

JULIE LESSARD

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DE
CIBLES TRANSCRIPTIONNELLES DU FACTEUR
DE TRANSCRIPTION ANDROGEN INDUCED-BZIP :
UN FACTEUR IMPLIQUÉ DANS LE STRESS DU
RÉTICULUM ENDOPLASMIQUE**

Thèse présentée
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval
dans le cadre du programme de doctorat en physiologie-endocrinologie
pour l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)

DÉPARTEMENT DE MÉDECINE MOLÉCULAIRE
FACULTÉ DE MÉDECINE
UNIVERSITÉ LAVAL
QUÉBEC

2010

©Julie Lessard, 2010

Résumé

Le facteur de transcription *Androgen Induced-bZIP* (AibZIP) est un membre de la famille ATF/CREB, plus précisément de la sous-famille CREB3. Sa découverte remonte au début des années 2000 où sa régulation par les androgènes fut démontrée, de même que son expression abondante dans le tissu prostatique. À l'image des facteurs ATF/CREB, AibZIP possède un domaine d'activation de la transcription en N-terminal, un domaine bZIP et un domaine transmembranaire lui permettant de s'ancrer dans la membrane du réticulum endoplasmique. La structure et la localisation d'AibZIP suggèrent qu'il puisse être clivé par le mécanisme *Regulated Intramembrane Proteolysis* (RIP) un mécanisme de clivage auquel sont soumis des facteurs ATF/CREB tels qu'ATF6. Ce clivage survient suite à un stress du réticulum endoplasmique (RE) qui peut être causé par différents stimuli qui perturbent l'homéostasie du RE. Les travaux présentés dans cette thèse visent l'identification de la fonction d'AibZIP dans le stress du réticulum endoplasmique des cellules prostatiques cancéreuses. Mes objectifs étaient de découvrir des stimuli capables d'induire son clivage et d'identifier et de caractériser ses cibles transcriptionnelles suite à sa translocation au noyau.

J'ai d'abord modifié le système d'expression inductible RheoSwitch et j'ai caractérisé son effet sur les cellules prostatiques cancéreuses LNCaP. Ce système s'est avéré être un outil efficace puisqu'il n'affecte pas le phénotype des LNCaP et il a été essentiel à la réalisation des travaux sur AibZIP. J'ai ensuite mis en évidence le clivage d'AibZIP par des agents qui causent une diminution de la concentration calcique au RE. Le système RheoSwitch modifié a permis de produire des cellules exprimant une forme active recombinante d'AibZIP qui ont servi à la réalisation de micropuces Affymetrix. Ces puces ont permis l'identification des gènes cibles d'AibZIP tel que le facteur de transcription CREB3. AibZIP active l'expression de CREB3 par le biais d'éléments de réponse similaires à ERSE et CRE situés dans le promoteur du gène. Lors du traitement des cellules LNCaP avec l'ionophore de calcium A23187, on observe successivement le clivage d'AibZIP, l'induction de l'expression de CREB3 et son clivage, ce qui suggère une chronologie dans l'activation des deux facteurs. La réponse au stress débute donc avec la

forme active d'AlbZIP, suivie d'une co-existence des formes nucléaires d'AlbZIP et CREB3 pour se terminer par la présence de CREB3. CREB3 est en mesure d'activer sa propre transcription. Le stress causé par A23187 est en mesure d'activer AlbZIP et CREB3 qui se trouvent alors seuls ou simultanément au noyau. Il est donc possible qu'ils partagent des cibles communes, tout en ayant leurs cibles uniques, ce qui devra être élucidé pour clarifier leurs rôles respectifs dans la réponse au stress des LNCaP.

Abstract

Androgen Induced-bZIP (AibZIP) is an ER-bound ATF/CREB transcription factor of the CREB3 subfamily. AibZIP was discovered in 2002 as an androgen-regulated transcript and its expression is more abundant in prostate. Like other ATF6-like transcription factors, AibZIP possesses an activation domain in its N-terminal portion, a bZIP domain and a transmembrane domain. By virtue of its structure and localization, AibZIP is a potential substrate for regulation by Regulated Intramembrane Proteolysis (RIP) following a stress that affects endoplasmic reticulum (ER) homeostasis. The objective of my thesis was to define stress that induces AibZIP processing and to identify and characterize its transcriptional targets.

First, I modified and characterized the RheoSwitch mammalian inducible expression system which was a valuable tool to study the targets and function of AibZIP because it does not affect LNCaP phenotype. Then, I demonstrated that AibZIP is processed by drugs that affect ER calcium concentrations. The modified RheoSwitch system was used to produce a stable cell line that conditionally produces an active form of AibZIP which enabled us to identify AibZIP transcriptional targets using Affymetrix microarrays. We found that the ER-bound transcription factor CREB3 is an AibZIP-regulated transcript in LNCaP cells. AibZIP uses sequences similar to ERSE and CRE elements in the CREB3 promoter to modulate CREB3 expression. In response to stress induced by the calcium ionophore A23187, the active form of AibZIP functions to up-regulate CREB3 expression, which is then processed to its active form, which suggests that AibZIP and CREB3 function during the early and late phases, respectively, of the ER stress response. AibZIP and CREB3 could collaborate to induce genes that function to restore cellular homeostasis following ER stress.

Avant-Propos

Cette thèse marque la fin d'une grande aventure et le début d'une autre. Mes années au CHUL m'ont permis de développer mes aptitudes scientifiques, mais aussi d'y rencontrer des gens fantastiques. Je dois beaucoup de cette réussite à plusieurs personnes qui m'ont aidé et appuyer tout au long de mes études graduées.

Je dois d'abord remercier mon directeur de thèse, le Dr Claude Labrie, qui m'a accueilli dans son laboratoire. Je le remercie pour sa confiance, sa disponibilité et ses conseils. Ce fut de belles années de recherche que j'ai grandement appréciées et qui ont contribué à mon désir de poursuivre ma formation.

Je remercie mes collègues de travail et amis Mélissa Pelletier, Andréa Fournier, Christine Bareil, Nicolas Léveillé, Hejer Boutej, Jean-François St-Laurent, Judith Bellemare, Éliane Lavergne, Véronique Bellemare, Jin Choi, Sonia Ben Aicha, Sonia Djebbar. C'est grâce à ces personnes que les journées étaient plaisantes et que les années ont passé si vite. C'est en grande partie grâce à vous que j'ai réussi à atteindre mes objectifs.

Je dois mille mercis à mes parents, Normand et Laurence, pour leur soutien et leur amour. Merci d'être fiers de moi et de me le dire. C'est toujours motivant. Merci à mon frère Benoit d'être un exemple de courage et d'intégrité. Merci aussi à ma belle-famille. Tous ont accepté mon horaire chargé et m'ont encouragé au cours de mes études.

Finalement, merci à Christian, qui partage ma vie, pour sa patience, sa compréhension et son amour. Merci de m'encourager dans mes projets et de me suivre dans mes aventures.

*La réussite, c'est obtenir ce que l'on veut. Le
bonheur, c'est apprécier ce que l'on obtient.*
H. Jackson Brown

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Avant-Propos	iv
Table des matières	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures	x
Liste des abréviations.....	xiii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Mise en situation.....	1
1.2 Le réticulum endoplasmique : site de synthèse et de maturation de protéines sécrétées et membranaires	3
1.2.1 La traduction couplée au RE et le repliement.....	4
1.2.2 La réponse au stress (<i>Unfolded protein response</i>).....	10
1.3 Les facteurs ATF/CREB : la sous-famille CREB3.....	24
1.3.1 Les facteurs CREB3 dans l'évolution.....	26
1.3.2 CREB3	27
1.3.3 CREB3L1/OASIS.....	33
1.3.4 CREB3L2/BBF2H7	38
1.3.5 CREB3L3/CREB-H.....	43
1.3.6 CREB3L4/AIbZIP/CREB4/ATCE1/TISP40 :.....	48
1.4 Problématique et objectifs de recherche	59
1.5 Approches expérimentales	61
1.5.1 Le modèle cellulaire de cancer de prostate : les cellules LNCaP	61
1.5.2 Les systèmes d'expression inductible.....	62
1.5.3 Identification de cibles transcriptionnelles : les micropuces à ADN.....	63
1.5.4 Caractérisation de gènes cibles	64
Chapitre 2: Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format	66
2.1 Résumé.....	66
2.2 Abstract.....	67
2.3 Introduction.....	68
2.4 Materials and methods	71
2.4.1 Cell culture.....	71
2.4.2 Construction of pZRD	71
2.4.3 Construction of pZRD derivatives containing RSL1-Responsive expression cassettes	72
2.4.4 Establishment and screening of stable cell lines.....	72
2.4.5 Luciferase assays	73
2.4.6 Immunoblotting	73
2.4.7 Microarray experiment	74
2.4.8 Statistical analysis of microarray data	75
2.4.9 Northern Blot analysis	75
2.5 Results.....	76
2.5.1 Establishment of stable cell lines.....	76

2.5.2	Effect of RSL1 on cell proliferation	77
2.5.3	Effect of RSL1 on endogenous gene expression	79
2.5.4	Development of a single vector format.....	82
2.5.5	RSL1-dependant regulation of stably integrated expression cassettes	83
2.6	Discussion.....	85
2.7	Conclusion	89
2.8	Acknowledgments	89
2.9	References.....	89
Chapitre 3: Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor A1bZIP/CREB3L4 in prostate cells		93
3.1	Résumé.....	93
3.2	Abstract.....	94
3.3	Introduction.....	95
3.4	MATERIALS AND METHODS.....	98
3.4.1	Cell Culture and Treatments	98
3.4.2	Cell Lines That Conditionally Produce the Processed Form of A1bZIP	98
3.4.3	Nuclear Extracts.....	99
3.4.4	Immunoblotting	99
3.4.5	RNA Interference.....	100
3.4.6	Microarray Experiment and Data Analysis	100
3.4.7	Probes for Northern Blot Analysis.....	101
3.4.8	Candidate Gene Validation	101
3.5	RESULTS	102
3.5.1	A1bZIP is a Substrate for Golgi Proteases	102
3.5.2	Dysregulation of ER Calcium Stores Downregulates ER-Associated A1bZIP 102	
3.5.3	A1bZIP is processed to its transcriptionally active form by drugs that alter ER calcium concentrations	104
3.5.4	Microarray-Based Screening for A1bZIP-Regulated Transcripts.....	106
3.5.5	Validation of A290HA-Regulated Transcripts	110
3.6	Discussion.....	117
3.7	Acknowledgments	119
3.8	Grants.....	120
3.9	References.....	120
3.10	Supplementary material	123
Chapitre 4: The Endoplasmic Reticulum (ER)-Bound Transcription Factor CREB3 is Up-regulated by the Processed Forms of A1bZIP and CREB3 During ER Stress.....		128
4.1	Résumé.....	128
4.2	Abstract.....	129
4.3	Introduction.....	129
4.4	Materials and methods	131
4.4.1	Cell lines	131
4.4.2	Immunoblotting	132
4.4.3	Transcription Factor Expression Vectors	132
4.4.4	Promoter constructs and transient transfection assays.....	133
4.4.5	Chromatin immunoprecipitation assays.....	134
4.4.6	Short interfering RNA	134

4.5	Results.....	135
4.5.1	AlbZIP up-regulates CREB3 protein levels	135
4.5.2	AlbZIP activates the CREB3 promoter via proximal response elements.....	136
4.5.3	The AlbZIP-responsive region of the CREB3 promoter mediates CREB3 promoter activation in response to ER stress.....	140
4.5.4	AlbZIP binds to the CREB3 promoter <i>in vivo</i>	140
4.5.5	AlbZIP and CREB3 are activated sequentially during ER stress.....	143
4.5.6	CREB3 activates its own promoter via the AlbZIP-responsive element.....	145
4.6	Discussion.....	147
4.7	Funding	151
4.8	Acknowledgements.....	151
4.9	References.....	151
4.10	Supplementary material	154
Chapitre 5 : Discussion et conclusion.....		156
5.1	Discussion.....	156
5.2	Conclusion	171
Annexe 1: Stage-Specific Expression of the Atce1/ Tisp40a Isoform of CREB3L4 in Mouse Spermatids.....		172
A.1	Résumé.....	172
A.2	Abstract	173
A.3	Introduction.....	174
A.4	Materials and Methods.....	177
A.5	Results.....	180
A.6	Discussion.....	186
A.7	Acknowledgments.....	188
A.8	References.....	189
Bibliographie		192

Liste des tableaux

Tableau 1.1: Éléments de réponse associés à la réponse UPR.....	p.32
Tableau 2.1: RSL1-dependent luciferase reporter gene activity in RheoSwitch cell lines.....	p.78
Tableau 2.2: Microarray data.....	p.81
Tableau 3.1.: A290HA-regulated genes selected for validation.....	p.111
Supplementary Table 3.1: Genes up-regulated after 24 hr of RSL1 treatment (1086 DAVID IDs). GO annotation by DAVID software.....	p.125
Supplementary Table 3.2: Genes up-regulated after 24 hr of RSL1 treatment (1086 DAVID IDs). Functional annotation clustering by DAVID software.....	p.125
Supplementary Table 3.3: Genes down-regulated after 24 hr of RSL1 treatment (852 DAVID IDs).GO annotation by DAVID software.....	p.125
Supplementary Table 3.4: Genes down-regulated after 24 hr of RSL1 treatment (852 DAVID IDs). Functional annotation clustering by DAVID software.....	p.125
Supplementary Table 3.5: Genes with at least one probe set that detected an average fold-change ≥ 3.0	p.125
Supplementary Table 3.6: Affymetrix data for the candidate AlbZIP-regulated genes selected for validation.....	p.126

Liste des figures

Chapitre 1 : Introduction

Figure 1.1 : Schématisation de l'homologie de séquences en acides aminés des cadres de lectures ouverts de certains facteurs ATF/CREB.....p.2

Figure 1.2 : Schématisation des complexes de pré-initiation et d'initiation de la traduction protéique.....p.5

Figure 1.3 : Représentation du complexe de translocon dans la membrane du réticulum endoplasmique.....p.7

Figure 1.4 : Processus de N-glycosylation.....p.9

Figure 1.5 : Les trois voies de la réponse au stress du réticulum endoplasmique.....p.10

Figure 1.6 : Des agents affectent le fonctionnement normal du RE en perturbant la synthèse protéique.....p.12

Figure 1.7 : Illustration du mécanisme de dégradation protéique associé au RE.....p.18

Figure 1.8 : Induction de l'apoptose par la réponse UPR.....p.20

Figure 1.9 : Schématisation de facteurs de transcription ATF/CREB.....p.25

Figure 1.10 : Probabilité d'appariement des bZIP de facteurs de la sous-famille CREB3.....p.26

Figure 1.11 : Résumé des connaissances sur le facteur de transcription CREB3.....p.33

Figure 1.12 : État des connaissances actuelles sur le facteur de transcription OASIS.....p.38

Figure 1.13 : Schématisation de la fusion entre les gènes BBF2H7 et PPAR γp.40

Figure 1.14 : Résumé des connaissances publiées sur la protéine BBF2H7.....p.43

Figure 1.15 : Régulation de l'expression de CREB-H, de son clivage et de ses cibles transcriptionnelles.....p.48

Figure 1.16 : Profil d'expression du facteur de transcription A1bZIP chez l'humain.....p.50

Figure 1.17 : Régulation d'A1bZIP par les androgènes.....p.51

Figure 1.18 : Spécimen de tissu prostatique qui contient des cellules cancéreuses (C) et non-cancéreuses (N) marqué avec un sérum anti-A1bZIP.....p.52

Figure 1.19 : Intensité de marquage avec du sérum anti-AIbZIP de spécimens prostatiques.....p.53

Figure 1.20 : Résumé des connaissances sur Tips40.....p.58

Chapitre 2 : Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format

Figure 2.1: Schematic linear representation of RheoSwitch System vectors.....p.77

Figure 2.2: Androgen responsive growth of RheoSwitch cell lines.....p.79

Figure 2.3: Validation of putative RSL1-responsive genes by Northern blot analysis.....p.80

Figure 2.4 : RSL1-dependent production of recombinant proteins from pZRD plasmids containing RSL1-responsive expression cassettes.....p.83

Figure 2.5: RSL1-regulated production of recombinant AIbZIP in stable cell lines.....p.85

Chapitre 3: Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AIbZIP/CREB3L4 in prostate cells

Figure 3.1: Effect of brefeldin A (1 µg/ml; *A*), tunicamycin (1 µM; *B*), thapsigargin (1 µM; *C*), A23187 (2 µM; *D*), and caffeine (10 mM; *E*) on androgen-induced bZIP (AIbZIP) and BiP levels in LNCaP cells.....p.104

Figure 3.2: AIbZIP is processed to its nuclear form during endoplasmic reticulum (ER) stress in LNCaP cells.....p.106

Figure 3.3: RSL1-induced production of A290HA in cells used for gene expression profiling.....p.108

Figure 3.4: Validation of AIbZIP-responsive transcripts in independent A290HA producing clones.....p.110

Figure 3.5: Validation of candidate A290HA-responsive genes.....p.116

Figure supplémentaire 3.1:p.124

Chapitre 4: The Endoplasmic Reticulum (ER)-Bound Transcription Factor CREB3 is Up-regulated by the Processed Forms of AIbZIP and CREB3 During ER Stress

Figure 4.1: AIbZIP up-regulates CREB3 protein levels.....p.136

Figure 4.2: AlbZIP activates the CREB3 promoter.....	p.137
Figure 4.3: AlbZIP response elements are located in the 5' untranslated region of the CREB3 gene.....	p.139
Figure 4.4: The AlbZIP-responsive elements of the CREB3 promoter mediate CREB3 induction by A23187.....	p.141
Figure 4.5: AlbZIP binds to the CREB3 promoter <i>in vivo</i>	p.142
Figure 4.6: AlbZIP processing precedes CREB3 up-regulation during A23187-induced ER stress.....	p.144
Figure 4.7: CREB3 activates the CREB3 promoter via the AlbZIP-responsive elements.....	p.146
Figure 4.8: Model for CREB3 regulation by AlbZIP.....	p.147
Figure supplémentaire 4.1 : CREB3 antibody specificity.....	p.155
Figure supplémentaire 4.2 : CREB3 siRNA specificity.....	p.155
Chapitre 5 : Discussion et conclusion	
Figure 5.1 : Résultats des tests de clivage obtenus par l'équipe du Dr O'Hare sur AlbZIP et CREB3 et deux hybride AlbZIP-CREB3.....	p.159
Figure 5.2 : Effet de différents agents pharmacologiques et conditions sur la forme pleine longueur d'AlbZIP.....	p.163
Figure 5.3 : Effet de différents agents pharmacologiques et conditions sur la forme nucléaire d'AlbZIP.....	p.164
Annexe : Stage-Specific Expression of the Atce1/ Tisp40a Isoform of CREB3L4 in Mouse Spermatids	
Figure A.1: Structure of the Creb3l4 gene and encoded polypeptides.....	p.175
Figure A.2: Localization of CREB3L4 protein in mouse testis.....	p.182
Figure A.3: Stage-specific expression of CREB3L4 during spermiogenesis.....	p.183
Figure A.4: Characterization of glycosylated and non-glycosylated forms of Atce1/ Tisp40a in mouse testis.....	p.185

