes en BI-1 y definir a nivel molecular los posibles mecanismos involucrados en esta regulación. Nuestros resultados sugieren una nueva función para BI-1, controlando la UPR a través de la modulación de la vía IRE1 α /XBP-1. Estos resultados, junto con antecedentes previos, reafirman un modelo en donde la expresión de proteínas pro- y anti-apoptóticas en la membrana del RE determinan la amplitud de las respuestas de UPR.

HIPOTESIS: BI-1 regula negativamente la señalización de IRE1 α mediante la formación de un complejo proteico.

OBJETIVO GENERAL

Investigar la participación de la proteína BI-1 en la regulación de la señalización de IRE1 α .

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1) Analizar la señalización de IRE1 α en células MEFs deficientes en BI-1 (BI-1 KO) y en células MEFs silvestres (BI-1 WT).

1.1 Estudiar los cambios en los niveles de procesamiento del ARNm y de la proteína de XBP-1 en condiciones de estrés reticular en células BI-1 KO y BI-1 WT.

1.2 Analizar la activación de XBP-1 de manera indirecta, determinando los niveles transcripcionales de sus genes blanco.

2) Estudiar la posible interacción entre IRE1 α y BI-1 y su relación con la regulación de la UPR.

Materiales y métodos

Animales

Los ratones silvestres y deficientes en BI-1 utilizados en este trabajo se generaron por el laboratorio del Dr. John Reed y son mantenidos en el centro de recursos animales del Instituto Burnham. Las moscas dBI-1^{EY03662} se obtuvieron de Bloomington stock center (BL-16568) y son mantenidas en el laboratorio del Dr. Álvaro Glavic en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Cultivo celular

Las células MEFS transformadas con SV40 deficientes y silvestres para BI-1 se obtuvieron como donación del Dr. John Reed y se describieron previamente (Chae et al., 2004). Las células HEK293 y HEK293T ψ utilizadas se adquirieron comercialmente de ATCC.

Reactivos

Las sales, ácidos, bases, detergentes, bromuro de etidio y solventes utilizados de grado analítico o de biología molecular, se consiguieron en Merck y Sigma. La agarosa ultrapura-1000, ADN estándar, enzimas Taq ADN polimerasa, se obtuvieron de Invitrogen, New England Biolabs y Promega, respectivamente. El reactivo Micro BCA para cuantificar proteínas y sustrato para quimioluminiscencia se obtuvieron en Pierce. Las películas

fotográficas de radiografía se obtuvieron de Fuji. Los anticuerpos primarios para anti-XBP-1, anti-ATF4, anti-SP-1, anti-MYC, anti-HA, anti-eIF2 α se consiguieron de Santa cruz a excepción de anti-p-eIF2 α que se elaboró por Stressgen, anti-BAK de UPSTATE y el anti-VSV de Sigma. Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP se obtuvieron de Zymed.

La Tunicamicina (Tm), Brefeldina (Bref.A) y zVAD-fmk se adquirieron de Calbiochem EMB Bioscience Inc. El medio de cultivo celular, los antibióticos y el TRIzol[®] se obtuvieron de Invitrogen. El suero fetal bovino se obtuvo de Life Technologies (Maryland). Hoechst, lysotracker, y Brefeldina A-BODIPY se obtuvieron de Molecular Probes.

Construcciones

Los amplificadores de PCR del ADNc humano de IRE1 α se ligaron con un linker que contenía las secuencias de marcaje HA. Luego estos se insertaron en un plasmidio pMSCV-hygro (Clontech) entre los sitios *Bgl II* y *Xho I* para generar IRE1 α -HA. Adicionalmente se generaron por la ligación de amplificadores del ADNc humano de IRE1 α en este mismo vector: IRE1 α -(Δ C)-HA, que contiene las secuencias aminoacídicas 1-500 de IRE1 α humano mediante los partidores: 5'-GAGATCTGCCATGCCGGCCCGGCGG-3' y 5'-GGACGCGTGGGTGGAAGGGCAGCTGC-3' e IRE1 α -(Δ N)-HA que contiene las secuencias aminoacídicas 467-977 de IRE1 α humano con los partidores: 5'-GGAGATCTGCCATGAGCATGCATCAGCAGCAG-3' y 5'-ACGCGTAGGGCGTCTGGAGTCACTGG-3'.

Alternativamente, la porción citosólica de IRE1 se marcó con VSV usando el vector pCR3 (Invitrogen). Luego se generó en este mismo vector un mutante inactivo en el dominio ARNsa IRE-K907A-VSV por mutagénesis sitio dirigida.

BI-1-MYC humano y la mutante de BI-1-C9A-MYC clonado en pCDNA3 (Invitrogen) se obtuvieron a partir de una donación del Dr. John Reed y se describieron previamente (Xu and Reed, 1998).

El ADNc de BI-1-WT humano y del mutante por delección de 9 residuos del carboxilo terminal (BI-1 Δ C) se subclonaron para generar proteínas fusionadas a EGFP mediante el uso del vector pEGFP-N1 (Clontech). A continuación, las proteínas fusionadas a EGFP se subclonaron en vector puro-retroviral pMSCV (Clontech).

Cultivo celular

Las células se mantuvieron a 37°C con 5% de CO₂ en "*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*" (DMEM). Suplementadas con 5% de suero fetal bovino (FBS), 1 mM de glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomycin y 10 μ M de aminoácidos no esenciales en el caso del cultivo de las células MEFs.

Para la inhibición de caspasas las células se pretrataron con 10 μ M de zVAD-fmk por 30 min.

Transfecciones

Las células se sembraron a una concentración de 0.35×10^6 células/ml y luego de 24h se transfectaron con el reactivo Efectene de Qiagen según el protocolo del fabricante. Una vez transfectadas, las células se cultivaron por 48 h antes de ser colectadas para preparar los extractos de proteína totales para su análisis por electroforesis e “*immunoblot*” (WB) en solución tampón de lisis RIPA (Tris 20mM pH 8,0, NaCl 150 mM, SDS 0,1 %, DOC 0,5% y tritón X-100 0,5%). En el caso de la preparación de extractos de proteínas para inmunoprecipitación (IP), las células se colectaron en solución tampón CHAPS (CHAPS 1%, KCl 100 mM, Tris 50 mM pH 7,5, NaF 50mM, Na_3VO_4 1mM, PMSF 250 mM e inhibidores de proteasas).

Extracción de ARN, RT-PCR y PCR en tiempo real

El RNA total se preparó a partir de células MEFs utilizando TRIzol[®] según el protocolo del fabricante. Luego se sintetizó el ADNc con el kit iScript cDNA Síntesis de BIORAD, utilizando el siguiente programa: 5 min. a 25 °C, 45 min. a 44 °C y 5 min. a 85 °C.

Realizamos reacciones cuantitativas de PCR en tiempo real utilizando el reactivo fluorescente SYBRgreen y la enzima ADN polimerasa GO Taq[®] Flexi (Promega) en un sistema ABI PRISM 7700 de Applied Biosystems. Las cantidades relativas de ARNm se calcularon a partir de los valores del ciclo umbral comparativo usando actina como control interno. Los partidores se diseñaron utilizando el software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA) u obtenidos de la base de datos de partidores:

<http://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>

Realizamos PCR en tiempo real usando los siguientes pares de partidores:

Gen	Partidor en sentido directo	Partidor en sentido inverso
<i>erdj4</i>	5'-CCCCAGTGTCAAACTGTACCAG-3'	5'-AGCGTTTCCAATTTTCCATAAATT-3'
<i>Edem</i>	5'-AAGCCCTCTGGAACCTTGC-3'	5'-AACCCAATGGCCTGTCTGG-3'
<i>sec61a</i>	5'-CTATTTCCAGGGCTTCCGAGT-3'	5'-AGGTGTTGTACTGGCCTCGGT-3'
<i>herp</i>	5'-CATGTACCTGCACCACGTCG-3'	5'-GAGGACCACCATCATCCGG-3'
<i>ero1</i>	5'-TCAGTGGACCAAGCATGATGA-3'	5'-TCCACATACTCAGCATCGGG-3'
<i>wfs-1</i>	5'-CCATCAACATGCTCCCGTTC-3'	5'-GGGTAGGCTCGCCAT-3'
<i>Actina</i>	5'-TACCACCATGTACCCAGGCA-3'	5'-CTCAGGAGGAGCAATGATCTTGAT-3'

Tabla 1: Partidores usados para PCR en tiempo real.

Ensayo de procesamiento del ARNm de XBP-1.

Para los ensayos de procesamiento las células MEFs se sembraron a una concentración de 0.35×10^6 células/ml y tratadas con Tm. El ARN se extrajo y el ADNc se sintetizó como se explicó en la sección anterior. Una vez obtenido el ADNc este se diluyó (1:2) en agua libre de nucleasas. Utilizamos los partidores 5'-ACACGCTTGGGAATGGACAC-3' y 5'-CCATGGGAAGATGTTCTGGG-3', que incluyen las secuencias que flanquean el sitio de procesamiento del ARNm de *xbp-1* en ratón, para su amplificación

por PCR con el mix para PCR GO Taq[®] Green (Promega). El programa que se utilizó es el siguiente: 4 min. de denaturación 94°C, luego 30 seg. de denaturación 94°C, 45 seg. de hibridación 58°C, 45 seg. de elongación 72°C por 35 ciclos y 10 min. finales de elongación a 72°C.

En el caso del ensayo de procesamiento del ARNm de XBP-1 en *Drosophila* utilizamos los siguientes partidores: 5'-CAGATGCATCAGCCAATCCAAC-3' y 5'-ACAACCTTTCCAGAG TGAG-3' y el programa que se utilizó es el siguiente: 2 min. de denaturación 95°C, luego 1min. de denaturación 95°C, 50 seg. de hibridación 56°C, 50 seg. de elongación 72°C por 35 ciclos y 10 min. finales de elongación a 72°C.

Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa-1000 al 2,5% y se visualizaron con tinción de bromuro de etidio.

En algunos casos el producto procesado se cuantificó por el número de píxeles utilizando el sistema Versadoc de Biorad y los valores totales se relativizaron con respecto al producto total y se expresaron en porcentaje.

Co-Inmunoprecitaciones.

Las inmunoprecitaciones (IP) se realizaron en solución tampón CHAPS. Para la preparación del extracto celular las células se recolectaron en PBS y se resuspendieron en tampón CHAPS. Luego se incubaron a 4 °C por 30 min en un rotor de rueda. Se realizaron las IP en 500 µl de extractos post-nucleares. Los extractos seleccionados se incubaron con complejos anticuerpo-agarosa anti-HA (Roche), o complejos anticuerpo-agarosa anti-MYC (Upstate technologies) por 4 h a 4°C. A continuación estos se lavaron

dos veces con 1 ml de solución tampón CHAPS y por último, una vez con solución tampón CHAPS con NaCl 500 mM. Los complejos de proteína se eluyeron mediante competencia con el péptido HA 1,4 mg/ml (Roche) o con el péptido MYC (Upstate Technologies) por 30 min. a 4°C y finalmente por 10 min. a 37°C.

En el caso del experimento realizado con el péptido BI-1^{C-ter}, luego del tercer lavado con CHAPS, el extracto posnuclear con el complejo anticuerpo-agarosa anti-MYC se incubó por 30 min. con distintas concentraciones del péptido y posteriormente se eluyó con el péptido MYC por 30 min. a temperatura ambiente y finalmente por 10 min. a 37°C.

Análisis de Western Blot.

Para este análisis, las células se colectaron y se homogenizaron mediante sonicación en solución tampón RIPA en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasa (Roche). La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo de micro-BCA. El equivalente a 30-50µg de proteína total se cargó en geles de 12 o 15 % de poliacrilamida preparados según (Laemmli, 1970).

Los siguientes anticuerpos y diluciones se utilizaron: anti-XBP-1 1:1000, anti-GFP 1:1000, anti-ATF4 1:2000, anti-SP-1 1:1000, anti-MYC 1:2000, anti-HA 1:2000, anti-VSV 1:3000, anti-p-eIF2 α 1:3000, anti-eIF2 α 1:3000, anti-Bak 1:3000. Los anticuerpos secundarios conjugados a HRP se utilizaron a una dilución de 1:4000.

Inmunofluorescencia.

Para este fin, distintos organelos se marcaron mediante sondas fluorescentes específicas para ER/Golgi y lisosomas. Las células vivas se tiñeron con LysoTracker 200 nM por 45 minutos a 37°C y CO₂ 5%. Agregando directamente al medio Brefeldina ABODIPY 0,2 µg/ml por 45 minutos y visualizado el ER/Golgi. Luego las células se lavaron dos veces con PBS frío y fijadas por 30 min con formaldehído 4% en hielo. Luego las células se mantuvieron en PBS con formaldehído 0,4% para su visualización y análisis mediante microscopio confocal.

Para el análisis de proteínas marcadas con MYC, las células se fijaron por 30 min en PBS con paraformaldehído 4% y se permeabilizaron con metanol frío a 20°C por 10 min. Después de 1 h. de bloqueo con gelatina 5%, las células se incubaron con anticuerpos anti-MYC por 1 h. a 37°C, lavadas tres veces en PBS, e incubadas con anticuerpos secundarios conjugados a fluoroforos Alexa (Molecular Probes) para su análisis mediante microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con Hoechst.

