



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina

**Participación de la vía de IRE1 en el estrés de retículo
endoplásmico inducido por la ausencia de glucosa en
neuronas de corteza cerebral**

Tesis

Para obtener el título de:

Licenciado en Investigación Biomédica Básica

Presenta:

Juan Carlos Gómora García

Directora de Tesis:

Lourdes Massieu Trigo

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos Académicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la doctora Lourdes Massieu Trigo por permitirme ser parte de su grupo de trabajo y enseñarme a ser un mejor científico.

Se agradece ampliamente a la bióloga Teresa Montiel por toda su asesoría técnica, los consejos, apoyo, sabiduría y paciencia que me ha brindado, haciendo posible la realización de este trabajo.

El Apoyo económico de Ayudante de investigador por parte de la doctora Lourdes Massieu Trigo (Exp. 12630)

Este proyecto se realizó con los recursos otorgados por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN204919.

Se agradece el apoyo y la participación de la unidad de Biología Molecular y a Francisco Pérez Eugenio de la unidad de cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

Finalmente se agradece a los miembros del jurado que revisaron y enriquecieron con sus observaciones a este trabajo:

Dr. Roberto Coria Ortega

Dra. Ana Brígida Clorinda Arias Álvarez

Dra. María de Lourdes Massieu Trigo

Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg

Dr. Rudolf Marinus Buijs



Índice

Lista de Abreviaturas	3
Resumen	4
Abstract	5
Introducción	6
1.0 Retículo Endoplásmico.....	8
1.1 La Respuesta a proteínas mal plegadas.....	8
1.1.1 ATF6.....	9
1.1.2 PERK.....	9
1.1.3 IRE1.....	10
2.1 La UPR en el cerebro ¿amigo o enemigo?.....	12
2.1.1 CHOP, un blanco común de la UPR.....	12
2.1.2 Caspasa 12, un integrante controversial.....	13
2.1.3 IRE1, una espada de doble filo.....	13
Justificación	15
Pregunta Experimental	15
Hipótesis	15
Objetivo General	16
Objetivos Particulares	16
Metodología	17
<i>Cultivo celular</i>	17
<i>Tratamiento de neuronas corticales</i>	17
<i>Análisis del splicing de XBP1</i>	17
<i>qRT-PCR</i>	18
<i>Ensayos de viabilidad</i>	18
<i>TUNEL</i>	18
<i>Fraccionamiento subcelular</i>	19
<i>Co-Imunoprecipitación</i>	19
<i>Análisis mediante Inmunoblot</i>	20
<i>Análisis bioinformático de ChIP-seq</i>	20
<i>Análisis estadístico</i>	20
Resultados	21
La ausencia de glucosa induce la activación de IRE1.....	21
Inducción de CHOP en el modelo de AG y RG.....	22

La Vía de IRE1/ASK1/JNK se activa durante la fase de RG	23
La vía IRE1/ASK1/JNK participa en la muerte neuronal	24
JNK induce la muerte neuronal regulando CHOP a nivel epigenético.....	25
El procesamiento de XBP1 sucede hasta el periodo de reintroducción de glucosa	26
Dos caras. La actividad RNAsa de IRE1 participa en la adaptación y en la muerte neuronal.....	28
La actividad de RNAsa de IRE1 regula la vía de ASK1/JNK	29
La activación sostenida de IRE1 participa en la muerte neuronal apoptótica	31
Discusión	33
Figuras Suplementarias.....	39
Referencias.....	41

Lista de Abreviaturas

ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RE	Retículo Endoplásmico
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
ATF4	<i>Activating Transcription Factor 4</i>
PERK	<i>PKR - like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
IRE1	<i>Inositol - Requiring Enzyme 1</i>
KEN	<i>Kinase Extension Nuclease</i>
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
GRP78	<i>Glucose Regulated Protein 78</i>
ERAD	<i>Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation</i>
ERSE	<i>ER Stress Response Elements</i>
UPRE	<i>Unfolded Protein Response Element</i>
CHOP	<i>C/EBP Homologous Protein</i>
TRAF2	<i>TNF Receptor-Associated Factor 2</i>
ASK1	<i>Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1</i>
JNK	<i>c-Jun N -terminal Kinase</i>
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
XBP1	<i>X-box binding protein 1</i>
RIDD	<i>Regulated IRE1-Dependent Decay</i>
eIF2	<i>eukaryotic Initiation Factor 2</i>
AG	Ausencia de Glucosa
RG	Reintroducción de Glucosa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
LDH	Lactato deshidrogenasa
qRT-PCR	<i>Real Time Polymerase Chain Reaction</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling</i>
ChIP-seq	<i>Chromatin Immunoprecipitation Sequencing</i>

Resumen

Perturbaciones en la homeostasis proteica celular pueden causar la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE) y comprometer la viabilidad celular. En respuesta a este desajuste se activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) la cual es orquestado por tres proteínas transmembranales residentes del RE: IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*), PERK (*PKR -like endoplasmic reticulum kinase*) y ATF6 (*activating transcription factor 6*). Juntos inducen una reprogramación en la célula caracterizada por la atenuación de la síntesis global de proteínas y el incremento selectivo de maquinaria de plegamiento (chaperonas) y maquinaria de degradación para amortiguar la acumulación de proteínas mal plegadas. En los últimos años se ha observado que alteraciones en la proteostasis se asocian con varias enfermedades neurodegenerativas y el daño isquémico. Sin embargo, se ha encontrado que la activación de la UPR puede mejorar o empeorar estas neuropatologías, dependiendo de la intensidad y duración del estímulo estresor.

En este trabajo evaluamos la dinámica de activación y la participación de IRE1, la vía más conservada de la UPR, y su posible papel en el daño neuronal inducido por la ausencia (AG) y reintroducción de glucosa (RG). Se utilizaron cultivos primarios de neuronas corticales y se evaluó la activación y regulación de IRE1 mediante su interacción con distintos cofactores, se detectó la activación de sus vías de señalización y se evaluó su función en la sobrevivencia neuronal ante la AG/RG.

Los resultados demuestran que IRE1 se activa tempranamente por fosforilación durante la AG y forma complejos con las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK que incrementan su capacidad de cortar y degradar RNA por el mecanismo denominado decaimiento regulado dependiente de IRE1 (Regulated IRE1-Dependent Decay, RIDD). Esta interacción se sostiene durante la RG y se recluta ASK1 al complejo lo que induce la translocación de JNK al núcleo y promueve el aumento en la expresión del factor de transcripción CHOP. La activación sostenida de IRE1a través de su actividad RNasa (RIDD) estimula la muerte apoptótica regulando positivamente la vía de ASK1-JNK posiblemente debido a la degradación del mensajero del regulador negativo de ASK1, la proteína 14-3-3.

En conclusión, la vía de IRE1 se activa tempranamente durante la AG como una respuesta adaptativa a la privación de glucosa, ya que al inhibirla la muerte neuronal se exacerba. Sin embargo, su interacción sostenida con proteínas pro-apoptóticas y su actividad de RIDD, contribuyen a la muerte neuronal durante la RG.

Abstract

Disturbances in cellular proteostasis can cause misfolded protein accumulation in the endoplasmic reticulum (ER) compromising cell viability. In response, the unfolded protein response (UPR) is activated, which is orchestrated by three ER transmembrane proteins: IRE1 (enzyme 1 that requires inositol), PERK (PKR: endoplasmic reticulum kinase) and ATF6 (activator transcription factor 6). Together they induce a reprogramming of the cell characterized by the attenuation of global protein synthesis, the selective increase of folding machinery proteins and the degradation of accumulated misfolded proteins. IRE1 is the most conserved sensor of the UPR. This is a transmembrane glycoprotein showing Ser/Thr kinase and endoribonuclease (RNase) activities, capable of degrading RNAs and interacting with different proteins which activate different intracellular signaling pathways. In recent years, alterations in proteostasis have been associated with neurodegenerative diseases and ischemic injury. However, it has been found that the activation of UPR can either improve or worsen these neuropathologies depending on the intensity and duration of the stressing condition.

The aim of the present study was to evaluate the dynamics of IRE1 activation and its possible role in neuronal death induced by glucose deprivation (GD) and reintroduction (GR) in primary cortical cultures. IRE1 activation was evaluated by determining its degree of phosphorylation and its interaction with different cofactors as the pro-apoptotic proteins BAX, BAK and ASK1, which increase its capability to break and degrade RNA by the mechanism known as Regulated IRE1-Dependent Decay (RIDD). The activation of IRE1 downstream signalling pathways was also evaluated as well as their role in neuronal survival after culture exposure to GD/GR.

Results show that IRE1 is early activated by phosphorylation during GD and its interaction with BAX and BAK promotes its RIDD activity. Increased IRE1 activity persists during GR and additionally ASK1 is recruited to the complex inducing JNK translocation to the nucleus. This promotes the up-regulation of the pro-apoptotic transcription factor, CHOP. Sustained activation of IRE1 RIDD activity stimulates apoptotic death by positively regulating the ASK1-JNK pathway, which in turn induces the mRNA degradation of the negative regulator of ASK1, the protein 14-3-3. Results also show that IRE1 is early activated as an adaptive response to GD, as its inhibition exacerbates neuronal death. However, IRE-1 hyperactivation favored by its interaction with pro-apoptotic proteins, and its persistent RIDD activity, contributes to neuronal death during GR.

Introducción

El cerebro es un órgano con alta demanda energética y depende de la glucosa como principal fuente de energía. Del peso total del cuerpo humano, el cerebro representa solamente el 2 % pero para asegurar un correcto funcionamiento consume aproximadamente el 25 % de la glucosa total del cuerpo (Mergenthaler et al, 2013).

El metabolismo energético del cerebro es prácticamente oxidativo, estudios pioneros en los 1940s por Schimitt y Kety (Kety & Schmidt, 1948) y después por Sokoloff (Sokoloff, 1981) demostraron que la glucosa es el sustrato energético obligatorio del cerebro siendo metabolizado a CO₂ y agua para producir de 32 a 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada (Squire, 2013). Esta alta demanda energética se debe a la gran cantidad de energía necesaria para mantener el potencial de membrana y funciones relacionadas con la señalización.

En comparación a otros órganos la eficiencia del cerebro para almacenar sustratos energéticos como el glucógeno es baja (Obel et al, 2012) por lo que requiere del aporte continuo de oxígeno y glucosa de la circulación sanguínea para su buen funcionamiento (Siegel, 2006). Una disminución en los niveles de glucosa sanguínea puede ocasionar alteraciones en la función cerebral y provocar daño neuronal (Cryer, 2007). La disminución de los niveles de glucosa en la sangre (hipoglucemia) puede resultar de trastornos endocrinos, desórdenes hepáticos, fallas renales, desnutrición, insulinomas y principalmente de la complicación en el tratamiento con insulina en pacientes con Diabetes Mellitus tipo 1, acompañado de la falla de la respuesta contra reguladora simpato-adrenal que corrige los niveles de glucosa en sangre (Cryer, 2007).

En condiciones fisiológicas, la concentración de la glucosa en el torrente sanguíneo es de 90-100 mg/dl aumentando hasta 200 mg/dl después de la ingesta de alimentos y disminuyendo a 40-60 mg/dl durante un ayuno prolongado. Si los niveles de glucosa se mantienen en 50 mg/dl o por debajo de este valor se considera un estado de hipoglucemia (Lavin, 2002). Durante la hipoglucemia se activan diversos mecanismos para contrarrestar la disminución de los niveles de glucosa en sangre. Cuando los niveles de glucosa están por debajo de 81 mg/dl se activan respuestas fisiológicas como el decremento en la secreción de insulina. Si la concentración de glucosa continua bajando hasta 68 mg/dl se incrementa la secreción de glucagón y adrenalina del páncreas y las glándulas suprarrenales, respectivamente. La hipoglucemia moderada se presenta cuando la glucosa en plasma alcanza niveles menores a 60 mg/dl, durante este periodo se presentan una serie de síntomas críticos para la percepción del estado hipoglucémico y que se pueden dividir en dos grupos. Un grupo de síntomas denominados autonómicos o neurogénicos (sudoración, hambre, mareos, náuseas, ansiedad y temblores) provocados por la liberación de noradrenalina y adrenalina del sistema simpato-adrenal y otro grupo de síntomas denominados neuroglucopénicos (debilidad, visión borrosa, irritabilidad, confusión, dificultad para hablar y pensar) causados por la falta de glucosa cerebral. Juntos estos síntomas inducen al organismo a la ingesta de alimentos (Languren et al, 2013).

Finalmente si las respuestas fisiológicas o neurológicas no revierten la caída de glucosa en plasma se puede presentar la hipoglucemia severa. Episodios prolongados de hipoglucemia severa que llevan al estado de coma provocan deterioro cognitivo y muerte neuronal (Cryer, 2007). Aunque bajo estas condiciones se demostró que el cerebro no es igualmente sensible a la hipoglucemia, encontrándose muerte neuronal más pronunciada en zonas vulnerables como es la corteza cerebral, el hipocampo y el estriado mientras que otras zonas como el tallo cerebral y el cerebelo son más resistentes (Auer, 1986; Auer et al, 1984).

Con este descubrimiento los esfuerzos para encontrar y entender los mecanismos de la muerte neuronal hipoglucémica han incrementado importantemente, encontrándose una gran variedad de mecanismos involucrados. Uno de los primeros en ser descubiertos fue el daño excitotóxico inducido por la liberación de aminoácidos excitadores y subsecuente activación de receptores de glutamato (Wieloch, 1985). Debido a la sobre activación de estos receptores se ha observado que aumenta la entrada de calcio extracelular y la liberación de calcio del retículo endoplásmico favoreciendo diversos sistemas generadores de especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*), los cuales producen daño en varios componentes celulares (Hernandez-Fonseca et al, 2008; Paramo et al, 2010). Por otra parte, también se ha observado la activación de proteasas como la calpaína, que es dependiente de calcio, son importantes ejecutores de la muerte neuronal (Paramo et al, 2013).

Sin embargo, aún con la gran cantidad de procesos desatados por la ausencia de glucosa, el daño celular continúa durante la fase de reintroducción de glucosa. La excesiva y continua generación de ROS (Suh et al, 2007), la activación de PARP-1 (*Poly [ADP-ribose] polymerase 1*) (Suh et al, 2003) y la ejecución de una autofagia aberrante debida en parte a la sobre actividad de la calpaína (Geronimo-Olvera et al, 2017), contribuyen a la muerte neuronal progresiva después del episodio hipoglucémico. En conjunto esta información indica que el daño producido por el episodio hipoglucémico puede prolongarse y causar neurodegeneración progresiva.

La constante salida de calcio de retículo endoplásmico, la progresiva acumulación de daño celular y el estrés energético propiciado por un episodio de hipoglucemia puede también propiciar un desbalance en el control, síntesis, plegamiento y degradación de proteínas lo que lleva a una pérdida en la homeostasis proteica (proteostasis) y a la acumulación de proteínas mal plegadas dentro de la célula (Elanchezhian et al, 2012; Schonthal, 2012). Las neuronas para mantener un correcto funcionamiento requieren de una eficiente coordinación entre el plegamiento de proteínas recién sintetizadas y mecanismos de degradación para reducir la carga de proteínas mal plegadas, y así evitar la agregación anormal de éstas que puede conducir a la pérdida de sus funciones, la neurodegeneración o finalmente a la muerte neuronal (Smith et al, 2015). Para mantener una correcta proteostasis las neuronas cuentan con mecanismos que ayudan a mantener o restaurar la homeostasis proteica y finalmente sobrevivir, como es la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR).

1.0 Retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un compartimento subcelular presente en todos los eucariontes que lleva a cabo una amplia variedad de procesos como es la síntesis de lípidos y el almacenamiento de calcio, además de cumplir una función central en el plegamiento y procesamiento de aproximadamente un tercio de las proteínas nacientes (Kaufman, 1999).

El lumen del RE es una gran fábrica que gracias a su ambiente oxidante permite el correcto plegado de proteínas transmembrana o de secreción recién sintetizadas. Estas proteínas nacientes reciben un gran número de modificaciones postraduccionales que son dependientes de ATP y Ca^{2+} como son la formación de enlaces de disulfuro, N-glicosilación, proteólisis controlada y plegamiento final mediado por chaperonas (DeGracia & Montie, 2004). También hay un sistema de control de calidad para detectar y eliminar proteínas procesadas incorrectamente denominada degradación de proteínas asociada al RE (ERAD, *Endoplasmic-Reticulum-Associated Protein Degradation*), donde el péptido mal plegado es reconocido, se transporta en dirección al citosol a través del translocón del RE, se ubiquitina y se degrada en el proteosoma (Brodsky & McCracken, 1999). Como cada uno de estos procesos es crítico para el plegamiento adecuado de los péptidos nacientes, su interrupción da como resultado la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE.

1.1 La respuesta a proteínas no plegadas

El RE es particularmente sensible a las alteraciones en la homeostasis celular. Condiciones como disminución en los niveles de ATP, el desbalance en los niveles redox intra-reticulares, la salida de calcio del RE (Chen & Gao, 2002) o la alteración de cualquiera de los procesos ya mencionados arriba, son capaces de provocar un estrés en el RE. Es por eso que las células eucariontes han evolucionado y desarrollado un conjunto de vías moleculares para hacer frente a esta pérdida en la proteostasis que en conjunto se denomina respuesta a proteínas no plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*). Esta respuesta reduce la carga de proteínas no plegadas a través de varios mecanismos que incluyen la expansión de la membrana del RE, la atenuación de la síntesis global de proteínas, el incremento de la síntesis selectiva de maquinaria de plegamiento como chaperonas, y maquinaria de degradación (Xin et al, 2014).