Liste des abréviations

- aa : amino acid-acide aminé
AlbZIP : Androgen Induced-bZIP
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
AMPc : Adénosine monophosphate cyclique
APP : Amyloid Precursor Protein
APR : Acute Phase Response / Phase aïgue de la réponse inflammatoire
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ARNt : Acide Ribonucléique de transfert
ASP : Antigène Spécifique de la Prostate
Atce-1 : Attaching to CRE-like
ATF : Activating transcription factor
ATF4 : Activating transcription factor-4
ATF6 : Activating transcription factor-6
ATP : Adénosine Triphosphate
BBF2H7 : BBF2 Human Homologue on Chromosome 7
Bcl-2 : B-cell CLL/Lymphoma 2
Bak : Bcl-2 homologous/antagonist killer
Bax : Bcl-2 associated X-protein
BGH: Bovine Growth Hormone
BIM : Bcl-2 Interacting Mediator of cell death
BMP2: Bone Morphogenetic Protein 2
BPH: Hyperplasie Bénigne de la Prostate
CAVI : Carbonic Anhydrase VI
C/EBP : CAAT/Enhancer Binding Protein
ChIP : immunoprécipitation de chromatine
CHOP: C/EBP Homologous Protein

CNX: Calnexine
COL1A1: Collagène de type 1 alpha 1
COMP : Cartilage Oligomeric Matrix Protein
CRE : cAMP Response Element
CREB : cAMP Responsive Element Binding Protein
CREB-H : cAMP Responsive Element Binding Protein-Hepatocytes
CREB3 : cAMP Responsive Element Binding Protein-3
CREM : cAMP Response Element Modulator
CRP: C-Reactive Protein
CRT : Calréticuline
CTL: control-Contrôle
DMSO : Dimethylsulfoxyde
DR5 : Death Receptor 5
DTT : Dithiothréitole
EDEM : ER Degradation Enhancing Mannosidase-like Protein
eIF : Eukaryotic Initiation factor
EF : Elongation factor
ERAD : ER Associated Degradation
ERMan1 : ER-mannosidase 1
ERO1 : ER oxydase 1
ERQC : Compartiment de Contrôle-Qualité du RE
ERSE : Endoplasmic Response Stress Element
ERSE-II : Endoplasmic Response Stress Element-II
Fbs : Fibrosine
GADD : Growth Arrest and DNA Damage
GDP : Guanine Diphosphate
Glnc1 : Glucosidase 1
GCMa/GCml : Glial Cell Missing homolog 1
GSK-3 β : Glycogen synthase kinase
GRIP : Glucocorticoid Receptor Interacting protein
GRP : Glucose Related Protein

GTP : Guanine Triphosphate
HSP: Heat Shock Protein
HCF : Host Cell Factor
HCLP-1 : HCF like Protein 1
HDAC: Histone Désacétylase
Herp : Homocystein-Induced ER stress protein
HGPIN : Néoplasie Intraépithéliale prostatique de haut grade
HNF4: Hepatocyte Nuclear Factor 4
hrGFP: human recombinant Green Fluorescent Protein
Ire1 : Inositol Requiring Kinase 1
IRS1: Substrat du récepteur à l'insuline
JIK : c-Jun N-terminal Inhibitory kinase
JNK : c-Jun NH2-terminal kinase
LDS: Lipid Depleted Serum – serum sans lipide
LGPIN: Néoplasie Intraépithéliale prostatique de faible grade
Lkn-1: Leukotactine 1
LPS: Lipopolysaccharide
LNCaP : Lymph Nodes Carcinoma of the Prostate
LRF : Luman/CREB3 Recruitment Factor
LUC: Luciférase
MEF : Mouse Embryonic Fibroblastes / Fibroblastes embryonnaires de souris
NF κ B : Nuclear Factor kappa B
NF-Y : Nuclear transcription factor Y
NS : Non Spécifique
OASIS : Old Astrocytes Specifically Induced Substance
ORF: Open Reading Frame- cadre de lecture ouvert
OS9 : Osteosarcoma amplified 9
OST : Oligosaccharyl Transférase
PERK : Protein Kinase-like ER kinase
PDI : Isomérase de protéines disulfures
PDTC : Pirrolodine Dithiocarbamate

PML : Promyelocytic Leukemia Protein
PPRE : Peroxisome Proliferating Responsive Element
prAlbZIP : Processed form of AlbZIP-Forme processée d'AlbZIP
RA : Récepteur des androgènes
RA : RheoActivator (Chapitre 2 seulement)
RE : Réticulum Endoplasmique
RIDD : Regulated Ire1-dependent decay
RMA : Multi-Array Analysis
RR1: RheoReceptor-1
RSL1: RheoSwitch Ligand 1
S1P : Serine Protease Site 1
S2P : Metalloprotease Site 2 Protease
SAP: Serum Amyloid P-component
SCF : Supercoiling Factor
SERCA : pompe Ca^{+2} -ATPase du réticulum endo(sarco)plasmique
siRNA : Short interfering RNA – Petit ARN d'interférence
Sox9 : SRY (Sex determining region Y)-box 9
SREBP : Sterol Regulatory Element Binding Protein
TAD : Transcriptional Activation Domain – Domaine d'activation de la transcription
TNF : Tumor Necrosis Factor
TRAF2 : TNF receptor associated-factor 2
TRB3 : Tribbles Homolog 3
UDP : Uracile Diphosphate
UGT1 : UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase
UPR : Unfolded Protein Response
UPRE : Unfolded Protein Response Element
VIH-1 : Virus de l'immunodéficience humaine-1
WCE : Whole Cell Extract –Extrait cellulaire total
XBP1 : X-Box Binding Protein 1

Chapitre 1 : Introduction

1.1 Mise en situation

Les travaux de recherche présentés dans cette thèse portent sur le facteur de transcription *Androgen Induced-bZIP* (AibZIP) qui a été identifié, en 2002 [1], par l'équipe du Dr Claude Labrie, équipe à laquelle je me suis jointe en 2004 pour d'abord y effectuer un stage d'été puis pour y poursuivre mes études graduées. Quoi de plus motivant qu'un sujet où l'état des connaissances y est précoce et où tout est à découvrir. AibZIP est un gène régulé par les androgènes dans les cellules cancéreuses prostatiques *Lymph Nodes carcinoma of the Prostate* (LNCaP) qui a été identifié par hybridation soustractive de bibliothèques d'acides désoxyribonucléiques complémentaires (ADNc) de LNCaP traitées ou non avec un androgène de synthèse [1]. Outre sa régulation par les androgènes, rien n'était connu quant à ses fonctions et à son mécanisme d'action dans les cellules cancéreuses prostatiques.

AibZIP est issu de la famille ATF/CREB qui comporte le facteur de transcription bien connu *Activating transcription factor 6* (ATF6) et ce dernier a servi à établir certaines hypothèses et à guider les travaux de recherche. Tout comme ATF6, AibZIP possède un domaine transmembranaire lui permettant un ancrage possible dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) et un domaine activateur de la transcription en N-terminal. Cela mène à penser qu'AibZIP, à l'image d'ATF6, pourrait être appelé à jouer un rôle dans la réponse au stress du RE. Cette introduction permettra d'abord de comprendre toutes les facettes du stress du RE, une réponse adaptative fortement régulée par des événements transcriptionnels et traductionnels. Alors que la découverte d'AibZIP était rapportée dans la littérature, on pouvait entrevoir une nouvelle branche de facteurs ATF/CREB davantage homologues entre eux qu'avec ATF6. Cette branche de l'arbre évolutif des facteurs ATF/CREB, nommée ici sous-famille CREB3 (figure 1.1) comporte les facteurs CREB3 (*cAMP Responsive Element Binding Protein-3*), OASIS (*Old Astrocytes Specifically Induced Substance*) et CREB-H, identifiés respectivement en 1997, 1999 et 2001 [2-4]. Le

gène *BBF2H7* (*BBF2 Human homologue on chromosome 7*) identifié chez l'humain un peu plus tard s'est joint à cette sous-famille [5], mais son homologue drosophilien *BBF-2* était connu depuis 1992 [6]. Les connaissances publiées sur cette famille au cours de mes études graduées seront explorées de manière à faire ressortir les caractéristiques communes et uniques de ces facteurs et leurs cibles transcriptionnelles connues dans différents processus physiologiques et pathologiques. C'est l'exploration de ces deux principaux sous-chapitres, le stress et la sous-famille *CREB3*, qui a permis l'élaboration d'un plan de travail contenant des objectifs de recherche réalistes appuyés par des données scientifiques fiables.

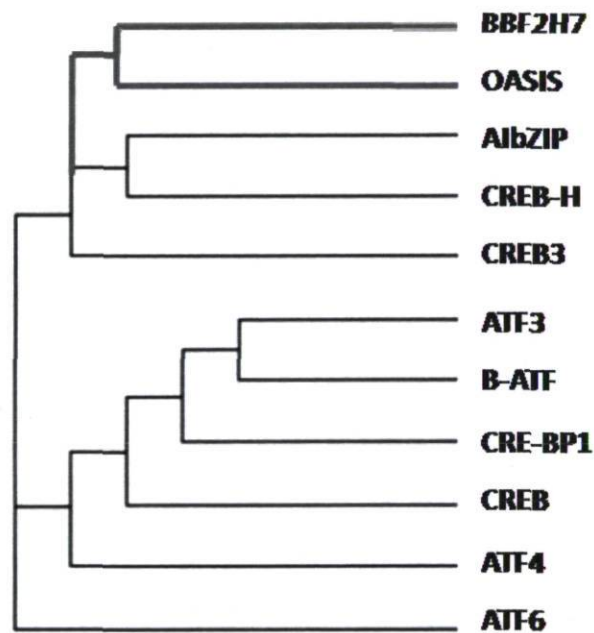


Figure 1.1 : Schématisation de l'homologie de séquences en acides aminés des séquences codantes de certains facteurs ATF/CREB. Ce diagramme démontre bien la similarité existant entre les facteurs *BBF2H7*, *OASIS*, *CREB-H*, *CREB3* et *AIBZIP* puisque ceux-ci sont issus d'une nouvelle branche de la famille ATF/CREB. Adaptée de Qi et collaborateurs 2002 et Kondo et collaborateurs 2007 [1, 5].

1.2 Le réticulum endoplasmique : site de synthèse et de maturation de protéines sécrétées et membranaires

Soumise à un environnement parfois hostile, la cellule eucaryote possède différents mécanismes lui permettant de survivre et de s'adapter à son milieu. La cellule est capable d'intervenir à différents niveaux afin de rétablir l'homéostasie qui est essentielle à sa survie. Elle contrôle d'une manière précise la transcription, la traduction, les modifications post-traductionnelles et la dégradation protéique. Étant un organe de premier plan dans la synthèse et la maturation protéique, le RE est extrêmement sensible aux changements survenant dans l'environnement cellulaire. Il est donc au cœur des processus de régulation dont dispose la cellule et possède de nombreuses protéines transmembranaires qui ont pour but de réagir aux changements et d'enclencher différentes réponses pour éviter à la cellule des dommages irréversibles. Il sera donc question, dans cette section, du RE et des moyens qu'il possède pour permettre à la cellule de s'adapter à son milieu.

Composé d'un réseau membranaire issu de la prolongation de la membrane nucléaire externe, le RE est un microenvironnement distinct qui supporte plusieurs fonctions primordiales à la cellule. Afin d'assurer ses fonctions, la membrane du RE n'est que peu perméable à certains constituants tel le calcium dont la concentration intraréticulaire doit être élevée puisqu'il s'agit d'un composé essentiel à certaines protéines résidentes du RE, dont les chaperonnes. L'environnement interne est dans un état très oxydé qui est nécessaire au repliement protéique. On y retrouve également des sucres et de l'adénosine triphosphate (ATP). La cellule possède deux types de RE soit le lisse et le rugueux. Le RE lisse a pour fonction principale la biosynthèse des lipides et des glucides et est particulièrement abondant dans des types cellulaires qui sécrètent des stéroïdes, alors que le RE rugueux est le site de synthèse et de maturation des protéines destinées à la sécrétion ou à une localisation membranaire. Les gènes encodant les protéines devant prendre la voie de sécrétion constituent environ 30% du génome [7]. Le RE rugueux doit son nom à la présence de ribosomes sur sa surface externe qui sont des constituants essentiels à la machinerie de traduction protéique. Selon le type cellulaire, le RE rugueux

peut prendre plus ou moins d'expansion, c'est-à-dire qu'une cellule sécrétant beaucoup de protéines aura un RE qui pourra prendre un volume très grand du cytosol. La séparation des deux types de RE est, en fait, dû à leur composition en protéines transmembranaires [8]. Le RE rugueux contiendra une concentration importante de protéines destinées à la synthèse protéique. Le RE n'est pas statique et il peut s'adapter aux perturbations externes. Dans le phénomène de stress du RE qui sera expliqué tout au long de cette section, il est fréquent d'observer une expansion de la taille du RE caractérisée par une biosynthèse accrue des constituants membranaires chez certaines cellules soumises à une demande accrue de synthèse protéique. Les facteurs de transcription ATF6 et *X-box binding protein-1* (XBP-1), activés au cours de la réponse à un stress, sont capables de réguler la synthèse de lipides en agissant sur l'activité de l'enzyme cytidine diphosphocholine qui est responsable de la biosynthèse de la phosphatidylcholine nécessaire à l'expansion des membranes [9-10]. Cela démontre tout le potentiel de remodelage dont est capable le RE pour assurer ses diverses fonctions.

1.2.1 La traduction couplée au RE et le repliement

La traduction de protéines membranaires et sécrétées par la cellule se fait à la surface externe du RE, là où sont localisés des ribosomes. Les ribosomes constituent l'unité catalytique du mécanisme et sont aidés par de nombreuses protéines accessoires. La traduction débute par l'assemblage de différents complexes. D'abord, la sous-unité 40S du ribosome forme un complexe de pré-initiation avec les facteurs d'initiation de la traduction eucaryotes (*eukaryotic initiation factor-* eIF) eIF1, eIF3, eIF5 et le complexe Met-tRNA-eIF2-GTP où Met-tRNA est un acide ribonucléique de transfert (ARNt) liant une méthionine [11]. Parallèlement à ce complexe, il y a assemblage d'un autre complexe constitué de plusieurs sous-unités d'eIF4 (eIF4A, B, E et G) qui est en mesure de lier la partie 5' de l'acide ribonucléique messenger (ARNm). eIF4 lie ensuite eIF3 pour former le complexe d'initiation de la traduction [11].

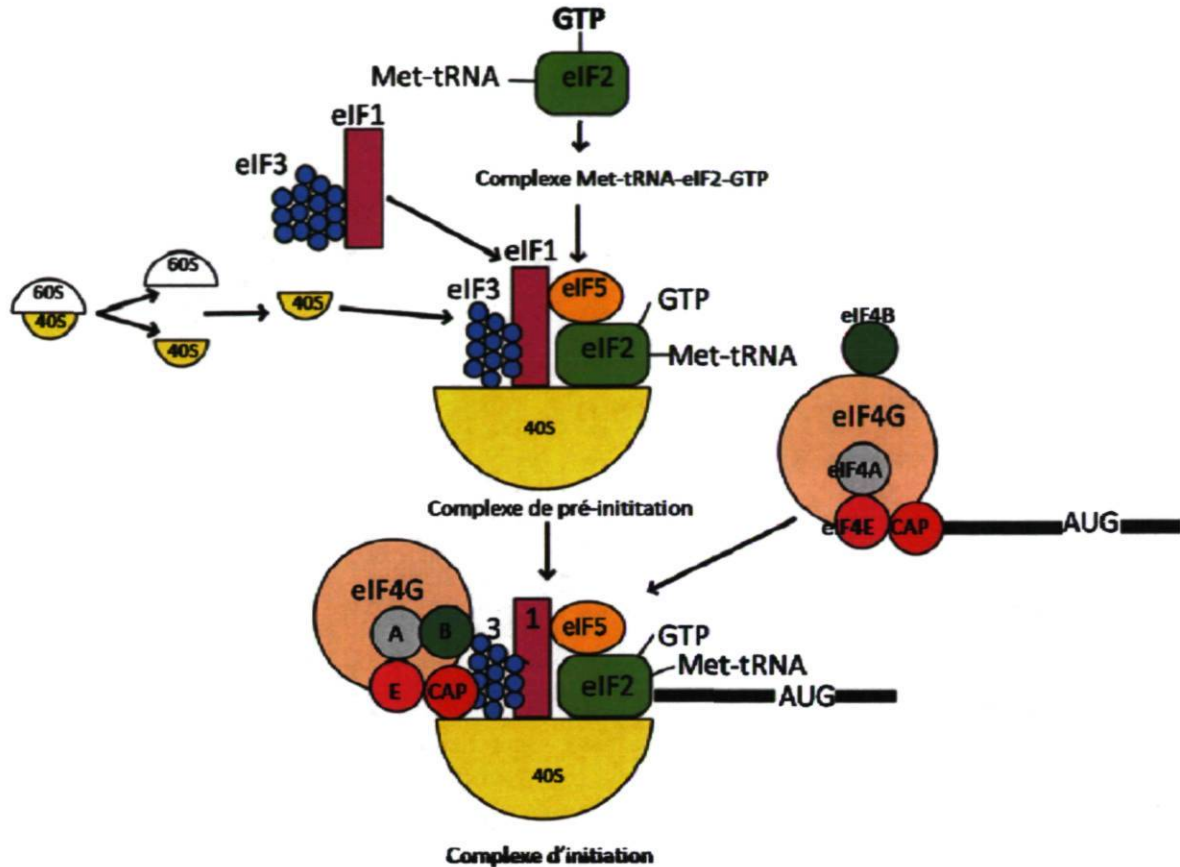


Figure 1.2 : Schématisation des complexes de pré-initiation et d'initiation de la traduction protéique. Le complexe de pré-initiation est formé de la sous-unité 40S du ribosome sur laquelle sont liés les facteurs d'initiation de la traduction eucaryote eIF1, eIF2, eIF3 et eIF5. eIF2 est complexé avec un ARN de transfert lié à la méthionine qui constituera le premier acide aminé du peptide. Au complexe de pré-initiation s'ajoute ensuite le complexe eIF4-ARNm qui permettra au complexe d'initiation de parcourir l'ARNm à la recherche du codon d'initiation. Adaptée de Van Der Kelen et collaborateurs [11].

Un élément de régulation majeur de la traduction est la phosphorylation de la sous-unité alpha d'eIF2. Tel qu'indiqué à la figure 1.2, eIF2 est lié à une guanine triphosphate (GTP), ce qui lui permet de lier un Met-ARNt et de participer, sauf exception, à l'initiation de la traduction [11]. Or, lorsqu'il y a phosphorylation de la sérine 51 d'eIF2 α , eIF2 se retrouve alors dans un état de liaison à une guanine diphosphate (GDP), état qui inhibe sa participation au complexe de pré-initiation [12].