Modelo experimental

Inducción de estrés de RE en líneas celulares

Las células se trataron con Tm a concentraciones que fluctuaban entre 0 y 1 µg/ml para los experimentos de dosis respuesta, los cuales se incubaron 2,5 h. para el ensayo de procesamiento del ARNm de XBP-1 y 4 horas para WB sin remover la Tm del medio. Solo cuando evaluamos la posible participación

de BI-1 en la inactivación de IRE1 α , las células BI-1 WT y KO se trataron con 1 mg/ml de Tm por 2h. Luego de transcurrido este tiempo las células se lavaron 3 veces con PBS 1X e incubadas por 0, 6, 8, 16 y 24 h en medio fresco libre de Tm previamente calentado a 37°C. Durante distintos tiempos de recuperación, el procesamiento del ARNm de XBP-1 se monitoreó utilizando RT-PCR. En el caso de la incubación con Bref A las células se trataron a una concentración de 10 μ M por 2,5 h.

Tratamientos con el péptido BI-1^{C-ter}

El medio de cultivo de las células MEFs deficientes y silvestre para BI-1 se sustituyó por medio con suero al 2% e incubadas por 1 hora a 37°C y 5% CO₂. Posteriormente las células se trataron con 50 μ M del péptido BI-1^{C-ter} que corresponde a la región C-terminal de BI-1 acoplado a 8 argininas adicionales en el amino terminal, adición que aumenta la permeabilidad a las células. Las incubaciones se realizaron por 2 horas. Finalmente las células se trataron con bajas concentraciones de Tm para determinar el efecto del péptido en el procesamiento del ARNm de XBP-1.

Generación de líneas estables de BI-1

Células MEFs BI-1 KO se reconstituyeron con BI-1 y BI-1 Δ C humano como proteínas de fusión EGFP usando vectores retrovirales. Para esto células HEK293T ψ se transfectaron con los vectores hBI-1-GFP-pMSCV y hBI-1 Δ C-GFP-pMSCV e incubaron por 48h. Luego el medio conteniendo los retrovirus se colectó y filtró; luego agregó sobre las células MEFs deficientes en BI-1 en presencia de "Polybreen" a una concentración de 10 μ g/ml. Posterior a

esto, las líneas celulares se seleccionaron utilizando Puromicina a 3 $\mu\text{g/ml}$. Finalmente, los niveles de expresión de GFP se determinaron mediante citometría de flujo en el equipo BD FACS modelo Canto, midiendo en el canal FITC (515-545nm).

Modelo de estrés de RE en ratones

Los animales se inyectaron intraperitonealmente una vez con 0,2 $\mu\text{g/gramo}$ de peso corporal con una suspensión de Tm en dextrosa. Luego de 6 h. los animales se sacrificaron por narcosis de CO_2 . El hígado se removió y se prepararon extractos celulares para análisis mediante WB. Para el análisis de XBP-1 los extractos de tejido se fraccionaron para obtener núcleos utilizando un protocolo previamente descrito (Hetz et al., 2006)

Generación de moscas transgénicas para BI-1 y modelo de estrés de RE en larvas

El mutante de mosca dBI-1EY03662 corresponde a un único elemento P insertado en la 5'UTR, 63 pb río abajo del sitio de inicio de la transcripción de dBI-1 (CG7188). Esta inserción produce una sobreexpresión de dBI-1, como se ha detectado por PCR. Para los ensayos UPR se crecieron larvas Canton S y dBI-1EY03662 en medio estándar o medio estándar suplementado con Tunicamicina 50 $\mu\text{g/ml}$ por 20h. Luego se extrajo el ARN total y se analizó el procesamiento de dXBP-1 como se describió anteriormente.

Resultados

Aumento del procesamiento del ARNm de XBP-1 en células deficientes para BI-1.

A pesar que la vía de señalización de IRE1 α es la más conservada de la UPR, poco se conoce acerca de su regulación. La activación de IRE1 α induce el procesamiento directo del ARNm de XBP-1. Con el objetivo de definir la posible regulación de IRE1 α por BI-1, fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) silvestres (BI-1 WT) y deficientes para BI-1 (BI-1 KO) se expusieron a distintas concentraciones de Tunicamicina (Tm) (0, 25, 100 y 250 ng/ml) por 2,5 h. y luego el nivel de procesamiento del ARNm de XBP-1 se monitoreó utilizando un ensayo basado en RT-PCR (Fig. 2B). Como se muestra en la Figura 4, las células BI-1 KO experimentaron procesamiento del ARNm de XBP-1 a concentraciones de Tm de 0 a 250 ng/ml las cuales son consideradas concentraciones bajas, comparadas con las células MEFs controles que no muestran procesamiento o solo un mínimo procesamiento bajo estas condiciones (panel superior). Por otra parte, los niveles de ARNm de XBP-1 procesado (XBP-1s) y XBP-1 total se determinaron, por RT-PCR observándose niveles mayores de XBP-1s en las células BI-1 KO expuestas a Tm comparadas con las células BI-1 WT. Como control analizamos los niveles de ARNm de BI-1 confirmando la deficiencia de BI-1 en las células BI-1 KO.

Sin embargo, los efectos de la ausencia de BI-1 en el procesamiento del ARNm de XBP-1 no se observaron a concentraciones de Tm mayores a 1,6 μ g/ml (Fig. 5A). Los niveles relativos del procesamiento de ARNm de

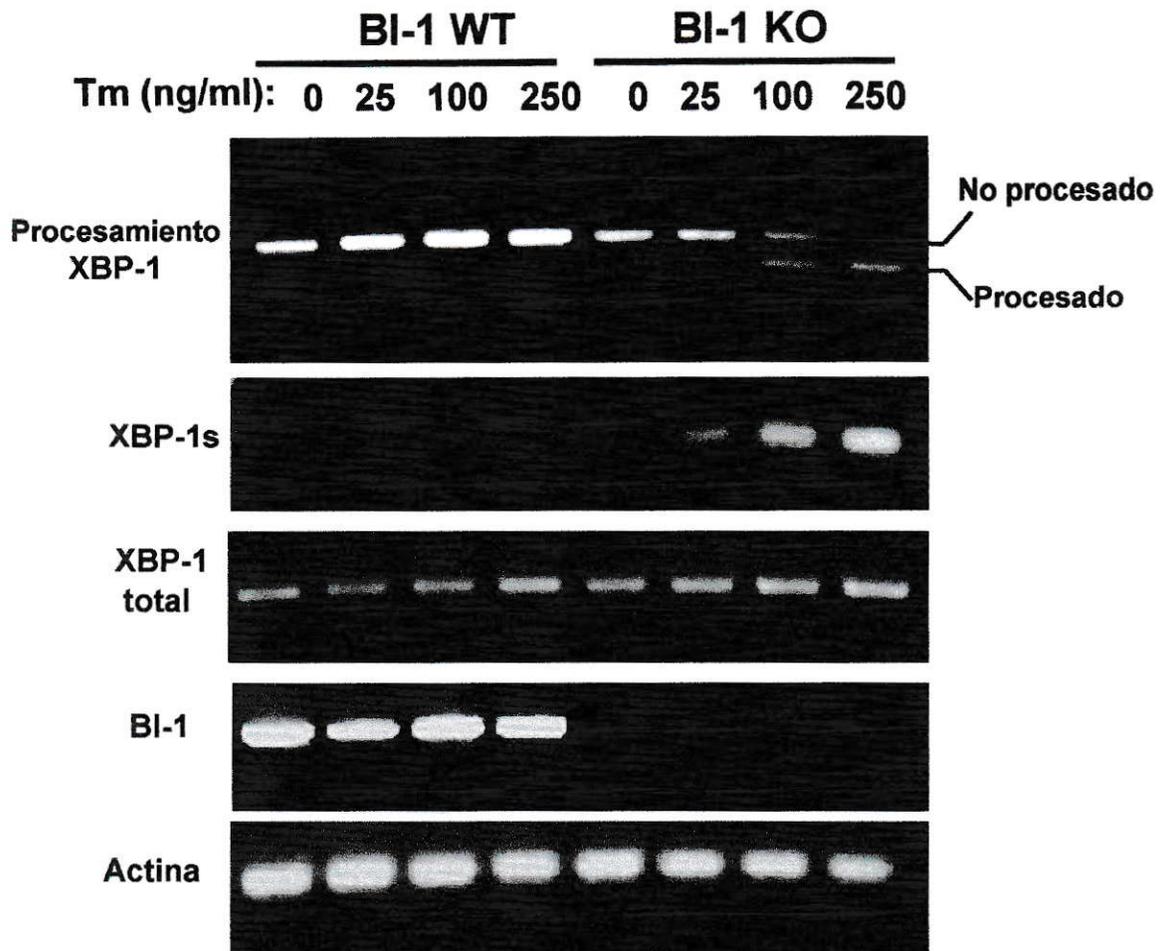


Figura 4: Aumento del procesamiento de XBP-1 en células deficientes para BI-1. MEFs KO de BI-1 y MEFs control se trataron con las concentraciones indicadas de Tm por 2,5 h. Los niveles de procesamiento de ARNm de XBP-1 se determinaron mediante un RT-PCR del ADNc total. Se indican los fragmentos de PCR procesados y no procesados. Adicionalmente los niveles totales de XBP-1 o ARNm de XBP-1 procesado se determinaron con partidores específicos mediante RT-PCR. Como control, los niveles de ARNm de BI-1 y actina se midieron por RT-PCR.

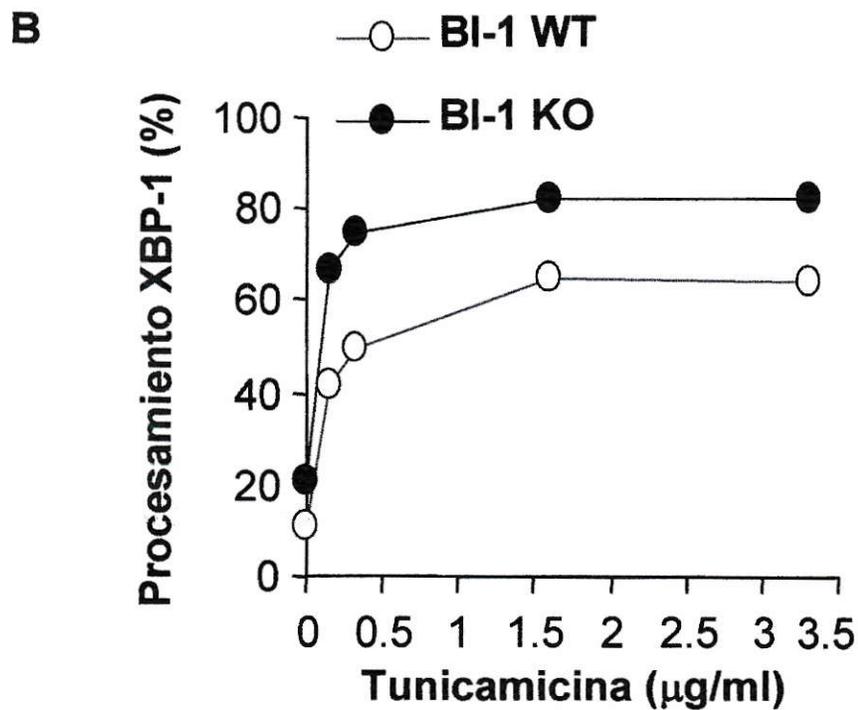
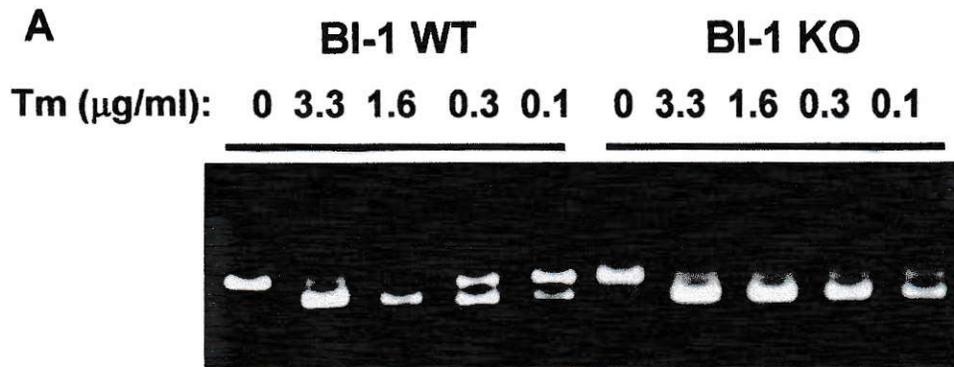


Figura 5: Los efectos inhibitorios de BI-1 dependen de las concentraciones de Tm.
 A) MEFs KO de BI-1 y MEFs control se trataron con las concentraciones indicadas de Tm por 2,5 horas y se determinaron los niveles de procesamiento de ARNm de XBP-1.
 B) Cuantificación del procesamiento del ARNm de XBP-1. Los niveles del ARNm de XBP-1 procesado se relativizaron respecto a los niveles totales (Sumatoria de XBP-1 total y procesado).