En células de mamíferos la UPR esta orquestada por 3 proteínas transmembrana residentes del RE: ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*), PERK (*PKR - like Endoplasmic Reticulum Kinase*) e IRE1 (*Inositol - Requiring Enzyme 1*). En condiciones de homeostasis cada una de estas tres proteínas es mantenida inactiva a través de su unión con la proteína chaperona del RE GRP78 (*Glucose Regulated Protein 78*). Sin embargo bajo condiciones de estrés la acumulación de proteínas no plegadas en el RE induce la disociación de GRP78 de estas 3 proteínas transmembrana llevando a la activación de la UPR (Wang & Kaufman, 2012).

1.1.1 ATF6

El factor de transcripción ATF6 se expresa como un precursor anclado a la membrana del RE mediante un dominio transmembrana. Su extremo N-terminal ubicado en el citoplasma contiene un dominio de unión a DNA de tipo bZIP (*basic Leucine Zipper Domain*), además de contener secuencias de localización nuclear. Por otro lado, su extremo C-terminal el cual se encuentra en el lumen del RE, contiene secuencias de reconocimiento de transporte al Golgi, pero en condiciones de homeostasis, éstas se encuentran enmascaradas por la interacción con la chaperona GRP78. Cuando se induce estrés de RE, GRP78 libera y expone estas secuencias de transporte promoviendo la translocación de ATF6 al Golgi (Shen et al, 2002). En el Golgi, ATF6 sufre un procesamiento secuencial por las proteasas transmembrana S1P (*Site-1 Protease*) y S2P (*Site-2 Protease*), liberando el fragmento citosólico de ATF6 (Ye et al, 2000), el cual es transportado al núcleo donde se une a secuencias de respuesta a estrés de RE (ERSE, *ER Stress Response Elements*) induciendo la expresión de chaperonas como GRP78 y GRP94, componentes de la vía de ERAD y el factor de transcripción XBP1 (Hillary & FitzGerald, 2018). (Fig. 1)

1.1.2 PERK

PERK es una proteína transmembrana de tipo 1 localizada en el RE, que tiene actividad de cinasa de serina/treonina en su dominio citoplasmático. El dominio N-terminal ubicado en el lumen del RE está unido a la chaperona GRP78 en condiciones de homeostasis. La inducción de estrés de RE facilita la disociación de GRP78 del dominio luminal y la exposición de surcos de tipo MHC (*Major Histocompatibility Complex*) los cuales unen proteínas mal plegadas desencadenando la dimerización de PERK. Esta configuración permite su trans-autofosforilación y activación (Cui et al, 2011). Una vez activa, PERK es capaz de fosforilar la subunidad α del factor eIF2 (*eukaryotic Initiation Factor 2*) (Harding et al, 1999), subunidad reguladora del complejo de inicio de la traducción. (Fig. 1)

Para cada inicio de la traducción de una proteína, el complejo multimérico eIF2 necesita para su activación asociarse a GTP. Cuando la subunidad eIF2 α se encuentra fosforilada se une al sitio regulador de eIF2 β inhibiendo su actividad de intercambiador de guanina. Esto reduce la capacidad del complejo eIF2 para iniciar la traducción reflejándose en la célula como una disminución en la síntesis de proteínas global permitiendo así, en una situación de estrés de RE, disminuir la carga de proteínas hacia el RE.

Sin embargo, la fosforilación de eIF2 α permite la traducción selectiva de algunas proteínas, las cuales presentan en el extremo 5' no traducido de su RNA mensajero (mRNA) uno o varios marcos abiertos de lectura (uORFs, *upstream Open Reading Frame*) como es el caso de ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*), un factor de transcripción que controla los niveles de genes de supervivencia relacionados con el equilibrio redox, el metabolismo de aminoácidos, el plegamiento de proteínas y la autofagia (Ameri & Harris, 2008).

1.1.3 IRE1

Dentro de los sensores de la UPR, IRE1 es el más conservado evolutivamente encontrándose en todas las familias de eucariontes. En mamíferos existen dos homólogos de esta proteína, IRE1 α e IRE1 β . IRE1 α se expresa en todas las células y tejidos, mientras que IRE1 β se expresa específicamente en el epitelio intestinal. La señalización UPR está mediada principalmente a través de IRE1 α , y la función de IRE1 β en la UPR todavía no es clara (Wang & Kaufman, 2012).

IRE1 consiste de un dominio luminal capaz de censar proteínas no plegadas, un segmento transmembrana de un solo paso y un segmento citoplásmico que contiene dos funciones enzimáticas, un dominio de cinasa de serina/treonina y un dominio endorribonucleasa (RNAsa) de tipo KEN (*Kinase Extension Nuclease*) (Lee et al, 2008). Siendo la única proteína reportada hasta el momento que contiene una actividad RNAsa acoplada a una actividad cinasa (Abdullah & Ravanani, 2018).

Al igual que las demás vías de la UPR, en condiciones de homeostasis la fracción luminal de IRE1 se mantiene asociado a la chaperona GRP78. El aumento en la concentración de proteínas no plegadas en el RE provoca la disociación de GRP78 de IRE1, sin embargo se ha visto que la disociación de GRP78 no es indispensable para que se active IRE1 (Oikawa et al, 2007), el dominio luminal de IRE1 es capaz de censar, unir y activarse con la sola presencia de proteínas no plegadas a través hendiduras que tienen similitud estructural con dominios MHC y que presentan gran afinidad por péptidos que expongan aminoácidos básicos e hidrofóbicos (Gardner & Walter, 2011). La interacción con péptidos no estructurados induce la oligomerización, la trans-autofosforilación y la activación del dominio de RNAsa de IRE1. Cuando el dominio KEN de IRE1 se encuentra activo cataliza la escisión de un intrón de 26 nucleótidos del RNA mensajero que codifica al factor de transcripción de unión a la caja X (*xbp1*), cambiando el marco de lectura y generando la expresión de una proteína más estable con capacidad de factor de transcripción denominado XBP1 procesado (XBP1s) (Yoshida et al, 2001). Este factor de transcripción se transloca al núcleo y se une a secuencias ERSE y UPRE (*Unfolded Protein Response Element*) para inducir la expresión de genes que codifican para chaperonas residentes del RE, componentes de la vía de ERAD y genes para la biosíntesis de fosfolípidos.

En 2006 se reportó en *drosophilla melanogaster* otro mecanismo relacionado con la actividad de RNAsa de IRE1, al cual denominaron RIDD (*Regulated IRE1-Dependent Decay*) (Hollien & Weissman, 2006), y el cual también se encuentra conservado en levaduras (Kimmig et al, 2012), mamíferos (Han et al, 2009) y plantas (Mishiba et al, 2013). La actividad de RIDD degrada mRNA que contienen una secuencia consenso similar al sitio de corte de XBP1 (Moore & Hollien, 2015). Esta actividad se sugiere que puede servir como mecanismo adicional para limitar la traducción de proteínas previniendo la sobrecarga del RE. Es más, esta actividad puede ser un mecanismo de la UPR mucho más antiguo evolutivamente de lo que se pensaba ya que en *Schizosaccharomyces pombe*, el cual no tiene un ortólogo de XBP1, la activación de

IRE1 ante un estrés de RE no induce una reprogramación transcripcional, es la activación de RIDD que contiene con el desbalance en la homeostasis del RE (Kimmig et al, 2012). Aún con esta información la participación de la actividad de RIDD en mamíferos no se comprende del todo.

Con respecto a la actividad de cinasa el único sustrato que se conoce que fosforila IRE1 es a sí mismo, pero esta activación permite la interacción de IRE1 con TRAF2 (*TNF Receptor-Associated Factor 2*), una proteína de andamiaje que recluta a la cinasa ASK1 (*Apoptosis Signal-Regulating Kinase 1*) resultando en la activación de JNK (*c-Jun N-terminal Kinase*) (Fig. 1). La señalización a través de esta ruta puede desencadenar la autofagia mediante la activación de beclin-1 (Ogata et al, 2006), un regulador esencial de la autofagia.

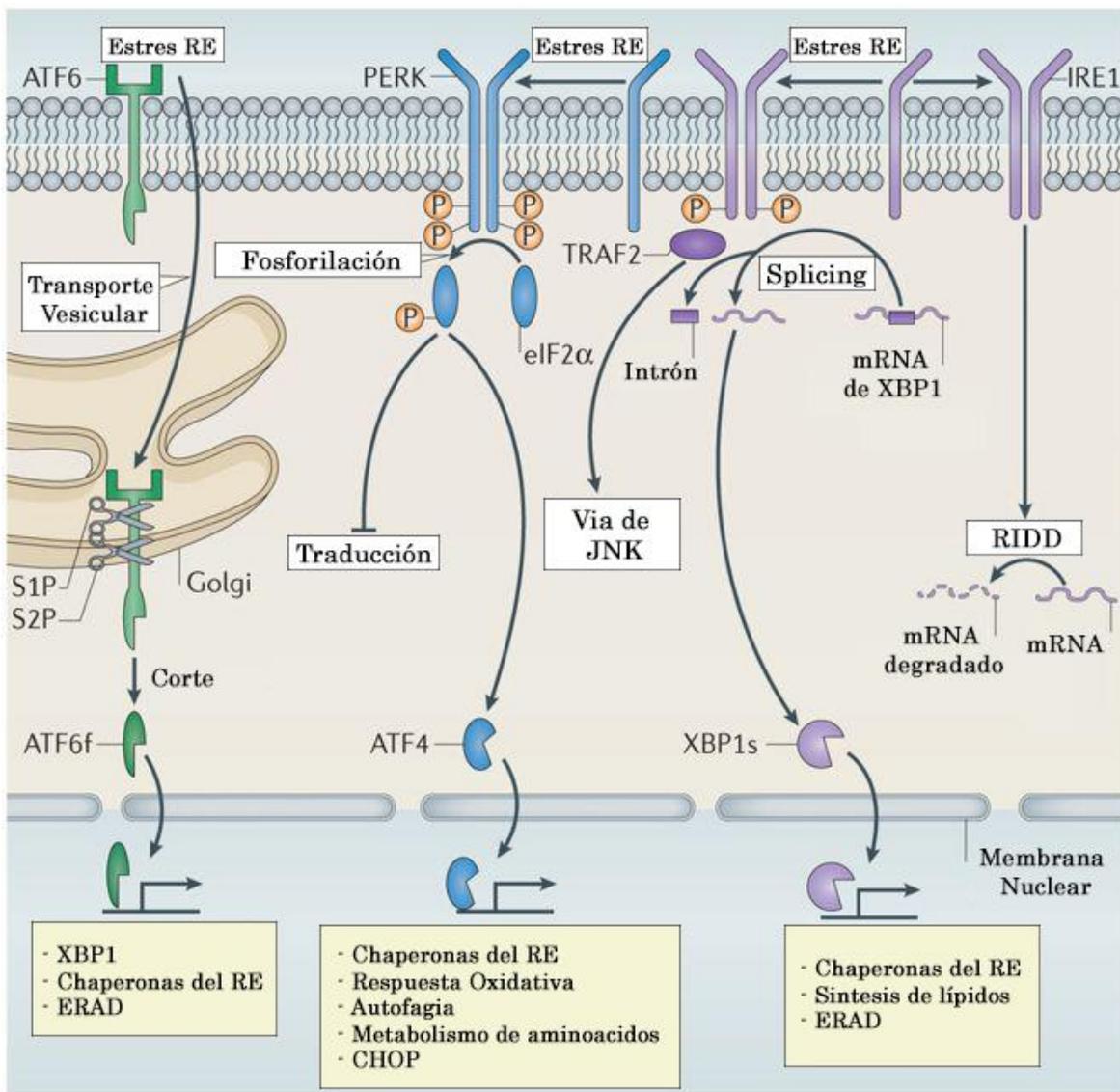


Figura 1. Señalización de la UPR en mamíferos. La respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) es una respuesta adaptativa en células de mamífero encargada de recuperar la homeostasis celular mediante la reducción de la carga de proteínas mal plegadas en el RE. Está orquestada por tres proteínas

transmembrana residentes del RE que censan el ambiente de plegamiento: ATF6 (*activating transcription factor 6*), PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) e IRE1 (*inositol-requiring enzyme 1*). Juntos inducen una reprogramación en la célula caracterizada por la atenuación de la síntesis global de proteínas y el incremento selectivo de la maquinaria de plegamiento (chaperonas) y maquinaria de degradación (ERAD y Autofagia). Modificado de (Hetz & Mollereau, 2014).

2.1 La UPR en el cerebro ¿amigo o enemigo?

Hasta el momento se conoce que la UPR confiere a las células una respuesta adaptativa importante ante la pérdida en la proteostasis transfiriendo información sobre el estado de plegamiento de las proteínas en el lumen del RE al núcleo y al citosol, para amortiguar las fluctuaciones en la carga de proteínas mal plegadas. Sin embargo cuando las células se enfrentan a un estrés del RE irreversible o prolongado estas vías son capaces de activar la muerte celular programada (Hetz, 2012).

2.1.1 CHOP, un blanco común de la UPR

Uno de los componentes más estudiados de la UPR que inducen la apoptosis es la proteína CHOP (*C/EBP Homologous Protein*) también conocido como DDIT3 (*DNA Damage-Inducible Transcript 3*). Esta proteína es un factor de transcripción que normalmente es inducido por estrés genotóxico, señales de interrupción de crecimiento y condiciones de estrés reticular. El promotor del gen *chop* contiene secuencias de unión para los tres factores de transcripción de la UPR, sin embargo solo ATF6 y ATF4 se han demostrado experimentalmente que inducen la expresión de CHOP (Xu et al, 2005).

CHOP promueve la muerte celular a través de varios mecanismos, uno de ellos es desregulando el delicado balance de proteínas de la familia BCL2 (*B-cell lymphoma 2*), una familia de proteínas que regulan procesos de permeabilización mitocondrial y constituyen un punto clave en la vía intrínseca de apoptosis celular. CHOP regula negativamente a la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (McCullough et al, 2001) y positivamente a las proteínas pro-apoptóticas BIM (Puthalakath et al, 2007) y PUMA (Galehdar et al, 2010).

Por otra parte CHOP se ha implicado en la muerte celular por estrés oxidativo ya que induce transcripcionalmente la expresión de ERO1 (Marciniak et al, 2004), una oxidasa residente del RE que en condiciones de estrés de RE prolongado promueve una hiperoxidación del lumen y salida de calcio del RE, activando vías de muerte dependientes de calcio (Li et al, 2009). Múltiples investigaciones han observado que el incremento en la expresión de esta proteína se relaciona con la muerte neuronal inducida en modelos de ausencia y reintroducción de glucosa (Maier et al, 2014; Wang et al, 2012). Además ratones CHOP -/- sufren menos pérdida de tejido neuronal después de un evento de isquemia/reperfusión (Tajiri et al, 2004) indicando así la participación de este mediador del estrés de RE en la muerte neuronal in vivo.

2.1.2 Caspasa 12, un integrante controversial

La familia de las proteasas de cisteína implicadas en la muerte celular mejor conocidas como caspasas tiene un integrante en particular que induce apoptosis durante el estrés de RE. La caspasa 12 es una proteína que se encuentra como zimógeno asociado al lado citoplasmático del RE y se ha encontrado que se activa de manera específica ante el estrés de RE (Nakagawa et al, 2000).

Esta caspasa puede ser activada después del corte por la calpaína durante alteraciones de la homeostasis de calcio intracelular. Se ha demostrado que la activación de la calpaína, una familia de proteasas dependientes de Ca^{2+} , desempeña un papel clave para generar una caspasa 12 activa en la lesión cerebral isquémica y el daño neuronal inducido por ausencia de glucosa (de la Cadena et al, 2014; Nakagawa & Yuan, 2000). Además también se ha observado que la caspasa 12 puede auto-activarse a través de una interacción directa con IRE1 y el adaptador TRAF2 (Yoneda et al, 2001). Con respecto a sus blancos, una vez activa la caspasa 12 puede cortar y activar a la caspasa 9 de manera independiente de Apaf1 (Rao et al, 2002), el mediador habitual de la activación de la caspasa 9. Sin embargo se ha encontrado que la caspasa 7 puede procesar y activar a la caspasa 12 independientemente del estímulo apoptótico (Rao et al, 2001), es por eso que aún hay mucha controversia con respecto a su activación y los blancos que proteoliza para inducir la muerte celular durante el estrés de RE.

2.1.3 IRE1, una espada de doble filo

Aparte de su rol en la atenuación del estrés de retículo endoplásmico, se ha demostrado en eucariontes que el estado de oligomerización de IRE1 y su interacción con diversas proteínas modulan su actividad, haciéndolo participe en múltiples procesos celulares como diferenciación, represión del ciclo celular y apoptosis (Abdullah & Ravanan, 2018). Esto hace a IRE1 una proteína versátil y modulable que determina el destino celular.