Une fois en complexe avec le complexe de pré-initiation (40S-eIF3-eIF1-eIF2-GTP-Met-tRNAi^{Met}), eIF4, qui est doté d'une activité hélicase, parcourt l'ARNm pour y trouver une séquence de nucléotides AUG correspondant au site d'initiation de la traduction [11]. Une fois sur le site, il y a hydrolyse du GTP d'eIF2 en GDP par eIF5, ce qui permet l'arrivée de la sous-unité 60S du ribosome. Interviennent ensuite des facteurs d'élongation (EF) qui permettent l'arrivée et la liaison d'ARNt qui apportent les acides aminés au complexe d'élongation [11]. Dans le cas de traduction liée à la membrane du RE, c'est-à-dire de traduction pour les protéines destinées à la sécrétion ou à la localisation membranaire, le peptide naissant est pris en charge par un complexe de protéines liées à la membrane du RE, le translocon, pour ensuite subir diverses modifications dans le RE [13].

Le processus par lequel les protéines sécrétées et transmembranaires subissent leurs modifications et acquièrent leur conformation finale est appelé la glycosylation. Toute erreur dans la conformation pourra mener à des agrégats de protéines et à une dysfonction de celles-ci. Le peptide nouvellement traduit entre dans le RE via le translocon qui est illustré à la figure 1.3. Ce complexe est formé des sous-unités α , β et γ de la protéine Sec61 qui constituent un canal dans la membrane du RE [14-15]. Sec61 est le cœur fonctionnel d'un complexe transmembranaire formé de plusieurs protéines dont certaines interagissent avec les ribosomes associés au RE. C'est le cas, entre autres, du cofacteur p180, aussi appelé récepteur des ribosomes, qui est distribué largement dans la membrane du RE, et de la protéine CLIMP63, une protéine de type microtubule qui est impliquée dans l'organisation spatiale du RE [16]. Des expériences d'électrophorèse native en haute résolution ont inclus CLIMP63 dans un complexe d'ancrage qui contient également d'autres cofacteurs tels que la transférase d'oligosaccharyle (OST) et la glucosidase I (GlcI) [16]. Ces protéines agissent au niveau de la prise en charge et de la modification du peptide naissant.

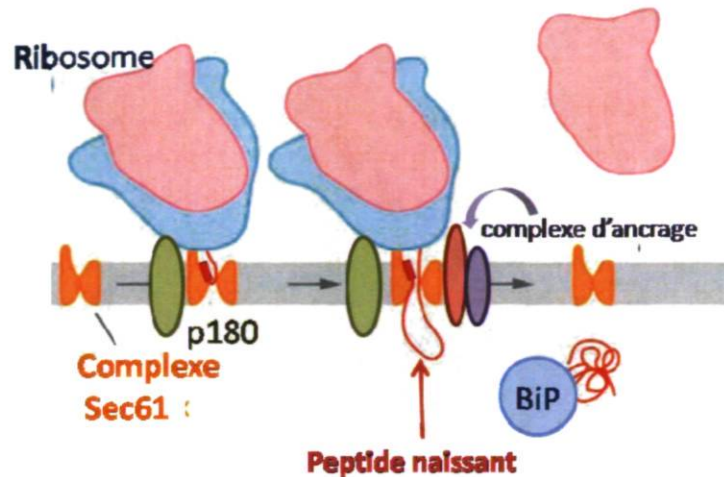


Figure 1.3 : Représentation du complexe de translocon dans la membrane du réticulum endoplasmique. Le translocon est constitué du complexe Sec61 qui constitue un passage à travers la membrane pour le peptide naissant. Le cofacteur p180 et le complexe d'ancrage permettent la liaison du ribosome à la membrane du RE. BiP prend en charge le peptide dans le réticulum. Adaptée d'Osborne et collaborateurs et Dejgaard et collaborateurs [15-16].

Une fois dans la lumière du RE, le peptide est d'abord modifié par l'enzyme OST associée au translocon, qui ajoute, de manière covalente, un N-glycan, défini comme suit : N-acetylglucosamine₂-mannose₉-glucose₃ et illustré à la figure 1.4A, sur les résidus asparagines. Ce processus est appelé la N-glycosylation et déclenche le processus de repliement qui dépendra du nombre de glucoses et de mannoses présents sur le N-glycan tout au long des étapes successives (Figure 1.4B) [17-19]. Le N-glycan complet est la cible de deux enzymes, soit les ER- α -glucosidases I et II qui enlèvent successivement un glucose sur le N-glycan. Le peptide ainsi transformé ne contient alors qu'un seul glucose et est reconnu par les lectines calnexine (CNX) et calréticuline (CRT) du cycle CNX/CRT. Celles-ci sont associées à l'oxydoréductase Erp57. Erp57 fait partie de la famille des isomérases de protéines disulfures (PDI) dont l'activité enzymatique est la catalyse de ponts disulfures entre des résidus cystéines pour stabiliser la structure protéique [20]. Une fois cette étape effectuée, le dernier glucose est enlevé par l'enzyme glucosidase II, ce qui permet aux protéines en cours de repliement d'échapper à une nouvelle ronde dans le cycle CNX/CRT. Advenant une erreur dans l'ajout de liens disulfures au cours du cycle

CNX/CRT, l'intermédiaire relâché par le cycle est pris en charge par l'enzyme UDP-glucose : glycoprotéine glucosyltransférase (UGT1) qui a pour fonction de rajouter un glucose [21]. Ce processus a pour but la rétention de glycoprotéines immatures. Interviennent ensuite les chaperonnes, des protéines qui lient les régions hydrophobes du peptide pour éviter la formation d'agrégats et terminer la maturation des protéines en favorisant leur conformation idéale. Lorsqu'une protéine est parvenue à maturation, elle est reconnue par une lectine liant le mannose (ERGIC-53, VIPL, ERGL), ce qui lui permet de quitter le RE et de poursuivre sa voie vers la sécrétion [22].

Les chaperonnes sont des protéines aussi appelées protéines reliées au glucose (*glucose related protein-GRP*) ou protéines de choc thermique (*Heat Shock Protein-HSP*). Elles ont besoin de calcium et d'énergie sous forme d'ATP pour pouvoir replier convenablement les protéines. Elles sont aidées des HSP40, des co-chaperonnes qui lient les protéines mal repliées pour les livrer aux HSP70 et qui stimulent l'activité ATPase des HSP70 nécessaire au repliement. Les HSP70 se dissocient ensuite des peptides dépendamment de l'action de facteurs d'échange de nucléotides [23]. Une des chaperonnes grandement étudiées est la protéine GRP78, communément appelée BiP (*Immunoglobulin binding Protein*). En absence de protéines à replier, la chaperonne BiP est associée à des senseurs de perturbations physiologiques et les maintient dans un état inactif [24].

Le repliement parfait d'une protéine est en lien direct avec sa capacité d'assurer sa fonction. Le repliement est un processus complexe qui doit être exempt d'erreur. De nombreuses maladies connues sont d'ailleurs associées à des mutations causant une erreur de conformation. Une incapacité de la part de la cellule à assurer le repliement, pouvant être causée par une mutation ou une perturbation physiologique, pourra mener à l'accumulation et l'agrégation de protéines au RE. Heureusement, dans la plupart des cas, la cellule est en mesure de gérer efficacement ce processus et de s'adapter à la demande de repliement [9].

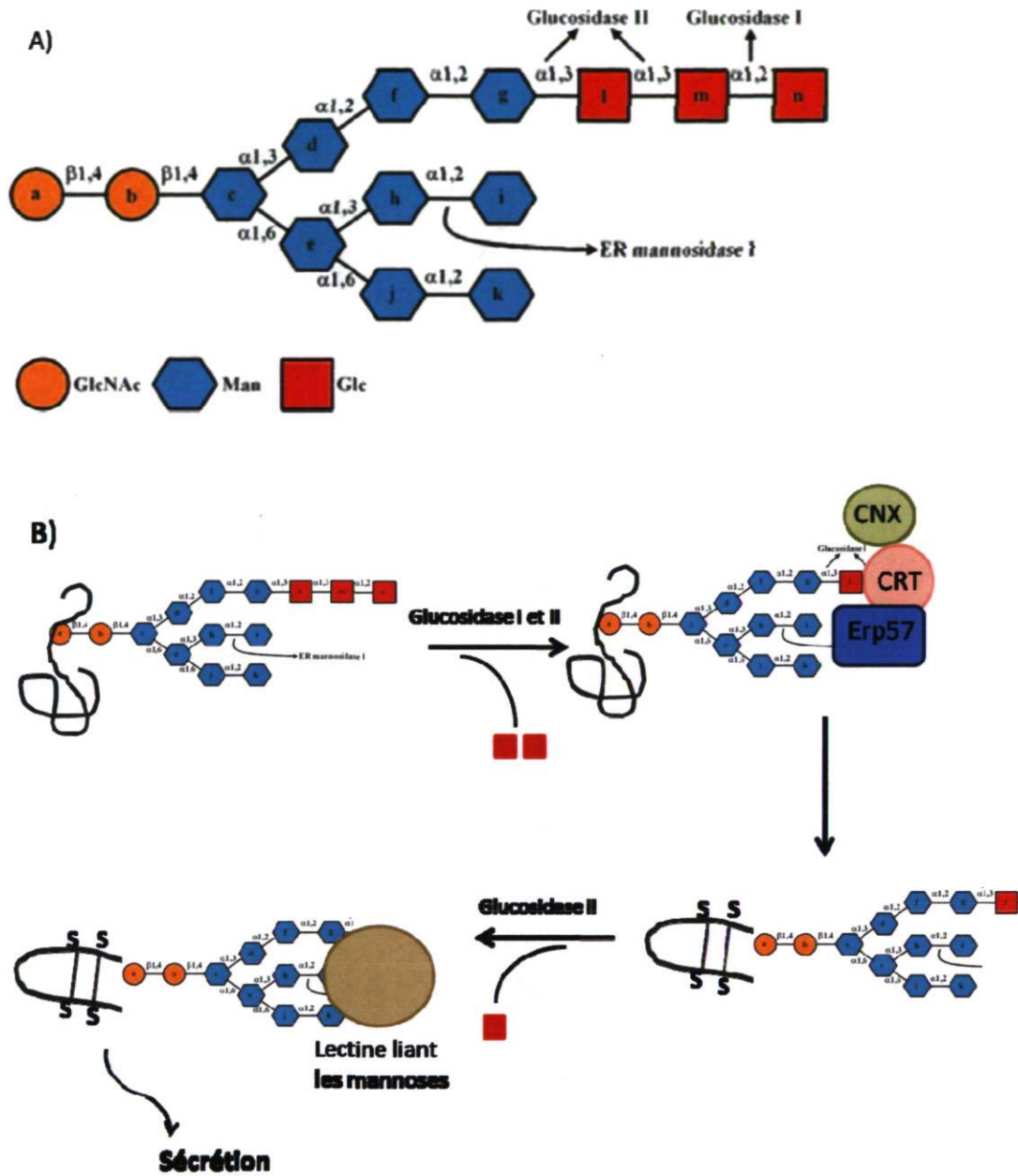


Figure 1.4 : Processus de N-glycosylation A) Représentation schématique d'un N-Glycan. Le glycan est formé par un assemblage de 2 N-acétylglucosamine, 9 mannoses et 3 glucoses. B) Processus de modification du N-Glycan par les enzymes du cycle CNX/CRT. Le nombre de résidus sur le glycan est déterminant pour le cycle de contrôle-qualité. La présence de 3 glucoses permettra l'entrée dans le cycle CNX/CRT alors qu'en l'absence de glucose, les mannoses exposés seront liés par des lectines et il y aura poursuite de la voie sécrétrice. Adaptée de Caramelo et collaborateurs [18].

1.2.2 La réponse au stress (*Unfolded protein response*)

Le mécanisme de repliement des protéines est un mécanisme complexe qui fait appel à de nombreux facteurs ayant besoin de différents éléments. Par exemple, l'activité des chaperonnes est dépendante d'ATP [25] et de calcium [26] et le cycle CNX/CRT est dépendant de N-glycans [27]. Évidemment, toute diminution importante de ces éléments ou toute demande accrue de synthèse protéique aura pour effet de surcharger le RE de protéines mal repliées. Les cellules possèdent une capacité d'adaptation surprenante pour gérer le repliement protéique selon la demande et les constituants disponibles. On parle alors de la réponse au mal repliement protéique plus communément appelée, en anglais, la *unfolded protein response* (UPR) (figure 1.5). Ce mécanisme est observé dans plusieurs conditions telles qu'une infection virale qui ordonne à la cellule une synthèse protéique virale importante ou encore lorsque les nutriments se font rares pour des cellules au cœur d'une tumeur inadéquatement vascularisée [28].

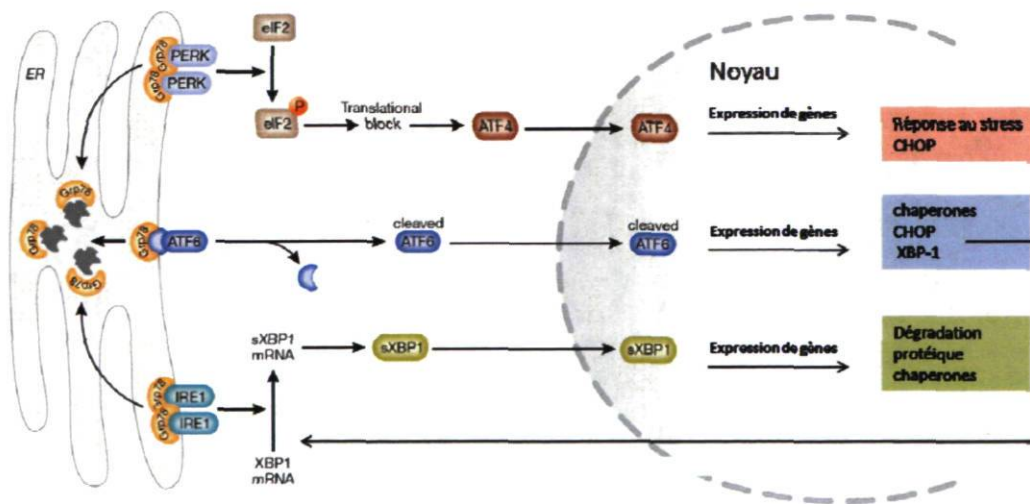


Figure 1.5 : Les trois voies de la réponse au stress du réticulum endoplasmique. Lorsque survient un stress, la chaperonne GRP78/BiP quitte les senseurs de stress PERK, ATF6 et IRE1 pour replier les protéines en formation. PERK, ATF6 sont des facteurs de transcription qui se rendent alors au noyau pour transcrire des gènes importants dans la réponse au stress, de même que XBP1 dont le produit issu de l'épissage spécifique par IRE1 est un facteur de transcription fonctionnel. Adaptée de Szegezdi et collaborateurs 2006 [29].

Plusieurs agents pharmacologiques ayant pour effet de perturber la synthèse et la maturation protéique sont utilisés en laboratoire pour occasionner un stress aux cellules (figure 1.6). On retrouve des agents qui affectent les concentrations calciques au RE. Par exemple, la thapsigargine agit en inhibant les pompes à calcium Ca^{+2} -ATPase du réticulum endo(sarco)plasmique (SERCA) [30] et la caféine favorise le relâchement de calcium par le récepteur à la ryanodine [31]. Altérant également les niveaux de calcium, deux ionophores du calcium, l'ionomycine et le A23187, sont utilisés pour capter le calcium à l'extérieur du RE, ce qui en diminue les concentrations intra-RE [32-33]. Le dithiothréitole (DTT) est souvent utilisé pour causer un stress car il est un agent réducteur qui prévient la formation des ponts disulfures qui sont primordiaux pour le repliement des protéines [34]. La tunicamicine, pour sa part, est un antibiotique employé pour inhiber la N-glycosylation des protéines [35]. Finalement, la brefeldin A, un agent antimicrobien originant des moisissures, est grandement utilisé pour étudier certains mécanismes du RE puisqu'elle inhibe la sortie de protéines du RE et cause une redistribution des constituants membranaires de l'appareil de Golgi vers le RE. Cela permet la relocalisation de certaines protéases résidentes de l'appareil de Golgi vers le RE [36]. Tous ces agents auront pour effet de créer un stress puisqu'elles contribueront à augmenter le volume de protéines en formation dans le RE. Ils sont donc d'une grande utilité pour identifier les acteurs impliqués dans la réponse UPR des cellules stressées.

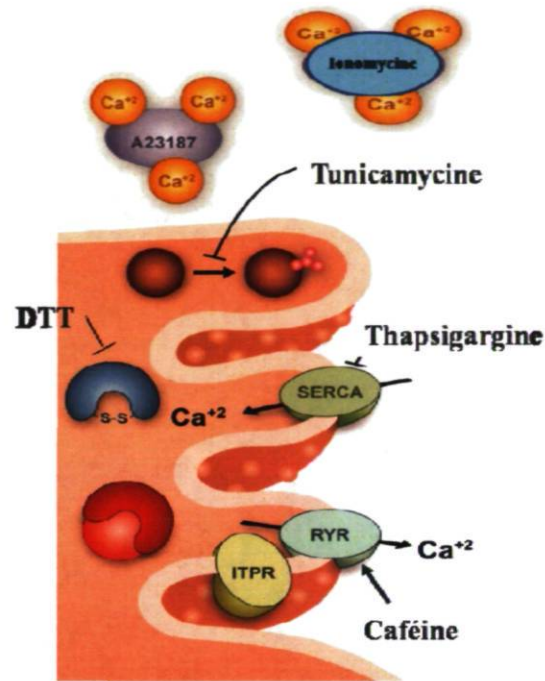


Figure 1.6 : Des agents affectent le fonctionnement normal du RE en perturbant la synthèse protéique. La thapsigargine et la caféine affectent des pompes et récepteurs à calcium, alors que le A23187 et l'ionomycine sont des chélateurs de calcium [32-33]. Les perturbations des concentrations calciques perturbent la synthèse protéique en contraignant la disponibilité du calcium nécessaire aux chaperonnes. Le DTT (dithiothréitole) et la tunicamycine bloquent des processus essentiels au repliement protéique soit la formation de ponts disulfures et la N-glycosylation [34].

La réponse UPR tentera de rétablir l'homéostasie cellulaire de diverses façons. Elle agit sur différents niveaux de régulation, soit sur la transcription, la traduction, la dégradation protéique et l'apoptose. Les senseurs de stress au RE enverront des signaux pour réduire le niveau de traduction général des ARNm, de façon à réduire le nombre de protéines nécessitant synthèse et maturation au RE. Des signaux conduiront à la transcription spécifique de gènes permettant d'augmenter la capacité de repliement telle que les chaperonnes. De plus, des protéines du RE contribueront à augmenter la dégradation des protéines mal repliées par le mécanisme de dégradation associée au RE (ERAD), ce qui aura pour effet de désengorger le RE. Advenant une incapacité de la cellule à reprendre le contrôle, la réponse UPR déclenchera des mécanismes menant à l'apoptose

de la cellule en danger. Trois principales voies de signalisation agissent simultanément lors de la réponse UPR et impliquent des acteurs majeurs qui sont tous localisés dans la membrane du RE en plus d'y être retenus par la chaperonne BiP dans la lumière du RE.