XBP-1 mostrados en la figura 5A se cuantificaron y graficaron como porcentaje, observando un mayor procesamiento en las células BI-1 KO (Fig 5B). Estos resultados sugieren que BI-1 es un modulador negativo de la actividad de IRE1 α .

La deficiencia de BI-1 induce un aumento de XBP-1s bajo condiciones de estrés de RE.

El procesamiento del ARNm de XBP-1 consiste en la remoción de 26 nucleótidos de un intrón, cambiando el marco de lectura lo que genera una proteína más estable y activa. Para evaluar los niveles de expresión de XBP-1s realizamos experimentos de curso temporal y dosis respuesta (Fig.6A y 6B, respectivamente). Células deficientes y controles para BI-1 se sometieron a concentraciones de de 0, 0,1, 0,25 y 1 μ g/ml de Tm por 4 h. Por otra parte, ambos tipos celulares se trataron con 100 ng/ml de Tm por tiempos 0, 1, 2, 4 y 8 horas. Luego, se obtuvieron los extractos de proteínas nucleares y se analizaron por WB, inmuno-detectando las proteínas XBP-1s y SP-1 como control de carga. En ambos experimentos observamos una mayor expresión de la proteína XBP-1s en las células KO para BI-1 en comparación con las células WT. Este resultado correlaciona muy bien con el incremento observado en el procesamiento del ARNm de XBP-1 que experimentan las células deficientes en BI-1 bajo condiciones de estrés de RE.

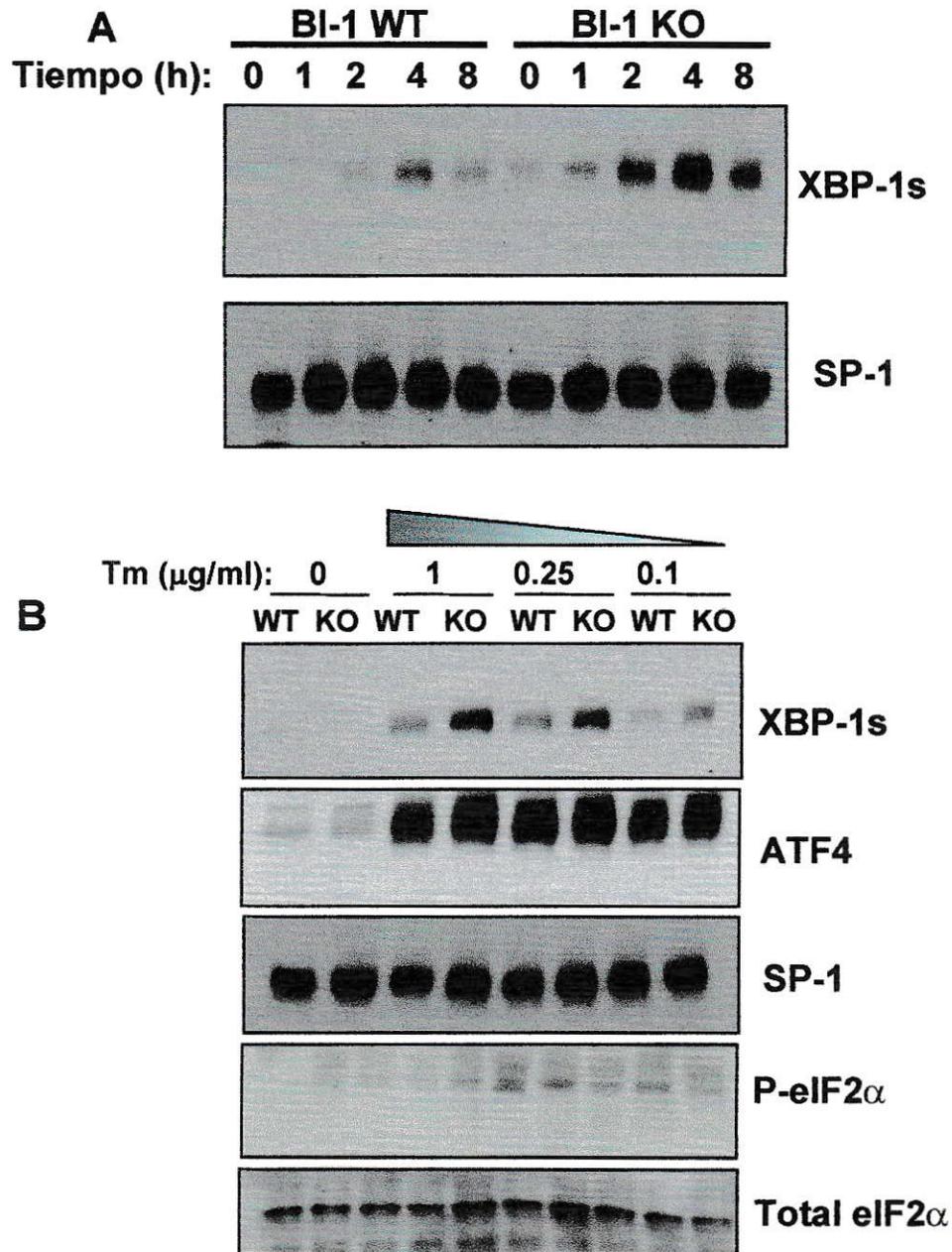


Figura 6: BI-1 inhibe la señalización río abajo de IRE1 α , sin afectar la vía de PERK.
 A) Las células WT y KO para BI-1, se trataron con Tm 100 ng/ml en los intervalos de tiempo indicados. Extractos de proteínas nucleares se analizaron por WB, midiéndose los niveles de XBP-1s, como control interno se utilizaron los niveles de la proteína nuclear SP-1. B) Células WT y KO para BI-1 se trataron con las concentraciones de Tm indicada por 4 h. Las proteínas XBP-1s, ATF4 y SP1 se analizaron en extractos nucleares mediante WB. Adicionalmente, se determinaron por medio de *Western blot* de extractos totales los niveles del factor de inicio de la traducción eucarionte 2 alfa en su forma fosforilada activa (fosfo-eIF2 α) y en su estado basal inactivo (eIF2 α).

BI-1 inhibe la señalización río abajo de IRE1 α , sin afectar la vía dependiente de PERK.

Células WT y deficientes para BI-1 se trataron por 4 horas con Tm a concentraciones de 0, 0,1, 0,25 y 1 μ g/ml. Las proteínas XBP-1s, ATF4 y SP1 se determinaron en extractos nucleares mediante WB. Adicionalmente, los niveles de fosforilación de eIF2 α y eIF2 α total se determinaron en extractos de proteínas totales por medio de WB. La deficiencia de BI-1 generó un incremento de la proteína XBP-1s bajo condiciones crecientes de Tm. Sin embargo, ésta no afectó drásticamente la expresión de eventos independientes de IRE1 α , como la expresión de ATF4 o la fosforilación de eIF2 α (Fig. 6B). Estos resultados sugieren que BI-1 afecta específicamente eventos de la UPR relacionados con la activación de IRE1 α .

Aumento en la expresión de los genes blanco de XBP-1s en células deficientes para BI-1.

Trabajos previos han demostrado que XBP-1 es un factor de transcripción que regula la expresión de genes frente a respuesta a estrés de RE. Para definir el impacto de BI-1 en las respuestas adaptativas de la UPR, los niveles de ARNm de diferentes genes blanco de XBP-1 se determinaron en células WT y deficientes en BI-1 mediante PCR en tiempo real. En experimentos de dosis-respuesta, donde las células se expusieron por 8 horas a las distintas concentraciones de Tm, donde observamos un aumento en los niveles del ARNm para Sec61 y EDEM en células deficientes para BI-

1 al ser comparadas con células controles (Fig. 7A). En consecuencia con esto, un amplio panel de genes blanco de XBP-1s (Erdj4, EDEM, Sec61, Ero1, Herp, WFS1) se analizó en células tratadas con 100 ng/ml de Tm por 8 h. Bajo estas condiciones las células BI-1 WT mostraron un leve aumento en los niveles de ARNm de los genes blanco de XBP-1. En contraste con esto, las células deficientes para BI-1 mostraron una marcada activación de la UPR evidenciada por un drástico aumento en los niveles de los ARNm de los genes blanco de XBP-1s (Fig. 7C).

Experimentos de curso temporal en células WT y deficientes para BI-1 tratadas con Tm a una concentración de 100 ng/ml a los tiempos de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 h., indicaron un rápido y pronunciado aumento en el ARNm de los genes EDEM, Sec61 y HERP en células deficientes para BI-1 (Fig. 7B), indicando que la expresión de BI-1 controla tanto la amplitud como la cinética de las respuestas transcripcionales dependientes de IRE1 α /XBP-1.

La expresión de BI-1 es necesaria para la inactivación de la vía de IRE1 α /XBP-1.

Previamente se ha reportado que los niveles de procesamiento del ARNm de XBP-1 disminuyen a niveles basales en condiciones de un estrés de RE prolongado (Lin et al., 2007). Esta respuesta se corroboró en nuestros experimentos al exponer las células WT a concentraciones de Tm 100 ng/ml por tiempos prolongados. En estos experimentos observamos una disminución en los niveles del procesamiento del ARNm de XBP-1 alrededor de las 18 h de tratamiento (Fig. 8A). Sorprendentemente, se observó que el

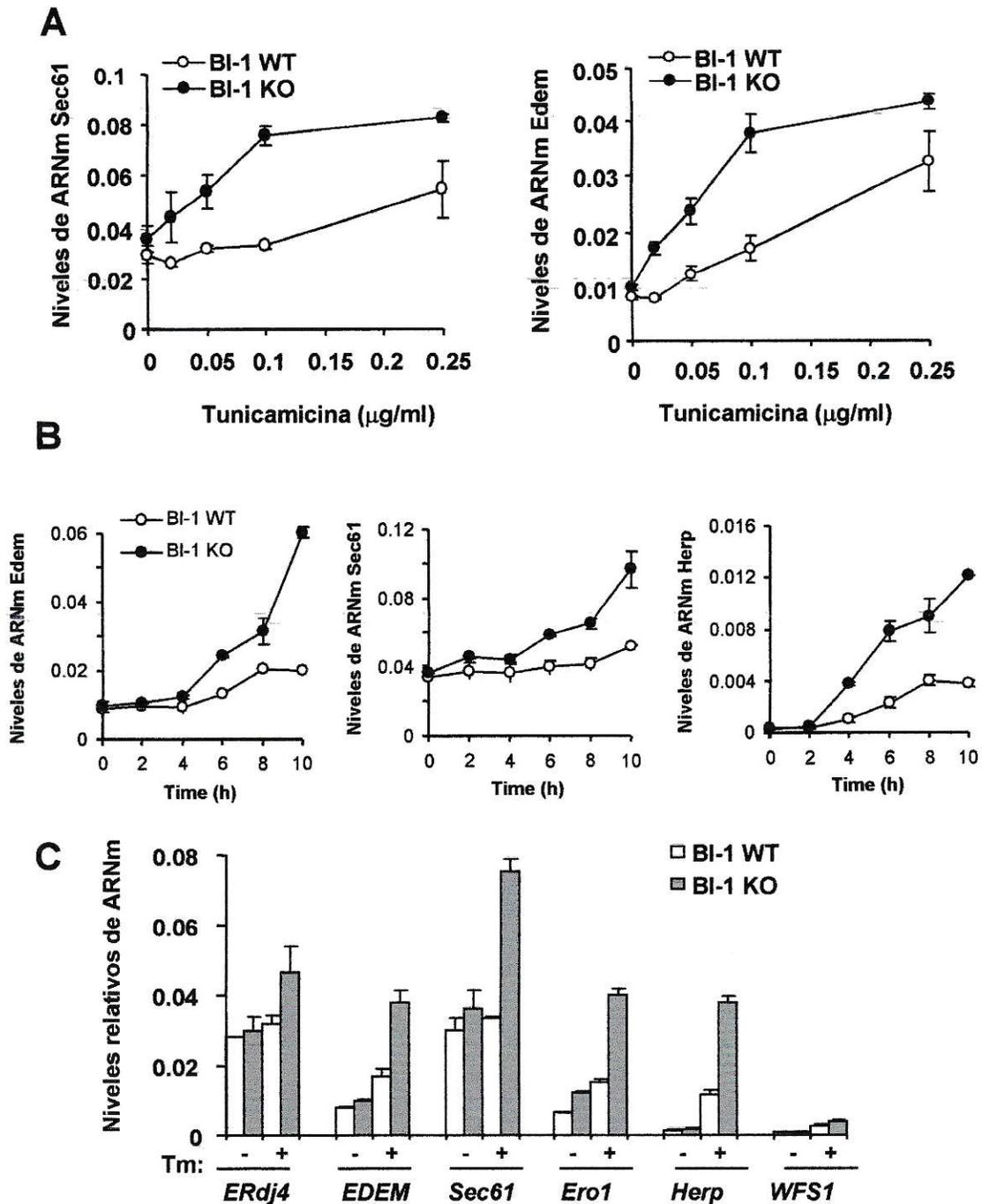


Figura 7: BI-1 controla la amplitud de las respuestas transcripcionales dependientes de la vía IRE1 α /XBP-1.