Recientemente se ha sugerido que IRE1 regula el destino celular dependiendo de la amplitud y la duración de su activación. Se ha encontrado que en condiciones de estrés prolongado la actividad RIDD de IRE1 induce la degradación de RNA mensajeros de sobrevivencia y de micro RNA que reprimen genes pro-apoptóticos. De hecho, la actividad RNAsa de IRE1 (el procesamiento del mRNA de XBP1 y la actividad de RIDD) se han asociado con efectos opuestos en el destino celular. Estudios en mamíferos indican que el corte de XBP1 tiene una función más de sobrevivencia, mientras que la actividad de RIDD tiene un destino apoptótico (Maurel et al, 2014). Sin embargo, queda por aclarar cómo se regula la actividad RNAsa de IRE1 que lleve a la muerte o a la adaptación de la célula en condiciones de estrés de RE.

IRE1 es capaz de inducir la muerte a través de otras rutas, una de ellas es la interacción con TRAF2 (Urano et al, 2000). Esta interacción recluta a ASK1 para formar

un complejo ternario IRE1/TRAF2/ASK1 el cual activa a JNK (Nishitoh et al, 2002). Tanto ASK1 como JNK son cinasas de serina/treonina integrantes de la familia de las MAPK que se activan por condiciones de estrés y que están íntimamente relacionadas con la muerte celular. JNK activo es capaz de promover la muerte apoptótica inactivando la proteína anti-apoptótica Bcl-2 (Yamamoto et al, 1999) y activando a las proteínas pro-apoptóticas BIM (Lei & Davis, 2003) y BAX por fosforilación (Tsuruta et al, 2004). Además, recientemente se ha demostrado que JNK es capaz de adentrarse al núcleo y fungir como regulador epigenético induciendo la expresión de genes de diferenciación y de muerte celular (Tiwari et al, 2011), sin embargo la regulación de las diversas funciones de JNK aún no se comprende bien a la fecha. Lo que sí se sabe, es que existe una creciente evidencia que confirma la participación de esta vía de las MAPK como mediador crítico en la inducción de la apoptosis por diversos inductores de estrés RE; tanto la inhibición de JNK como la deficiencia de ASK1 han mostrado una protección ante la muerte neuronal en condiciones de estrés de RE (Choi et al, 2010), isquemia (Zhu et al, 2012) y enfermedades neurodegenerativas (Nishitoh et al, 2002), por lo que la atenuación de esta vía puede desempeñar un papel neuroprotector en diversas neuropatologías como el coma hipoglucémico.

TRAF2/ASK1 no son las únicas proteínas que se ha encontrado que interaccionan con IRE1, se ha demostrado que varias proteínas se asocian físicamente con IRE1 y que modulan su actividad. Dentro de estos reguladores están incluidos las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK, la chaperona de choque térmico HSP72, la fosfatasa PTP1B (*protein-tyrosine phosphatase 1B*) y las proteínas relacionadas con las MAPK como la proteína AIP1 (*ASK1-interacting protein 1*) y JIK (*JNK-inhibitory kinase*). Estas proteínas mejoran la señalización de IRE1 regulando el estado de oligomerización y la actividad enzimática de IRE1. Por el contrario, la proteína JAB1 (*JUN activation domain-binding protein 1*) y BI-1 (*BAX-inhibitor 1*) atenúan la actividad de IRE1 (Hetz, 2012). Aunque aún se desconoce mucho sobre esta compleja dinámica de asociación y disociación de cofactores con IRE1, la gran cantidad de moduladores sugiere que existe una regulación fina en la actividad de IRE1 y que es fundamental en el destino de las células al determinar la adaptación y la supervivencia al estrés de RE o la eliminación de células dañadas irreversiblemente.

Justificación

El asegurar una adecuada proteostasis requiere de un control preciso de síntesis, plegamiento y degradación de proteínas siendo el retículo endoplásmico el organelo fundamental donde se lleva a cabo esta compleja regulación de la homeostasis proteica. Cualquier perturbación en estos procesos puede causar la acumulación de proteínas mal plegadas y comprometer la viabilidad neuronal. En respuesta a este desajuste se activa la UPR cuya finalidad es amortiguar la acumulación de proteínas mal plegadas.

En los últimos años se ha observado que alteraciones en la proteostasis se asocian con varias neuropatologías con alteraciones cognitivas (Buffington et al, 2014), enfermedades neurodegenerativas (Martinez et al, 2018) y muerte neuronal inducida por isquemia (DeGracia & Montie, 2004) . Además se ha encontrado que la activación de la UPR puede mejorar o empeorar estas neuropatologías (Hetz & Mollereau, 2014) sugiriendo que dependiendo del grado o duración del estrés, la UPR puede ayudar a la adaptación de la neurona o llevarla a la muerte. En el caso particular la vía de IRE1 parece ser de las tres mencionadas, la vía más modulable en una situación de estrés de RE y que podría determinar el destino celular. Estudios previos han demostrado que la UPR (de la Cadena et al, 2014) y en específico la vía de IRE1 (Badiola et al, 2011) se activan durante la ausencia de glucosa, sin embargo aún se desconoce si la activación de esta polifacética vía contribuye a la sobrevivencia o la muerte neuronal.

Pregunta

¿Cuál es la participación de la vía de IRE1 en el daño neuronal inducido por la ausencia de glucosa?

Hipótesis

El estrés energético inducido por la ausencia y reintroducción de glucosa (AG/RG) desencadenará la activación sostenida de la vía de IRE1 contribuyendo con el daño neuronal.

Objetivo General

Determinar la participación de la vía de IRE1 en el estrés de RE inducido por la AG/RG, y su contribución a la sobrevivencia o la muerte neuronal.

Objetivos Particulares

- Analizar la activación de la vía de IRE1 en cultivos de neuronas corticales sometidas a la AG/RG.
- Determinar la contribución de las diversas vías que se desencadenan por la activación de IRE1 a la muerte neuronal inducida por la AG/RG.
- Estudiar el mecanismo por el cual IRE1 contribuye o no a la muerte neuronal inducida por la AG/RG

Metodología

- *Cultivo celular*

Cultivos primarios de neuronas de corteza se prepararon a partir de embriones de ratas Wistar de 17-18 días de gestación. Después de la disección, el tejido de 10-12 cortezas fue cortado en un rebanador, incubados en una solución de tripsina al 0.25 % y disgregados pasándolo por una malla en una solución con DNAsa e inhibidor de tripsina al 0.08 % y 0.52 %, respectivamente. Las células se resuspendieron en medio Neurobasal con 25 mM de glucosa (Gibco) suplementado con 1% de B27, 1% de B27 Minus AO, 0.5 mM de L-glutamina y 20 µg/ml de gentamicina (Sigma).

Las células se sembraron en cajas precubiertas con poli-L-lisina (5 µg/ml) a una densidad de $2.2 \times 10^5/\text{cm}^2$. Las células se mantuvieron durante 8 días in vitro (DIV) a 37 °C en una atmósfera húmeda de 5% de CO₂ / 95% de aire. Cuatro días después de sembrar las células se añadió citosina arabinosa a una concentración final de 1 µM para inhibir la proliferación de las células gliales.

- *Tratamiento de neuronas corticales*

A los 8 DIV se retiró el medio Neurobasal y las células se expusieron a medio libre de glucosa DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) durante diferentes periodos de tiempo (periodo de AG, ausencia de glucosa); finalizado este periodo el medio libre de glucosa es sustituido por el medio con el que inicialmente las células fueron sembradas (periodo de RG, reintroducción de glucosa).

Las células se trataron con el inhibidor de la actividad RNAsa de IRE1 (STF-083010, 30 y 60 µM), el inhibidor de ASK1 (MSC 2032964A, 1 µM) y el inhibidor de JNK (SP600125, 10 µM) durante la AG o la RG.

- *Análisis del splicing de xbp1*

Después de los tratamientos se extrajo RNA total con el reactivo TRIZOL (Invitrogen). El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de ARN con el uso del kit de High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un termociclador de la siguiente manera: 25 °C durante 10 min, 37 °C durante 120 min y 85 °C durante 5 min. Los siguientes oligos fueron usados para Xbp1: forward 5'- ACACGCTTGGGGATGAATGC - 3', reverse 5'- CCATGGGAAGATGTTCTGGG - 3'. El protocolo de amplificación fue: 95°C por 10 min, 40 ciclos de 95°C por 30 seg y 60°C por 1 min, por último se dejó una extensión final de 5 min a 72°C. Los productos fueron analizados por electroforesis en un gel de agarosa al 3 %. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizado bajo luz UV. (Fig. Suplementaria 2)

- *qRT-PCR*

El RNA total se extrajo con el reactivo TRIZOL (Invitrogen). El cDNA se sintetizó a partir de 2 µg de ARN con el uso del kit de High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). La reacción se llevó a cabo en un termociclador de la siguiente manera: 25 °C durante 10 min, 37 °C durante 120 min y 85 °C durante 5 min. Se utilizaron 50 ng de cDNA para cada reacción y se usó el termociclador de tiempo real StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems). Las secuencias de los oligos utilizados para tubulina, Chop, Xbp1 procesado (Xbp1s) y no procesado (Xbp1u) fueron:

Xbp1s: 5'-TCAGACTACGTGCGCCTCT - 3', 5'- CTCTGGGGAAGGACATTTGA - 3';
Xbp1u: 5'- CTGAGTCCGCAGCAGGTG - 3', 5'-TAGCAGACTCTGGGGAAGGA - 3';
Chop: 5'- GAAAGCAGAAACCGGTCCAAT - 3', 5'- GGATGAGATATAGGTGCCCCC - 3';
14-3-3 theta: 5'- AGGACTGACAGCACATTTGG - 3', 5'- GAAAGGAAACCCCAAGAAA - 3';
α-Tubulina: 5'- GATCTGATGTATGCCAAGCG - 3', 5'- TCCACAGAATCCACACCAAC - 3'.

La expresión de *α-Tubulina* fue utilizada como gen normalizador.

- *Ensayos de viabilidad*

MTT

Como índice de sobrevivencia celular se evaluó la formación de la sales de formazán a partir de la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) que es un indicativo de la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales en células vivas. Después de 2 h de AG y 22 h de RG las células se incubaron con MTT 150 µM durante 1 h a 37 °C; terminado la incubación se retiró el medio y se añadió isopropanol- HCL para solubilizar las sales de formazán precipitadas. La absorbancia del formazán se midió con un espectrómetro de luz visible a 570 nm. La viabilidad celular se expresa como porcentaje de la reducción del MTT con respecto al control.

Liberación de LDH

Como indicativo de muerte celular se cuantificó la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) liberado al medio de cultivo. Después de la exposición a 2 h AG y 22 h de RG se colecto medio de cultivo de las células tratadas y se añadió a un buffer de K₂HPO₄/KH₂PO₄ (50 mM, pH 7,5) con NADH (9.4 mM). Para iniciar la reacción se añadió piruvato (20 mM) a la mezcla y se cuantificó la disminución de la fluorescencia del NADH a 340 nm después de 5 min en un espectrofotómetro. Los datos se expresan como porcentaje de actividad LDH en el medio respecto al control. La actividad de LDH en cultivos control no expuestos a AG se normalizó a 0%.

- *TUNEL*

Las células se sembraron en cubreobjetos y se expusieron a 2 horas de AG y a distintos tiempos de RG en presencia o ausencia de los fármacos. Después de los tratamientos se lavaron las células con PBS y se fijaron por 20 min con paraformaldehído al 4%. Después fueron bloqueados con una solución de H₂O₂ al 3 % en metanol durante 10 min a temperatura ambiente. Terminado el bloqueo, se lavaron las células con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1 % y citrato de sodio al 0.1 % en hielo por 2 min. En seguida se agregó la mezcla de reacción de TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit, TMR Red*; Roche Diagnostics) a 37 °C por una hora cubiertas de la luz. Finalmente las células se tiñeron con Hoechst 0.001% en PBS y los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos. Las células se observaron en un microscopio con una lámpara de fluorescencia. Con el objetivo de 60x se contabilizaron 7 campos diferentes de cada condición. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas a TUNEL con respecto al número total de células presentes en cada condición.

- *Fraccionamiento subcelular*

Las células se cultivaron en cajas de 60 mm. Después del tratamiento, las células se lavaron con PBS 0.1 M frío, se recolectaron en buffer A (sacarosa 0,25 M, EDTA 1 mM, HEPES 20 mM, KCl 10 mM, MgCl₂ 1,5 mM, Triton X-100 al 0.1%, DTT 1 mM y 2 mg/ml de inhibidor de proteasas), se transfirieron a un tubo eppendorf, se agitaron suavemente en un rotor durante 10 min a 4 °C y se centrifugaron a 1000 g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se recuperó a un nuevo tubo, esta fracción se tomó como el extracto citoplasmático. El sedimento se lavó y se resuspendió en buffer de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, Triton X-100 al 1%, desoxicolato sódico al 0,5%, SDS al 1% y 2 mg/ml de inhibidor de proteasas), esta porción se tomó como la fracción nuclear.

- *Co-inmunoprecipitación*

Después del tratamiento las células se lavaron con PBS 0.1 M frío y se resuspendieron en buffer de IP (Tris-HCl pH 7.5 20 mM, EDTA 1 mM, NaCl 20 mM, Triton 1 %) con 2 mg/ml de inhibidor de proteasas (Complete, Roche). Se cuantificó proteína por el método de Lowry y se incubaron 200 µg de proteína con el anticuerpo contra IRE1 (Cell Signaling) toda la noche a 4 °C. Posteriormente se incubó con perlas de proteína A-sefarosa (Sigma) por 2 horas a 4 °C. Terminada la incubación se lavaron tres veces las perlas con buffer C (NaH₂PO₄ 0.02 M, NaCl 0.15 M, pH 8). Las perlas se resuspendieron en Lamelli con 10% de B-Mercaptoetanol y calentadas por 10 min. El sobrenadante fue utilizado como el inmunoprecipitado y cargado en geles de SDS-PAGE.

- *Análisis mediante Inmunoblot (Western blot)*

Las células cultivadas en cajas de 35 mm se expusieron a 2h de AG y a distintos tiempos de RG. Después de los diferentes tratamientos, las células se lavaron con PBS 0.1 M enfriado con hielo y se lisaron con un buffer de lisis que contenía: Tris-HCl pH 8.0 50 mM, NaCl 150 mM, Triton X-100 1%, desoxicolato sódico 0.5%, SDS 1% y 2 mg/ml de inhibidor de proteasas (Complete, Roche); se centrifugaron a 1500 g a 4 °C durante 5 min. La concentración de proteína se determinó por el método de Lowry y se separaron 30 µg de proteína en geles de SDS-PAGE, posteriormente se transfirieron a membranas de PVDF de 0.45 µm (Merck Millipore). Las membranas fueron bloqueadas con una solución de leche descremada al 5 % en buffer TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM y Tween 20 al 0.1 %) durante 1 h a temperatura ambiente y con agitación. Los anticuerpos primarios se incubaron durante 24 h a 4 °C. Los siguientes anticuerpos primarios usados y sus diluciones fueron: IRE1 (1:1000, Cell Signaling), p-IRE1 S724 (1:1000, Abcam), XBP1 (1:500, Santa Cruz), CHOP (1:500, Santa Cruz) GRP78 (1:16000, Abcam), JNK (1:1000, Cell Signaling), ASK1 (1:2000, Cell Signaling), p-ASK1 S967 (1:1000, Cell Signaling), H1.0 (1:1000, Abcam), BAX (1:1000, Merck Millipore), BAK (1:1000, Cell Signaling), GAPDH (1:16000, Cell Signaling), Actina (1:8000, Merck Millipore). Para la detección de los anticuerpos primarios se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón de cabra acoplados a la enzima peroxidasa, se detectó la inmunoreactividad mediante el sustrato HRP quimioluminiscente (Merck Millipore).

- *Análisis bioinformático de ChIP-seq*

Los datos de ChIP-seq para JNK usados en este trabajo provienen de la base de datos GEO (*Gene Expression Omnibus*) con el nombre de acceso GSE25533; estos resultados fueron obtenidos del trabajo: *A chromatin-modifying function of JNK during stem cell differentiation (Tiwari et al, 2011)*. Los datos fueron visualizados en el programa Genome Data Viewer del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*).

- *Análisis estadístico*

Los datos obtenidos se presentan como la media +/- el error estándar de al menos tres experimentos independientes. Posteriormente se analizaron estadísticamente usando ANOVA de una vía seguido de la prueba de Fisher con significancia estadística de $p < 0.05$ en el software GraphPad Prisma 6.

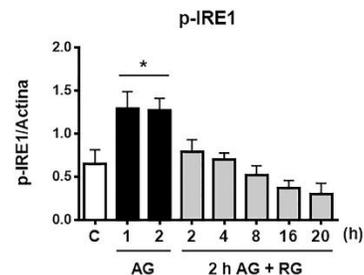
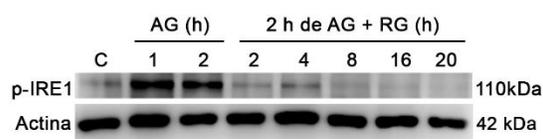
Resultados

La ausencia de glucosa induce la activación de IRE1

Para analizar la activación de IRE1 durante la ausencia o la reintroducción de glucosa (AG/RG) se cuantificó el estado de fosforilación de IRE1 mediante inmunoblot. La fosforilación de IRE1 ocurre cuando existe un estrés de retículo endoplásmico, esta fosforilación permite que se active su actividad de RNAsa. Se utilizó un anticuerpo específico que reconoce a IRE1 fosforilado en la serina 724, una serina importante para su activación (Prischi et al, 2014). Se observó que IRE1 fosforilado aumenta significativamente con respecto al control durante las 2 horas de ausencia de glucosa (AG) y vuelve a niveles control durante el periodo de reintroducción de glucosa (RG) (Fig. 2A), esto parece indicar que la AG induce un estrés en el retículo endoplásmico que activa la vía de IRE1.