Au niveau de la transcription, la réponse UPR fait appel à différents facteurs de transcription qui utilisent une sélection assez spécifique d'éléments de réponse retrouvés sur les promoteurs des gènes à induire. Le premier élément de réponse identifié comme étant spécifique à cette réponse est l'élément de réponse *Endoplasmic Reticulum Stress Element* (ERSE). Sa séquence (CCAAT-N₉-CCACG) a été découverte lors de l'étude des promoteurs des chaperonnes GRP78, GRP94 et CRT [37]. Un second élément identifié, assez similaire à ERSE, a été nommé ERSE-II. Sa séquence (ATTGG-N-CCACG) diffère d'ERSE par la présence d'un seul nucléotide au centre des deux séries de cinq nucléotides et la première série se veut être une séquence complémentaire à la série retrouvée dans ERSE [38]. Un troisième élément associé à la réponse UPR est l'élément *Unfolded Protein Response* (UPRE) (TGACGTGG) qui est un élément qui se retrouve dans le promoteur de plusieurs gènes associés à la dégradation de protéines mal repliées par le mécanisme ERAD [39-40].

1.2.2.1 La voie Ire1 (figure 1.5-voie du bas)

Ire1 ou *Inositol requiring kinase 1* est une enzyme ayant une double fonction : elle possède une activité kinase et une activité endoribonucléase [41-42]. Cette protéine constitutivement exprimée dans toutes les cellules eucaryotes est ancrée dans la membrane du RE. Son domaine C-terminal, qui contient une activité kinase et une activité endonucléase, est dans le cytosol, ce qui en fait une protéine transmembranaire de type 1 [43]. La voie Ire1, qui est très conservée chez les eucaryotes, a d'abord été identifiée et grandement caractérisée chez la levure. Deux homologues humains à l'Ire1 de levure ont été identifiés, soit Ire1 α , une protéine ubiquitaire, et Ire1 β , dont l'expression est restreinte aux cellules épithéliales intestinales. Toutes deux possèdent des fonctions de kinase et d'endoribonucléase, mais il sera question de l'isoforme α dans le contexte du stress du RE décrit dans cette section. En absence de stress, Ire1 est ancrée dans la membrane et sa portion intra-RE est liée à la chaperonne BiP. Lorsque survient un stress, BiP relâche Ire1

et se rend sur des protéines mal repliées afin d'accroître la capacité de repliement du RE. La protéine Ire1 peut alors former des homodimères avec ses semblables, ce qui permet à leur domaine kinase de se phosphoryler l'un et l'autre. Il est intéressant de noter que l'activité kinase d'Ire1 n'a pas d'autre substrat connu qu'Ire1 [22]. Cette transphosphorylation a pour effet d'activer leur activité RNase qui cible et clive l'ARNm de XBP-1, originellement identifié chez la levure sous le nom HAC1. Cet épissage, qui se veut indépendant de celui mené par la machinerie standard d'épissage, le spliceosome, est spécifique à l'ARNm de XBP-1 et lui enlève 26 nucléotides situés dans une partie intronique [44]. Cet événement a pour but de changer le cadre de lecture de la séquence codante et il en résulte une protéine beaucoup plus stable et un facteur de transcription fonctionnel [22, 44].

Tel que mentionné précédemment, la transcription de gènes impliqués dans la réponse au stress passe par trois principaux éléments de réponse. Le facteur de transcription XBP-1 résultant de l'épissage de son ARNm est en mesure de lier la région CCACG de ERSE lorsque le co-facteur NF-Y est placé sur le CCAAT de l'élément [45]. XBP-1 lie aussi, sans aide cette fois, les éléments de réponse ERSE-II et UPRE, mais avec une plus grande affinité pour UPRE [45]. Plusieurs cibles de XBP-1 sont connues et jusqu'à la découverte des facteurs ATF/CREB de la sous-famille CREB3 (section 1.2), XBP-1 était le seul facteur capable de lier UPRE. Utilisant l'élément UPRE, XBP-1 induit la transcription du gène *ER Degradation Enhancing Mannosidase-like protein* (EDEM), un gène impliqué dans le mécanisme de dégradation protéique ERAD [40]. Ce mécanisme sera plus longuement abordé dans une section subséquente (1.2.2.4). La voie Ire1-XBP-1 est aussi impliquée dans la régulation du gène *homocysteine-induced ER stress protein* (HERP), ce qui a été démontré par une absence de l'expression de l'ARN de Herp dans des fibroblastes embryonnaires de souris qui n'expriment pas Ire1 (MEF Ire1^{-/-}) [45]. Ces cellules sont issues de la délétion des exons 7 à 14 du gène murin Ire1 α qui furent remplacés par le gène de résistance à la néomycine afin de faciliter la sélection des cellules [46]. Le promoteur de Herp contient deux éléments de réponse reliés à la réponse UPR, soit les éléments ERSE et ERSE-II. Des expériences *in vitro* de retardement sur gel ont montré que XBP-1 lie préférentiellement l'élément ERSE-II à l'élément ERSE [45]. Herp est un gène induit suite

à un stress causé par une concentration élevée d'homocystéine, un acide aminé soufré dont l'accumulation anormale peut occasionner des événements de thrombose vasculaire [47-49]. La protéine BiP est également induite lors d'une exposition importante à l'homocystéine suggérant que cette condition expose la cellule à un stress du RE [47]. Il a été démontré que la protéine Herp est impliquée dans la réponse au stress en augmentant la tolérance au stress des cellules qui l'expriment. En effet, l'absence de Herp dans des cellules embryonnaires de souris conduit à une vulnérabilité accrue au stress caractérisée par une induction importante de la chaperonne BiP, une diminution de la dégradation protéique et une induction hâtive de l'apoptose [50].

Assez récemment, un mécanisme de destruction d'ARNm a été identifié comme faisant partie de la réponse UPR. Le mécanisme nommé, en anglais, *Regulated Ire1-dependent decay* (RIDD) consiste en une destruction spécifique d'ARNm devant conduire à la biosynthèse de protéines sécrétées. En situation de stress, la cellule utilise l'activité ribonucléase d'Ire1, indépendamment de son activité kinase pour détruire des ARNm et le mécanisme semble différent de celui menant à l'épissage de XBP-1 [51]. Étant un mécanisme relativement nouveau, il y a beaucoup à découvrir quant à la régulation de cette voie et à la spécificité de destruction des ARNm.

1.2.2.2 La voie PERK-eIF2 α (figure 1.5 voie du haut)

PERK (*Protein kinase-like ER Kinase*) est la seconde voie impliquée dans la réponse UPR et elle produit une réponse rapide et réversible. Elle se produit dans la majorité des cellules puisque l'expression de PERK est constitutive et ubiquitaire. Outre une régulation transcriptionnelle, cette voie passe d'abord par une régulation de la traduction. Tout comme Ire1, PERK est une protéine membranaire de type I ancrée dans la membrane du RE et liée à la chaperonne BiP dans la lumière du RE [43]. En situation de stress, BiP se détache de PERK qui peut alors former des dimères qui utilisent leur domaine kinase pour effectuer une trans-phosphorylation. Cette phosphorylation de la portion cytosolique de PERK conduit à la phosphorylation subséquente, sur la sérine 51, de la sous-unité α du facteur traduction eIF2 [43]. Tel que mentionné précédemment, cette phosphorylation est suffisante pour inhiber, de manière générale, la traduction protéique

[12]. Cela aura pour effet de diminuer considérablement le nombre de protéines qui se rendront au RE pour y être synthétisées. L'ingéniosité de cette voie réside toutefois dans une traduction spécifique, suite à la phosphorylation d'eIF2 α , de certains ARNs pouvant apporter des bénéfices à la cellule dans le contexte de stress du RE. Cette traduction se fait via un cadre de lecture ouvert en amont du site habituelle de traduction. Parmi ces ARN, il y a celui du facteur de transcription *Activating transcription factor 4* (ATF4) [52]. Une fois traduit, le facteur de transcription permettra d'activer l'expression de gènes pouvant aider à rétablir l'homéostasie. Parmi ses cibles, on retrouve le gène CHOP (*CAAT/Enhancer binding protein (C/EBP) homologous protein*) qui code pour un facteur de transcription possédant un bZIP, mais de la famille C/EBP [52]. L'activité transcriptionnelle de CHOP lui permet ensuite de transcrire des gènes tels que GADD34 (*Growth Arrest and DNA damage 34*) et ERO1 (*ER oxidase-1*) [52-54]. GADD34 code pour une sous-unité régulatrice de la phosphatase PP1 qui déphosphoryle la sous-unité α de eIF2 et met ainsi fin à la voie PERK-eIF2 [55], alors que la protéine ERO1 est nécessaire au repliement protéique en permettant la formation des ponts disulfures [56]. La protéine CHOP est aussi grandement impliquée dans l'induction de l'apoptose suite au stress du RE (Voir section 1.2.2.5) [22, 43, 54].

1.2.2.3 ATF6

ATF6 est une protéine transmembranaire de type II qui réside, tout comme les protéines abordées jusqu'à maintenant, dans la membrane du RE [57]. Elle y est retenue par la chaperonne BiP qui la libère lorsqu'il y a augmentation de la synthèse protéique au RE [58-59]. Deux isoformes de la protéine, soit ATF6 α et ATF6 β , sont présentes dans la cellule, mais l'activité principale de cette voie est liée à l'activité de l'isoforme α [22]. L'activité du facteur ATF6 est régulée par le mécanisme RIP. Cela implique que le facteur ATF6, libre de sa liaison avec BiP, est alors transporté à l'appareil de Golgi par le complexe protéique COPII [60], pour y subir des clivages successifs par les protéases *Serine protease site-1* (S1P) et *Metalloprotease site-2 protease* (S2P) [61-62]. La protéase S1P clive la séquence d'acides aminés arginine-histidine-leucine-leucine qui répond au motif reconnu par S1P, soit RxxL où x correspond à n'importe quel acide aminé. Le clivage par S2P nécessite le clivage préalable par S1P et la présence de résidus asparagine-proline

au niveau du segment transmembranaire de la protéine [61-62]. Le facteur ATF6 clivé est alors transloqué de l'appareil de Golgi jusqu'au noyau, par un mécanisme encore incompris, où il saura transcrire des gènes importants pour la réponse UPR. Il est connu qu'ATF6 est un facteur de la famille ATF/CREB, une grande famille de facteurs possédant un motif bZIP, soit une région d'acides aminés basiques suivie d'un motif de fermeture à leucines, essentiels, respectivement, pour les liaisons à l'ADN et les interactions protéine-protéine. Les facteurs ATF/CREB ont la capacité de lier la séquence consensus ATF/CRE définie comme suit : TGACGTCA [63]. Dans le cas de la réponse UPR, ATF6 lie très fortement l'élément ERSE [37, 45], plus précisément la séquence CCACG de cet élément seulement quand le facteur NF-Y est sur le CCAAT [45]. Des études *in vitro* ont permis de démontrer qu'ATF6 lie aussi, mais plus faiblement, l'élément ERSE-II d'une manière dépendante de la présence de NF-Y, et qu'il ne lie pas l'élément de réponse UPRE [45]. BiP est une cible transcriptionnelle d'ATF6, expression qui passe par l'élément de réponse ERSE présent dans sa séquence promotrice [37, 45]. Son induction aura pour effet de permettre à une plus grande quantité de protéines mal repliées d'être repliées correctement. Des expériences de puces à ADN réalisées avec le facteur ATF6 α ont démontré que la grande majorité de ses cibles sont des protéines chaperonnes (BiP, Ero1, GRP94) et des protéines impliquées dans le mécanisme ERAD (Derlin, Herp, EDEM1), et qu'ATF6 ne semble pas induire des protéines qui favorisent le transport et la translocation de protéines à l'extérieur du RE [64].

L'augmentation de l'expression de BiP est un des repères les plus importants pour dire que la cellule est en situation de stress puisque cette chaperonne est à la base des trois principales voies de transduction de signaux de stress [65]. Une fois que BiP sera en surplus dans la lumière du RE et que les protéines mal repliées seront en quantité normale, la chaperonne sera en mesure de se lier à nouveau à ATF6, de même qu'à Ire1 et PERK, pour mettre un terme à la réponse UPR. Assurément, chacune des trois voies a des rôles spécifiques à jouer dans la réponse UPR, mais elles sont aussi quelque peu redondantes de part leurs cibles transcriptionnelles communes identifiées. Fait intéressant, des facteurs de transcription identifiés au cours des dernières années et faisant partie de la sous-famille CREB3 des facteurs ATF/CREB (voir section 1.3) seraient soumis à une régulation par le

mécanisme RIP et seraient impliqués dans la réponse UPR. Ils pourraient donc être potentiellement complémentaires à l'activité d'ATF6 dans la réponse UPR en plus de posséder des activités particulières et propres à chacun.

1.2.2.4 Le mécanisme ERAD

Tel qu'il a été mentionné à quelques reprises, le mécanisme de dégradation protéique ERAD est déclenché par la réponse UPR et est en fait une conséquence directe des trois principales voies de transduction des signaux de stress. La réponse au stress permettra la dégradation accrue des protéines mal repliées par le protéasome 26S. Tel que démontré à la figure 1.7, le mécanisme ERAD utilise le N-glycan des protéines en formation, tel que décrit lors du processus de N-glycosylation, afin de différencier une protéine qui n'a pas encore complété ses cycles de repliement de celle qui a été incorrectement repliée et qui doit être dégradée.

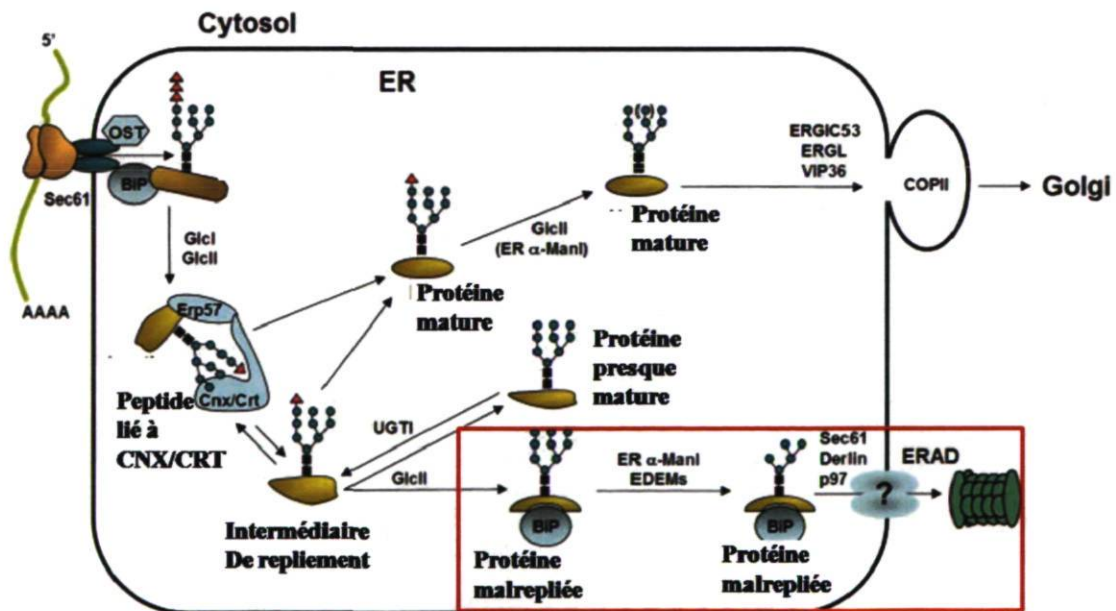


Figure 1.7 : Illustration du mécanisme de dégradation protéique associé au RE. Le mécanisme ERAD est étroitement lié au cycle de repliement impliquant les lectines CNX et CRT. L'état du N-glycan résultant du repliement est primordial dans la reconnaissance des protéines à dégrader. Une diminution du nombre de mannoses par les enzymes ER

mannosidase I (ERManI) ou les enzymes EDEM conduira à la dégradation par le protéasome. Adaptée de Malhotra et collaborateurs [22].

L'enzyme clé dans la décision de dégradation est la *ER Mannosidase I* (ERManI) qui fait passer le nombre de mannoses de 9 à 5 [66-67], mais la compréhension exacte du mécanisme de reconnaissance des protéines mal repliées demeure incertaine. Il y a de la redondance dans les enzymes enlevant les mannoses puisque les protéines EDEM1 à 3 sont également aptes à effectuer cette tâche qui dirige la protéine jusqu'au mécanisme de dégradation [68-69]. Il a été observé que les enzymes enlevant des mannoses seraient grandement concentrées dans une zone du RE nommée compartiment de contrôle qualité dérivé du RE (ERQC) qui serait séparée par des microtubules en situation de stress ou d'inhibition du protéasome [17]. Une fois les mannoses nécessaires enlevés sur les protéines, les glycoprotéines ont habituellement un statut mannose 5 ou mannose 6 qui leur confère une forte affinité pour la lectine *Osteosarcoma amplified 9* (OS9), qui est liée à la machinerie d'ubiquitination ancrée dans la membrane du RE [70]. La glycoprotéine avec un statut mannose 5 ou 6 n'a toutefois aucune affinité pour les lectines VIPL, VIP36, ERGIC53 qui elles sont impliquées dans le transport du RE à l'appareil de Golgi des protéines repliées correctement [17, 71]. OS9 est liée au complexe d'ubiquitination HRD1-SEL1L et aux chaperonnes BiP et GRP94, ce qui permet l'ubiquitination des glycoprotéines à dégrader [17]. La retrotranslocation est encore mal expliquée, mais elle nécessite les protéines membranaires Derlin 1,2 et 3 et Herp [17]. Une fois au cytosol, les glycoprotéines ubiquitinées sont extraites du complexe de translocation par une ATPase (Cdc48) qui est liée à HRD1 et elles sont ensuite prises en charge par une ubiquitine ligase cytosolique (SCF) associée à deux lectines (Fbs1 et Fbs2) [17]. Ensuite, il y a l'étape de déglycosylation effectuée par la *P97-associated PNGase* et la dégradation par le protéasome 26S [17]. Le protéasome est un très gros complexe qui peut se diviser en deux parties, soit le protéasome 20S et le 19S [72]. Le 19S se veut être une unité de régulation. Il permet l'entrée et la reconnaissance des peptides, de même que le recyclage des ubiquitines. Le protéasome 20S est l'unité catalytique qui possède 3 activités protéolytiques distinctes. La sous-unité $\beta 2$ a une activité tryptique qui clive après les résidus basiques, la $\beta 5$ clive après les résidus hydrophobes grâce à son activité chymotryptique et la sous-unité

$\beta 1$ favorise le clivage suite à la présence de résidus acides [72]. Bien que certains aspects du processus demeurent mal compris, le mécanisme ERAD est essentiel à la survie des cellules en situation de stress.