A) Células MEFs KO y BI-1 se trataron con las concentraciones indicadas de Tm por 8 h. y los niveles de ARNm de los genes blanco de XBP-1, Sec61 y EDEM, se determinaron por PCR en tiempo real. Los valores se normalizaron con los niveles de ARNm de actina para cada muestra, como control interno. B) Los niveles de ARNm de EDEM, Sec61 y HERP se determinaron en los intervalos de tiempo indicados en células tratadas con Tm 100 ng/ml. C) El nivel de ARNm para los genes blancos de la UPR: ERdj4, EDEM, Sec61, Ero1, Herp y WFS1 se midió mediante PCR en tiempo real en células WT y KO de BI-1 tratadas con Tm 100 ng/ml por 8 h.

procesamiento del ARNm de XBP-1 se mantuvo en el tiempo en células deficientes para BI-1, inclusive 24h después del tratamiento con Tm. Esto sugiere que BI-1 podría estar involucrado en la inactivación de la señalización de IRE1 α (Fig. 8A). Este efecto inhibitorio se correlacionó con un aumento en los niveles del ARNm de Sec61 y EDEM luego de 24h después del tratamiento con Tm en células deficientes en BI-1 (Fig. 8B).

Para evaluar la posible participación de BI-1 en la inactivación de IRE1 α , las células BI-1 WT y KO se trataron con una concentración alta de Tm de 1 μ g/ml 2 h para inducir un procesamiento total de XBP-1 en células BI-1 WT y KO. Luego de transcurrido este tiempo, las células se lavaron e incubaron por 0, 6, 8, 16 y 24 h en medio fresco libre de Tm (Fig 8C). Durante este periodo de recuperación observamos el procesamiento de XBP-1 en células controles. Concordando con los resultados previos, las células deficientes en BI-1 presentaron niveles sostenidos de procesamiento del ARNm de XBP-1 comparadas con células WT donde observamos una disminución de los niveles del ARNm de XBP-1 procesado a las 24 h después del tratamiento (Fig. 8C). En conjunto, estos resultados permiten postular a BI-1 como un regulador negativo de la vía IRE1 α /XBP-1.

BI-1 forma un complejo proteico con IRE1 α

Ya que BI-1 es capaz de modular la señalización de IRE1 α decidimos investigar si esta modulación esta asociada o no con una asociación física entre IRE1 α y BI-1. En esta sección evaluamos y definimos las regiones de IRE1 α implicadas en la interacción entre IRE1 α y BI-1 y su efecto sobre la

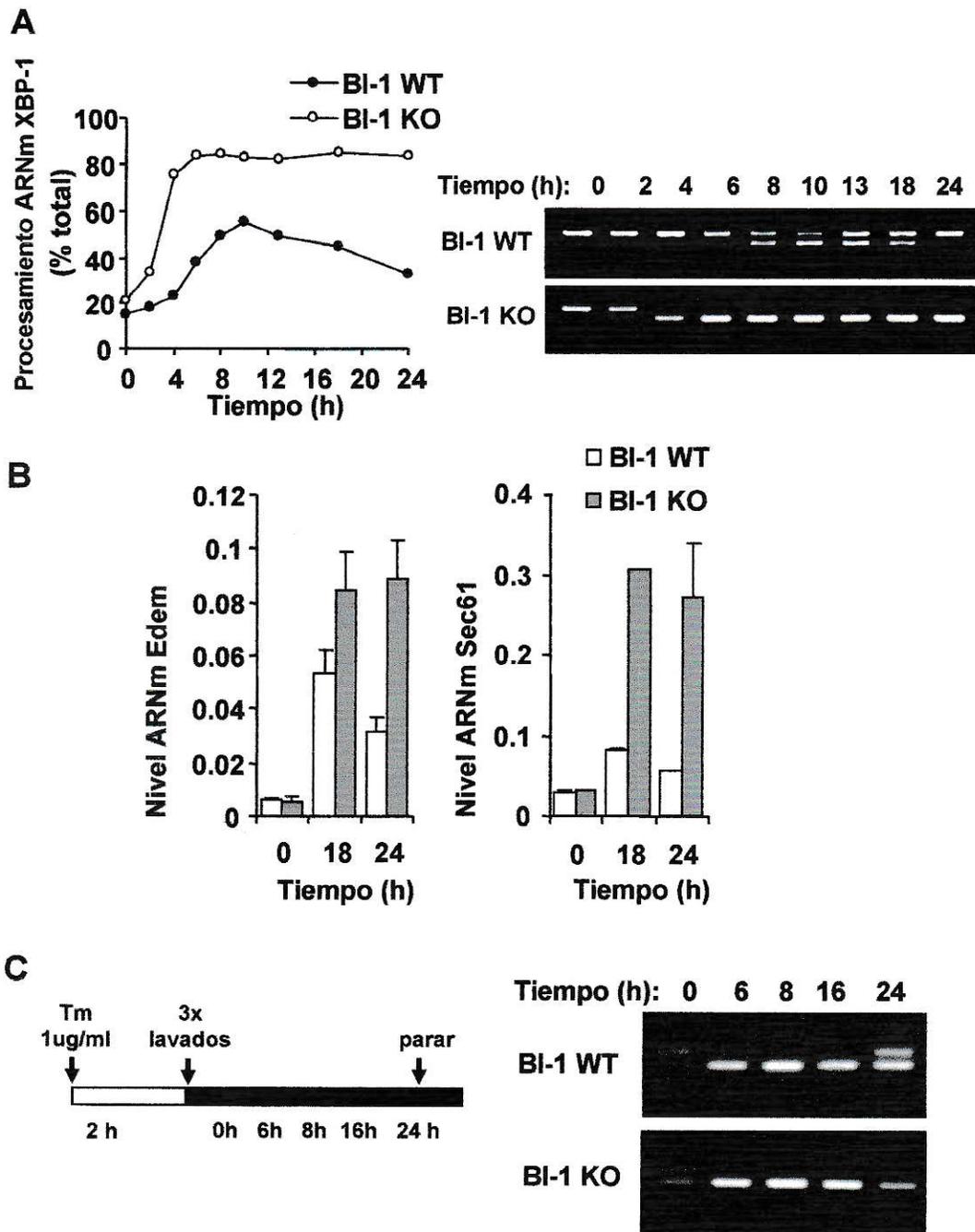


Figura 8: Inactivación retardada de la señalización IRE1 α /XBP-1 en células deficientes en BI-1.

A) El procesamiento de ARNm de XBP-1 se monitoreó a través del tiempo en células KO de BI-1 y WT tratadas con Tm 100 ng/ml. B) Los niveles de ARNm de genes blanco de XBP-1 se determinaron mediante PCR en tiempo real: Edem y Sec61 en células MEFs KO y WT para BI-1 después de 18 y 24 h de tratamiento con Tm 100 ng/ml. C) Células WT y KO de BI-1 se trataron por 2 h con 1 mg/ml y lavadas 3 veces con PBS e incubadas por los tiempos indicados en medio fresco libre de Tm. Posteriormente, el procesamiento de ARNm de XBP-1 se evaluó mediante RT-PCR.

actividad de IRE1 α . También realizamos experimentos para analizar si la interacción entre BI-1 se produce cuando IRE1 α es activado o bien si la interacción es independiente de la activación de este sensor.

La posible interacción de IRE1 α con BI-1 se evaluó mediante experimentos de co-inmunoprecipitación utilizando lisados de células HEK 293T co-transfectadas con vectores de expresión para IRE1 α -HA y BI-1-MYC. Luego la posible co-inmunoprecipitación se determinó mediante WB. Se observó una fuerte co-precipitación entre ambas proteínas (Fig. 9,10 y 11).

Con el objeto de determinar e identificar regiones de IRE1 α relevantes en su interacción con BI-1, células 293T se co-transfectaron con vectores de expresión para BI-1-MYC o BI-1C9A-MYC en conjunto con IRE1 α -HA WT o mutantes de delección de IRE1 α en su dominio citosólico (IRE1 α Δ C) o luminal del ER (IRE1 α Δ N). La co-inmunoprecipitación entre IRE1 α y BI-1 resultó ser dependiente de la región citosólica de IRE1 α e independiente de la región luminal de IRE1 α (Fig. 11A). Por lo tanto inferimos que la interacción entre BI-1 e IRE α requiere de la región C-terminal citosólica de IRE1 α , la cual codifica para los dominios quinasa y endorribonucleasa de esta proteína.

Para comprobar si la interacción entre IRE1 α y BI-1 depende de la activación de IRE1 α , realizamos experimentos bajo condiciones de estrés de RE (en presencia de Tm o Bref A). Células 293T se co-transfectaron con vectores de expresión para BI-1-MYC e IRE1 α -HA. Después de 48 h., las

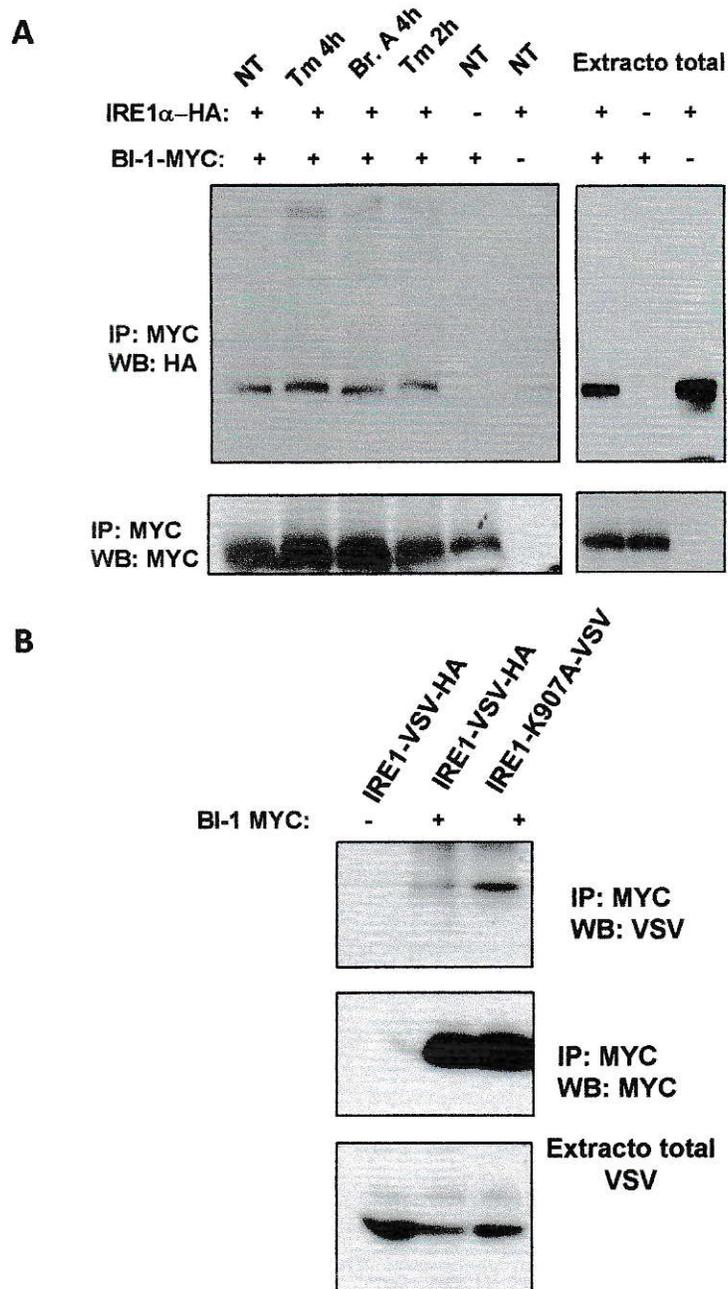


Figura 9 : BI-1 forma un complejo proteico con IRE1 α que no es afectado por el estrés de RE.

A) Células 293T se co-transfectaron con vectores de expresión para BI-1-MYC e IRE1 α -HA. Después de 48 h, las células se trataron con Tm o Brefeldina A (Bref. A) en los intervalos de tiempo indicados. Extractos citosólicos totales se inmunoprecipitaron con anti-MYC-agarosa. Posteriormente realizamos WB para las proteínas de fusión HA y Myc. B) Células 293T se co-transfectaron con BI-1-MYC o con un mutante inactivo de IRE1 α (K907A) en presencia de IRE1 α marcada con VSV. Esta última carecía del dominio luminal del ER y se inmunoprecipitó y analizó por *Western Blot*.

células se trataron con Tm o Bref. A en los intervalos de tiempo indicados en la Figura 9A. La interacción entre BI-1 e IRE1 α no se vio afectada en células expuestas a estresores del RE, observándose un nivel similar de co-inmunoprecipitación como en la condiciones control (Figura 9A).