Debido a que IRE1 es una proteína con un gran número de cofactores que inducen su activación y modulan su señalización se determinó investigar la dinámica de interacciones (interactoma) de IRE1 mediante un curso temporal de coimmunoprecipitaciones de IRE1 con otras proteínas. Las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK, se ha encontrado que son esenciales para la activación de IRE1 en condiciones de estrés de RE (Hetz et al, 2006). Tanto BAX como BAK aumentan su interacción con IRE1 durante la fase de AG, los cuales continúan durante la fase de RG, desde las 4 hasta las 20 h (Fig. 2B). Por otro lado, ASK1 es una cinasa de las MAPK que interactúa indirectamente con IRE1 a través de la proteína adaptadora TRAF2; ésta interacción permite la activación de la vía de JNK mediada por IRE1. El experimento de coimmunoprecipitación reveló que ASK1 se asocia con IRE1 solo en la fase de RG (Fig.2B). En conjunto, estos resultados indican que IRE1 mantiene una activación sostenida desde la AG hasta la fase de RG.

A



B

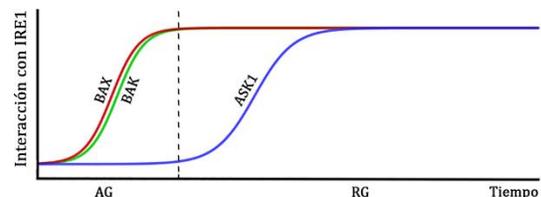
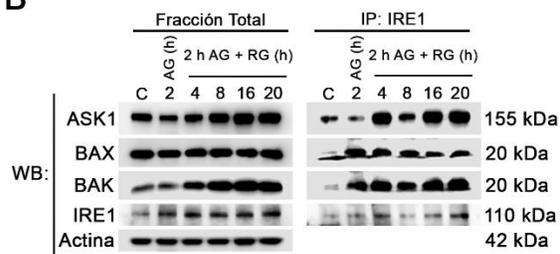


Figura 2 Activación e interactoma de IRE1 en el modelo de AG/RG. **A)** Western Blot representativo y cuantificación de p-IRE1/actina; n=4, * p<0.05 vs control. **B)** Análisis de la interacción de BAK, BAX y ASK1 con IRE1 mediante coimmunoprecipitación y detectados con inmunoblot. Inmunoblots representativos y esquema de la cinética de interacción de BAX, BAK y ASK1 con IRE1 a lo largo de la AG y RG. h = horas.

Inducción de CHOP en el modelo de AG y RG

El estrés crónico y la activación sostenida de IRE1 puede resultar en la muerte celular apoptótica. CHOP es un factor de transcripción fuertemente relacionado con la apoptosis en condiciones de estrés de RE al promover la expresión de genes pro-apoptóticos como BIM y PUMA, e inhibir la expresión de Bcl2, un gen anti-apoptótico (Yang et al, 2017). Es por tal razón que nos dimos a la tarea de investigar si CHOP se inducía en nuestro modelo. Mediante qRT-PCR se observó que existe un aumento significativo con respecto al control del mensajero de *Chop* desde las 8 horas de la fase de RG (Fig. 3A). Además mediante el fraccionamiento subcelular se observó que este aumento en el mensajero correlaciona con la presencia de la proteína CHOP en el núcleo y en el citoplasma a partir de la misma hora de la RG (Fig. 3B), sugiriendo que este factor de transcripción puede estar fungiendo como inductor de la muerte neuronal debido al estrés crónico ocasionado por la AG/RG.

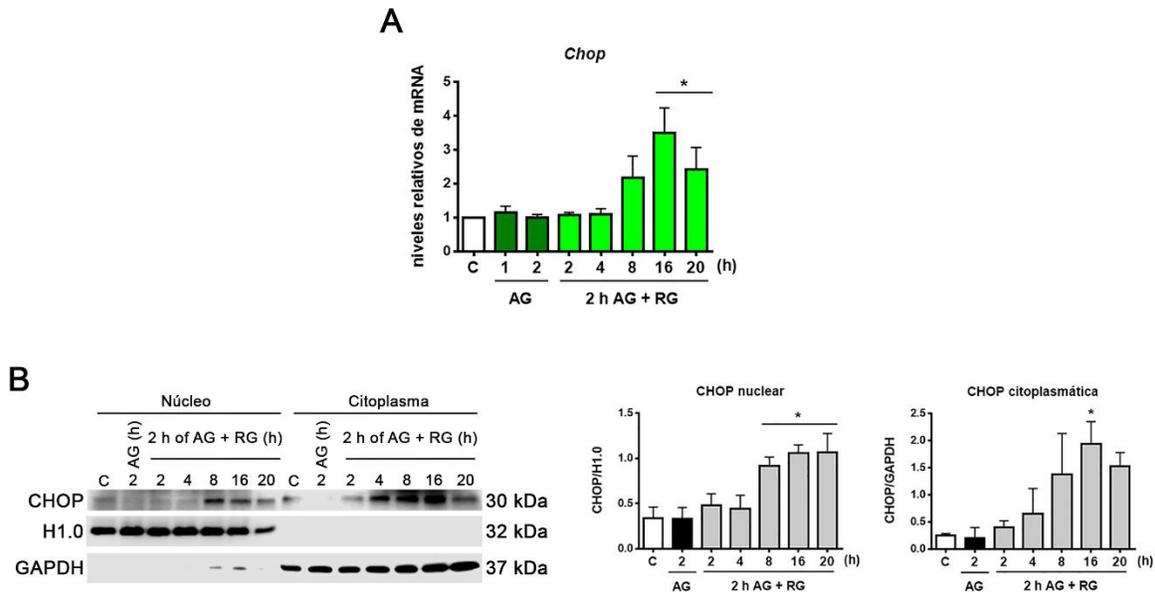


Figura 3 Inducción de CHOP en el modelo AG y RG. **A)** Expresión del gen *Chop* por qRT-PCR en neuronas corticales expuestas a AG/RG; n=3, * p<0.05 vs control. **B)** Análisis de la localización de CHOP mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificación de CHOP en el núcleo y citoplasma; n=3, * p<0.05 vs control. h = horas.

La vía de IRE1/ASK1/JNK se activa durante la fase de RG

Para descifrar si la activación sostenida de IRE1 induce la muerte neuronal ante el estrés energético se investigaron sus diferentes vías de señalización. Primero, al observar que ASK1 se encuentra interaccionando con IRE1 se determinó investigar la vía de ASK1/JNK. ASK1 es una cinasa que se encuentra inactiva constitutivamente en las células, su fosforilación en la serina 967 es esencial para la asociación de ASK1 con la proteína 14-3-3 y la supresión de su actividad, por lo que una disminución en esta fosforilación indica un aumento en su actividad. Mediante Western blot se determinaron los niveles de esta fosforilación y se observó que disminuye significativamente contra el control en la fase de RG (Fig. 4A). Este resultado sugiere que la interacción de esta cinasa con IRE1 aumenta su actividad durante el periodo de RG. Al conocer que ASK1 se activa, se investigó la fosforilación de su blanco principal, la cinasa JNK. Recientemente se ha observado que JNK es capaz de ingresar al núcleo, unirse a promotores e inducir la expresión de genes relacionados con muerte celular (Tiwari et al, 2011), es por esta razón que se determinó investigar si JNK ingresa al núcleo y si esta translocación es mediada por ASK1.

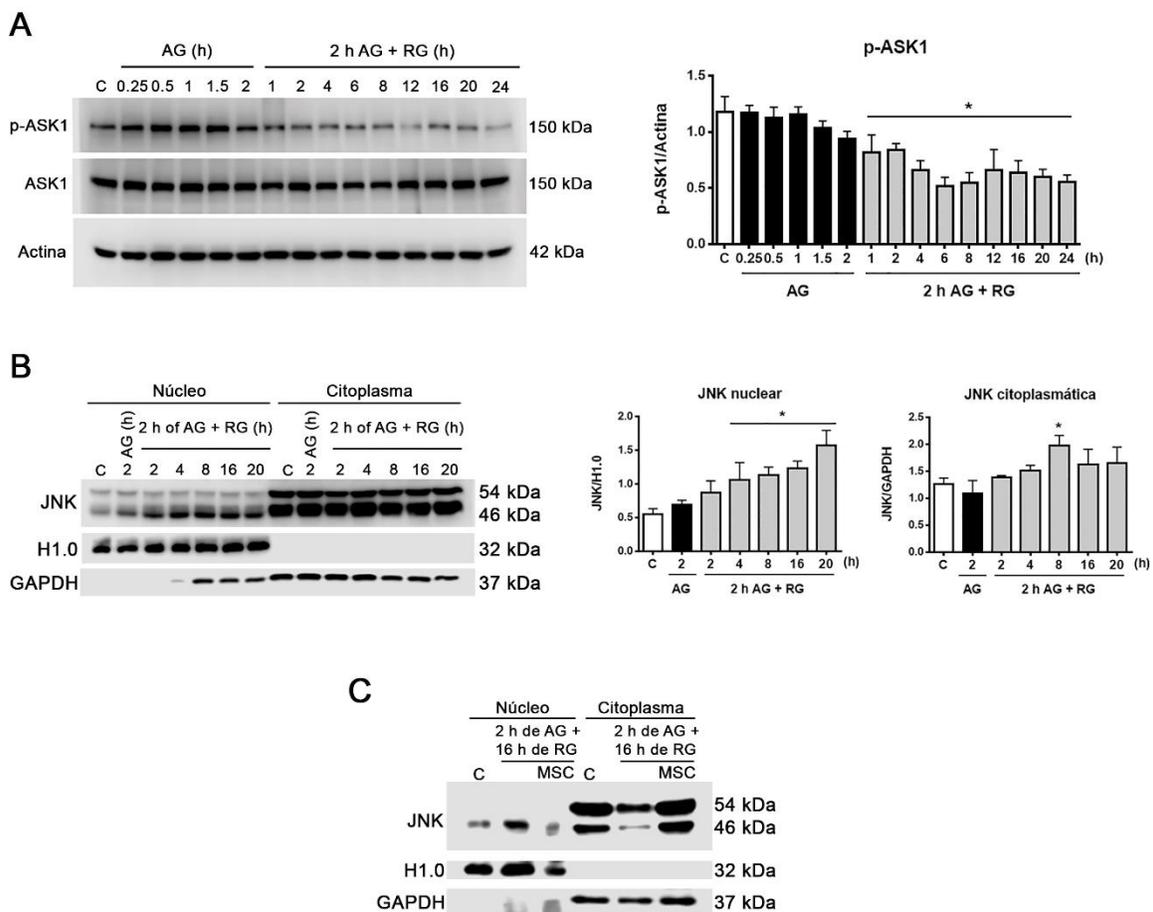


Figura 4 La activación de la vía ASK1/JNK ocurre durante la RG. **A)** Análisis de la fosforilación de ASK1 en la S967 mediante western blot. Inmunoblot representativo y cuantificación de p-ASK1/actina; n=3, * p<0.05 vs control. **B)** Análisis de la localización de JNK en las neuronas corticales expuesta a AG/RG

mediante fraccionamiento subcelular. H1.0 (histona H1) se usó como control de proteína nuclear y GAPDH como control de proteína citoplasmática. Inmunoblot representativo y cuantificaciones de JNK en el núcleo y citoplasma; n=3, * p<0.05 vs control. C) La translocación de JNK al núcleo es mediada por ASK1. Análisis de la localización de JNK en presencia del inhibidor de ASK1 (MSC 2032964A, 1 μ M); n=3, * p<0.05 vs control, & p<0.05 vs 2h AG +16h RG. h = horas.

Se utilizó un anticuerpo que reconoce las 3 variantes de JNK (*JNK1*, *JNK2* y *JNK3*) las cuales después de ser analizadas en un gel de poliacrilamida se distribuyen predominantemente en dos pesos: 46 y 54 kDa. Mediante el fraccionamiento subcelular se observó que al menos una de las variantes de JNK incrementa su translocación al núcleo después de las 4 horas de la fase de RG (Fig. 4B) y esta translocación es revertida al utilizar el inhibidor MSC 2032964A (MSC), un inhibidor específico contra la cinasa ASK1 (Fig. 4C). Estos resultados sugieren que la vía IRE1/ASK1 induce la translocación de JNK al núcleo y la posible regulación a la alza de genes pro-apoptóticos.

La vía IRE1/ASK1/JNK participa en la muerte neuronal

Los resultados descritos arriba sugieren que la vía de IRE1/ASK1/JNK puede contribuir a la muerte neuronal. Para comprobar esta hipótesis se utilizó el inhibidor de ASK1 (MSC) y se determinó la viabilidad celular mediante dos ensayos. Con el ensayo de LDH se midió la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa liberada al medio por las células muertas, y con el ensayo de MTT se monitoreó indirectamente la viabilidad mediante la actividad metabólica de las células vivas. Al utilizar el inhibidor MSC durante la fase de RG se observó una neuroprotección ante el daño producido por la AG/RG, al disminuir la liberación de LDH y aumentar la reducción de MTT (Fig. 5A). Estos resultados sugieren así que la activación de ASK1 mediada por IRE1 contribuye a la ejecución de la muerte neuronal durante la fase de RG.

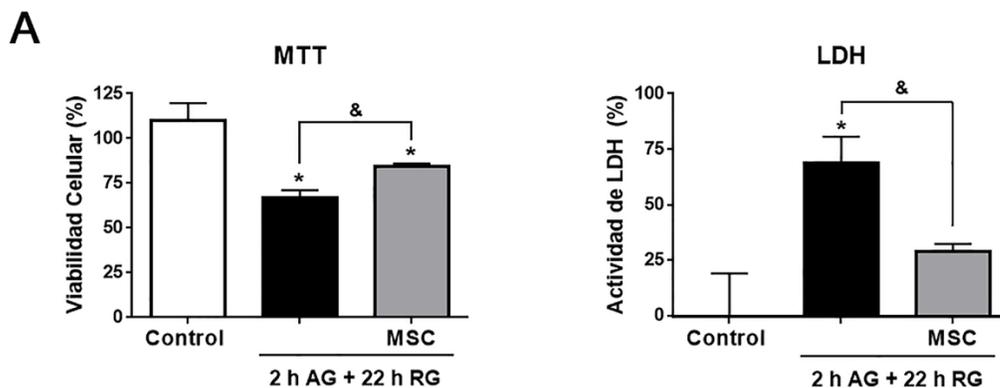


Figura 5 La inhibición de ASK1 durante la RG reduce la muerte neuronal inducida por la AG/RG. **A)** Reducción de MTT y actividad de LDH de neuronas corticales expuestas a 2h de AG y 22h de RG en presencia o ausencia del inhibidor de ASK1 (MSC, 1 μ M) durante la RG; n=3, * p<0.05 vs control, & p<0.05 vs 2h AG + 22h RG. h = horas.

JNK induce la muerte neuronal regulando CHOP a nivel epigenético

Al observar que la vía de IRE1/ASK1/JNK participa en la muerte neuronal se determinó investigar el posible mecanismo o vía de acción. Varios trabajos han observado que inhibir la actividad de JNK correlaciona con una disminución en los niveles de CHOP en condiciones de estrés de RE (Choi et al, 2010; Xin et al, 2014) y como se mencionó anteriormente, recientemente se descubrió que JNK tiene una función epigenética al unirse en la zona promotora de diversos genes, fosforilar la serina 10 de la histona 3 (H3S10) e inducir la expresión de estos genes (Tiwari et al, 2011). Es por tal motivo que se propuso la hipótesis de que JNK es capaz de regular epigenéticamente a CHOP. Para contestar esta posibilidad, se realizó un análisis bioinformático del gen *Ddit3* (nombre del gen que transcribe a la proteína CHOP) con los datos de ChIP-seq contra JNK de neuronas glutamatérgicas diferenciadas publicados en la base de datos GEO del NCBI. Utilizando el programa Genome Data Viewer se observó que JNK se encuentra enriquecido en la zona reguladora del gen *Ddit3* sugiriendo que es capaz de regular su expresión. Sin embargo, esta inmunoprecipitación de cromatina fue realizada en una condición sin estrés del RE. Para confirmar que JNK regula la expresión de *Chop* en nuestro modelo se realizó una qRT-PCR de neuronas tratadas con el inhibidor de JNK (SP600125, 10 μ M) durante la RG. Se observó una clara disminución en los niveles de *Chop* en las células tratadas con el inhibidor de JNK (Fig. 6B) sugiriendo que JNK induce la muerte neuronal a través de la regulación epigenética de *Chop* además, el inhibidor de ASK1 también disminuyó los niveles de *Chop* (Fig. 6B) reforzando la idea que ASK1 regula la actividad de JNK. En conjunto estos datos sugieren que la activación de la vía IRE1/ASK1 induce la muerte neuronal regulando a la alza a CHOP.