1.2.2.5 Apoptose : la solution ultime au stress du RE

Assurément, le but de la réponse UPR est de favoriser la survie cellulaire, mais lorsque survient une activation prolongée des différentes voies UPR, l'induction du processus apoptotique est inévitable. L'apoptose est un évènement de mort cellulaire programmée qui résulte de la balance entre des composés pro-apoptotiques et anti-apoptotiques. Dans le cas de la réponse UPR, on observe plusieurs voies apoptotiques synergiques qui font intervenir différents acteurs. On pourrait diviser cette réponse en trois principales voies qui mèneront toutes à l'activation des caspases, soit l'induction de CHOP, l'effet des niveaux de calcium au RE sur différentes protéines pro-apoptotiques et l'activation de la voie JNK par Ire1 (figure : 1.8).

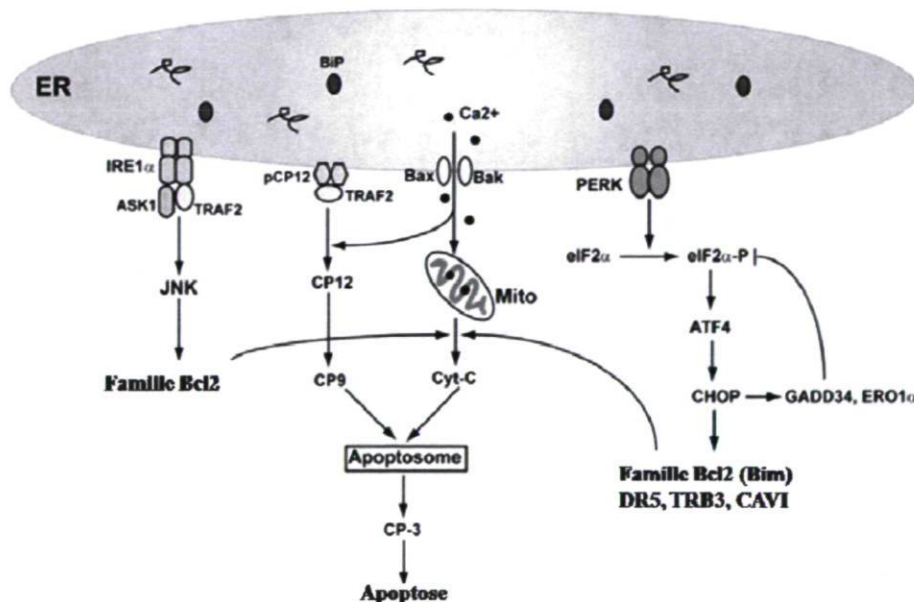


Figure 1.8 : Induction de l'apoptose par la réponse UPR. De l'activation prolongée de la réponse UPR résulte l'induction de plusieurs voies qui mèneront à la mort cellulaire. Sont présentées ici les voies impliquant le facteur de transcription CHOP, les membres pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl2 dont les actions conduisent au relâchement de

cytochrome c par la mitochondrie et l'implication des protéines TRAF2 et Ire1. Adaptée de Fribley et collaborateurs [73].

Il a été question précédemment de l'induction de CHOP par le facteur ATF4. CHOP est également une cible d'ATF6 et de XBP-1 [54]. Des études ont démontré que son absence protège les cellules de l'apoptose [53]. CHOP est aussi appelé GADD153 dont l'abréviation signifie *Growth Arrest and DNA Damage*, nom qui est plutôt révélateur de la fonction du gène. Étant un facteur de transcription, l'activité de CHOP permet l'arrêt du cycle cellulaire et l'induction de l'apoptose. La mort par apoptose est la conséquence directe des fonctions cellulaires des cibles transcriptionnelles de CHOP, parmi lesquelles on retrouve le *Death Receptor 5* (DR5) [74], le *Tribbles homologue 3* (TRB3) [75], la *Carbonic Anhydrase VI* (CAVI) [76] et l'oxydase ERO1 α [53]. Pour ne détailler que quelques-uns des candidats nommés, il est bien de savoir que DR5 est un récepteur de surface cellulaire qui déclenchera une cascade d'activation des caspases et que Ero1 peut lier le facteur *cAMP-responsive element binding protein* (CREB) qui supprime alors l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 [73]. Puisque l'expression de CHOP est médiée par plus d'une voie de la réponse UPR, on peut dire que CHOP est un pilier dans l'induction de l'apoptose liée au stress [73].

La famille des protéines Bcl2 joue un rôle majeur dans l'induction de l'apoptose. Cette famille comprend des membres anti et pro-apoptotiques qui sont activés différemment selon l'état de la cellule. L'expression de BIM (*Bcl2-interacting mediator of cell death*) est augmentée en situation de stress et elle serait conséquente, en partie, à l'activité transcriptionnelle de CHOP. La protéine BIM est transloquée au RE où elle peut provoquer l'activation de la procaspase 12, une résidente du RE [77-78]. Deux membres de la famille BH3 (*Bcl2-homology domain-3*) sont présents dans la membrane du RE et sont impliqués dans le relâchement du calcium par le RE : Bax (*Bcl2-associated X-protein*) et Bak (*Bcl2 homologous/antagonist killer*) [79]. Lors d'une perturbation, Bax et Bak forment un hétérodimère, ce qui favorise la sortie du calcium du réticulum et cause une augmentation des concentrations calciques au cytosol et dans la mitochondrie [79]. Les concentrations de calcium affectent l'activité de la protéase m-calpain qui initiera la

cascade d'activation en clivant d'abord la procaspase 12 au RE, qui clivera ensuite la procaspase 9 [22, 73]. Conséquemment à l'arrivée de calcium dans la mitochondrie, il y aura dépolarisation de la membrane de cette dernière et relâchement de cytochrome c. Réunies ensemble dans un complexe appelé apoptosome, les caspases 9 et 12 activées, le cytochrome c et la protéine Apaf-1 permettront de cliver la procaspase 3 en caspase 3, la caspase qui exécutera les dernières étapes menant à l'apoptose [22, 73].

Finalement, la voie Ire1 est aussi très impliquée dans le processus de mort cellulaire en cas de stress puisqu'Ire1 interagit avec le *TNF receptor-associated factor 2* (TRAF2), ce qui lui permet de recruter la protéine *c-Jun-N-terminal Inhibitory kinase* (JIK) [80-81]. TRAF2 active alors la kinase de signal apoptotique ASK1. Cette kinase phosphoryle la kinase Jun (JNK) qui déclenche l'apoptose en phosphorylant des membres anti-apoptotiques de la famille Bcl2 les rendant ainsi inactifs. Parallèlement à JNK, il faut mentionner que TRAF2 est associé à la procaspase 12 et est susceptible de l'activer [80-81]. Ire1 est aussi capable d'interagir avec Bax et Bak, ce qui facilite le relâchement de calcium par le RE en cas de stress [22, 73, 82].

Ces quelques lignes définissent assez sommairement le mécanisme apoptotique lié au stress, mais démontrent toute la complexité du processus. L'apoptose est essentielle dans la réponse UPR puisqu'elle permettra la destruction de cellules fortement affectées par le stress qui pourraient, par la suite, être la source d'un processus pathologique.

1.2.2.6 Pathologies associées au dysfonctionnement de la réponse UPR

La réponse UPR est grandement étudiée puisqu'elle est au centre de bien des pathologies. Suite à un stress prolongé, la cellule peut devenir insensible aux signaux de la réponse UPR et répondre de manière aberrante au stress. Cette sous-section décrira brièvement l'impact fonctionnel de la réponse UPR dans les pathologies du diabète de type II, de la maladie d'Alzheimer et du cancer.

Dans le contexte du diabète de type II lié à l'obésité, il faut se rappeler que le RE est très sensible aux concentrations en nutriments et en énergie et que des déséquilibres dans

les concentrations de glucoses et de lipides pourront occasionner un stress et mener à l'activation de la réponse UPR. Cela a été démontré dans une expérience où les tissus métaboliques, tels que les graisses et le foie, de souris nourries avec une diète élevée en lipides présentent une réponse UPR importante. En effet, la phosphorylation de PERK et Ire1 a été observée démontrant ainsi qu'un apport exagéré en énergie et nutriments induit un stress aux adipocytes et hépatocytes [83]. La voie Ire1 est particulièrement intéressante dans le contexte du diabète puisqu'elle conduit au phénomène de résistance à l'insuline. Ire1 active la voie JNK qui, en plus de conduire à l'apoptose, affecte l'état de phosphorylation du substrat du récepteur à l'insuline 1 (IRS1). Cette phosphorylation conduit à l'inhibition de l'action de l'insuline sur son récepteur, donc à la résistance à l'insuline [83].

Le stress du RE est aussi impliqué dans la maladie d'Alzheimer, un désordre neurodégénératif progressif caractérisé par l'agrégation des peptides d'amyloïdes- β A β 40 et A β 42 et par des enchevêtrements neurofibrillaires dans les neurones. Les plaques d'amyloïdes β sont causées par le clivage anormal de l'APP, la protéine précurseur de l'amyloïde- β transmembranaire, par la β -sécrétase BACE1 et les enchevêtrements sont causés par une hyperphosphorylation de la protéine Tau [84]. Les neurones atteints de la maladie présentent une réponse UPR élevée où les facteurs PERK, eIF2 et Ire1 sont phosphorylés [84]. Les neurones dans lesquels la voie PERK est fortement activée expriment la glycogène synthase kinase-3 β (GSK-3 β) qui est responsable de la phosphorylation de Tau [84]. Ces données indiquent que le stress du RE est impliqué dans la progression de la maladie d'Alzheimer.

Il est connu que le développement de tumeurs solides entraîne chez celles-ci des conditions d'hypoxie et de carence en nutriments. Ces deux conditions sont sources de stress et la cellule tumorale devra les affronter en déclenchant la réponse au stress. La réponse UPR induit des signaux anti et pro-apoptotiques qui décideront du sort des cellules cancéreuses qui auront tout avantage à survivre au stress. Il a été rapporté que les voies PERK et Ire1 sont activées dans plusieurs spécimens cancéreux et qu'il y a surexpression de la chaperonne BiP [85]. Dans certains cas de cancers, une corrélation a été démontrée

entre l'expression de BiP et la capacité proliférative des cellules [85]. De plus, des cellules de fibrosarcomes n'exprimant pas BiP n'ont pas été en mesure de former des tumeurs *in vivo* lors de xénogreffes sur des souris [85]. D'autres facteurs de la réponse UPR pourraient être abordés dans le contexte du cancer, mais cette courte explication sur l'importance de BiP dans la progression tumorale démontre l'intérêt d'étudier la réponse au stress dans les tissus cancéreux [85].

1.3 Les facteurs ATF/CREB : la sous-famille CREB3

Tel que mentionné précédemment, le facteur de transcription ATF6 fait parti des facteurs de transcription ATF/CREB. La sous-famille CREB3 a fait son apparition dans cette grande famille au début des années 2000. On compte, à ce jour, 5 facteurs associés à la sous-famille CREB3 de par l'homologie que ces facteurs partagent entre eux. Les publications des dix dernières années sur le sujet ont démontré que cette homologie de séquence donnait lieu à des domaines similaires chez les protéines codées par ces gènes (figure 1.9). D'abord, ce sont des facteurs de transcription ancrés par leur domaine transmembranaire dans la membrane du RE. Ils se caractérisent par un domaine d'activation situé dans la portion N-terminale de la protéine et un domaine bZIP. Tout comme pour le facteur ATF6, le bZIP comprend une région basique permettant une interaction avec le sillon majeur de l'ADN et un motif de fermeture éclair à leucines pour les interactions protéine-protéine. Il est intéressant de noter que ces facteurs sont potentiellement en mesure de former des homodimères ou des hétérodimères via leur motif de fermeture à leucines dans le but de transcrire des gènes. La formation de dimères est connue pour augmenter la sélectivité et la diversité des interactions protéine-ADN pour un petit nombre de facteurs [86]. Les facteurs CREB3 partagent une homologie de séquence favorisant les interactions possibles entre eux. Par exemple, le motif bZIP de CREB-H partage respectivement 84%, 69%, 71% et 69% avec ceux de CREB3, OASIS, BBF2H7 et A1bZIP [1, 5].

Une expérience *in vitro* utilisant une puce de peptides a permis de prédire que les membres de la sous-famille CREB3 testés, à l'exception de BBF2H7 qui n'a pas été évalué,

seraient en mesure de former des dimères [86]. Cette expérience consistait à lier sur une puce des peptides correspondant à 49 bZIPs humains et 10 bZIPs de levure connus et à hybrider cette puce avec les mêmes peptides fluorescents en solution [86]. La probabilité d'appariement entre 2 bZIPs était ensuite convertie en valeur numérique. La figure 1.10 présente les résultats obtenus avec les facteurs de la sous-famille CREB3. Les carrés noirs représentent une forte probabilité d'appariement, alors que les blancs indiquent l'absence d'interaction.

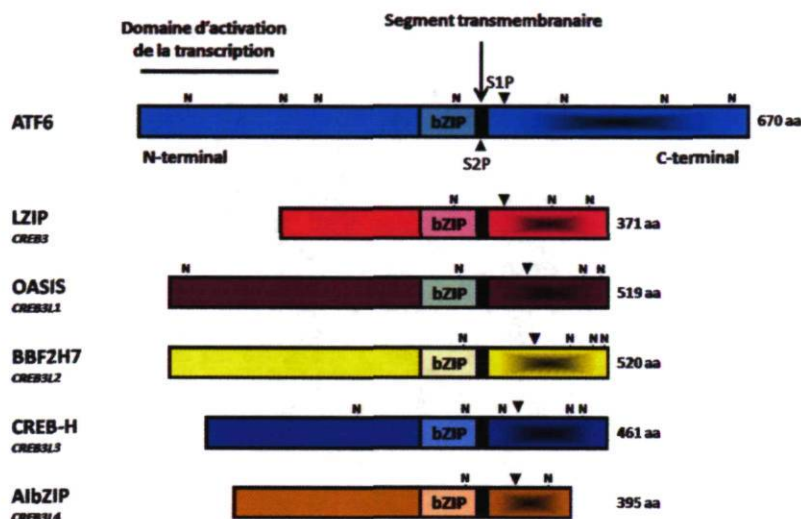


Figure 1.9 : Schématisation de facteurs de transcription ATF/CREB. Les facteurs de la sous-famille CREB3 (CREB3, OASIS, BBF2H7, CREB-H et AIBZIP) possèdent des domaines protéiques semblables à ceux du facteur bien connu ATF6, soit un domaine d'activation en N-terminal, un bZIP, un segment transmembranaire. Des sites potentiels de clivage pour la protéase S1P sont indiqués par une flèche et les sites potentiels de glycosylation sont marqués d'un N.

Les peptides liés à la puce sont indiqués sur la gauche, alors que les peptides en solution sont mentionnés en haut du tableau. Ces résultats suggèrent, entre autre, que les facteurs de la sous-famille CREB3 pourraient probablement former des dimères entre eux [86]. Outre la sous-famille CREB3, les facteurs OASIS, CREB-H et CREB3 ont montré une probabilité d'appariement relativement intéressante avec le facteur nucléaire E4BP4 [86]. Sans être nulle, la probabilité qu'OASIS, CREB-H, CREB3 et CREB4 lient les 55 autres bZIP testés est relativement faible [86]. L'intérêt de discuter de cette sous-famille dans

cette thèse est que tous les membres de la famille CREB3 seraient des acteurs potentiels dans le stress du RE et que CREB3L4/AIbZIP/CREB4 est au cœur du projet présenté dans cette thèse. Chacun sera donc présenté dans cette section afin de regrouper les connaissances à leur sujet et de comprendre leurs rôles potentiels dans le stress du RE et dans des processus physiologiques.

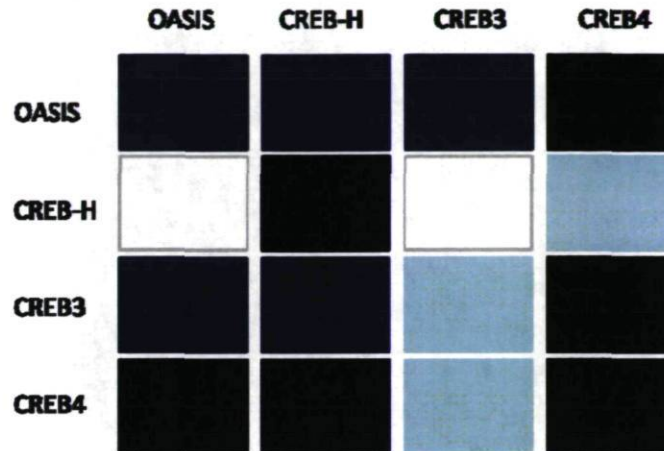


Figure 1.10 : Probabilité d'appariement des bZIP de facteurs de la sous-famille CREB3. Les bZIP étant liés au support solide sont inscrits à gauche, alors que les bZIP utilisés comme sondes fluorescentes sont indiqués en haut de l'image. La probabilité d'appariement est illustrée selon la couleur du carré, le noir signifiant une forte probabilité et le blanc signifiant l'absence d'interaction. CREB4 correspond à AibZIP/CREB3L4. Adaptée de Newman et Keating [86].

1.3.1 Les facteurs CREB3 dans l'évolution

Tel que mentionné au tout début de l'introduction, la découverte du facteur CREB3 remonte à 1997. Toutefois, des homologues très semblables à CREB3 avaient déjà été identifiés chez la souris en 1994 par Burbelo et ses collaborateurs. Ils présentaient alors la découverte de deux facteurs bZIP murins ubiquitairement exprimés appelés LZIP-1 et LZIP-2 [87]. Tous deux, contenant respectivement 379 et 404 acides aminés, possèdent un domaine de liaison à l'ADN et un motif de fermeture à leucines caractéristiques des facteurs bZIP et sont capables de lier *in vitro* les éléments de réponse CRE et AP-1 [87]. La région constituée de la région basique et de quelques dizaines d'acides aminés qui la précède de la protéine CREB3 humaine partage 92% d'homologie avec celle de la protéine

LZIP-1 [2]. Lorsqu'on s'attarde à des espèces encore moins évoluées, il est intéressant de noter que CREB3 partage 72% d'homologie avec une séquence rapportée chez le nématode *Caenorhabditis elegans* et 81% d'homologie avec le facteur BBF-2 identifié chez *Drosophila melanogaster* [2]. Outre une séquence, aucune donnée expérimentale n'est disponible pour la protéine présumée chez *C. elegans*. Pour ce qui est de BBF-2, il est assurément un ancêtre très près des facteurs CREB3. BBF-2 est impliqué dans la régulation de gènes spécifiques aux graisses par sa liaison à des séquences d'ADN promotrices correspondant à des éléments de réponse Adh (alcool déshydrogénase) [6]. Pour ce qui est des facteurs CREB-H, OASIS et AIBZIP, tous possèdent des homologues murins qui seront présentés dans les sections subséquentes.