Con el objetivo de confirmar que la interacción entre IRE1 α y BI-1 no depende de la activación de IRE1 α , utilizamos una mutante inactiva de la región ARNasa de IRE1 α . Con este fin, células 293T se co-transfectaron con BI-1-MYC o con IRE-1 α WT o con la mutante inactiva de IRE1 α (K907A), ambas con la marca VSV y carentes del dominio luminal del ER. Se observó que BI-1 se asoció en forma similar con el mutante inactivo de IRE1 α (K907) e IRE1 α silvestre en experimentos de co-inmunoprecipitación (Fig. 9B).

BAK y BI-1 interactúan con IRE a través de mecanismos relacionados.

Ya que es conocido que las proteínas BAX y BAK estabilizan la forma activa de IRE1 α por una unión con este receptor, quisimos determinar si el complejo IRE1 α -BAK es o no afectado por la presencia de BI-1.

Células 293T se co-transfectaron con vectores de expresión para BAK e IRE1 α -HA en presencia o ausencia de BI-1. Posteriormente, se evaluó el efecto de BI-1 sobre la co-inmunoprecipitación de BAK con IRE1 α -HA. La co-expresión de BAK y BI-1, redujo significativamente la interacción de BAK con IRE1 α , en comparación con la interacción determinada en ausencia de BI-1. Estos resultados sugirieron que BAK y BI-1 interaccionan con IRE1 α a través de mecanismos relacionados (Fig.10).

BI-1 regula IRE1 α a través de su región C-terminal

La secuencia proteica de BI-1 está altamente conservada en distintas especies. Además, el extremo C-terminal citosólico de BI-1 está compuesto por solo 10 aminoácidos altamente conservados en mamíferos, región esencial para la regulación de la apoptosis. Para determinar la posible función del C-terminal de BI-1 en la UPR, expresamos una mutante de BI-1 donde los últimos nueve aminoácidos de la proteína se reemplazaron por alaninas (BI-1^{C9A}). Luego la interacción con IRE1 α se determinó por ensayos de co-inmunoprecipitación. Como se muestra en la figura 13A, BI-1^{C9A} no interactuó significativamente con IRE1 α . Por otro lado, realizamos controles para determinar la localización subcelular de la mutante BI-1^{C9A} utilizando inmunolocalización y co-tinción con diversos marcadores de organelos incluyendo RE/Golgi, lisosomas y núcleo. No se observaron cambios en la distribución subcelular de BI-1^{C9A} comparado con BI-1^{WT}. Ambas proteínas se localizaron en el RE, mostrando un patrón de distribución perinuclear característico del RE y Golgi. Por lo tanto, la disminución de la interacción entre BI-1^{C9A} e IRE1 α no se debe a cambios en la localización de la proteína (Fig 11B). Con el fin de analizar en más detalle el rol del extremo C-terminal de BI-1 en la UPR, utilizamos un péptido sintético idéntico a los últimos 10 aminoácidos de BI-1, el que se acopló a una región de poliarginina para aumentar su permeabilidad celular (BI-1^{C-ter}). Para determinar los posibles efectos del péptido BI-1^{C-ter} en la interacción entre BI-1 e IRE1 α , primero el complejo BI-1/IRE1 α se inmunoprecipitó y luego se incubó con diferentes concentraciones de BI-1^{C-ter} por 30 minutos.

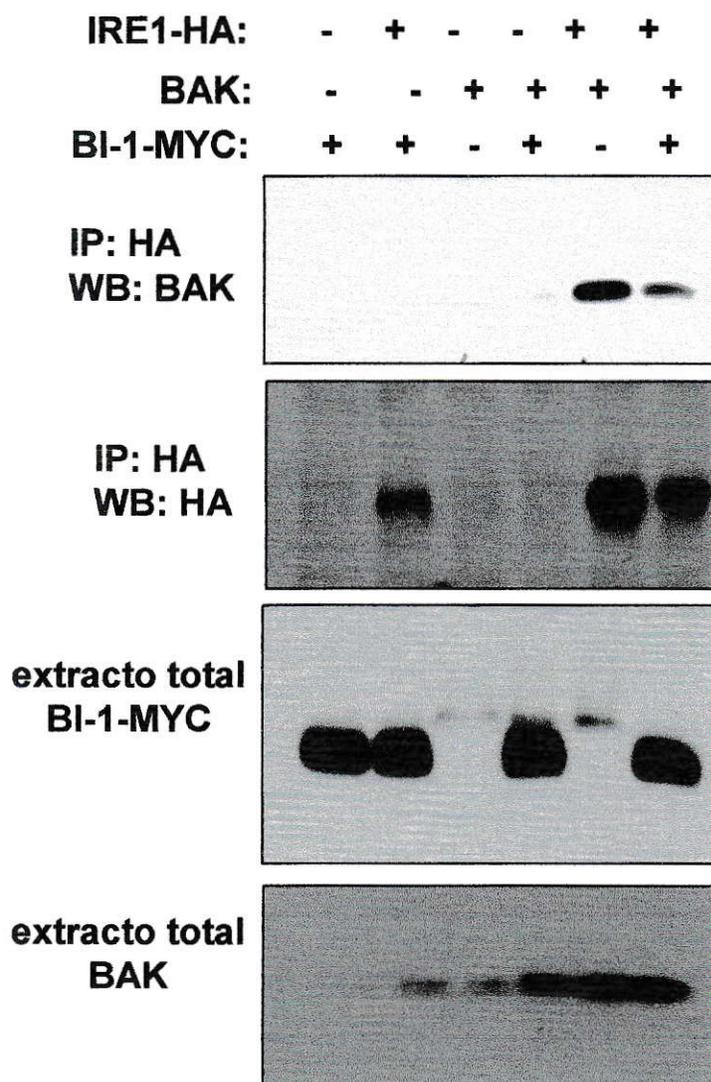


Figura 10 : BAK y BI-1 interactúan con IRE α a través de mecanismos relacionados.

Células 293T se co-transfectaron con vectores de expresión para BAK e IRE1 α -HA en presencia o ausencia de BI-1. Luego la co-IP de BAK con IRE1 α -HA se evaluó mediante Western Blot. Para evitar los efectos tóxicos de sobre-expresión de BAK, los experimentos se realizaron en presencia del inhibidor de caspasas zVAD-fmk.

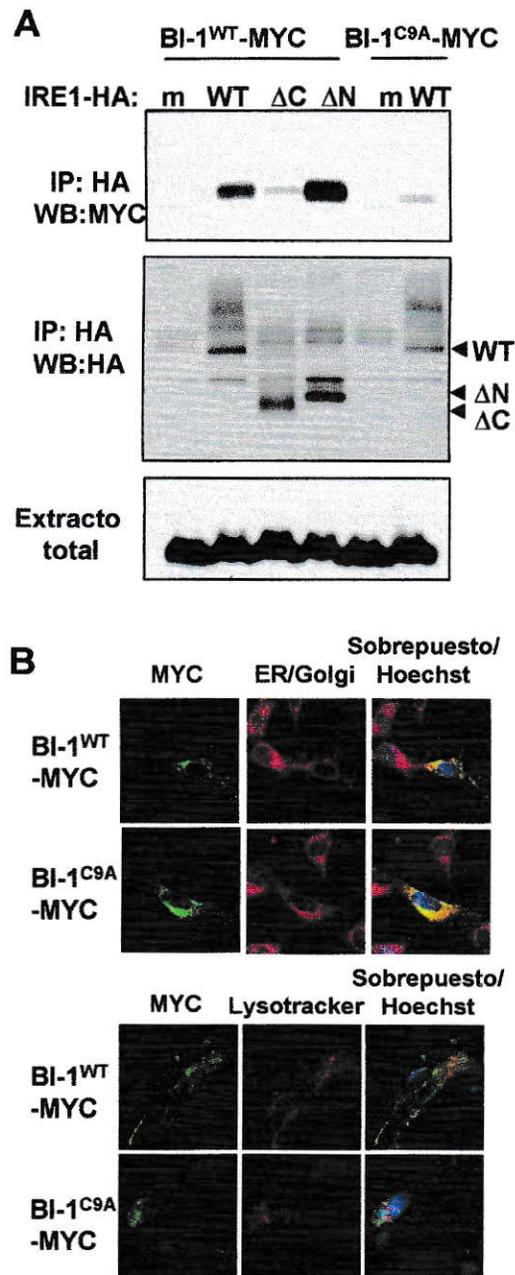


Figura 11. El dominio C-terminal de BI-1 es necesario para su interacción con IRE1 α .

Células 293T se co-transfectaron con vectores de expresión para BI-1-MYC o BI-1C9A-MYC con mutantes IRE1 α -HA WT o mutantes de deleción de IRE1 α en su dominio citosólico o luminal del ER. Transcurridas 48 h., se prepararon extractos celulares para luego inmunoprecipitar HA-IRE1 α . Posteriormente determinamos la posible interacción con BI-1 por medio de Western blot. B) La distribución subcelular de BI-1^{WT} y BI-1^{C9A} se evaluó mediante inmunofluorescencia (verde) para ver la ubicación de BI-1, co-tinción con brefeldina A-BODYPI para ver ubicación del RE/Golgi, lysotracker (rojo) para ver la ubicación de los compartimientos ácidos y Hoechst (azul) como control para ver el núcleo.

Al utilizar 150 μ M el péptido observamos una disminución clara en la interacción entre IRE1 α de BI-1^{WT}. Este resultado mostró que el péptido sintético idéntico al extremo C-terminal es capaz de competir con BI-1 del complejo con IRE1 α de una manera dependiente de su concentración (Fig.12A)

Posteriormente la actividad de BI-1^{C-ter} se evaluó en células tratadas con bajas dosis de Tm. Como se muestra en la Fig. 12B, se aumentó el procesamiento del ARNm de XBP-1 al tratar las células con el péptido BI-1^{C-ter}. Este efecto no se observó en células MEFs BI-1 KO en ninguna concentración utilizada (Fig 12B), indicando que la actividad del péptido BI-1^{C-ter} depende de la expresión BI-1 endógeno. En conjunto, estos resultados indican que BI-1 es un regulador negativo de IRE1 α y que esta regulación ocurre a través de la formación de un complejo proteico entre ambas proteínas donde participa el extremo terminal de BI-1.

Finalmente, células MEFs deficientes en BI-1 se reconstituyeron con un vector de expresión de BI-1 humano o un mutante en el que se delecionaron los últimos 10 aminoácidos BI-1 ^{Δ C} como proteínas de fusión con GFP usando vectores retrovirales (Fig. 12C). Consistentemente con la falta de interacción entre BI-1^{C9A} e IRE1 α en experimentos de co-inmunoprecipitación, la mutante carente del extremo C-terminal no logró restaurar los niveles normales de actividad de IRE1 α en células deficientes en BI-1. Sin embargo, la expresión de BI-1 humano redujo los niveles de procesamiento del ARNm de XBP-1 en células deficientes en BI-1 expuestas a estrés de RE (Fig. 12C).

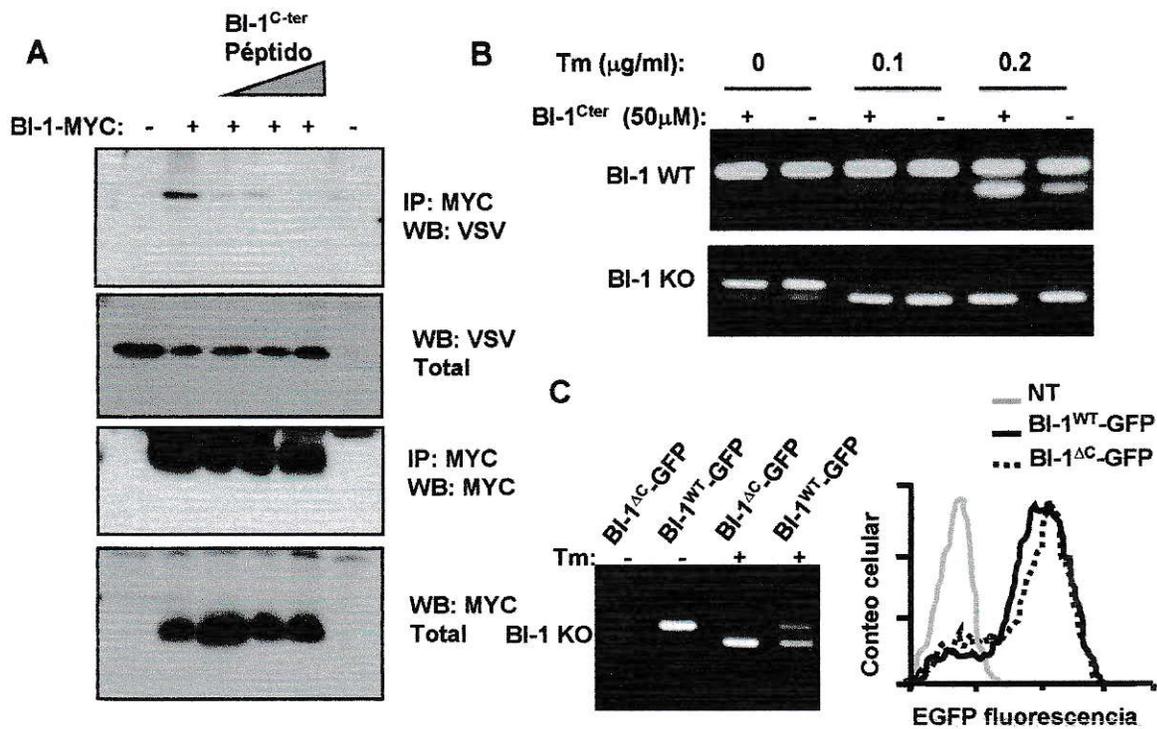


Figura 12: BI-1 regula a IRE1 α mediante su región citosólica C-terminal.