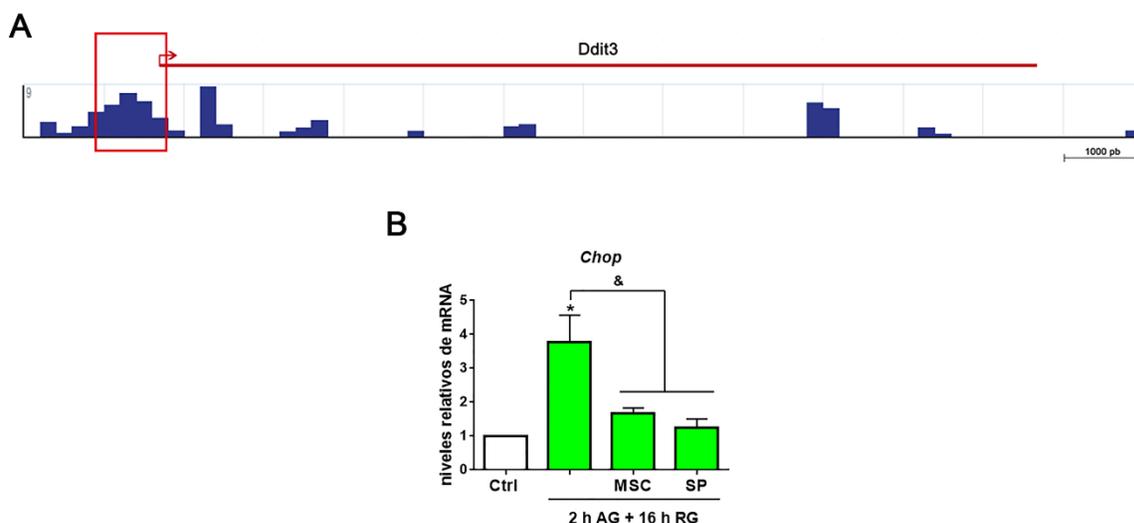


Figura 6 JNK regula a CHOP a nivel epigenético **A)** ChIP-seq contra JNK del gen *Ddit3* visualizado en el programa Genome Data Viewer. Recuadro rojo: región promotora del gen *Ddit3*. **B)** Reducción de los niveles de *Chop* en neuronas corticales tratadas con el inhibidor de JNK (SP, 10 μ M) o el inhibidor de ASK1 (MSC, 1 μ M) durante la RG expuestas a 2h de AG y 22h de RG; n=3, * p<0.05 vs control, & p<0.05 vs 2h AG + 16h RG. h = horas

El procesamiento de XBP1 sucede hasta el periodo de reintroducción de glucosa

Hasta el momento se ha investigado que la activación sostenida de la vía de ASK1/JNK mediada por IRE1 participa en la muerte neuronal inducida por la ausencia de glucosa, sin embargo, retomando los resultados obtenidos con la coimmunoprecipitación, se observó igualmente que las proteínas BAX y BAK mantienen una interacción continua con IRE1 sugiriendo que su actividad de RNAsa se activa durante la AG/RG. La activación de la capacidad RNAsa de IRE1 permite cortar un intrón de 26 nucleótidos en el mRNA del gen de *Xbp1* provocando un cambio en el marco de lectura lo cual llevará a que se traduzca una proteína con función transcripcional. Para determinar si existe el corte de *Xbp1* en el modelo de AG/RG se realizó una PCR usando oligos que delimitan el intrón, por lo que se amplificara tanto la variante procesada (*Xbp1s*) y no procesada (*Xbp1u*) (Fig. Suplementaria 2). Después de correrlos en un gel de agarosa se observó la aparición de *xbp1* procesado hasta las últimas horas de RG (Fig. Suplementaria 3) indicando que la actividad RNAsa de IRE1 se activa hasta la RG.

Para corroborar este resultado se realizó un qRT-PCR con oligos diseñados específicamente para cada uno de las dos variantes de *Xbp1* (Fig. Suplementaria 4). Se observó que *xbp1u* disminuye a las 2 horas de AG sugiriendo que IRE1 está cortándolo pero en el mismo tiempo no se vio un aumento de *Xbp1s*. De manera inesperada *Xbp1* procesado aumenta sus niveles hasta las 8 horas de la RG (Fig. 7A). Para confirmar que los cambios en los niveles de *Xbp1* son debido al procesamiento por IRE1, se utilizó un inhibidor específico contra la actividad RNAsa de IRE1 denominado STF-083010 (Papandreou et al, 2011). Después de ser tratadas las neuronas con el inhibidor durante la RG, se observó mediante qRT-PCR que el inhibidor STF revirtió el aumento en los niveles de *Xbp1s* (Fig. 7B) confirmando así que IRE1 corta este mensajero durante la RG.

Al determinar que existe el corte de *Xbp1* se investigó la presencia del factor de transcripción XBP1 en el núcleo mediante el fraccionamiento subcelular. Se observó que XBP1 aumenta su translocación al núcleo en las últimas horas de la RG (Fig. 7C). Esto correlacionó con el aumento en los niveles de la proteína GRP78 (Fig. 7D), un gen regulado por XBP1. Estos resultados indican que el corte y la señalización de XBP1 se dan hasta la fase de reintroducción de glucosa.

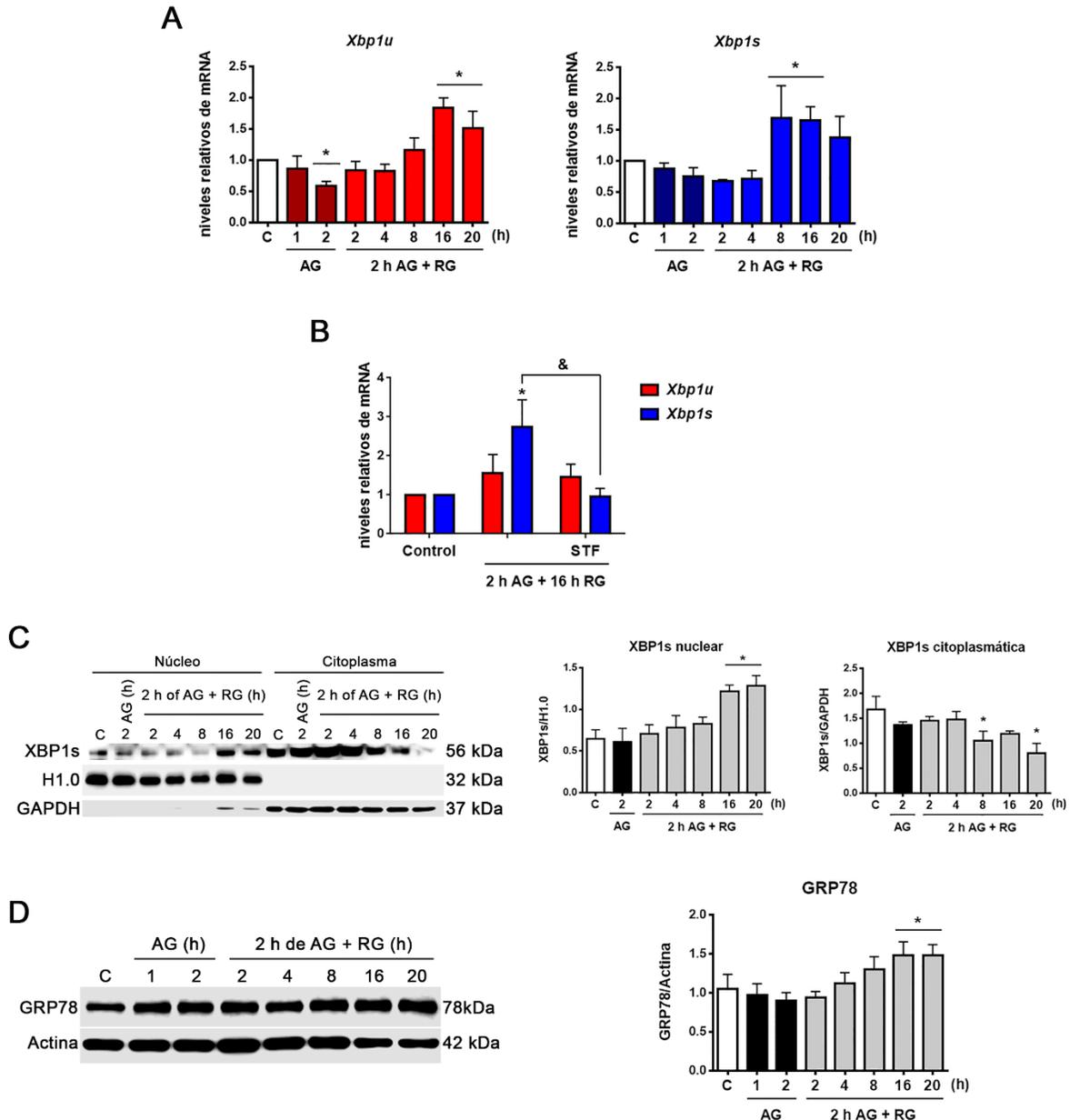


Figura 7 Dinámica de la activación de la vía de XBP1 en el modelo AG y RG. **A)** Expresión de *Xbp1u* y *Xbp1s* por qRT-PCR en neuronas corticales expuestas a AG y RG; n=3, * p<0.05 vs control. **B)** Efecto de la inhibición de la actividad RNasa de IRE1 en la expresión de *Xbp1u* y *Xbp1s*. El inhibidor STF (30 μ M) fue incubado durante la RG; n=3, * p<0.05 vs control, & p<0.05 vs 2h AG + 16h RG. **C)** Análisis de la localización de XBP1 procesado (XBP1s) mediante fraccionamiento subcelular. Inmunoblot representativo y cuantificaciones de XBP1s en el núcleo y citoplasma; n=3, * p<0.05 vs control. **D)** Expresión de GRP78 en neuronas corticales expuestas a AG y RG. Inmunoblot representativo y cuantificación; n=5, * p<0.05 vs control. h = horas

Dos caras: La actividad RNAsa de IRE1 participa en la adaptación y en la muerte neuronal

Los resultados descritos arriba sugieren que la activación de IRE1 ocurre rápidamente en respuesta a la ausencia de glucosa pero la señalización a través de XBP1 se da hasta la fase tardía de reintroducción de glucosa. Para poder determinar la participación de la actividad de RNAsa de IRE1 en la sobrevivencia neuronal se utilizó el inhibidor STF. Al incubar el inhibidor durante la AG se observó que hubo una disminución significativa en la viabilidad celular con respecto a las neuronas expuestas a la AG/RG aunque solo en el ensayo de MTT (Fig. 8A), esto podría indicar que la actividad de RNAsa de IRE1 durante la ausencia de glucosa contribuye a la adaptación y sobrevivencia neuronal. Pero cuando se incubó el inhibidor durante la fase de RG hubo mayor viabilidad celular al aumentar la reducción de MTT y disminuir la actividad de LDH en el medio. Además se usaron dos concentraciones del inhibidor STF y se observó que su efecto es dependiente de la dosis (Fig. 8B) indicando así que la actividad de RNAsa de IRE1 está participando en la muerte neuronal durante la reintroducción de glucosa.

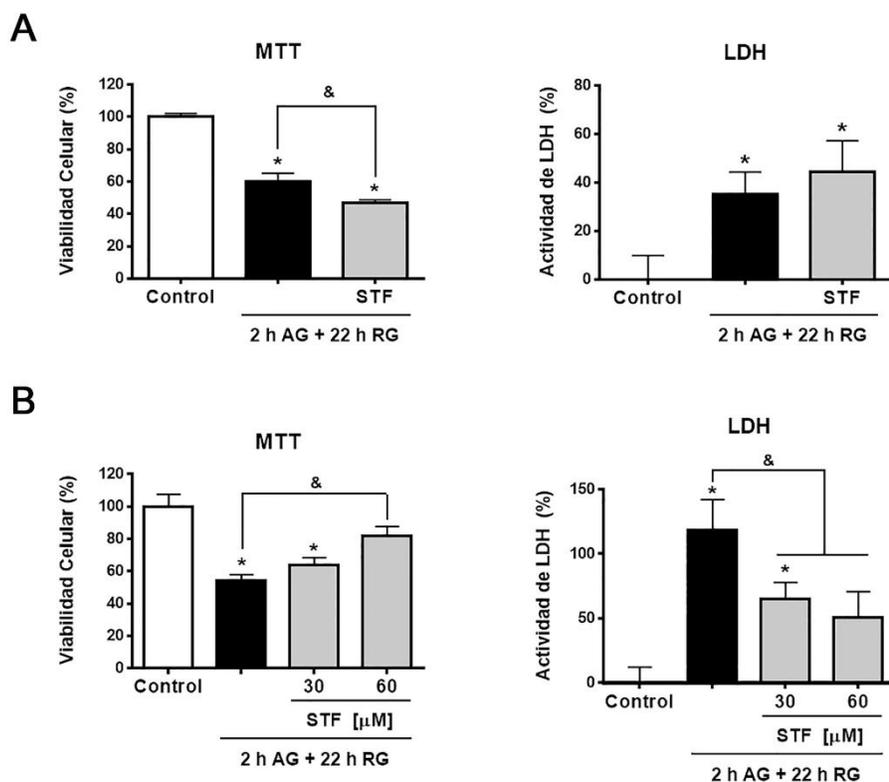


Figura 8 Dependiendo del periodo de AG o RG, la actividad de RNAsa de IRE1 participa en la sobrevivencia o en la muerte neuronal inducida por el estrés energético. **A)** La actividad RNAsa de IRE1 participa en la sobrevivencia neuronal durante la AG. Reducción de MTT y actividad de LDH de neuronas corticales expuestas de AG/RG, en presencia o ausencia del inhibidor STF (30 μM) durante la AG. **B)** La actividad RNAsa de IRE1 participa en la muerte neuronal durante la fase de RG. Reducción de MTT y actividad de LDH de neuronas corticales expuestas de AG/RG, en presencia o ausencia de diferentes concentraciones del inhibidor STF durante la RG; n=3, * p<0.05 vs control, & p<0.05 vs 2h AG + 22h RG. h = horas.

La actividad de RNAsa de IRE1 regula la vía de ASK1/JNK

Al observar que la capacidad RNAsa de IRE1 participa en la muerte neuronal durante la fase de RG, surge la pregunta de que cual es el posible mecanismo por el cual esta capacidad de cortar mensajeros puede inducir la muerte neuronal. Como se mencionó anteriormente, la actividad RNAsa de IRE1 se ha visto involucrada en destinos celulares opuestos, una mediante el corte y señalización de XBP1 el cual se asocia más con la sobrevivencia, y el otro mediante la inducción de la actividad RIDD la cual se ha asociado más con la muerte celular. Es por eso que se decidió indagar sobre la posible participación de la actividad RIDD en la muerte neuronal. Para ello se investigó en la literatura posibles mensajeros blancos capaces de ser cortados por IRE1 y que se asocian con la muerte neuronal. Como requisito para ser un blanco de la actividad RIDD de IRE1 se ha observado que el mensajero debe de contener una secuencia consenso similar al sitio de corte de *Xbp1*, además esta secuencia debe de estar expuesta en el extremo de una estructura secundaria de tipo tallo-asa. Como resultado de esta búsqueda se encontró al gen *YWHAQ* como posible blanco de la actividad RIDD (Oikawa et al, 2010). Este gen transcribe a la proteína 14-3-3 Θ , integrante de una familia de proteínas conservadas en todos los eucariontes y que se unen a diversas proteínas involucradas en ciclo celular, control de la transcripción y apoptosis (Berg et al, 2003). Múltiples investigaciones le han conferido a esta proteína un papel protector ante diversos estímulos inductores de estrés de RE (Brennan et al, 2013; Namikawa et al, 1998). Uno de las proteínas que regula negativamente es justamente a ASK1 (Cockrell et al, 2010). Es por esta razón que se decidió investigar si la actividad RIDD de IRE1 induce la muerte neuronal regulando la vía de ASK1/JNK en el modelo de AG/RG.

Primero se investigó de manera bioinformática si el mensajero del gen *14-3-3 Θ* (*YWHAQ*) de rata mantiene conservado el sitio de corte de IRE1 en nuestro modelo ya que en el trabajo donde se encontró a este posible candidato, se utilizaron células de humano. Al comparar las secuencia de rata y humano se aprecia que mantienen mucha homología (Fig. 9A, color azul) y de manera específica, el sitio de corte se mantiene conservado (Fig. 9A, negritas). Además, *in silico*, usando el servidor Web RNAfold, la capacidad para formar la estructura secundaria de tallo-asa en el sitio de corte es altamente probable (Fig. 9B). Este análisis sugiere así que el mensajero de la proteína 14-3-3 Θ es capaz de ser cortado por IRE1 en nuestro modelo experimental. Para contestar esta posibilidad se inhibió la actividad RNAsa de IRE1 a diferentes tiempos durante la AG/RG y se midió mediante qRT-PCR los niveles del gen *14-3-3 Θ* . Se observó que la inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 aumenta los niveles del gen *14-3-3 Θ* desde las 2 horas de AG y hasta las 8 horas de RG (Fig. 9C) sugiriendo que la actividad RIDD de IRE1 está degradando el mensajero de *14-3-3 Θ* .