1.3.2 CREB3

Premier de cette petite famille et ayant donné son nom aux facteurs subséquentement identifiés, deux groupes de recherche ont simultanément cloné le facteur CREB3 à partir d'une librairie d'ADNc de cellules Hela et rapporté qu'il est un partenaire d'interaction de la protéine *Host Cell Factor* (HCF) [2, 88]. HCF est une protéine impliquée dans le cycle cellulaire qui est en mesure de lier la chromatine [89]. L'équipe du Dr Vikram Misra s'intéressait à l'infection cellulaire par le virus *Herpes Simplex* dont la protéine virale VP16 est connue pour lier le HCF, ce qui lui sert de stabilisateur afin de transcrire les gènes viraux [2]. En plus d'être impliqué dans le cycle viral de l'*Herpes Simplex*, CREB3 participe à d'autres cycles viraux tels que ceux du virus de l'hépatite C et du virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1). Outre ses fonctions potentielles dans les cycles viraux, il est impliqué dans la migration de cellules dépendante du récepteur CCR1 et de la chimiokine leukotactine. Finalement, dans une optique plus pertinente aux travaux présentés dans cet écrit, CREB3 est un facteur de transcription ATF/CREB qui est impliqué dans le stress du RE. Tout le potentiel multifonctionnel du facteur CREB3 sera illustré dans les paragraphes ci-dessous et démontrera que CREB3 est ressorti, par des techniques de double-hybride, comme étant le partenaire d'une grande variété de protéines, lui conférant ainsi de nombreuses fonctions.

1.3.2.1 L'implication de CREB3 dans les cycles viraux

Les premiers articles portant sur le facteur de transcription CREB3 ont démontré qu'il est exprimé de façon ubiquitaire, tout comme l'est le HCF. Dans le contexte d'étude de CREB3 dans le cycle de réplication du virus *Herpes Simplex*, l'équipe du Dr Misra a démontré que CREB3 et la protéine virale VP16 partagent le même site de liaison à HCF et qu'ils compétitionnent entre eux pour ce site [2]. VP16 possède toutefois une plus forte affinité de liaison que CREB3, ce qui a pour conséquence d'inhiber l'activité transcriptionnelle de CREB3 [2]. Ils se sont donc attardés à l'activation transcriptionnelle de CREB3, à l'importance de HCF et à l'influence de VP16 dans cette activité. Tout d'abord, ils ont montré que la partie N-terminale de CREB3, qui est constituée de résidus acides est responsable de l'activité transcriptionnelle du facteur [2]. De plus, des expériences réalisées *in vitro* ont révélé que CREB3 est capable de lier l'élément de réponse CRE (CGTCA) et qu'il est aussi en mesure d'activer la transcription via un promoteur qui contient cet élément [2]. Fait intéressant, la présence du HCF est nécessaire pour permettre à CREB3 d'agir via CRE, mais pas pour s'y lier [90].

Les travaux dans ce domaine ont permis d'identifier un puissant inhibiteur de CREB3, soit la protéine nommée Zhangfei. Elle possède un domaine bZIP, un domaine d'activation qui est incapable de lier l'ADN (délétion d'un résidu asparagine) et un domaine de liaison à HCF [91]. L'activité inhibitrice de Zhangfei sur CREB3 a été caractérisée par le Dr Misra et semble être issue d'un mécanisme relativement plus complexe qu'une simple compétition pour interagir avec le HCF. Il est à noter que les deux protéines peuvent interagir avec le même domaine de HCF, mais qu'elles sont incapables d'interagir entre elles, même en présence du HCF [91]. Les interactions Zhangfei-HCF et CREB3-HCF confèrent toutefois aux protéines des localisations particulières dans la cellule. Le complexe CREB3-HCF est retenu dans le RE, alors que Zhangfei-HCF est retrouvé au noyau, localisation non observée lorsque Zhangfei est muté dans son site de liaison à HCF [91]. Des expériences d'immunofluorescence ont permis de montrer que la forme nucléaire de CREB3 et Zhangfei colocalisent avec la protéine *Promyelocytic Leukemia Protein* (PML), une protéine retrouvée dans le domaine nucléaire 10. Cette colocalisation serait sans doute à la base du mécanisme d'inhibition de CREB3 par Zhangfei

puisqu'elle dépend directement de la présence de HCF. Il semble que Zhangfei, qui colocalise avec CREB3, serait en mesure de reconnaître les promoteurs cibles de CREB3 et de les inhiber avec l'aide du HCF [91].

Mis à part le virus de l'*Herpes Simplex*, il a été démontré que CREB3 est un cofacteur du complexe protéique du virus de l'hépatite C au niveau du foie [92]. La protéine CREB3 est séquestrée par un complexe protéique viral au niveau du RE, mais aussi au noyau, ce qui contribue à inhiber l'activité transcriptionnelle de CREB3 [92]. La formation du complexe CREB3-protéines virales préviendrait la formation d'homodimères de CREB3. Un rôle de suppresseur de tumeurs a été suggéré pour CREB3 puisqu'une inhibition de ses activités par les protéines virales contribue à une prolifération cellulaire anormale et à une transformation des cellules [92]. Brièvement, CREB3 participe aussi au cycle lytique du virus VIH-1 en interagissant, au niveau du RE, avec la protéine de l'enveloppe virale TMgp41, ce qui n'affecte pas le cycle viral [93]. Toutefois, la surexpression d'une forme nucléaire et active de CREB3 interfère avec la liaison de facteurs viraux sur l'élément de réponse virale Tat et réprime ainsi la transactivation de gènes viraux. Cette inhibition entraîne une diminution de la production et de la libération du virus [93].

Outre Zhangfei, un autre régulateur négatif de CREB3 a été identifié, mais il est en mesure, cette fois-ci, d'inhiber CREB3 par une association spécifique avec lui [94]. Ce régulateur est, en fait, une protéine similaire à HCF nommée HCLP-1 (*Host Cell factor Like Protein-1*). Cette protéine nucléaire est ubiquitaire et son association avec CREB3 empêche la liaison de CREB3 à ses promoteurs cibles [94]. D'autres mécanismes de régulation de CREB3 seront abordés ultérieurement.

1.3.2.2 CREB3 dans la migration des monocytes

Dans la poursuite de l'étude de partenaires de CREB3, mais dans un champ d'intérêt différent des cycles viraux, CREB3 démontre la capacité de lier le récepteur des chimiokines CCR1 et d'influencer le comportement migratoire des monocytes. Il existe deux types de récepteurs de chimiokines, soit les CXCR et les CCR, et chaque récepteur est

capable de lier plusieurs chimiokines. Le récepteur CCR1 est en mesure de transmettre des signaux venant des chimiokines Leukotactine-1 (Lkn-1), MIP-1 α , RANTES et HCC-4 [95]. Les travaux portant sur CCR1 et CREB3 ont montré que l'activité chimiotaxique des monocytes THP-1 est augmentée lorsqu'il y a présence de CREB3 et de la chimiokine Lkn-1 [95]. Cette activité est spécifique à l'action de cette chimiokine; les autres chimiokines liant le CCR1 n'ayant pas d'effet. La chimiokine Lkn-1 est connue pour induire la chimiotaxie via différentes voies de signalisation, comme celle de la phospholipase C, de la protéine kinase C δ et du facteur de transcription NF κ B.

Les travaux sur ces voies ont permis d'impliquer CREB3 et NF κ B dans la voie de migration des monocytes dépendante de la chimiokine Lkn-1. D'abord, des travaux ont démontré que, dans des monocytes THP-1 traités avec Lkn-1, il y a augmentation de l'expression de CREB3 [96]. L'analyse du promoteur de CREB3 permet de suspecter une activation via des éléments de réponse NF κ B et Sp1. L'inhibition de ces facteurs à tour de rôle a permis d'imputer à NF κ B l'expression accrue de CREB3 [96]. NF κ B est un facteur de transcription impliqué dans de nombreux contextes cellulaires tel que l'inflammation, l'angiogénèse, la chimiotaxie et la survie cellulaire. Il est formé par l'homo ou l'hétérodimérisation des protéines de la famille Rel. Le dimère formé par les protéines Rel p65 et p50 est le plus commun. Dans le cas de la régulation transcriptionnelle de CREB3, les dimères p65/p65 et p65/p50 sont impliqués [96]. Des expériences de retardement sur gel ont révélé que p65 et p50 sont en mesure de lier *in vitro* une séquence du promoteur de CREB3 contenant un élément de réponse NF κ B (5'-GAACGTCCC-3') [96]. À l'image d'une boucle, CREB3 a aussi sa part de travail dans l'activité de NF κ B puisqu'une surexpression de CREB3 favorise la dégradation de la protéine cytoplasmique I κ B α [97]. Cette dernière a pour fonction de séquestrer les protéines Rel dans le cytoplasme, régulant ainsi l'activité du facteur NF κ B, ce qui fait que sa dégradation favorise la transcription par NF κ B [97]. CREB3 est donc un régulateur positif de la voie NF κ B dépendante de la chimiokine Lkn-1 [97]. Finalement, il faut mentionner qu'une surexpression de CREB3 augmente les niveaux d'ARN et de protéines des récepteurs CCR1 et CCR2 et que la régulation de CCR2 passe par un élément de réponse C/EBP [98]. Toutes ces informations démontrent l'importance de CREB3 au cœur de la migration des monocytes dépendante de Lkn-1.

1.3.2.3 CREB3 et le stress du RE

Les équipes de recherche travaillant sur CREB3 ont assurément tenté de faire un parallèle entre CREB3 et ATF6, car les deux protéines possèdent un domaine transmembranaire. Il a été démontré que la protéine CREB3 endogène pleine longueur colocalise avec la protéine calnexine qui est une protéine localisée au RE [99]. La protéine CREB3 transfectée est également située dans le RE [100]. Cette localisation augmente les soupçons quant à la possibilité que CREB3 soit clivée par le mécanisme RIP tout comme l'est ATF6. Des expériences réalisées avec la brefeldin A ont confirmé le clivage de CREB3 puisque suite à ce traitement, il y a apparition d'une forme courte de CREB3 [101]. Il est à noter que l'accumulation du produit de clivage est observable au noyau lorsqu'il y a ajout de MG-132, un inhibiteur du protéasome, ce qui indique que la forme nucléaire de CREB3 est normalement rapidement dégradée. Des analyses mutationnelles de sites SIP potentiels ont confirmé qu'une mutation dans la séquence RQLR abolit le clivage de CREB3 par l'effet de la brefeldin A [101]. Plusieurs conditions ont été testées afin d'identifier celles qui sont en mesure d'induire le clivage du facteur CREB3 ancré dans la membrane du RE et il semble que seule la thapsigargine ait eu l'effet escompté; les agents A23187 et tunicamycine n'ayant eu aucun effet [102]. Il est à noter qu'une surexpression d'une forme recombinante de CREB3 pleine longueur a occasionné le clivage spontané de la protéine [101]. Afin de comprendre son rôle dans le stress du RE, il importait d'identifier les cibles transcriptionnelles de CREB3. Il a été montré que CREB3 est capable de lier les éléments de réponse CRE et C/EBP [2], mais la liaison des éléments plus spécifiques au stress a aussi été rapportée. CREB3 est, en effet, en mesure de lier les éléments de réponse UPRE [100] et ERSE-II [102], mais pas l'élément ERSE [100]. Les séquences de ces éléments sont rapportées à la section 1.2.2, de même qu'au tableau 1.1. L'élément UPRE serait utilisé pour transcrire le gène EDEM, dont l'ARNm est augmenté lors d'une surexpression de CREB3. Une surexpression de CREB3 n'induit toutefois pas les ARNm des gènes CHOP, XBP-1 et BiP [100]. Outre EDEM, une autre cible de CREB3 qui est aussi impliquée dans le mécanisme ERAD a été identifiée, soit le gène Herp [102]. L'utilisation d'un siRNA qui diminue CREB3 de 75% a permis de réduire l'expression de Herp de 30% [102]. Assurément, Herp étant induit fortement par tous les agents qui induisent un stress, CREB3 n'est pas l'unique acteur de son induction dans la réponse au

stress du RE [102]. Les deux cibles connues de CREB3 sont liées à la dégradation protéique ERAD, ce qui montre que CREB3 serait en mesure de diminuer la quantité de protéines à replier et ainsi d'augmenter la tolérance au stress.

Tableau 1.1 : Éléments de réponse associés au stress du RE

Élément de réponse	Séquence
ERSE	CCAAT-N ₉ -CCACG
ERSE-II	ATTGG-N-CCACG
UPRE	TGACGTGG

L'étude du mécanisme ERAD et de l'activité de CREB3 a mené à la découverte d'une nouvelle protéine qui serait très instable et rapidement dégradée par le mécanisme ERAD. La protéine nommée *Luman/CREB3 Recruitment Factor* (LRF) serait un régulateur négatif de la réponse UPR puisqu'elle favorise la dégradation de CREB3 par le protéasome [103]. LRF possède deux motifs de fermeture à leucine qui interagissent avec celui de CREB3. Une expérience d'immunofluorescence a permis de colocaliser CREB3 nucléaire et LRF, lors d'une co-transfection, avec la protéine GRIP (*glucocorticoid receptor interacting protein-1*), un coactivateur de récepteur nucléaire [103]. Il a été démontré que GRIP se retrouve dans une région nucléaire riche en composantes du protéasome [104]. L'expression de LRF est modulée par les mêmes stress qui régulent CREB3, soit la thapsigargine et le MG-132. LRF possède une demi-vie de moins de 20 minutes qui augmente avec un traitement au MG-132, ce qui indique qu'elle est rapidement dégradée par le protéasome [103]. L'activité transcriptionnelle de CREB3 via les éléments UPRE et ERSE-II est modérément régulée par LRF, une régulation qui pourrait se jouer à deux niveaux. D'abord, il semble que LRF serait en mesure de favoriser la dégradation de CREB3 par le protéasome. Puis la séquestration de CREB3 par LRF dans des foyers nucléaires contribuerait à inhiber son activité transcriptionnelle en le rendant non-disponible pour ses co-activateurs [103]. Des expériences réalisées dans des fibroblastes embryonnaires de souris n'exprimant pas LRF ont montré qu'il y avait alors une

augmentation de l'expression de certains gènes de la réponse UPR tels que EDEM, Herp et CHOP, ce qui laisse croire en une régulation négative de LRF sur CREB3 et sur l'expression de ses cibles transcriptionnelles [103].

La figure 1.11 résume les connaissances sur CREB3, une protéine ubiquitaire qui intervient dans différents contextes cellulaires, mais il demeure toutefois difficile de lui définir un rôle clair dans des processus physiologiques et pathologiques. L'identification de cibles transcriptionnelles additionnelles contribuerait sans doute à éclaircir ses fonctions.

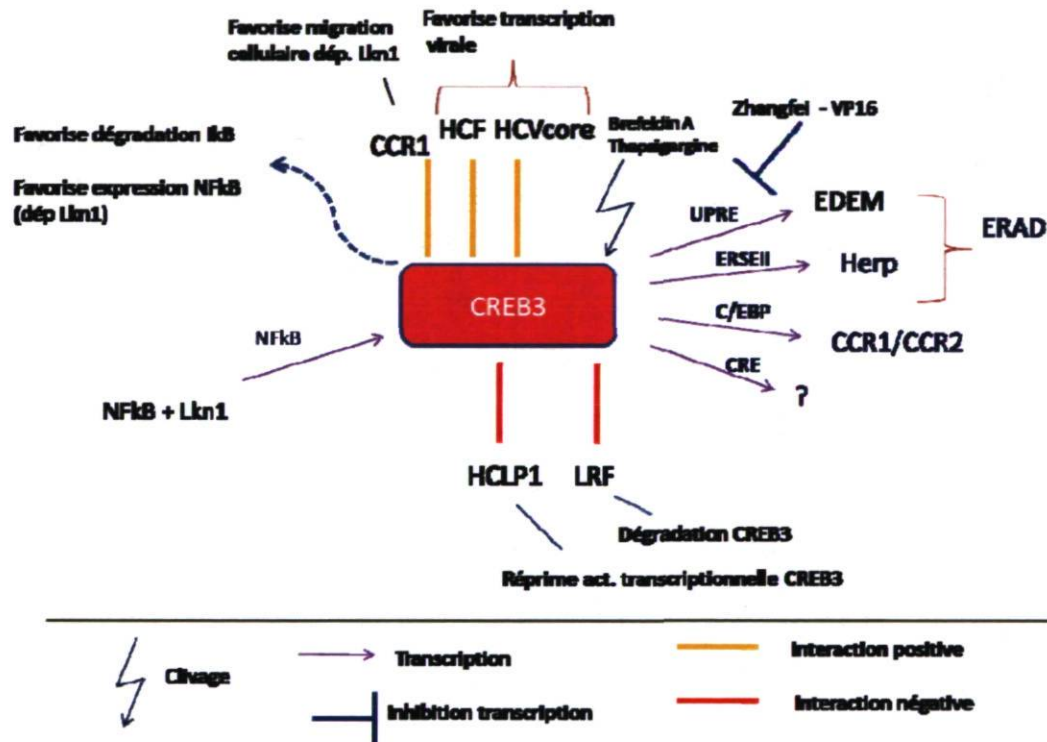


Figure 1.11 : Résumé des connaissances sur le facteur de transcription CREB3. Les partenaires de CREB3 qui favorisent la transcription sont indiqués par un trait jaune, alors que ceux qui régulent la transcription de manière négative sont indiqués par un trait rouge. Les cibles transcriptionnelles connues et les éléments de réponse utilisés de CREB3 sont indiqués à la droite du schéma.

1.3.3 CREB3L1/OASIS

Le facteur de transcription CREB3L1 est plus communément appelé OASIS, nom signifiant *Old Astrocyte Specifically-Induced Substance*. Pour mieux saisir la signification

de ce nom, il faut savoir qu'il a été découvert dans des astrocytes cultivés 12 semaines sans avoir subi de passage [3]. Ce type de culture est utilisé pour étudier le mécanisme de la gliose, une réponse spécifique des astrocytes à l'inflammation ou à un traumatisme du système nerveux central, puisque les astrocytes longuement cultivés développent un phénotype semblable à celui retrouvé dans les sites de lésions du système nerveux central. L'étude du facteur murin a mené à des découvertes intéressantes sur sa fonction dans l'ostéogénèse et le stress, alors que les travaux sur le facteur humain ont porté principalement sur la formation du placenta.