Células 293T se co-transfectaron con vectores de expresión para BI-1-MYC y VSV-dominio citosólico de IRE1 α . Después de 48 h., se prepararon extractos celulares y se realizó IP de BI-1-MYC. Los complejos proteicos inmunoprecipitados se incubaron con concentraciones crecientes de un péptido sintético idéntico en secuencia a los 10 aminoácidos del C-terminal por 30 min., y la asociación entre IRE1 α y BI-1 se midió vía Western blot. B) A partir de ADNc total, los niveles de procesamiento de ARNm de XBP-1 se determinaron en células BI-1 WT y BI-1 KO mediante RT-PCR. Estas células se trataron previamente con péptido BI-1C-term 50 μ M por 2 h. y luego con Tm 100 o 200 ng/ml por 2,5 h. C) Células deficientes en BI-1 se infectaron con retrovirus codificantes para proteínas de fusión con GFP para BI-1WT, y BI-1 Δ C. Los niveles de procesamiento del ARNm de XBP-1 se midieron después del tratamiento por 2,5 h. con tunicamicina.

BI-1 regula negativamente a IRE1 α en organismos multicelulares

Para evaluar la función de BI-1 en la regulación de la UPR en distintas especies *in vivo*, primero determinamos la susceptibilidad de respuesta a estrés en ratones BI-1 KO. Para esto utilizamos un modelo ampliamente empleado en la literatura para monitorear respuestas a estrés de RE en animales (Hetz et al., 2006). Ratones WT y deficientes en BI-1 se inyectaron intra-peritonealmente con una dosis de Tm (0.2 μ g/g de ratón) por 6h y luego los niveles de XBP-1s, ATF4, y CHOP se analizaron en extractos nucleares de hígado (Fig. 13). Los ratones deficientes en BI-1 experimentaron un fuerte aumento en los niveles de XBP-1s, comparados con los ratones WT. Sin embargo, no se observaron diferencias en la inducción de ATF4 en estas muestras, indicando que BI-1 regula específicamente la rama de IRE1 α de la UPR *in vivo*. Resultados similares se observaron cuando se analizaron los riñones de los mismos ratones, otro órgano altamente afectado por tratamiento con Tm (datos no mostrados).

La vía de IRE1 α /XBP-1 esta altamente conservada en *D. melanogaster* (Plongthongkum et al., 2007; Soud et al., 2007). En consecuencia con esto, decidimos determinar el posible efecto regulatorio de BI-1 sobre la UPR en moscas. Para esto, obtuvimos una mosca transgénica para BI-1 de la colección Bloomington (BL-16568). Luego el procesamiento del ARNm de XBP-1 se monitoreó en larvas que sobreexpresan BI-1 de *D. melanogaster*. Como modelo experimental, larvas de moscas se crecieron en medio que contenía 50 μ g/ml de Tm por 20 h y posteriormente los niveles de procesamiento del ARNm de XBP-1 se determinaron por RT-PCR en

extractos de ADNc derivados de tejido total. Como se muestra en la Figura 14, la sobreexpresión de dBI-1 disminuyó significativamente los niveles de procesamiento de XBP-1 en larvas tratadas con Tm, indicando que BI-1 también regula la vía IRE1 α /XBP-1 en invertebrados.

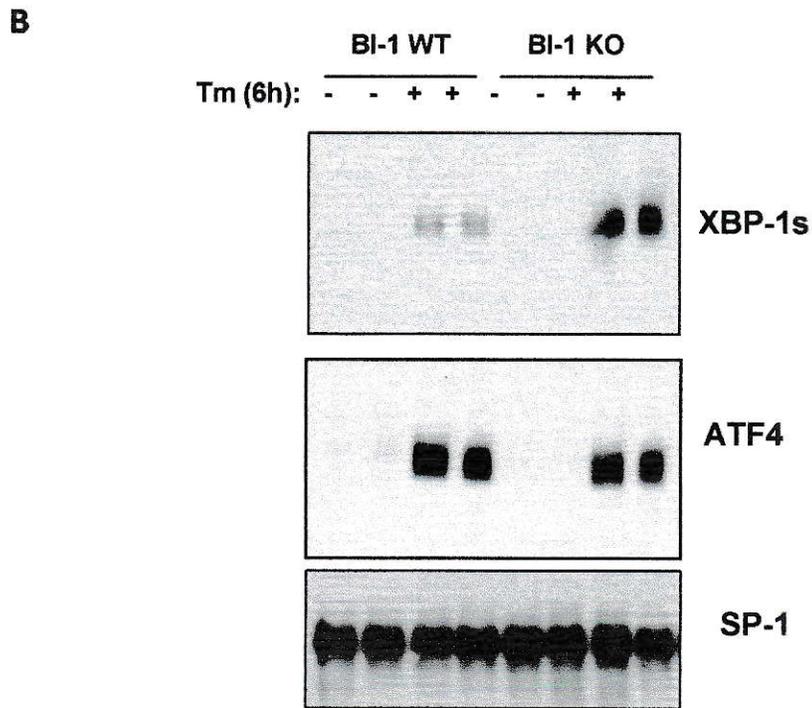
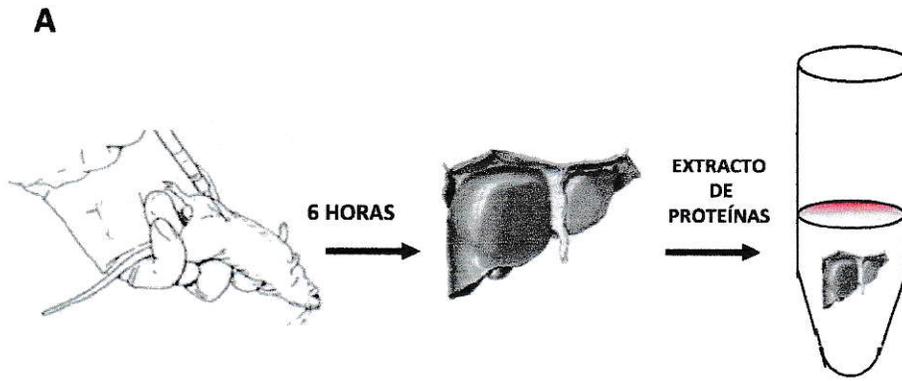


Figura 13: BI-1 regula el procesamiento del ARNm de XBP-1 en ratones *in vivo*.

A) Ratones BI-1 WT y deficientes se inyectaron intraperitonealmente con Tm 0,2 $\mu\text{g}/\text{gr}$ peso. Una vez transcurridas 6 h. desde el tratamiento, los animales se sacrificaron por narcosis de CO₂. El hígado se removió y se prepararon extractos celulares para análisis mediante WB. B) Los niveles de expresión XBP-1s, ATF4 se determinaron mediante *Western blot* de extractos nucleares. Los niveles de SP-1 nuclear se analizaron como control de carga.

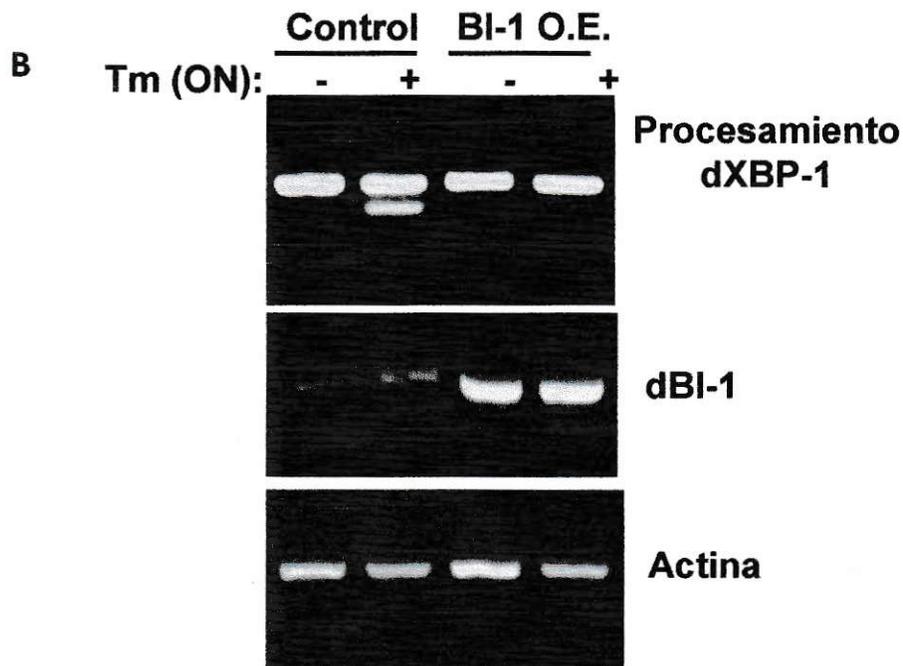
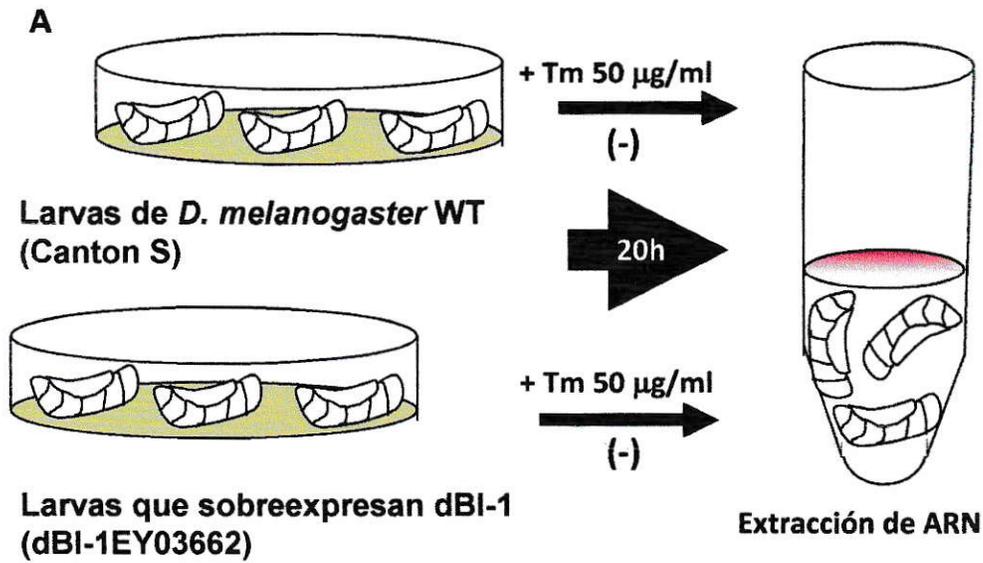


Figura 14: BI-1 regula el procesamiento del ARNm de XBP-1 en *Drosophila in vivo*.

A) Larvas de *D. melanogaster* WT (Canton S) o que sobreexpresan dBI-1 (dBI-1EY03662) se crecieron en medio estándar en presencia o ausencia de Tm 50 µg/ml por 20 h. Luego el ARN total se extrajo. B) Los niveles de ARNm de XBP-1s se determinaron por PCR. Como control la sobreexpresión de dBI-1 se midió vía RT-PCR en larvas que presentaban alelos control o alelos dBI-1EY03662. Los niveles de actina se monitorearon como control de carga.

Discusión

La familia BCL-2 juega un papel esencial en el control de la apoptosis en mamíferos, sin embargo estas proteínas no están presentes en plantas y levaduras. BI-1 es uno de los pocos supresores de la muerte celular conservados en animales y plantas. Homólogos putativos de BI-1 humano han sido descritos en otros eucariontes, plantas, bacterias e incluso virus que codifican proteínas tipo BI-1 (Chae et al., 2003; Huckelhoven, 2004). Predicciones computacionales del perfil hidrofóbico de la proteína utilizando los criterios de Kyte-Doolittle sugieren que BI-1 es una proteína integral de membrana, con 6 a 7 dominios transmembrana (Fig.3) (Xu and Reed, 1998). BI-1 posee un dominio C-terminal citosólico con características hidrofílicas, rico en lisinas, el cual es esencial para su actividad anti-apoptótica (Chae et al., 2004; Xu and Reed, 1998).

BI-1 está específicamente localizada en el RE donde controla la homeostasis del Ca^{2+} (Fig.3) (Chae et al., 2004; Westphalen et al., 2005) al igual que sus pares anti-apoptóticos de la familia BCL-2 como BCL-X_L y BCL-2 (Hetz and Glimcher, 2008). El dominio hidrofílico ubicado en el extremo C-terminal de BI-1 también es necesario para el control ejercido sobre la homeostasis del Ca^{2+} , sumándose a lo descrito para su actividad anti-apoptótica.