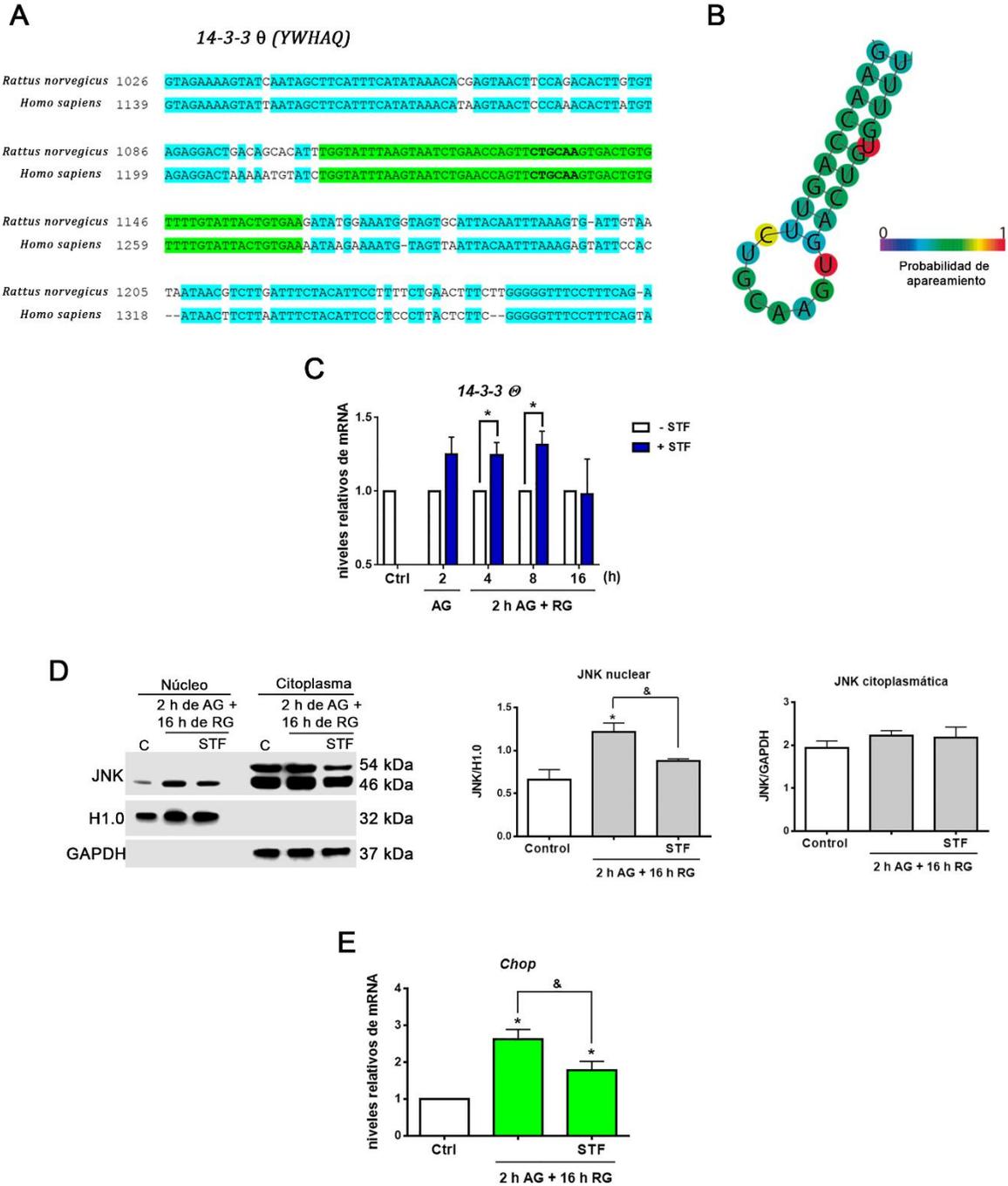


Figura 9 La actividad RIDD de IRE1 induce la muerte neuronal regulando la vía de ASK1/JNK. **A)** Comparación del mensajero de *14-3-3 θ* humano y rata. Zonas de homología (Color azul), dominio de tallo-asa (color verde), sitio de corte (negritas). **B)** Estructura secundaria pronosticada del mRNA de *14-3-3 θ* plegado *in silico* mediante el servidor web RNAfold. **C)** Efecto de la inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 en la expresión del gen *14-3-3 θ* a diferentes tiempos de AG y RG. El inhibidor STF (30 μ M) fue incubado durante la AG (2h) o la RG (4, 8 y 16 h); n=3, * p<0.05 vs control. **D)** La inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 revierte la translocación de JNK al núcleo. Análisis de la localización de JNK en presencia o ausencia del inhibidor STF (30 μ M) incubado durante la RG. Inmunoblot representativo y cuantificaciones de JNK en el núcleo y citoplasma; n=3, * p<0.05 vs control, & p<0.05 vs 2h AG + 16h RG.

E) Expresión de *Chop* en neuronas corticales expuestas a AG y RG en presencia o ausencia del inhibidor de STF (30 μ M) incubado durante la RG; n=3, * $p < 0.05$ vs control. h = horas.

Si IRE1 es capaz de cortar este mensajero, la inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 sería capaz de abatir toda la vía de ASK1/JNK. Para ello se analizó la presencia de JNK en el núcleo en presencia del inhibidor STF durante la RG, se observó que el inhibidor revierte la translocación de JNK al núcleo (Fig. 9D) y el aumento en los niveles de *Chop* (Fig. 9E) confirmando así que la actividad RNAsa de IRE1 induce la muerte neuronal regulando positivamente la vía de ASK1/JNK.

La activación sostenida de IRE1 participa en la muerte neuronal apoptótica

En conjunto, todos estos resultados sugieren que la activación sostenida de la vía de IRE1 contribuye a la muerte neuronal apoptótica durante el estrés energético a través de la translocación de JNK al núcleo y la inducción en la expresión de CHOP, es por tal motivo que se realizó el ensayo de TUNEL que permite identificar las células en proceso de apoptosis mediante la incorporación de deoxynucleotidos marcados con un fluorocromo en los extremos de fragmentos de DNA, los cuales se presentan en células que iniciaron un proceso apoptótico. La AG y RG indujo la muerte de aproximadamente un 70 % de las células. La inhibición de la actividad RNAsa de IRE1, la inhibición de ASK1 y de JNK durante la RG disminuyeron significativamente las neuronas positivas a TUNEL (Fig. 10) confirmando así que la activación sostenida y crónica de esta vía de la UPR cambia el destino celular hacia la muerte apoptótica.

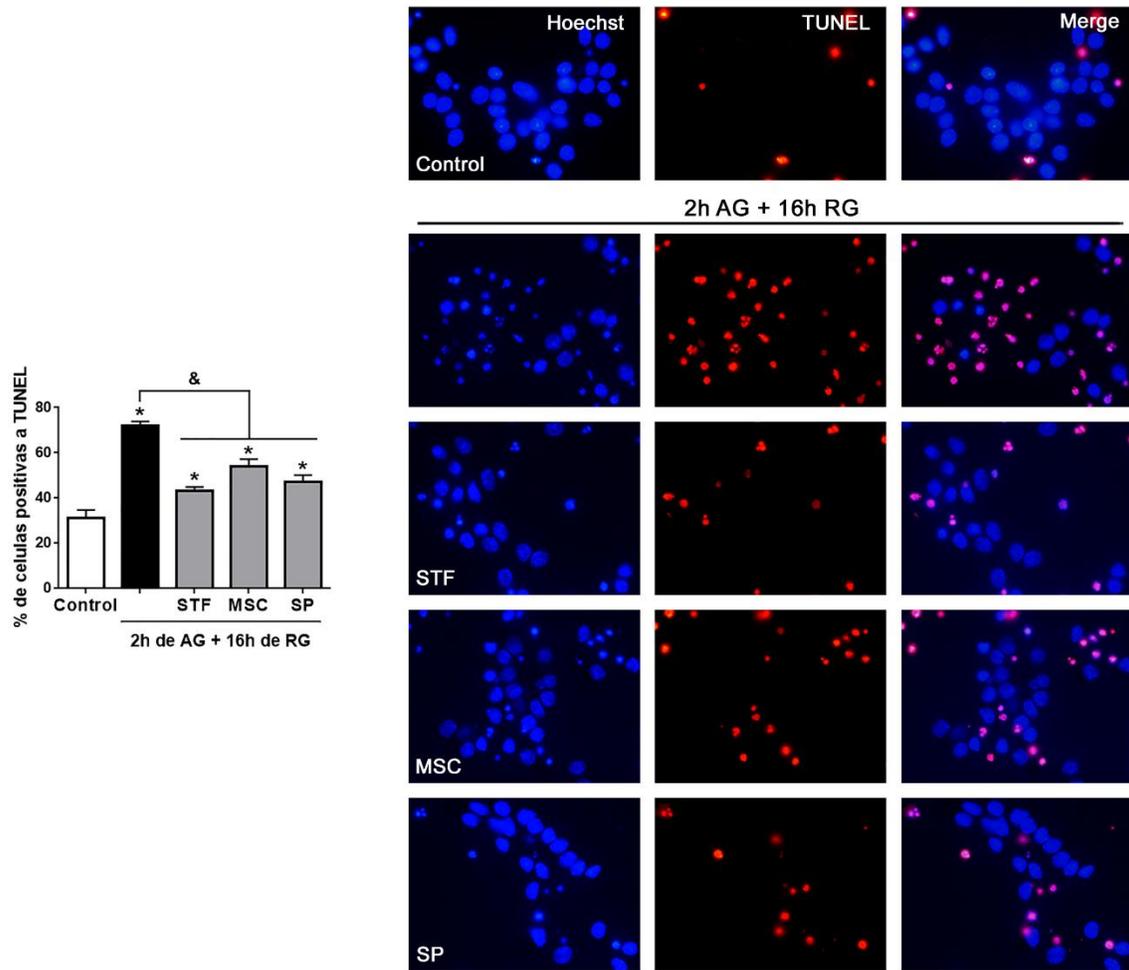


Figura 10 La activación sostenida de IRE1 contribuye en la muerte neuronal inducida por la AG/RG. Cuantificación y micrográficas representativas de células positivas a TUNEL expuestas a 2h de AG y 16 h de RG en presencia o ausencia de los inhibidores: de IRE1 (STF, 30 μ M), de ASK1 (MSC, 1 μ M) y de JNK (SP, 10 μ M). Los fármacos se administraron solamente en la fase de RG. * p < 0.05 vs control, & p < 0.05 vs 2h AG + 16h RG. h = horas.

Discusión

IRE1 es finamente regulado durante el estrés de RE.

Perturbaciones en la proteostasis neuronal pueden ser parte de la etiología de varias enfermedades neurodegenerativas, el encargado de contrarrestar y restablecer la homeostasis celular es la UPR, sin embargo, en el caso particular de IRE1, la activación de esta vía es capaz de inducir señales adaptativas o de muerte. En este trabajo se describe por primera vez que el destino celular después de la activación de IRE1 en las neuronas es dependiente del momento y duración de su actividad en un modelo de estrés energético, como es la ausencia y reintroducción de glucosa (AG/RG).

Se ha descrito que la AG en neuronas induce diversos mecanismos para contender con el estrés energético tal como la activación de la autofagia (Geronimo-Olvera et al, 2017), respuestas antioxidantes (Sun et al, 2018a) y la UPR (Badiola et al, 2011; de la Cadena et al, 2014). Sin embargo, la muerte neuronal no resulta necesariamente de la falla energética inicial, si no de la secuencia de eventos que prosiguen durante la RG (Suh et al, 2007). Estudios realizados en nuestro laboratorio ha encontrado que es la fase de RG donde ocurre la muerte neuronal correlacionando con un aumento en las ROS (Julio-Amilpas et al, 2015) y la activación de una autofagia aberrante (Geronimo-Olvera et al, 2017). Juntos estos resultados sugieren que volver a introducir la glucosa al medio provoca la ejecución de la muerte neuronal debido a una desregulación de mecanismos que un primer instante pudieron ser adaptativos para la neurona.

Los datos obtenidos apuntan a esta línea de pensamiento en donde IRE1 se activa rápidamente ante la AG, ya que se observa que aumenta su fosforilación y su interacción con las proteínas BAX/BAK. Además, contribuye a la sobrevivencia neuronal a través de su actividad RNAsa, ya que al inhibir esta actividad la muerte se exagera. Esto sugiere que IRE1 podría contender con el estrés de RE por dos rutas, procesando a XBP1 el cual induciría la expresión de chaperonas, o mediante el corte de RNA mensajeros gracias a su actividad RIDD reduciendo la carga de proteínas al RE. De manera sorpresiva nuestros resultados indican que XBP1 procesado no aumenta durante la AG por lo que, el posible mecanismo por el que IRE1 está participando en la sobrevivencia neuronal es reduciendo la carga de proteínas al RE degradando RNA mensajeros. Esta condición se asemeja a lo ocurrido en *Schizosaccharomyces pombe* donde su único mecanismo para contender la sobrecarga de proteínas al RE es justamente la actividad RIDD al no tener un ortólogo de XBP1 (Kimmig et al, 2012), sin embargo faltarían más experimentos para confirmar esta idea.

Con respecto a la RG, se observó que IRE1 mantiene una activación sostenida ya que persiste la interacción con BAX y BAK; además de observar el reclutamiento de ASK1 en el basto interactoma de IRE1. Estos resultados indican que la actividad de RNAsa persiste durante la RG y que la vía de IRE1-TRAF2-ASK1 se activa. Cuando se administró el inhibidor de RNAsa de IRE1 o el inhibidor de ASK1 durante la RG, se observó una clara reducción en la muerte neuronal indicando que la activación sostenida de IRE1 durante la RG adopta una faceta contraria a la que muestra durante

la AG, promoviendo la muerte neuronal por varias rutas. Algo que vale la pena resaltar es que nuestros datos sugieren que la dinámica de asociación de estos cofactores (BAX, BAK y ASK1) y la actividad de IRE1 es independiente de su estado de fosforilación. Esto contrasta con resultados previos que demuestran que la fosforilación de IRE1 en la S724 es necesaria para su actividad de RNAsa (Ali et al, 2011) y que la interacción de BAX/BAK es importante para la actividad de IRE1 al promover su fosforilación y oligomerización (Hetz et al, 2006). Estas diferencias podrían deberse a que existen otros sitios de fosforilación en el dominio cinasa de IRE1 que promueven su actividad RNAsa (Korenykh et al, 2009). Además de que existen más cofactores que no se estudiaron en este trabajo que pudieran estar modulando la actividad de IRE1. Por lo que nuestros resultados sugieren que la fosforilación en este residuo de serina no necesariamente correlaciona con un aumento en la actividad RNAsa de IRE1 pero la interacción de BAX y BAK si es indispensable para su activación.

Esto indica que IRE1 es regulado finamente mediante una compleja dinámica de asociación y disociación de estos cofactores, haciendo posible que el patrón de expresión de los cofactores de IRE1 pueda determinar el umbral de estrés necesario para participar en las respuestas que determinen el destino celular.

La translocación de JNK al núcleo mediado por IRE1, un factor esencial en la muerte neuronal

Mediante nuestros experimentos de inmunoprecipitación pudimos observar que a lo largo de la AG/RG la actividad y participación de IRE1 en la muerte neuronal es modulado a través de su interacción con distintas proteínas. En específico nuestros datos sugieren que durante la RG, la interacción de ASK1 con IRE1 contribuye en la muerte neuronal. Estos datos concuerdan con diversos estudios en donde se ha demostrado a ASK1 como un importante inductor de la apoptosis en diversas neuropatologías a través de la formación del complejo IRE1-TRAF2-ASK1 (Nishitoh et al, 2002; Shi et al, 2018). Sin embargo el mecanismo por el cual induce la muerte neuronal es aún poco comprendido.

Uno de los blancos principales de ASK1 es JNK, una cinasa de las MAPK que es un regulador importante en la fosforilación de proteínas en el sistema nervioso. Sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que JNK es capaz de fosforilar y regular diversas proteínas dependiendo de su localización intracelular (Coffey, 2014) por lo que la regulación de su localización intracelular es de gran interés. Datos de otros grupos de investigación sugieren que la presencia de JNK en el núcleo es un importante inductor de muerte, ya que se ha observado la translocación de JNK al núcleo en células cardiacas después de un evento isquémico (Mizukami et al, 1997) y un grupo en 2008 demostró que la actividad de esta cinasa en el núcleo es necesaria para la muerte neuronal (Bjorkblom et al, 2008). Sin embargo, la regulación de importación/exportación de JNK y la función que lleva a cabo dentro del núcleo es aún poco clara. Nuestros resultados sugieren que ASK1 induce la muerte neuronal apoptótica a través de la translocación de JNK al núcleo. Además la inhibición

farmacológica de JNK protegió a las neuronas ante la AG/RG al reducir el número de células positivas a TUNEL. En su conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis de que JNK en el núcleo induce la muerte neuronal, aunque no podemos descartar que en el citoplasma JNK también es capaz de inducir la muerte neuronal apoptótica al activar mediante fosforilación directa a la proteína pro-apoptótica Bim e inhibir a Bcl2 (Putcha et al, 2003). Ambas posibilidades podrían estar participando en nuestro modelo ya que la neuroprotección observada al inhibir farmacológicamente a JNK no distingue entre diferentes compartimentos celulares.

Profundizando en el mecanismo, al confirmar que JNK se transloca al núcleo nos preguntamos cuál era su participación en la muerte neuronal dentro de este compartimento celular. En un trabajo de 2011 se demuestra que JNK en el núcleo tiene una función epigenética al estar enriquecido en promotores de genes activos y fosforilando la ser10 de la histona 3 (H3S10) (Tiwari et al, 2011). Con base a los datos de Chip-seq obtenidos por este grupo, se buscó de manera bioinformática posibles genes relacionados con la muerte neuronal que podría estar regulando JNK. Se encontró que JNK está enriquecido en la zona promotora del gen *Chop*. Este gen codifica para un factor transcripcional que se encuentra íntimamente relacionado con la muerte celular inducido por estrés de RE. CHOP es un factor de transcripción capaz de inducir muerte celular a través de la regulación a la alza de genes pro-apoptóticos, la baja de genes anti-apoptóticos (Li et al, 2014) y de la desregulación en los niveles de calcio intrareticular (Li et al, 2009). Nuestros datos indican que los niveles de RNA mensajero de *chop* y la presencia de la proteína en el núcleo aumentan durante la RG. Estos resultados correlacionan con el aumento de JNK en el núcleo reforzando la hipótesis de que JNK es capaz de regular epigenéticamente los niveles de *Chop*. Para confirmar esta idea se usaron los inhibidores de JNK y ASK1 observando una clara reducción de los niveles de *Chop*.