1.3.3.1 Expression d'OASIS chez la souris et son rôle dans l'homéostasie du tissu osseux

Lors du développement embryonnaire de souris, l'ARNm d'OASIS a été détecté dans les glandes salivaires, dans le cartilage et dans le cerveau. Au niveau du cerveau, il y a augmentation d'intensité du marquage deux semaines après la naissance, puis une atténuation du marquage dans le cerveau des souris adultes [3]. L'ARNm d'OASIS a aussi été détecté dans le pancréas et dans la prostate [105]. Le bulbe dentaire de souris en développement est également marqué par l'expression d'OASIS, ce qui a suscité un intérêt pour son expression au niveau des os. OASIS est fortement exprimé dans les cellules pré-ostéoblastes. Les ostéoblastes sont l'un des deux types cellulaires retrouvés au niveau des os et se distinguent des ostéoclastes par la production d'une matrice extracellulaire minérale. L'homéostasie osseuse résulte de l'équilibre entre la formation osseuse par les ostéoblastes et la résorption du tissu par les ostéoclastes. Les ostéoblastes possèdent un RE bien développé qui produit une grande quantité de protéines matricielles dont la principale est le collagène de type 1 [106]. OASIS est exprimé plus tardivement dans le développement osseux et participerait à la différenciation des ostéoblastes [107].

L'expression d'OASIS dans le tissu osseux a suscité une curiosité qui a mené à la réalisation de souris OASIS^{-/-}. Ainsi, l'absence totale d'OASIS a causé, chez ces animaux, un retard de croissance et une ostéopénie sévère caractérisée par une fragilité du squelette qui présente une faible densité et un taux élevé de fractures [108]. Une diminution importante de la production de collagène de type 1 dans la matrice osseuse a été observée. Les cartilages, de même que les épiphyses, n'étaient toutefois pas affectés. Les ostéoblastes

présentaient une expansion anormale du RE qui contenait un grand nombre de protéines de matrice [108]. Ces observations laissent croire qu'OASIS pourrait probablement jouer un rôle dans la production de collagène de type 1 et dans la formation osseuse.

La formation osseuse et la différenciation des ostéoblastes nécessitent la présence de la protéine morphogénétique osseuse 2 (*Bone morphogenetic protein 2-BMP2*) et cette dernière est suffisante pour induire l'expression d'OASIS et pour accélérer son clivage. Dans les ostéoblastes qui expriment BMP2, il y a une augmentation des marqueurs de stress BiP, CHOP, ATF4 et EDEM indiquant un stress du RE suite à l'expression de BMP2 [108].

Il a été démontré que le collagène de type 1 est une cible transcriptionnelle d'OASIS et que ce facteur est en mesure de lier un élément de réponse similaire à UPRE (CGACGTGG) *in vitro* et *in vivo* et d'activer la transcription du promoteur du gène COL1A1 qui contient cet élément. Malgré l'absence d'OASIS et d'une diminution importante de l'expression de COL1A1 dans les souris OASIS^{-/-}, des ostéoblastes matures sont tout de même retrouvés chez la souris génétiquement modifiée. Cela suggère qu'en absence d'OASIS, il y aurait une voie compensatoire qui assurerait une légère production de collagène de type 1 et de sécrétion de protéines de matrice. La voie ATF4, qui est connue pour être impliquée dans le processus de formation osseuse, est visée pour cette compensation [108].

1.3.3.2 OASIS et le stress du RE

Le clivage d'OASIS en situation de stress a été démontré avec la forme murine dans les astrocytes. OASIS possède une séquence RSLI pour le clivage par S1P dont l'importance dans le mécanisme RIP a été mise en évidence par des mutations dans cette séquence qui abolissent le clivage d'OASIS suite à un traitement avec la brefeldin A [105]. Les agents thapsigargine et tunicamicine produisent un stress du RE qui cause le clivage de la forme endogène d'OASIS dans des astrocytes murins primaires, générant une protéine de 50 kDA détectable par immunobuvardage [105]. Ces agents sont également en mesure d'induire l'expression de l'ARNm d'OASIS dans les gliomes C6, des cellules gliales

cancéreuses de rat. La conséquence du clivage d'OASIS se caractérise par une augmentation de l'expression de BiP et une tolérance accrue au stress [105]. BiP étant une cible des différentes voies de la réponse UPR et les voies ATF6, Ire1 et PERK étant présentes dans les astrocytes, il est possible que l'induction de BiP ne soit pas exclusive à la présence d'OASIS. La transfection d'un siRNA ciblant OASIS a permis de diminuer l'expression de BiP d'environ 50%, ce qui indique qu'OASIS est responsable, en partie, de cette régulation [105]. Le promoteur de BiP contient un élément de réponse semblable à CRE et quatre éléments ERSE. Le CRE-like est défini par la séquence TGACGTGA, où le G souligné est habituellement un C dans la séquence CRE, et cette séquence du promoteur de BiP est employée par le facteur ATF4 [109]. Des analyses mutationnelles des éléments de réponse indiquent que les éléments sont tous importants pour l'activation de la transcription par OASIS, mais il a été démontré par des expériences *in vitro* de retardement sur gel qu'OASIS lie le CRE-like et non les éléments ERSE du promoteur de BiP [105]. Le clivage par RIP d'OASIS protège les astrocytes de la mort cellulaire occasionnée par le stress [105]. Il est extrêmement intéressant de voir qu'OASIS est fortement exprimé dans des cerveaux de souris ayant subi un cryo-traumatisme, plus précisément dans les astrocytes se trouvant près du site de trauma, ce qui en fait une protéine d'intérêt dans l'étude des mécanismes de réparation des tissus nerveux [105].

1.3.3.3 OASIS chez l'humain

Le facteur de transcription a été cloné chez l'humain à partir d'une librairie d'ADNc de poumon et partage 84,8% d'homologie avec la forme murine [110]. Des expériences de buvardage de type Northern ont montré le caractère d'expression ubiquitaire d'OASIS qui est exprimé dans plusieurs tissus et plus fortement dans le pancréas et la prostate [110]. La transfection des formes recombinantes d'OASIS pleine longueur et d'OASIS sans son domaine transmembranaire permet de conclure que les protéines recombinantes humaines sont localisées respectivement au RE et au noyau [110]. Il a été démontré que la région en N-terminale de la protéine est responsable de son activité transcriptionnelle et qu'OASIS est capable d'activer la transcription via l'élément de réponse Box-B (TTACGTGT) [110].

1.3.3.4 OASIS et le développement placentaire

Des expériences menées dans des cellules placentaires humaines montrent que le facteur OASIS y est présent et qu'il participerait à la formation du placenta. Le placenta résulte de la fusion des trophoblastes qui permet ainsi la formation des labyrinthes placentaires. Le facteur connu qui est responsable de ce processus est le facteur de transcription *Glial cell missing homolog-1* GCMA/GCm1 et ce dernier est régulé par la voie AMPc-Protéine Kinase A. L'étude plus approfondie de cette voie dans le contexte placentaire a mené à la constatation que les facteurs de transcription CREB et OASIS participent au processus de formation du placenta et devancent l'activité du facteur GCMA. Ils sont, en fait, responsables de son expression. Le promoteur de GCMA contient plusieurs sites CRE et il a été démontré que CREB et OASIS sont capables de lier des éléments différents sur ce promoteur *in vitro* et *in vivo* [111]. L'activation du promoteur de GCMA est spécifique à CREB et OASIS puisque les facteurs ATF/CREB Jun, Fos, CREB3, CREB-H, ATF1, 2, 4, 5 et 7 sont incapables d'activer la transcription via le promoteur de GCMA [111]. L'expression spatiale et temporelle des deux facteurs dans le processus de placentogénèse de souris a permis de conclure que l'activation des facteurs CREB et OASIS est séquentielle et que c'est CREB qui précède l'expression d'OASIS [111].

Les données scientifiques sur le facteur OASIS sont résumées à la figure 1.12. Il faut mentionner que les cibles connues d'OASIS (GCMA, BiP et COL1A1) sont assez limitées et que seulement l'une d'entre elles a été identifiée chez l'humain. Des travaux futurs devraient tenter de transposer les observations faites chez les rongeurs à l'humain.

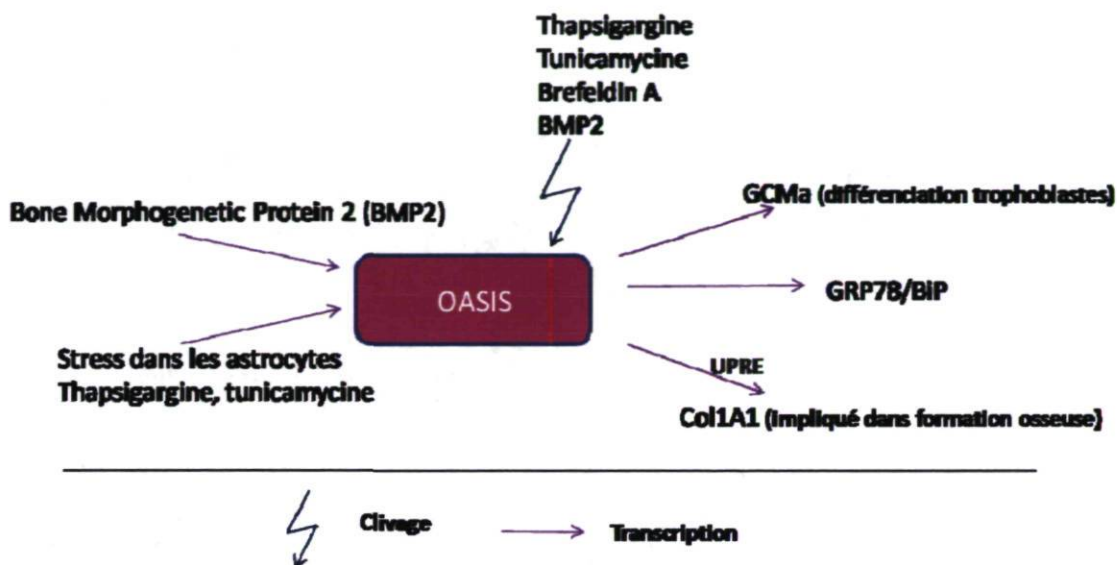


Figure 1.12 : État des connaissances actuelles sur le facteur de transcription OASIS. Il est à noter que toutes les informations présentées dans ce tableau, à l'exception de l'induction de du *Glial cell missing homolog-1* (GC1Ma) sont issues d'études effectuées chez les rongeurs. UPRE : *unfolded protein response element*, Col1A1 : collagène de type I alpha 1, GRP78/BiP : *Glucose Related Protein 78*.

1.3.4 CREB3L2/BBF2H7

BBF2H7 doit son nom à son homologie avec le facteur BBF-2 de la drosophile et à sa localisation sur le chromosome 7 chez l'humain. La protéine humaine a été retrouvée en fusion dans des cellules cancéreuses, alors que chez la souris, le facteur est grandement impliqué dans la chondrogénèse.

1.3.4.1 Les fusions contenant BBF2H7

Les premières publications portant sur le facteur BBF2H7 humain l'impliquent dans une fusion avec le gène FUS [112-114]. FUS est un facteur de transcription riche en glycine qui lie l'ARN nucléaire dans des sarcomes fibromyxoïdes de faible grade. Des fusions sont fréquemment observées et spécifiques à certains types de tumeurs, ce qui permet l'activation quelque peu erronée de certaines voies de signalisation favorisant la tumorigénèse. La protéine de fusion FUS-BBF2H7 est composée de la partie N-terminale

de FUS et du bZIP et de la partie C-terminale de BBF2H7 [112]. BBF2H7, de même que la fusion FUS-BBF2H7 sont localisées au RE [114]. Du point de vue de la transcription, il semble que FUS-BBF2H7 ait une activité transcriptionnelle plus forte que le facteur BBF2H7. La protéine de fusion et BBF2H7 sont capables d'activer la transcription via les éléments de réponse Box-B, ATF6 et CRE, de même que via le promoteur de BiP [114]. Le gène FUS est impliqué dans bon nombre de translocations chromosomiques dans des cellules cancéreuses, mais la fusion FUS-BBF2H7 est très spécifique aux sarcomes fibromyxoïdes de faible grade, ce qui pourrait en faire un marqueur intéressant pour ce cancer [113].

Un autre cas de fusion impliquant BBF2H7 a récemment été identifié. Il s'agit d'une fusion BBF2H7/PPAR γ au niveau de la glande thyroïde (figure 1.13) [115]. PPAR γ est un facteur de transcription de la famille des facteurs nucléaires qui promeut l'adipogénèse et l'obésité, le diabète, la résistance à l'insuline, l'inflammation et l'athérosclérose. De plus, il induit la différenciation des adipocytes et module l'expression des gènes spécifiques au tissu grasseux. Des mutations de PPAR γ ont été observées dans des cancers tels que ceux du côlon et de la thyroïde. La fusion est composée du domaine activateur de transcription de BBF2H7 et du domaine régulateur de PPAR γ et la protéine qui en résulte intensifie la prolifération des cellules carcino-thyroïdiennes et réprime la transcription de gènes normalement induit en réponse à une stimulation par l'AMPc [115]. La fusion n'est pas observée dans des tissus thyroïdiens sains, mais ceux-ci expriment la protéine BBF2H7 qui est en mesure d'y être clivée par la brefeldin A. Une différence majeure est observée quant à la capacité transcriptionnelle de BBF2H7 par rapport à celle de la protéine de fusion lorsque leur activité est testée sur un élément CRE. BBF2H7 nucléaire augmente considérablement la transcription, alors que la fusion BBF2H7/PPAR γ inhibe la transcription via le même promoteur, ce qui lui confère une fonction régulatrice importante à PPAR γ dans le contexte des carcinomes thyroïdiens [115].

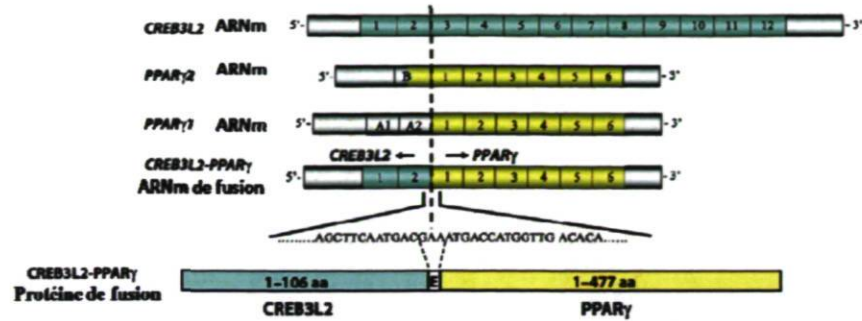


Figure 1.13 : Schématisation de la fusion entre les gènes *BBF2H7* et *PPAR γ* . Une fusion survient lorsqu'il y a translocation chromosomique et que deux gènes ne forment plus qu'un seul et même gène qui donnera lieu à un ARNm hybride. Adaptée de Lui et collaborateurs [115]

1.3.4.2 Profil d'expression, localisation cellulaire, clivage et activité transcriptionnelle de *BBF2H7*

Des expériences de type Northern ont démontré l'ubiquité de l'ARNm de *BBF2H7* qui est retrouvé dans une panoplie de tissus humains tels que le placenta, le cœur, l'ovaire, le testicule, le pancréas, le petit intestin, le poumon, le foie, le muscle squelettique, le rein, la prostate et le cerveau [114]. L'équipe de recherche qui a publié d'importantes données concernant OASIS dans les cellules gliales a aussi vérifié l'activité de *BBF2H7* dans ce contexte [5]. Les astrocytes n'expriment pas normalement *BBF2H7*, mais lorsqu'ils sont traités avec la thapsigargine, l'inhibiteur des pompes SERCA, il y a apparition d'une forme pleine longueur de *BBF2H7* de 85 kDA et également d'une forme nucléaire [5]. Des expériences de localisation cellulaire ont montré que la forme pleine longueur colocalise avec la calnexine, une protéine du RE, et que la forme plus courte est située dans le noyau des cellules stressées [5]. Une mutation dans le site S1P, qui correspond à la séquence RNLL de *BBF2H7*, est suffisante pour bloquer le clivage induit par un traitement à la brefeldin A, ce qui confirme la régulation de *BBF2H7* par le mécanisme RIP [5]. L'induction et le clivage de *BBF2H7* endogène ont été observés dans deux autres lignées cellulaires traitées avec la thapsigargine, les cellules rénales HEK293T et les fibroblastes embryonnaires de souris [5]. Comme il y a apparition de la protéine pleine longueur suite à un stress, il y a lieu de se questionner s'il s'agit d'une régulation transcriptionnelle ou

traductionnelle. Les travaux de Kondo et ses collaborateurs ont montré que l'ARNm de BBF2H7 est présent avant le stress et qu'un traitement combiné de la thapsigargine avec la cycloheximide, un inhibiteur de la traduction, empêche l'apparition de la protéine, alors qu'un traitement combiné avec l'inhibiteur de transcription actinomycine D n'empêche pas l'apparition de la protéine [5]. Cela dévoile une régulation traductionnelle de BBF2H7 dans une situation de stress, évènement assez similaire à la régulation d'ATF4 par la voie PERK-eIF2a. Des cellules MEF PERK^{-/-} ont été utilisées pour tenter de montrer une régulation de BBF2H7 par eIF2a, mais les résultats ont infirmé cette hypothèse : eIF2a n'est pas impliqué dans la régulation de la protéine BBF2H7 suite au stress du RE [5].

Au niveau de l'activité transcriptionnelle de BBF2H7, il a été décrit que le facteur de transcription est capable d'activer le promoteur de BiP qui contient un élément CRE et trois ERSE, mais BBF2H7 est incapable de lier, *in vitro*, les éléments ERSE [5]. Dans un contexte cellulaire de neuroblastomes SK-N-SH, la protéine BiP n'est pas détectée lorsque qu'il y a surexpression de BBF2H7 et sa présence n'est pas non plus affectée par l'abolition de BBF2H7 par siRNA. Toutefois, la surexpression de BBF2H7 suivie d'un traitement à la thapsigargine diminue considérablement la mort cellulaire normalement observée suite au stress, ce qui révèle que BBF2H7 pourrait jouer un rôle protecteur dans les cellules stressées [5].