La familia de proteínas BCL-2 tiene un rol esencial en la regulación de las vías de apoptosis mitocondrial donde BAX y BAK son requeridas para la activación de las caspasas (Wei et al., 2001). Estudios recientes indican que varios miembros de la familia BCL-2 están también presentes en otros

organelos donde realizan funciones alternativas a las relacionadas con el control de la apoptosis (Hetz, 2007). Apoyando este concepto, recientemente nuestro laboratorio describió que BAX y BAK modulan al sensor de estrés IRE1 α en la membrana del RE (Hetz et al., 2006). Mutaciones en los dominios BH1 y BH3 de BAK, motivos críticos para la inducción de la apoptosis, interrumpen su interacción física con IRE1 α anulando sus efectos moduladores de la UPR. Hasta el momento no se han descrito otras proteínas relacionadas con apoptosis que a su vez regulen a IRE1 α . En esta tesis presentamos evidencias indicando que BI-1 interactúa con IRE1 α y que regula negativamente la vía IRE1 α /XBP-1. Células deficientes para BI-1 mostraron una hiperactivación de IRE1 α asociado con un aumento en el procesamiento del ARNm de XBP-1 y el consecuente aumento de los niveles de la proteína XBP-1s (Fig.6). Esto último, correlacionó con el incremento en su función medido por el aumento en el ARNm de los genes blanco de este factor de transcripción: Erdj4, EDEM, Sec61, Ero1, Herp y WFS1 (Fig.7).

Es importante destacar que nuestros resultados sugieren que el proceso de inactivación de IRE1 α , medido a través del procesamiento del ARNm de XBP-1, se retrasó marcadamente en las células MEFs deficientes en BI-1, indicando que BI-1 tiene una actividad inhibitoria importante sobre la actividad endonucleasa de IRE1 α (Fig. 8). La regulación de IRE1 α por BI-1 ocurrió solo a concentraciones bajas de Tunicamicina. Sin embargo, a concentraciones mayores a 1.6 μ g/ml no se observaron diferencias entre el procesamiento del ARNm de XBP-1 entre células BI-1 WT y células deficientes en BI-1 (Fig. 4 y 5). Este resultado nos permite postular que BI-1

es mas bien un modulador de la actividad de IRE1 α , y no un prerrequisito para esta actividad.

Bioquímicamente, esta regulación se evaluó mediante el análisis de la formación de posibles complejos proteicos entre IRE1 α y BI-1. Nuestros resultados indican que BI-1 forma un complejo que contiene IRE1 α . Esta asociación no se afectó por condiciones de estrés de RE (Fig.9A). Asimismo, una mutación en el dominio endonucleasa de IRE1 α no afecto su interacción con BI-1 (Fig.9B). Lo anterior nos indica que el complejo proteico entre IRE1 α y BI-1 es independiente de la activación de IRE1 α .

También determinamos a través del uso de mutantes de IRE1 α que la interacción entre IRE1 α y BI-1 es dependiente de la región citosólica de IRE1 α e independiente de la región luminal de este sensor (Fig.11). Posteriormente, se evaluó el rol del C-terminal citosólico de BI-1 en la regulación de IRE1 α mediante la utilización de un péptido sintético que contenía la misma secuencia del dominio C-terminal de BI-1 (los últimos 10 aminoácidos). Mediante el uso de este péptido logramos inhibir competitivamente la unión de BI-1 al complejo proteico con IRE1 α utilizando ensayos de inmunoprecipitación. Concentraciones crecientes del péptido desplazaron a BI-1 del complejo BI-1-IRE1 α . Del mismo modo, el efecto biológico de éste péptido se evaluó al ser incubado con las células BI-1 WT y células deficientes en BI-1. Este tratamiento produjo un aumento en los niveles de procesamiento del ARNm de XBP-1 bajo condiciones de estrés del RE. Respecto a este resultado, es posible proponer que la región C-terminal de BI-1 es esencial para regular la activación de IRE1 α en

respuesta a estrés de RE, lo cual abre la posibilidad de usar este péptido para activar artificialmente la UPR.

Luego analizamos el posible efecto de BI-1 sobre la unión de BAK a IRE1 α , un regulador positivo de este sensor. Utilizando ensayos de sobreexpresión y co-inmunoprecipitación de BAK con IRE1 α logramos observar que la expresión de BI-1 desplaza a la proteína BAK del complejo con IRE1 α , indicando que BAK y BI-1 estarían interactuando con IRE1 α a través del mismo sitio de unión (directo o indirecto) o bien, BI-1 podría alterar la conformación de IRE1 α liberando a BAK, entre otras posibilidades.

La inhibición de IRE1 α por BI-1 se comprobó *in vivo* utilizando ratones deficientes en BI-1 y en larvas de moscas que sobreexpresan el homólogo de BI-1 de *D. melanogaster*. Estos experimentos se realizaron utilizando modelos experimentales de estrés de RE *in vivo* ampliamente utilizados y validados en la literatura (Plongthongkum et al., 2007; Souid et al., 2007). Estos resultados indican fuertemente que BI-1 es un regulador importante de IRE1 α *in vivo* y que esta función está conservada en diferentes especies.

La activación de la vía IRE1 α /XBP-1 confiere protección frente al estrés del RE (Lin et al., 2007). Nuestros resultados indican que BI-1 controla negativamente la expresión de XBP-1s, lo que contrasta con su conocida actividad anti-apoptótica frente a estímulos intrínsecos de muerte, tales como privación de factores de crecimiento, estrés oxidativo y daño de ADN (Xu and Reed, 1998). De manera interesante, los efectos regulatorios de BI-1 sobre la UPR son más evidentes cuando se emplean dosis más bajas de estresores del RE a lo comúnmente usado en la literatura. Este paradigma

experimental se asemeja mucho más a condiciones fisiológicas en las cuales la UPR es normalmente activada *in vivo* como es en las células secretoras donde un procesamiento basal bajo del ARNm de XBP-1 es observado. En este sentido, dosis bajas de Tm se asemejan mas a condiciones adaptativas en la cual las células pueden sobrevivir al estrés. Altas dosis de Tunicamicina llevan al daño crónico del RE, resultando en una apoptosis celular masiva (Fig.15). De acuerdo con éste concepto, ha sido reportado que condiciones suaves de estrés del RE generan distintos procesos de señalización, donde eventos relacionados con la apoptosis, como la expresión de CHOP y fosforilación de JNK, no son observados al compararlos con las señales de estrés del RE bajo estímulos crónicos (altas dosis de estresor) (Rutkowski et al., 2006).

Actividades bifuncionales de proteínas relacionadas con la apoptosis, han sido descritas recientemente (ver revisión en (Hetz and Glimcher, 2008). A modo de ejemplo, la proteína pro-apoptótica BAD controla positivamente el metabolismo de la glucosa (Danial et al., 2003) y la secreción de insulina en células β (Danial et al., 2008), lo que contrasta con su conocida actividad pro-apoptótica. De forma similar, la expresión de la proteína pro-apoptótica BID es importante para el compromiso de sobrevivida en respuestas de reparación de ADN (Kamer et al., 2005; Zinkel et al., 2005). Finalmente, BAX y BAK también controlan la morfogénesis mitocondrial (Karbowski et al., 2006). En resumen, estos reportes indican que proteínas relacionadas con la apoptosis tienen funciones alternativas a la muerte celular, jugando un papel vital en otros procesos fisiológicos.

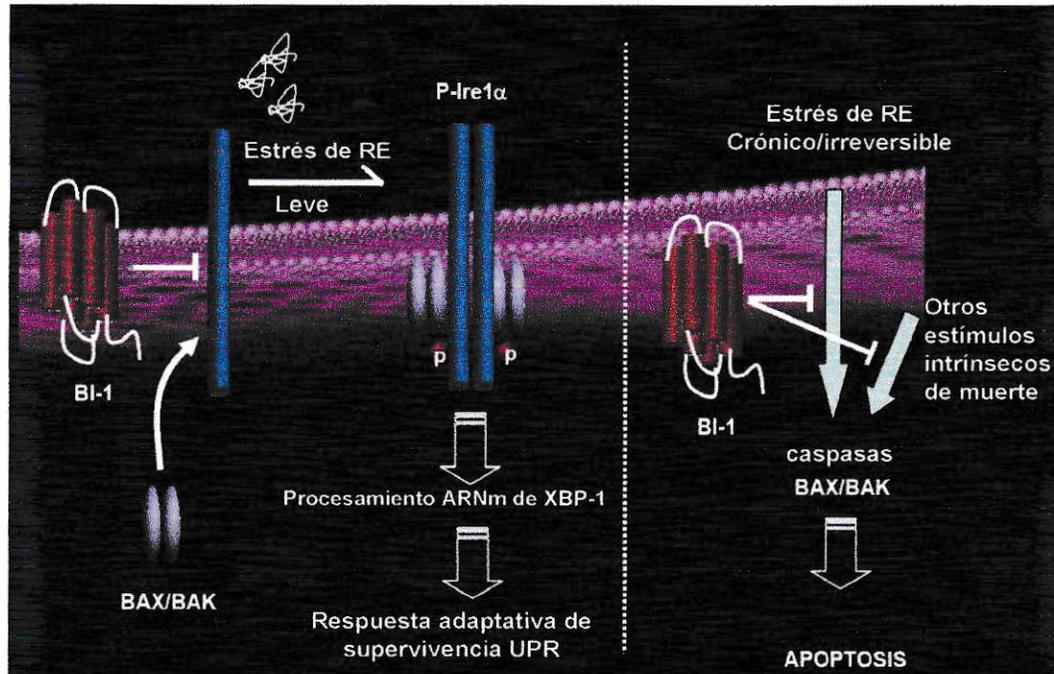


Figura 15: El papel dual de BI-1 en la regulación de la UPR y la apoptosis.

La señalización de la UPR inicia procesos de adaptación rápidos en células bajo estrés de ER. BI-1 controla negativamente la actividad de IRE1 α , posiblemente mediante asociación física con el complejo IRE α . Este fenómeno se correlaciona con el desplazamiento de BAK desde el complejo.

Cuando las células son dañadas irreversiblemente por stress de ER, entran en apoptosis. BI-1 también regula la iniciación de la activación de caspasas río-abajo, iniciado por estrés de ER y otros estímulos de muerte intrínsecos.

IRE1 α /XBP-1 es la rama más conservada de la UPR, y es la única vía que gobierna respuestas de estrés de RE en levadura. Ya que BAX y BAK no están presentes en levaduras, la adquisición de una actividad moduladora sobre la UPR puede haber aparecido en eucariontes superiores. Conocemos antecedentes que indican que no existe un efecto significativo en la activación de la UPR en levaduras deficientes para la proteína putativa tipo BI-1 de levadura (YNL305c) (datos no mostrados), lo que correlaciona con la ausencia de la región C-terminal citosólica de esta proteína en levaduras (Fig.3). Por otro lado, ha sido demostrado que la proteína YNL305c no está localizada en el RE (Huh et al., 2003) lo que sugiere que esta proteína no es un homólogo funcional de BI-1 de mamíferos.

PERK e IRE1 α comparten dominios funcionales de activación en la región luminal, similares en estructura primaria y ambos sensores son normalmente activados *in vitro* con cinéticas similares. Sin embargo, ambas proteínas son activadas diferencialmente *in vivo* por estrés fisiológico de proteínas mal plegadas. Por ejemplo, la secreción de inmunoglobulinas en los linfocitos B depende de IRE1 α y XBP-1 pero no es afectada por la deficiencia de PERK (Bertolotti et al., 2000). Nuestros experimentos muestran que en células y ratones deficientes para BI-1, la inhibición de la vía de IRE1 α es específica, sin afectar la vía de PERK. Este hallazgo nos da una idea de la especificidad y regulación fina del proceso de activación de la UPR, lo que podría ayudar a explicar la activación diferencial de esta respuesta a estrés en tejidos específicos *in vivo* donde proteínas accesorias modulan el proceso de activación de sensores de estrés particulares.

La activación de IRE1 α controla no solo el procesamiento del ARNm de XBP-1, sino también otras vías de señalización como la activación de las quinasas como JNK (Urano et al., 2000), ASK1 (Nishitoh et al., 2002), ERK (Nguyen et al., 2004), y la vía NF- κ B (Hu et al., 2006). Proteínas tales como la fosfatasa PTP-1B modulan específicamente la amplitud de la señalización de IRE1 α sin afectar a PERK (Gu et al., 2004). De forma similar BAX/BAK (Hetz et al., 2006) o AIP1 (Luo et al., 2008) regulan específicamente la rama de la UPR medida por IRE1 α . Estos antecedentes en conjunto con los resultados presentados en esta tesis sugieren que la señalización de IRE1 α es un proceso altamente regulado, controlado por la formación de un complejo proteico que nuestro laboratorio denominó previamente como UPRosoma. Estas observaciones sugieren un modelo en el cual el balance entre la expresión de proteínas anti- y pro-apoptóticas en la membrana del RE controla la amplitud de la señalización de IRE1 α , y por lo tanto modula la sensibilidad celular frente a condiciones de estrés de RE. En resumen, nuestro trabajo de tesis permitió identificar un nuevo regulador de la UPR específico sobre IRE1 α . Por otro lado, logramos demostrar a nivel molecular que BI-1 forma un complejo proteico con IRE1 α el cual es importante para la regulación del procesamiento del ARNm de XBP-1. Por último, nuestros resultados sugieren que BI-1 regula la inactivación de IRE1 α , proceso pobremente estudiado en la literatura. En resumen, mediante un estudio sistemático a diferentes niveles y mediante el uso de herramientas genéticas poderosas en dos modelos animales, proponemos que BI-1 es parte integral de la vía de señalización de IRE1 α , representando uno de los pocos

reguladores conocidos para esta vía de adaptación a estrés conservada en la evolución.