En conjunto, nuestros datos aportan un nuevo mecanismo por el cual la activación de la vía IRE1-ASK1 media la translocación de JNK al núcleo, la regulación de los niveles de CHOP y la subsecuente ejecución de la muerte neuronal. Indicando que la presencia de JNK en el núcleo es un marcador de inducción de muerte neuronal, por lo que plantear experimentos de chip-seq para identificar los posibles genes blancos que regula y conocer el mecanismo molecular de importación/exportación al núcleo sería de gran ayuda para comprender mejor la inducción de la muerte neuronal a través de la localización intracelular de JNK.

Actividad RNAsa de IRE1, un modulador en el destino celular durante el estrés del RE

Por otra parte, aun con el mecanismo descrito hasta el momento, la función más reconocida y descrita de IRE1 es su capacidad de cortar RNAs mediante su actividad RNAsa. Nuestros datos indican que esta actividad presenta dos efectos diferentes dependiendo del tiempo en que se analice. Durante la AG participa en la sobrevivencia neuronal posiblemente cortando mensajeros y disminuyendo la carga de proteínas al

RE pero en la RG esta misma actividad de RNAsa contribuye en la ejecución de la muerte apoptótica. Además tanto el splicing de XBP1 como la degradación de RNA mediada por la actividad RIDD están ocurriendo en la RG, aunque probablemente no en el mismo momento. Estudios previos han observado que la actividad RIDD y el corte del mRNA de *Xbp1* están temporalmente espaciados en condiciones de estrés de RE prolongado (Bright et al, 2015), por lo que no necesariamente hay una activación simultánea de ambos mecanismos.

En experimentos previos de nuestro laboratorio se realizó un seguimiento *in vitro* y en tiempo real el curso de la muerte neuronal en el modelo de AG/RG. Se observó que la muerte de aproximadamente 50 % de la población ocurre durante las primeras 12h de la RG y la población celular restante alcanza a adaptarse y sobrevivir (Geronimo-Olvera et al, 2017). Con base en esta información, es probable que la ejecución de la muerte neuronal durante la RG se debe a la sobre activación de RIDD, ya que esta antecede la muerte neuronal. Por otra parte, posiblemente la aparición del corte de *Xbp1* a tiempos tardíos representa una respuesta de adaptación en aquellas células que lograron sobrevivir al estrés energético.

En general, nuestros resultados concilian la doble función de IRE1 en las respuestas celulares que determinan su sobrevivencia o su muerte. De hecho estudios en mamíferos indican que el splicing de XBP1 normalmente correlaciona con una función de adaptación y sobrevivencia, incluso a menudo esta sobre activada en el cáncer (Sheng et al, 2019; Sun et al, 2018b), mientras que la actividad RIDD esta predominantemente relacionada con la inducción de la apoptosis y predomina en otras enfermedades, como la diabetes (Hetz et al, 2011; Morita et al, 2017) es por tal motivo que conocer cuáles son los RNAs que regula o degrada IRE1 es de gran importancia.

El mRNA de *Xbp1* es el único blanco de splicing de IRE1 identificado hasta el momento, pero se ha demostrado que numerosos tipos de RNA son sustratos de la actividad RIDD al tener un sitio de corte homólogo al mRNA de XBP1 (Oikawa et al, 2010). Uno de esos posibles candidatos es el transcrito que codifica la proteína 14-3-3 Θ , el cual es el regulador negativo endógeno de ASK1 (Zhang et al, 1999). Nuestros resultados demuestran de manera preliminar que IRE1 es capaz de cortar el mRNA de 14-3-3 y esta degradación estimula la activación de ASK1, la translocación de JNK y el aumento en los niveles del gen pro apoptótico *Chop* que en conjunto amplifican señales de muerte. A pesar de esto se han propuesto diversas rutas pro apoptóticas dependientes de RIDD, donde predomina la degradación de miRNA. Algunos de los miRNAs que degrada IRE1 reprimen la traducción de la caspasa-2 (CASP2). Esta caspasa escinde a BID lo que conduce a su translocación a la mitocondria y a la activación de la apoptosis dependiente de BAX/BAK (Upton et al, 2012). Otro mecanismo pro apoptótico dependiente de la actividad de RIDD es a través de la degradación del miR-17 que conduce a un aumento en la expresión de la proteína pro oxidante que interactúa con la tiorredoxina (TXNIP) (Lerner et al, 2012). Curiosamente TXNIP es un regulador positivo de ASK1 al secuestrar a la tiorredoxina (Trx), una proteína antioxidante que inhibe a ASK1. Esta podría ser otra ruta de activación de ASK1 mediado por la actividad RIDD, reforzando la idea de que IRE1 induce la muerte neuronal amplificando la vía de ASK1/JNK.

Aún con estos resultados queda por aclarar cómo se regulan las diferentes modalidades de la actividad RNasa de IRE1 que dirijan el destino celular. Nuestros resultados sugieren que ambas actividades (splicing de mRNA de *Xbp1* y la actividad RIDD) tienen funciones citoprotectoras, pero después de una exposición prolongada y/o crónica al estrés de RE, el RIDD se convierte en citotóxico. El mecanismo que controla el cambio de la función citoprotectora a la función citotóxica de RIDD sigue siendo desconocido, pero se podría proponer que exceder un umbral específico de estrés de RE podría llevar a la inducción de funciones citotóxicas dependientes de RIDD. Estas amplificarían señales de muerte como la vía de ASK1/JNK. De manera esquematizada se plantea la ruta de activación dependiente de IRE1 en el modelo de AG/RG en la figura 11.

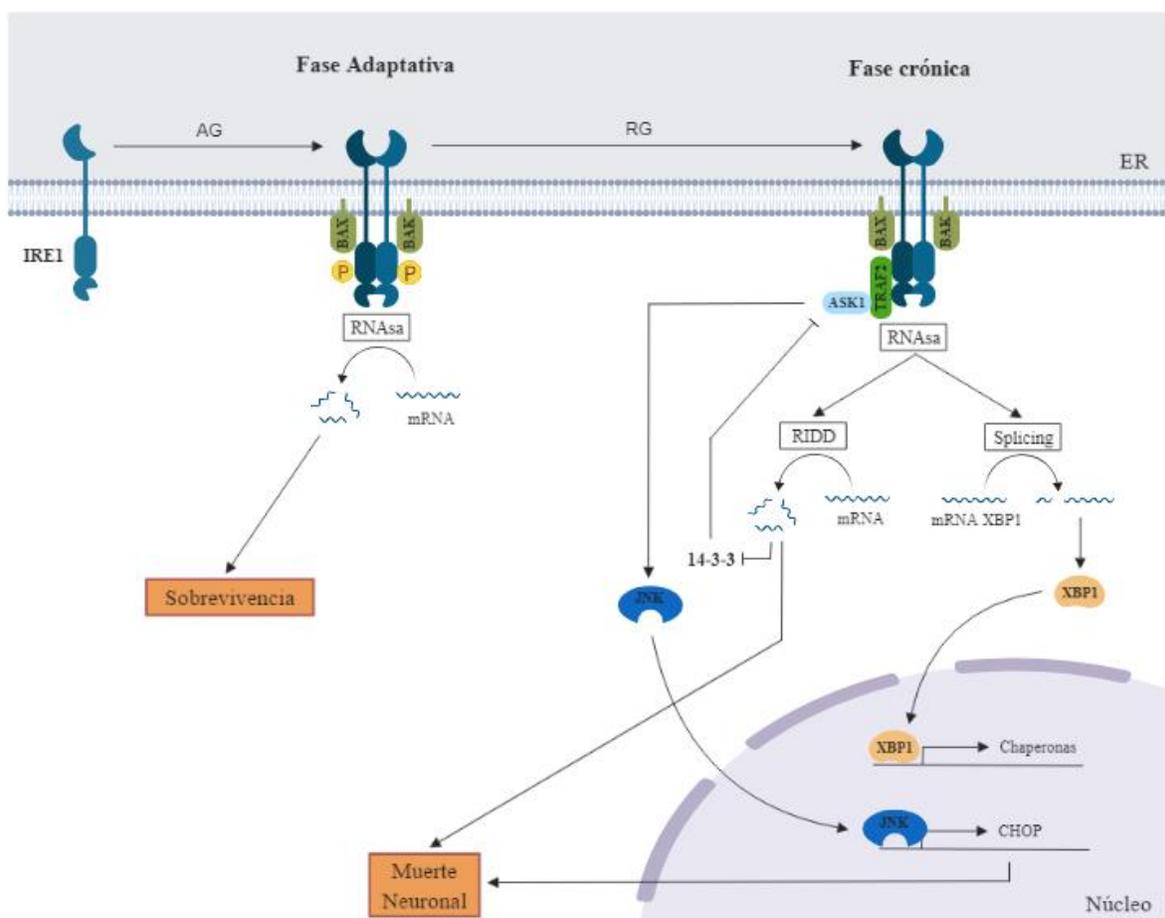


Figura 11 Modelo de la activación de IRE1 en el modelo de AG/RG y su modulación de la muerte neuronal.

En conclusión los resultados de este estudio sugieren que IRE1 es un sensor de la UPR altamente modulable, que a través de su actividad RNAsa funciona como reóstato que amplifica señales de supervivencia o de muerte dependiendo de la duración o intensidad del estrés. Tener una mejor comprensión de los mecanismos que modulan la activación de IRE1 podría darnos mejores herramientas para contrarrestar esta vía de manera más oportuna en situaciones de estrés de retículo prolongado, como ocurre en algunas enfermedades neurodegenerativas.

Figuras Suplementarias

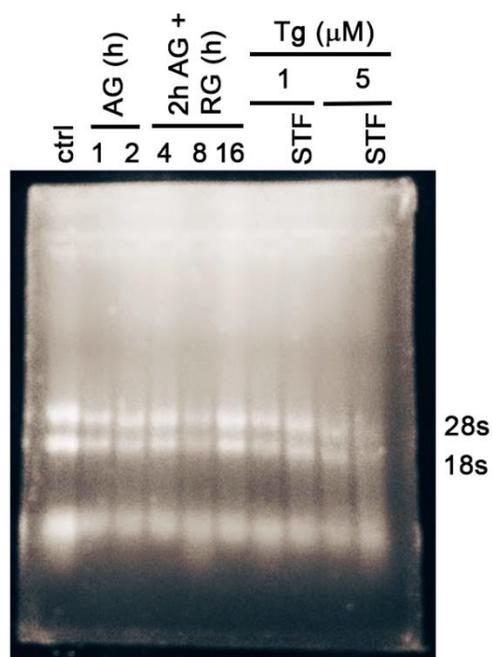


Figura Suplementaria 1 Integridad de RNA. Detección de la integridad del RNA de muestras extraídas con Trizol a diferentes tiempos de AG y RG mediante la detección de RNA ribosomales en un gel de agarosa desnaturalizante.

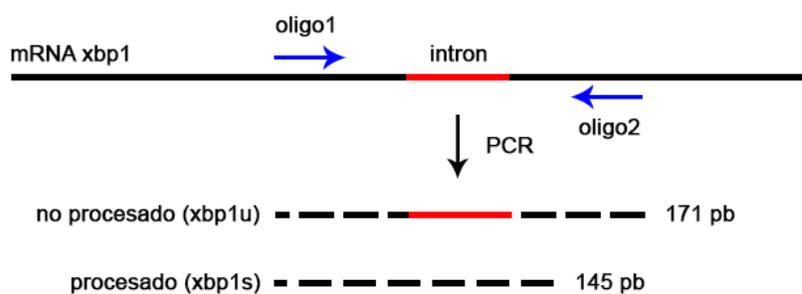


Figura Suplementaria 2 Diseño de oligos para ensayo del procesamiento de *Xbp1*

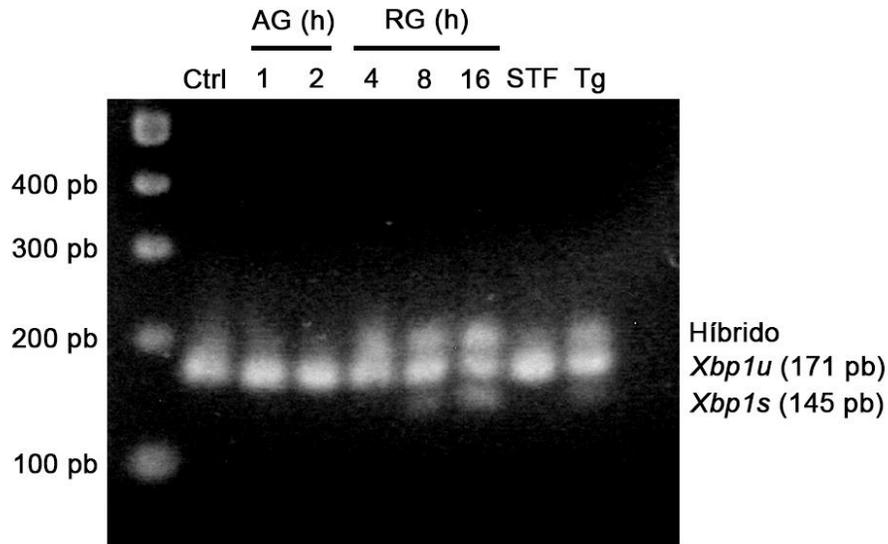


Figura Suplementaria 3 Procesamiento de *Xbp1* durante la AG/RG. Productos de amplificación analizados por electroforesis en un gel de agarosa. Se observan los productos correspondientes a *Xbp1u* (171 pb), *Xbp1s* (145 pb) y una tercera banda que corre más lento en el gel de agarosa, este producto es un artefacto de la PCR. Es el híbrido entre una hebra de *Xbp1u* y una hebra de *Xbp1s* que se forman durante la renaturalización del último paso de la PCR (Shang & Lehrman, 2004). Inhibidor de IRE1 (STF, 60 μ M), Tapsigargina (TG, 5 μ M).

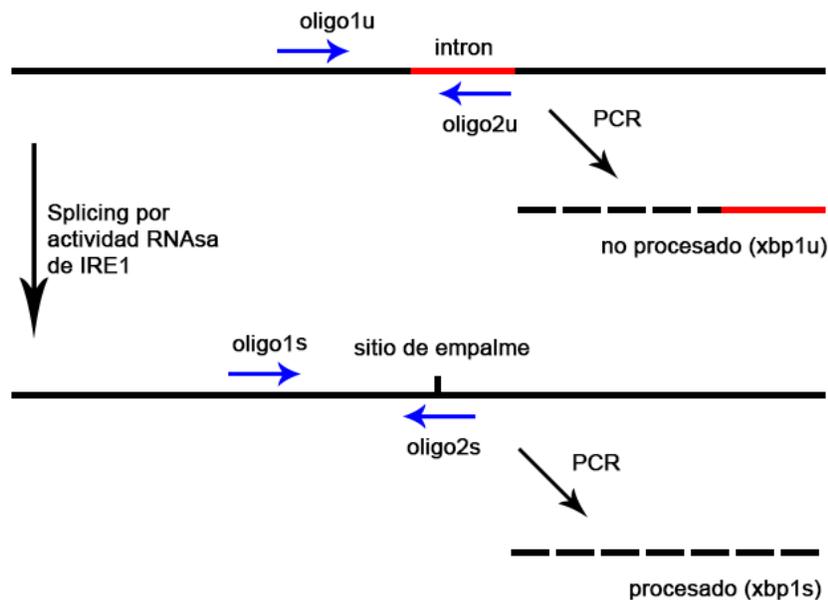


Figura Suplementaria 4 Diseño de oligos para qRT-PCR

Referencias

Abdullah A, Ravanan P (2018) The unknown face of IRE1alpha - Beyond ER stress. *European journal of cell biology* **97**: 359-368

Ali MM, Bagratuni T, Davenport EL, Nowak PR, Silva-Santisteban MC, Hardcastle A, McAndrews C, Rowlands MG, Morgan GJ, Aherne W, Collins I, Davies FE, Pearl LH (2011) Structure of the Ire1 autophosphorylation complex and implications for the unfolded protein response. *The EMBO journal* **30**: 894-905

Ameri K, Harris AL (2008) Activating transcription factor 4. *The international journal of biochemistry & cell biology* **40**: 14-21

Auer RN (1986) Progress review: hypoglycemic brain damage. *Stroke* **17**: 699-708

Auer RN, Wieloch T, Olsson Y, Siesjo BK (1984) The distribution of hypoglycemic brain damage. *Acta neuropathologica* **64**: 177-191

Badiola N, Penas C, Minano-Molina A, Barneda-Zahonero B, Fado R, Sanchez-Opazo G, Comella JX, Sabria J, Zhu C, Blomgren K, Casas C, Rodriguez-Alvarez J (2011) Induction of ER stress in response to oxygen-glucose deprivation of cortical cultures involves the activation of the PERK and IRE-1 pathways and of caspase-12. *Cell death & disease* **2**: e149

Berg D, Holzmann C, Riess O (2003) 14-3-3 proteins in the nervous system. *Nature reviews Neuroscience* **4**: 752-762

Bjorkblom B, Vainio JC, Hongisto V, Herdegen T, Courtney MJ, Coffey ET (2008) All JNKs can kill, but nuclear localization is critical for neuronal death. *The Journal of biological chemistry* **283**: 19704-19713

Brennan GP, Jimenez-Mateos EM, McKiernan RC, Engel T, Tzivion G, Henshall DC (2013) Transgenic overexpression of 14-3-3 zeta protects hippocampus against endoplasmic reticulum stress and status epilepticus in vivo. *PloS one* **8**: e54491

Bright MD, Itzhak DN, Wardell CP, Morgan GJ, Davies FE (2015) Cleavage of BLOC1S1 mRNA by IRE1 Is Sequence Specific, Temporally Separate from XBP1 Splicing, and Dispensable for Cell Viability under Acute Endoplasmic Reticulum Stress. *Molecular and cellular biology* **35**: 2186-2202

Brodsky JL, McCracken AA (1999) ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Seminars in cell & developmental biology* **10**: 507-513

Buffington SA, Huang W, Costa-Mattioli M (2014) Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annual review of neuroscience* **37**: 17-38

Cockrell LM, Puckett MC, Goldman EH, Khuri FR, Fu H (2010) Dual engagement of 14-3-3 proteins controls signal relay from ASK2 to the ASK1 signalosome. *Oncogene* **29**: 822-830

Coffey ET (2014) Nuclear and cytosolic JNK signalling in neurons. *Nature reviews Neuroscience* **15**: 285-299

Cryer PE (2007) Hypoglycemia, functional brain failure, and brain death. *The Journal of clinical investigation* **117**: 868-870

Cui W, Li J, Ron D, Sha B (2011) The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation. *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* **67**: 423-428

Chen L, Gao X (2002) Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Neurochemical research* **27**: 891-898

Choi JH, Choi AY, Yoon H, Choe W, Yoon KS, Ha J, Yeo EJ, Kang I (2010) Baicalein protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through inhibition of reactive oxygen species production and CHOP induction. *Experimental & molecular medicine* **42**: 811-822

de la Cadena SG, Hernandez-Fonseca K, Camacho-Arroyo I, Massieu L (2014) Glucose deprivation induces reticulum stress by the PERK pathway and caspase-7- and calpain-mediated caspase-12 activation. *Apoptosis: an international journal on programmed cell death* **19**: 414-427

DeGracia DJ, Montie HL (2004) Cerebral ischemia and the unfolded protein response. *Journal of neurochemistry* **91**: 1-8

Elanchezhian R, Palsamy P, Madson CJ, Mulhern ML, Lynch DW, Troia AM, Usukura J, Shinohara T (2012) Low glucose under hypoxic conditions induces unfolded protein response and produces reactive oxygen species in lens epithelial cells. *Cell death & disease* **3**: e301

Galehdar Z, Swan P, Fuerth B, Callaghan SM, Park DS, Cregan SP (2010) Neuronal apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress is regulated by ATF4-CHOP-mediated induction of the Bcl-2 homology 3-only member PUMA. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* **30**: 16938-16948

Gardner BM, Walter P (2011) Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science* **333**: 1891-1894

Geronimo-Olvera C, Montiel T, Rincon-Heredia R, Castro-Obregon S, Massieu L (2017) Autophagy fails to prevent glucose deprivation/glucose reintroduction-induced neuronal death due to calpain-mediated lysosomal dysfunction in cortical neurons. *Cell death & disease* **8**: e2911

Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton JP, Xu W, Hagen A, Backes BJ, Oakes SA, Papa FR (2009) IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* **138**: 562-575

Harding HP, Zhang Y, Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**: 271-274

Hernandez-Fonseca K, Cardenas-Rodriguez N, Pedraza-Chaverri J, Massieu L (2008) Calcium-dependent production of reactive oxygen species is involved in neuronal damage induced during glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* **86**: 1768-1780

Hetz C (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature reviews Molecular cell biology* **13**: 89-102

Hetz C, Bernasconi P, Fisher J, Lee AH, Bassik MC, Antonsson B, Brandt GS, Iwakoshi NN, Schinzel A, Glimcher LH, Korsmeyer SJ (2006) Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha. *Science* **312**: 572-576

Hetz C, Martinon F, Rodriguez D, Glimcher LH (2011) The unfolded protein response: integrating stress signals through the stress sensor IRE1alpha. *Physiological reviews* **91**: 1219-1243

Hetz C, Mollereau B (2014) Disturbance of endoplasmic reticulum proteostasis in neurodegenerative diseases. *Nature reviews Neuroscience* **15**: 233-249

Hillary RF, FitzGerald U (2018) A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *Journal of biomedical science* **25**: 48

Hollien J, Weissman JS (2006) Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response. *Science* **313**: 104-107

Julio-Amilpas A, Montiel T, Soto-Tinoco E, Geronimo-Olvera C, Massieu L (2015) Protection of hypoglycemia-induced neuronal death by beta-hydroxybutyrate involves the preservation of energy levels and decreased production of reactive oxygen species. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **35**: 851-860

Kaufman RJ (1999) Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes & development* **13**: 1211-1233

Kety SS, Schmidt CF (1948) The Nitrous Oxide Method for the Quantitative Determination of Cerebral Blood Flow in Man: Theory, Procedure and Normal Values. *The Journal of clinical investigation* **27**: 476-483

Kimmig P, Diaz M, Zheng J, Williams CC, Lang A, Aragon T, Li H, Walter P (2012) The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis. *eLife* **1**: e00048

Korenykh AV, Egea PF, Korostelev AA, Finer-Moore J, Zhang C, Shokat KM, Stroud RM, Walter P (2009) The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1. *Nature* **457**: 687-693

Languren G, Montiel T, Julio-Amilpas A, Massieu L (2013) Neuronal damage and cognitive impairment associated with hypoglycemia: An integrated view. *Neurochemistry international* **63**: 331-343

Lavin N (2002) *Manual of endocrinology and metabolism*, 3rd edn. Philadelphia ; London: Lippincott Williams & Wilkins.

Lee KP, Dey M, Neculai D, Cao C, Dever TE, Sicheri F (2008) Structure of the dual enzyme Ire1 reveals the basis for catalysis and regulation in nonconventional RNA splicing. *Cell* **132**: 89-100

Lei K, Davis RJ (2003) JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 2432-2437

Lerner AG, Upton JP, Praveen PV, Ghosh R, Nakagawa Y, Igbaria A, Shen S, Nguyen V, Backes BJ, Heiman M, Heintz N, Greengard P, Hui S, Tang Q, Trusina A, Oakes SA, Papa FR (2012) IRE1alpha induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell metabolism* **16**: 250-264

Li G, Mongillo M, Chin KT, Harding H, Ron D, Marks AR, Tabas I (2009) Role of ERO1-alpha-mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of cell biology* **186**: 783-792

Li Y, Guo Y, Tang J, Jiang J, Chen Z (2014) New insights into the roles of CHOP-induced apoptosis in ER stress. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **46**: 629-640

Maier PJ, Zemoura K, Acuna MA, Yevenes GE, Zeilhofer HU, Benke D (2014) Ischemia-like oxygen and glucose deprivation mediates down-regulation of cell surface gamma-aminobutyric acidB receptors via the endoplasmic reticulum (ER) stress-induced transcription factor CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)-homologous protein (CHOP). *The Journal of biological chemistry* **289**: 12896-12907

Marciniak SJ, Yun CY, Oyadomari S, Novoa I, Zhang Y, Jungreis R, Nagata K, Harding HP, Ron D (2004) CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes & development* **18**: 3066-3077

- Martinez G, Khatiwada S, Costa-Mattioli M, Hetz C (2018) ER Proteostasis Control of Neuronal Physiology and Synaptic Function. *Trends in neurosciences* **41**: 610-624
- Maurel M, Chevet E, Tavernier J, Gerlo S (2014) Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in biochemical sciences* **39**: 245-254
- McCullough KD, Martindale JL, Klotz LO, Aw TY, Holbrook NJ (2001) Gadd153 sensitizes cells to endoplasmic reticulum stress by down-regulating Bcl2 and perturbing the cellular redox state. *Molecular and cellular biology* **21**: 1249-1259
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013) Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends in neurosciences* **36**: 587-597
- Mishiba K, Nagashima Y, Suzuki E, Hayashi N, Ogata Y, Shimada Y, Koizumi N (2013) Defects in IRE1 enhance cell death and fail to degrade mRNAs encoding secretory pathway proteins in the Arabidopsis unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 5713-5718
- Mizukami Y, Yoshioka K, Morimoto S, Yoshida K (1997) A novel mechanism of JNK1 activation. Nuclear translocation and activation of JNK1 during ischemia and reperfusion. *The Journal of biological chemistry* **272**: 16657-16662
- Moore K, Hollien J (2015) Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status. *Molecular biology of the cell* **26**: 2873-2884
- Morita S, Villalta SA, Feldman HC, Register AC, Rosenthal W, Hoffmann-Petersen IT, Mehdizadeh M, Ghosh R, Wang L, Colon-Negron K, Meza-Acevedo R, Backes BJ, Maly DJ, Bluestone JA, Papa FR (2017) Targeting ABL-IRE1alpha Signaling Spares ER-Stressed Pancreatic beta Cells to Reverse Autoimmune Diabetes. *Cell metabolism* **25**: 1207
- Nakagawa T, Yuan J (2000) Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *The Journal of cell biology* **150**: 887-894
- Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, Yuan J (2000) Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. *Nature* **403**: 98-103
- Namikawa K, Su Q, Kiryu-Seo S, Kiyama H (1998) Enhanced expression of 14-3-3 family members in injured motoneurons. *Brain research Molecular brain research* **55**: 315-320
- Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, Hori S, Kakizuka A, Ichijo H (2002) ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes & development* **16**: 1345-1355

Obel LF, Muller MS, Walls AB, Sickmann HM, Bak LK, Waagepetersen HS, Schousboe A (2012) Brain glycogen-new perspectives on its metabolic function and regulation at the subcellular level. *Frontiers in neuroenergetics* **4**: 3

Ogata M, Hino S, Saito A, Morikawa K, Kondo S, Kanemoto S, Murakami T, Taniguchi M, Tanii I, Yoshinaga K, Shiosaka S, Hammarback JA, Urano F, Imaizumi K (2006) Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress. *Molecular and cellular biology* **26**: 9220-9231

Oikawa D, Kimata Y, Kohno K (2007) Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *Journal of cell science* **120**: 1681-1688

Oikawa D, Tokuda M, Hosoda A, Iwawaki T (2010) Identification of a consensus element recognized and cleaved by IRE1 alpha. *Nucleic acids research* **38**: 6265-6273

Papandreou I, Denko NC, Olson M, Van Melckebeke H, Lust S, Tam A, Solow-Cordero DE, Bouley DM, Offner F, Niwa M, Koong AC (2011) Identification of an Ire1alpha endonuclease specific inhibitor with cytotoxic activity against human multiple myeloma. *Blood* **117**: 1311-1314

Paramo B, Hernandez-Fonseca K, Estrada-Sanchez AM, Jimenez N, Hernandez-Cruz A, Massieu L (2010) Pathways involved in the generation of reactive oxygen and nitrogen species during glucose deprivation and its role on the death of cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* **167**: 1057-1069

Paramo B, Montiel T, Hernandez-Espinosa DR, Rivera-Martinez M, Moran J, Massieu L (2013) Calpain activation induced by glucose deprivation is mediated by oxidative stress and contributes to neuronal damage. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**: 2596-2604

Prischi F, Nowak PR, Carrara M, Ali MM (2014) Phosphoregulation of Ire1 RNase splicing activity. *Nature communications* **5**: 3554

Putchu GV, Le S, Frank S, Besirli CG, Clark K, Chu B, Alix S, Youle RJ, LaMarche A, Maroney AC, Johnson EM, Jr. (2003) JNK-mediated BIM phosphorylation potentiates BAX-dependent apoptosis. *Neuron* **38**: 899-914

Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, Hughes PD, Michalak EM, McKimm-Breschkin J, Motoyama N, Gotoh T, Akira S, Bouillet P, Strasser A (2007) ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell* **129**: 1337-1349

Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *The Journal of biological chemistry* **277**: 21836-21842

Rao RV, Hermel E, Castro-Obregon S, del Rio G, Ellerby LM, Ellerby HM, Bredesen DE (2001) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. Mechanism of caspase activation. *The Journal of biological chemistry* **276**: 33869-33874

Schonthal AH (2012) Endoplasmic reticulum stress: its role in disease and novel prospects for therapy. *Scientifica* **2012**: 857516

Shang J, Lehrman MA (2004) Discordance of UPR signaling by ATF6 and Ire1p-XBP1 with levels of target transcripts. *Biochemical and biophysical research communications* **317**: 390-396

Shen J, Chen X, Hendershot L, Prywes R (2002) ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals. *Developmental cell* **3**: 99-111

Sheng X, Nenseth HZ, Qu S, Kuzu OF, Frahnow T, Simon L, Greene S, Zeng Q, Fazli L, Rennie PS, Mills IG, Danielsen H, Theis F, Patterson JB, Jin Y, Saatcioglu F (2019) IRE1alpha-XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling. *Nature communications* **10**: 323

Shi L, Wang Z, Liu X, Li M, Zhang S, Song X (2018) Bax inhibitor-1 is required for resisting the Early Brain Injury induced by subarachnoid hemorrhage through regulating IRE1-JNK pathway. *Neurological research* **40**: 189-196

Siegel GJ (2006) *Basic neurochemistry : molecular, cellular and medical aspects*, 7th edn. Burlington, MA: Elsevier Academic.

Smith HL, Li W, Cheetham ME (2015) Molecular chaperones and neuronal proteostasis. *Seminars in cell & developmental biology* **40**: 142-152

Sokoloff L (1981) Localization of functional activity in the central nervous system by measurement of glucose utilization with radioactive deoxyglucose. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* **1**: 7-36

Squire LR (2013) *Fundamental neuroscience*, 4th edn. Amsterdam ; Boston: Elsevier/Academic Press.

Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J, Swanson RA (2003) Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **23**: 10681-10690

Suh SW, Gum ET, Hamby AM, Chan PH, Swanson RA (2007) Hypoglycemic neuronal death is triggered by glucose reperfusion and activation of neuronal NADPH oxidase. *The Journal of clinical investigation* **117**: 910-918

Sun X, Li X, Ma S, Guo Y, Li Y (2018a) MicroRNA-98-5p ameliorates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R)-induced neuronal injury by inhibiting Bach1 and promoting Nrf2/ARE signaling. *Biochemical and biophysical research communications* **507**: 114-121

Sun Y, Jiang F, Pan Y, Chen X, Chen J, Wang Y, Zheng X, Zhang J (2018b) XBP1 promotes tumor invasion and is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Oncology reports* **40**: 988-998

Tajiri S, Oyadomari S, Yano S, Morioka M, Gotoh T, Hamada JI, Ushio Y, Mori M (2004) Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell death and differentiation* **11**: 403-415

Tiwari VK, Stadler MB, Wirbelauer C, Paro R, Schubeler D, Beisel C (2011) A chromatin-modifying function of JNK during stem cell differentiation. *Nature genetics* **44**: 94-100

Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y (2004) JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *The EMBO journal* **23**: 1889-1899

Upton JP, Wang L, Han D, Wang ES, Huskey NE, Lim L, Truitt M, McManus MT, Ruggero D, Goga A, Papa FR, Oakes SA (2012) IRE1alpha cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science* **338**: 818-822

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

Wang MD, Huang Y, Zhang GP, Mao L, Xia YP, Mei YW, Hu B (2012) Exendin-4 improved rat cortical neuron survival under oxygen/glucose deprivation through PKA pathway. *Neuroscience* **226**: 388-396

Wang S, Kaufman RJ (2012) The impact of the unfolded protein response on human disease. *The Journal of cell biology* **197**: 857-867

Wieloch T (1985) Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonist. *Science* **230**: 681-683

Xin Q, Ji B, Cheng B, Wang C, Liu H, Chen X, Chen J, Bai B (2014) Endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia. *Neurochemistry international* **68**: 18-27

Xu C, Bailly-Maitre B, Reed JC (2005) Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. *The Journal of clinical investigation* **115**: 2656-2664

Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ (1999) BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Molecular and cellular biology* **19**: 8469-8478

Yang Y, Liu L, Naik I, Braunstein Z, Zhong J, Ren B (2017) Transcription Factor C/EBP Homologous Protein in Health and Diseases. *Frontiers in immunology* **8**: 1612

Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Molecular cell* **6**: 1355-1364

Yoneda T, Imaizumi K, Oono K, Yui D, Gomi F, Katayama T, Tohyama M (2001) Activation of caspase-12, an endoplasmic reticulum (ER) resident caspase, through tumor necrosis factor receptor-associated factor 2-dependent mechanism in response to the ER stress. *The Journal of biological chemistry* **276**: 13935-13940

Yoshida H, Matsui T, Yamamoto A, Okada T, Mori K (2001) XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell* **107**: 881-891

Zhang L, Chen J, Fu H (1999) Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 8511-8515

Zhu HY, Zhu HY, Xiao SP, Sun HY, Xie CL, Ma YW (2012) Activation and crosstalk between the endoplasmic reticulum road and JNK pathway in ischemia-reperfusion brain injury. *Acta Neurochir* **154**: 1197-1203