Reference List

Bailly-Maitre,B., Fondevila,C., Kaldas,F., Droin,N., Luciano,F., Ricci,J.E., Croxton,R., Krajewska,M., Zapata,J.M., Kupiec-Weglinski,J.W., Farmer,D., and Reed,J.C. (2006). Cytoprotective gene bi-1 is required for intrinsic protection from endoplasmic reticulum stress and ischemia-reperfusion injury 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 2809-2814.

Bertolotti,A., Zhang,Y., Hendershot,L.M., Harding,H.P., and Ron,D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response 2. *Nat. Cell Biol.* *2*, 326-332.

Brostrom,M.A. and Brostrom,C.O. (2003). Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability. *Cell Calcium* *34*, 345-363.

Calfon,M., Zeng,H., Urano,F., Till,J.H., Hubbard,S.R., Harding,H.P., Clark,S.G., and Ron,D. (2002). IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA 1. *Nature* *415*, 92-96.

Chae,H.J., Ke,N., Kim,H.R., Chen,S., Godzik,A., Dickman,M., and Reed,J.C. (2003). Evolutionarily conserved cytoprotection provided by Bax Inhibitor-1 homologs from animals, plants, and yeast 2. *Gene* *323*, 101-113.

Chae,H.J., Kim,H.R., Xu,C., Bailly-Maitre,B., Krajewska,M., Krajewski,S., Banares,S., Cui,J., Digicaylioglu,M., Ke,N., Kitada,S., Monosov,E., Thomas,M., Kress,C.L., Babendure,J.R., Tsien,R.Y., Lipton,S.A., and Reed,J.C. (2004). Bi-1 regulates an apoptosis pathway linked to endoplasmic reticulum stress 1. *Mol. Cell* *15*, 355-366.

Cox,J.S. and Walter,P. (1996). A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell* *87*, 391-404.

Credle,J.J., Finer-Moore,J.S., Papa,F.R., Stroud,R.M., and Walter,P. (2005). On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 18773-18784.

Danial,N.N., Gramm,C.F., Scorrano,L., Zhang,C.Y., Krauss,S., Ranger,A.M., Datta,S.R., Greenberg,M.E., Licklider,L.J., Lowell,B.B., Gygi,S.P., and Korsmeyer,S.J. (2003). BAD and glucokinase reside in a mitochondrial complex that integrates glycolysis and apoptosis 2. *Nature* *424*, 952-956.

Danial,N.N. and Korsmeyer,S.J. (2004). Cell death: critical control points 1. *Cell* *116*, 205-219.

Danial,N.N., Walensky,L.D., Zhang,C.Y., Choi,C.S., Fisher,J.K., Molina,A.J., Datta,S.R., Pitter,K.L., Bird,G.H., Wikstrom,J.D., Deeney,J.T., Robertson,K.,

Morash,J., Kulkarni,A., Neschen,S., Kim,S., Greenberg,M.E., Corkey,B.E., Shirihai,O.S., Shulman,G.I., Lowell,B.B., and Korsmeyer,S.J. (2008). Dual role of proapoptotic BAD in insulin secretion and beta cell survival 1. *Nat. Med.* 14, 144-153.

Gonzalez,T.N. and Walter,P. (2001). Ire1p: a kinase and site-specific endoribonuclease. *Methods Mol. Biol.* 160, 25-36.

Gu,F., Nguyen,D.T., Stuible,M., Dube,N., Tremblay,M.L., and Chevet,E. (2004). Protein-tyrosine phosphatase 1B potentiates IRE1 signaling during endoplasmic reticulum stress 2. *J. Biol. Chem.* 279, 49689-49693.

Hetz,C., Bernasconi,P., Fisher,J., Lee,A.H., Bassik,M.C., Antonsson,B., Brandt,G.S., Iwakoshi,N.N., Schinzel,A., Glimcher,L.H., and Korsmeyer,S.J. (2006). Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* 312, 572-576.

Hetz,C. and Glimcher,L. (2008). The daily job of night killers: alternative roles of the BCL-2 family in organelle physiology 2. *Trends Cell Biol.* 18, 38-44.

Hetz C. and Glimcher L. (2008). The UPRosome and XBP-1: mastering secretory cell function. *Curr. Immunol. Rev.* 4:1-10.

Hetz,C.A. (2007). ER stress signaling and the BCL-2 family of proteins: from adaptation to irreversible cellular damage 3. *Antioxid. Redox. Signal.* 9, 2345-2355.

Hu,P., Han,Z., Couvillon,A.D., Kaufman,R.J., and Exton,J.H. (2006). Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression 1. *Mol. Cell Biol.* 26, 3071-3084.

Huckelhoven,R. (2004). BAX Inhibitor-1, an ancient cell death suppressor in animals and plants with prokaryotic relatives 1. *Apoptosis.* 9, 299-307.

Huh,W.K., Falvo,J.V., Gerke,L.C., Carroll,A.S., Howson,R.W., Weissman,J.S., and O'Shea,E.K. (2003). Global analysis of protein localization in budding yeast 2. *Nature* 425, 686-691.

Kamer,I., Sarig,R., Zaltsman,Y., Niv,H., Oberkovitz,G., Regev,L., Haimovich,G., Lerenthal,Y., Marcellus,R.C., and Gross,A. (2005). Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response 1. *Cell* 122, 593-603.

Karbowski,M., Norris,K.L., Cleland,M.M., Jeong,S.Y., and Youle,R.J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis 1. *Nature* 443, 658-662.

Kawai-Yamada,M., Otori,Y., and Uchimiya,H. (2004). Dissection of Arabidopsis Bax inhibitor-1 suppressing Bax-, hydrogen peroxide-, and salicylic acid-induced cell death 3. *Plant Cell* 16, 21-32.

Kim,H.R., Lee,G.H., Ha,K.C., Ahn,T., Moon,J.Y., Lee,B.J., Cho,S.G., Kim,S., Seo,Y.R., Shin,Y.J., Chae,S.W., Reed,J.C., and Chae,H.J. (2008). Bax Inhibitor-1 Is a pH-dependent regulator of Ca²⁺ channel activity in the endoplasmic reticulum 1. *J. Biol. Chem.* 283, 15946-15955.

Kimata,Y., Ishiwata-Kimata,Y., Ito,T., Hirata,A., Suzuki,T., Oikawa,D., Takeuchi,M., and Kohno,K. (2007). Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins 1. *J. Cell Biol.* 179, 75-86.

Kimata,Y., Kimata,Y.I., Shimizu,Y., Abe,H., Farcasanu,I.C., Takeuchi,M., Rose,M.D., and Kohno,K. (2003). Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins 1. *Mol. Biol. Cell* 14, 2559-2569.

Laemmli,U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee,A.H., Iwakoshi,N.N., and Glimcher,L.H. (2003). XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* 23, 7448-7459.

Li,J., Lee,B., and Lee,A.S. (2006). Endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis: multiple pathways and activation of p53-up-regulated modulator of apoptosis (PUMA) and NOXA by p53 1. *J. Biol. Chem.* 281, 7260-7270.

Lin,J.H., Li,H., Yasumura,D., Cohen,H.R., Zhang,C., Panning,B., Shokat,K.M., Lavail,M.M., and Walter,P. (2007). IRE1 signaling affects cell fate during the unfolded protein response 1. *Science* 318, 944-949.

Luo,D., He,Y., Zhang,H., Yu,L., Chen,H., Xu,Z., Tang,S., Urano,F., and Min,W. (2008). AIP1 is critical in transducing IRE1-mediated endoplasmic reticulum stress response 1. *J. Biol. Chem.* 283, 11905-11912.

Nguyen,D.T., Kebache,S., Fazel,A., Wong,H.N., Jenna,S., Emadali,A., Lee,E.H., Bergeron,J.J., Kaufman,R.J., Larose,L., and Chevet,E. (2004). Nck-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-1 and regulation of cell survival during endoplasmic reticulum stress 1. *Mol. Biol. Cell* 15, 4248-4260.

Nishitoh,H., Matsuzawa,A., Tobiume,K., Saegusa,K., Takeda,K., Inoue,K., Hori,S., Kakizuka,A., and Ichijo,H. (2002). ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats 4. *Genes Dev.* 16, 1345-1355.

Plongthongkum,N., Kullawong,N., Panyim,S., and Tirasophon,W. (2007). Ire1 regulated XBP1 mRNA splicing is essential for the unfolded protein response (UPR) in *Drosophila melanogaster* 1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **354**, 789-794.

Puthalakath,H., O'Reilly,L.A., Gunn,P., Lee,L., Kelly,P.N., Huntington,N.D., Hughes,P.D., Michalak,E.M., Kimm-Breschkin,J., Motoyama,N., Gotoh,T., Akira,S., Bouillet,P., and Strasser,A. (2007). ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**, 1337-1349.

Ron,D. and Walter,P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response 1. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 519-529.

Rong,Y. and Distelhorst,C.W. (2008). Bcl-2 protein family members: versatile regulators of calcium signaling in cell survival and apoptosis. *Annu. Rev. Physiol* **70**, 73-91.

Rutkowski,D.T., Arnold,S.M., Miller,C.N., Wu,J., Li,J., Gunnison,K.M., Mori,K., Sadighi Akha,A.A., Raden,D., and Kaufman,R.J. (2006). Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins 1. *PLoS. Biol.* **4**, e374.

Schroder,M. and Kaufman,R.J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 739-789.

Shamu,C.E. and Walter,P. (1996). Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J.* **15**, 3028-3039.

Sidrauski,C. and Walter,P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response 1. *Cell* **90**, 1031-1039.

Soud,S., Lepesant,J.A., and Yanicostas,C. (2007). The xbp-1 gene is essential for development in *Drosophila* 1. *Dev. Genes Evol.* **217**, 159-167.

Szegezdi,E., Logue,S.E., Gorman,A.M., and Samali,A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep.* **7**, 880-885.

Travers,K.J., Patil,C.K., Wodicka,L., Lockhart,D.J., Weissman,J.S., and Walter,P. (2000). Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation 1. *Cell* **101**, 249-258.

Urano,F., Wang,X., Bertolotti,A., Zhang,Y., Chung,P., Harding,H.P., and Ron,D. (2000). Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1 3. *Science* **287**, 664-666.

Walter,L., Marynen,P., Szpirer,J., Levan,G., and Gunther,E. (1995). Identification of a novel conserved human gene, TEGT 1. *Genomics* 28, 301-304.

Wei,M.C., Zong,W.X., Cheng,E.H., Lindsten,T., Panoutsakopoulou,V., Ross,A.J., Roth,K.A., MacGregor,G.R., Thompson,C.B., and Korsmeyer,S.J. (2001). Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death 2. *Science* 292, 727-730.

Westphalen,B.C., Wessig,J., Leyboldt,F., Arnold,S., and Methner,A. (2005). BI-1 protects cells from oxygen glucose deprivation by reducing the calcium content of the endoplasmic reticulum 1. *Cell Death. Differ.* 12, 304-306.

Wu,J., Rutkowski,D.T., Dubois,M., Swathirajan,J., Saunders,T., Wang,J., Song,B., Yau,G.D., and Kaufman,R.J. (2007). ATF6alpha optimizes long-term endoplasmic reticulum function to protect cells from chronic stress 1. *Dev. Cell* 13, 351-364.

Xu,C., Xu,W., Palmer,A.E., and Reed,J.C. (2008). BI-1 regulates endoplasmic reticulum Ca²⁺ homeostasis downstream of Bcl-2 family proteins 1. *J. Biol. Chem.* 283, 11477-11484.

Xu,Q. and Reed,J.C. (1998). Bax inhibitor-1, a mammalian apoptosis suppressor identified by functional screening in yeast. *Mol. Cell* 1, 337-346.

Yoshida,H., Oku,M., Suzuki,M., and Mori,K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *J. Cell Biol.* 172, 565-575.

Zhou,J., Liu,C.Y., Back,S.H., Clark,R.L., Peisach,D., Xu,Z., and Kaufman,R.J. (2006). The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 14343-14348.

Zinkel,S.S., Hurov,K.E., Ong,C., Abtahi,F.M., Gross,A., and Korsmeyer,S.J. (2005). A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response 1. *Cell* 122, 579-591.