1.3.4.3 BBF2H7 dans la chondrogénèse

À l'image d'OASIS, le facteur de transcription BBF2H7 murin est impliqué dans le processus physiologique essentiel qu'est la chondrogenèse, soit la prolifération de chondrocytes nécessaires à la formation de cartilages. Des souris déficientes en BBF2H7 ont été réalisées et, à l'inverse de celles n'exprimant pas OASIS, elles présentent une mortalité suivant la naissance [116]. BBF2H7 est habituellement fortement exprimé dans les cartilages de souris sauvages et plus intensément dans la zone de prolifération cartilagineuse des os longs en développement. Chez les souris BBF2H7^{-/-}, les cartilages présentent une diminution marquée de protéines matricielles et ne sont pas complètement formés, ce qui cause des problèmes au niveau de cartilages essentiels tels que celui de la cavité abdominale dont la malformation provoque la mort des souris par suffocation après la naissance [116]. Les chondrocytes des souris BBF2H7^{-/-} présentent une prolifération

normale, mais une diminution de la production de protéines de matrices extracellulaires. Leur RE est anormalement grand et comporte des agrégats protéiques de collagène de type II et de *cartilage oligomeric matrix protein* (COMP), ce qui laisse croire en un défaut du transport et de la sécrétion des protéines matricielles [116]. Dans des chondrocytes de souris normales, il y a occurrence d'un stress modéré durant la différenciation des cellules qui est détecté par une augmentation des chaperonnes BiP, GRP94 et PDI. Lorsqu'on s'attarde à l'état de stress des chondrocytes BBF2H7^{-/-}, il y a un stress sévère et une accumulation importante de protéines au RE [116]. La protéine Sox9 a été pointée du doigt comme source potentiel du stress dans les chondrocytes puisque sa présence est essentielle à leur différenciation. Des investigations sur le sujet ont confirmé l'hypothèse voulant que Sox9 cause un stress et une augmentation de l'expression des chaperonnes BiP, GRP94 et PDI dans les chondrocytes. L'expression de Sox9 permet également le clivage de BBF2H7. Des expériences de micropuces à ADN comparant des chondrocytes sauvages et des chondrocytes BBF2H7^{-/-} ont permis d'identifier des gènes modulés par BBF2H7. Plusieurs des gènes identifiés sont impliqués dans le transport et la sécrétion des protéines et dans la biogénèse du RE. Parmi ces gènes se trouvent la protéine Sec23a dont la fonction est de recruter Sec31 dans le complexe COPII, responsable du transport protéique du RE vers l'appareil de Golgi [116]. Sec23a est une cible directe de BBF2H7 pouvant lier son promoteur qui contient un élément semblable à CRE (TAACGTAA) et d'y induire la transcription. Les souris BBF2H7^{-/-} sont déficientes en Sec23 et l'absence de la protéine est fortement responsable du phénotype observé chez les souris. La transfection de chondrocytes BBF2H7^{-/-} avec la forme active de BBF2H7 ou la protéine Sec23 contribue à la formation d'un complexe COPII fonctionnel, à la restauration de la sécrétion des protéines de matrice et au rétablissement partiel de la structure normale du RE [116].

L'étude de BBF2H7 démontre que ce facteur possède des caractéristiques bien distinctes des autres facteurs et témoigne de son rôle essentiel dans des processus physiologiques tels que la chondrogenèse. Un résumé des travaux portant sur BBF2H7 est présenté à la figure 1.14 et nous permet de conclure que peu de données concernant ses cibles transcriptionnelles sont connues.

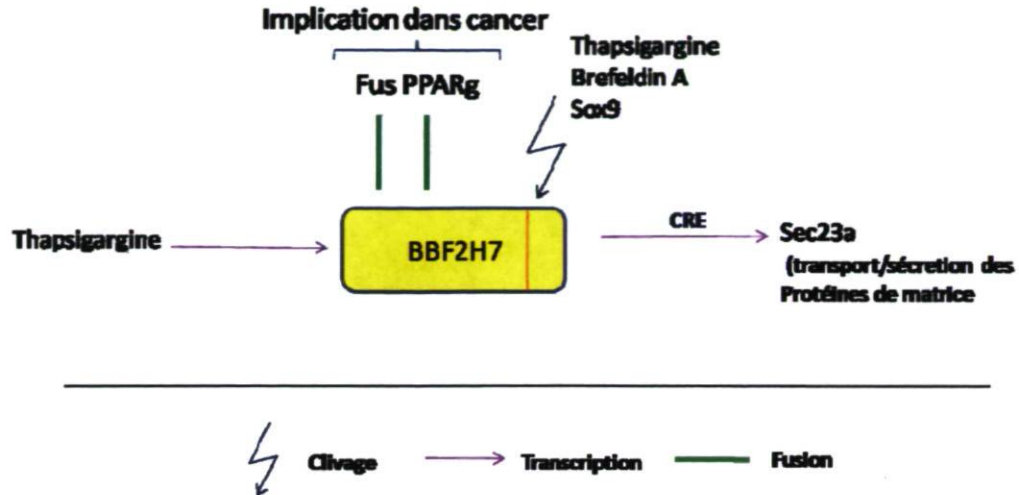


Figure 1.14 : Résumé des connaissances publiées sur la protéine BBF2H7. BBF2H7 est trouvée en fusion avec les gènes *FUS* et *PPARγ* dans des contextes de cancers. Sa cible transcriptionnelle connue, *Sec23*, est impliquée dans le transport et la sécrétion des protéines de matrice du cartilage, alors que *Sox9* est un facteur impliqué dans la différenciation des chondrocytes.

1.3.5 CREB3L3/CREB-H

Quatrième de cette sous-famille des facteurs ATF/CREB, l'ARN humain de CREB-H a été identifié lors de la recherche de transcrits spécifiques aux cellules humaines hépatiques à l'aide d'une librairie d'ADNc réalisée sur les cellules hépatiques cancéreuses HepG2. Il doit d'ailleurs le H de son nom à sa découverte dans les cellules hépatiques.

1.3.5.1 Identification et profil d'expression de CREB-H

L'exploration de son profil d'expression, fait par plus d'une équipe de recherche sur une grande variété de tissus, confirme son expression presque exclusive au foie [4, 117]. Le profil d'expression de la forme murine de CREB-H a été réalisé. Il semble que cette protéine soit exprimée au niveau du foie au cours de l'embryogénèse des souris et y persiste jusqu'à l'âge adulte [118]. De faibles niveaux d'ARNm de CREB-H ont toutefois été détectés dans l'estomac et le petit intestin murins. Tous les tissus dans lesquels l'ARNm de CREB-H est retrouvé expriment aussi l'ARN de l'Hepatocytes Nuclear Factor 4 (HNF4 α), un facteur de transcription impliqué dans l'hépatogénèse et dans l'initiation de la

différenciation des hépatocytes [118]. Dans des souris déficientes en HNF4 α , l'ARNm de CREB-H n'a pas été détecté au foie, mais il était présent dans le petit intestin, ce qui suggère un rôle important de HNF4 α dans la régulation de CREB-H au foie. CREB-H ne semble toutefois pas essentiel à la formation de cet organe puisque des souris déficientes en ce facteur sont viables et possèdent un foie normalement constitué [118].

1.3.5.2 Caractéristiques transcriptionnelles de CREB-H

Tout comme ses confrères, CREB-H possède un domaine d'activation dans sa partie N-terminale. La protéine recombinante pleine longueur est située dans les structures réticulaires de la cellule, alors que sa forme sans domaine transmembranaire est au noyau. CREB-H se distingue quelque peu des autres membres de sa famille par la présence, dans sa structure, d'un deuxième motif à fermeture de leucines dont le rôle n'a pas été établi. CREB-H peut lier les éléments de réponse CRE, Box-B et ATF6 et activer la transcription via ces éléments [4, 117]. De plus, il a été démontré par des expériences *in vivo* d'immunoprécipitation de la chromatine que CREB-H lie le promoteur de l'enzyme gluconéogénique phosphoénolpyruvate carboxykinase [117]. Ce promoteur, qui est activé par CREB-H, est habituellement régulé par la voie AMPc-Protéine kinase A et est utilisé comme modèle pour l'étude de l'activité transcriptionnelle des facteurs CREB et C/EBP. Il a été remarqué que l'expression de CREB-H endogène est moindre dans des lignées cellulaires de cancers hépatiques, ce qui a mené à l'étude de son rôle potentiel dans la croissance des cellules cancéreuses. Tel que soupçonné, les cellules hépatiques qui surexpriment la protéine CREB-H présentent un plus faible taux de prolifération, ce qui suggère que CREB-H pourrait agir en tant que suppresseur de tumeur [117].

1.3.5.3 Régulation de CREB-H par le stress du RE et la réponse aigüe de l'inflammation

CREB-H est régulé par le mécanisme RIP spécifiquement dans le contexte physiologique de la phase de réponse aigüe (*acute phase response-APR*) de la réponse inflammatoire systémique de l'immunité innée. Des souris déficientes en CREB-H ont été

réalisées par la technologie d'interférence à l'ARN. Des homogénats de foies des souris déficientes en CREB-H et de foies de souris contrôles ont été utilisés pour faire des expériences de micropuces à ADN. Cette expérience a permis l'identification de deux gènes impliqués dans la phase de réponse aiguë de l'inflammation dont l'expression était diminuée dans les souris n'exprimant pas CREB-H, soit les gènes *Serum Amyloid P-component* (SAP) et *C-reactive Protein* (CRP) [119]. Ces deux protéines sont normalement régulées par des cytokines pro-inflammatoires et des composantes bactériennes telles que les lipopolysaccharides (LPS). Toutefois, dans les souris déficientes en CREB-H, il n'y a pas induction de ces protéines suite à une stimulation par les cytokines et le LPS, ce qui suggère fortement une implication de CREB-H dans ce mécanisme. Des analyses plus poussées ont révélé un lien important entre la réponse UPR et la réponse APR. Il a été montré que l'ARNm de CREB-H est régulé, au niveau du foie, à la fois par des agents qui induisent un stress du RE (DTT, thapsigargine et brefeldin A) et par des cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-1 β et TNF α). Le clivage de CREB-H a été observé, dans le foie des souris sauvages, suite à des traitements avec la brefeldin A, la thapsigargine, la tunicamicine et le DTT et par l'utilisation de cytokines [119]. Une exposition de 24 heures du foie de souris aux cytokines IL-6, IL-1 β et au LPS cause un stress du RE qui est caractérisé par une augmentation des ARNm codant pour BiP et CHOP, de même que par la présence accrue d'ARN épissé de XBP1 et de l'ARNm d'EDEM. Cette réponse est toutefois deux fois moins importante que la réponse observée suite à un traitement avec la tunicamicine [119]. À l'inverse, un traitement avec la tunicamicine accroît l'expression des gènes SAP et CRP, ce qui suggère que les réponses UPR et APR soient étroitement reliées entre elles dans le foie [119].

L'activité transcriptionnelle de CREB-H est conséquente à sa liaison aux éléments de réponse CRE et UPRE, mais pas à l'élément ERSE. CREB-H ne permet pas la transcription via le promoteur de BiP (ERSE), mais active la transcription via un élément UPRE placé en amont du gène rapporteur de la luciférase [119]. Concernant les gènes SAP et CRP, leurs promoteurs possèdent des éléments CRE et UPRE et CREB-H augmente significativement l'expression transcriptionnelle via ces promoteurs [119]. L'utilisation d'un dominant négatif de CREB-H constitué de son bZIP, mais démuné de son domaine d'activation, inhibe l'activité via les promoteurs des gènes SAP et CRP, ce qui indique la

possibilité que CREB-H agisse en tant qu'homodimère [119]. ATF6 est aussi en mesure d'activer la transcription via les promoteurs SAP et CRP et une cotransfection ATF6-CREB-H induit la transcription des deux gènes testés d'une manière synergique. Des expériences d'immunoprécipitations ont montré qu'ATF6 et CREB-H sont capables d'interagir entre eux et des tests de liaison ADN-protéine ont confirmé leur pouvoir de lier le promoteur CRP. Ces données suggèrent fortement la formation d'hétérodimères ATF6-CREB-H pour moduler l'expression de gènes impliqués dans la réponse APR [119].

1.3.5.4 CREB-H dans des processus physiologiques

Des fonctions physiologiques de CREB-H ont été mises en évidence dans différents processus physiologiques tels que le contrôle de l'homéostasie du fer et la régulation nutritionnelle. Il a été démontré que CREB-H induit l'hepcidine, une hormone peptidique sécrétée par le foie qui contrôle l'homéostasie du fer [120]. L'hepcidine est appelée à intervenir au cours la réponse APR par son pouvoir de limiter les concentrations de fer disponibles pour les micro-organismes envahisseurs en favorisant la dégradation de la ferroportine. À l'image des gènes régulés par la réponse APR, l'expression de l'hepcidine est augmentée suite à un stress du RE et suite à des traitements avec la cytokine IL-6 ou le LPS. L'utilisation de siRNA ciblant spécifiquement CREB-H a démontré que CREB-H est davantage essentiel à l'induction de l'hepcidine suite au stress qu'à celle par les molécules inflammatoires [120]. D'une manière plus concrète, CREB-H est capable de lier et d'activer le promoteur de l'hepcidine dans des cellules hépatiques [120]. Pour ne donner qu'un bref aperçu de la régulation nutritionnelle, il faut savoir que des souris soumises à une diète riche en acides gras expriment davantage d'ARNm de CREB-H dans leurs hépatocytes et que cette régulation est la conséquence de l'activité transcriptionnelle du facteur PPAR α , un transducteur des signaux des acides gras. Le promoteur de CREB-H possède un élément PPRE (*Peroxisome Proliferator Responsive Element*-AGGGGAGAGGTCA) qui est lié par PPAR α pour mener à son activation [121].

1.3.5.5 Régulation du clivage de CREB-H

L'étude de CREB-H a été abordée sur un aspect qui n'a pas été traité chez les autres facteurs CREB3, soit son mécanisme de régulation avant clivage. Il est bien connu qu'ATF6 est régulé par la chaperonne BiP qui le retient au RE. La dissociation de BiP permet à ATF6 d'être transporté à l'appareil de Golgi pour y subir un clivage. Il a été clairement démontré que CREB-H n'interagit pas avec BiP [122]. BiP, de même qu'aucune autre chaperonne, n'a été rapportée comme étant des régulateurs de clivage des facteurs CREB3. L'équipe du Dr Peter O'Hare s'est intéressée au mécanisme de rétention de CREB-H au RE et a démontré l'existence d'une séquence essentielle à la localisation au RE qui est relativement conservée chez les facteurs de la sous-famille CREB3 et complètement absente chez ATF6. Cette région est définie par 12 résidus (QSTSKSAQTGTC) qui chevauchent le site de clivage pour S2P et a été nommé motif de rétention au RE (ERM) [123]. Une délétion de la région ERM est suffisante pour qu'il y ait un changement marqué de l'emplacement habituel de CREB-H vers l'appareil de Golgi [123]. La régulation de CREB-H passe également par sa stabilité. Il a effectivement été démontré que CREB-H possède une demi-vie très courte et qu'un traitement avec l'inhibiteur du protéasome favorise l'apparition d'une population de CREB-H dans le cytosol des cellules, ce qui indique qu'il est rapidement dégradé par le mécanisme ERAD [122]. Les modifications post-traductionnelles de CREB-H sont également impliquées dans son processus d'activation. CREB-H subit plusieurs glycosylations dont l'omission conduit à l'accumulation de protéines CREB-H non glycosylés dans le RE et à une inhibition de tout clivage normalement induit par des agents qui engendrent un stress du RE [124].

Les informations portant sur l'induction de CREB-H et ses cibles transcriptionnelles sont résumées à la figure 1.15. Les cibles les mieux documentées (hepcidine, SAP et CRP) proviennent d'études réalisées chez les souris et un effort de transposition chez l'humain devra être réalisé pour confirmer le rôle de CREB-H dans le foie.

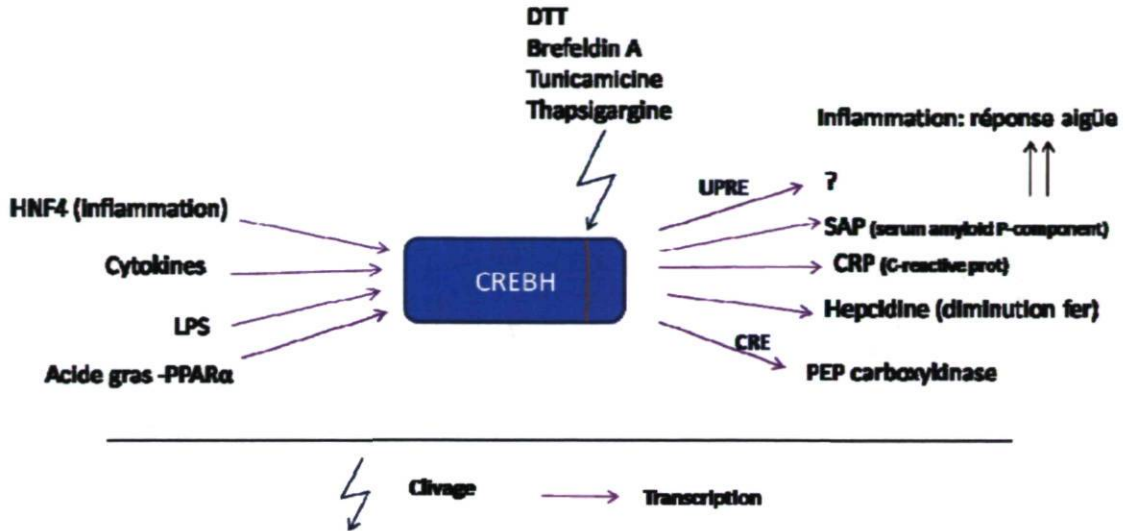


Figure 1.15 : Régulation de l'expression de CREB-H, de son clivage et de ses cibles transcriptionnelles. Le facteur est fortement modulé par l'inflammation et clivé par des agents qui causent un stress du RE. Ses cibles les plus documentées sont impliquées dans la réponse aigüe de l'inflammation.

1.3.6 CREB3L4/AIbZIP/CREB4/ATCE1/TISP40 :

L'identification d'AIbZIP remonte en 2002 alors que l'équipe du Dr Labrie cherchait à identifier des cibles transcriptionnelles du récepteur des androgènes (RA) dans les cellules prostatiques cancéreuses, les LNCaP. Par hybridation soustractive de banques d'ADNc issues de cellules LNCaP traitées ou non avec l'androgène synthétique R1881, ce groupe a cloné des séquences d'ADN correspondant à une protéine de 395 acides aminés qui s'est révélée être fortement apparentée à des facteurs de la superfamille BZIP, plus précisément des facteurs ATF/CREB [1].

1.3.6.1 Profil d'expression d'AIbZIP et régulation par les androgènes

La présence d'AIbZIP semble corrélée avec la présence d'androgènes. Il est fort intéressant de constater que le profil d'expression d'AIbZIP est assez restreint à la prostate. Une analyse de type Northern réalisée sur 16 tissus différents a permis de détecter l'ARNm d'AIbZIP uniquement dans la prostate (figure 1.16A) [1]. Des réactions de polymérase en chaîne (PCR) quantitatifs ont également mis en évidence le caractère spécifique d'AIbZIP

(figure 1.16B). Sans pouvoir affirmer une exclusivité au tissu prostatique, AIBZIP est beaucoup plus abondant dans ce tissu, n'étant exprimé qu'à des niveaux très faibles dans les 15 autres tissus testés par PCR quantitatif [125].

Sa spécificité tissulaire va de paire avec sa régulation par les androgènes puisque ces hormones stéroïdiennes, plus précisément la testostérone et son puissant métabolite actif le 5 α -dihydrotestostérone, modulent la différenciation et le développement du tissu prostatique via leur liaison avec le récepteur des androgènes (RA). L'implication des androgènes dans le développement et la progression du cancer de la prostate ne fait aucun doute dans le milieu médical. L'équipe du Dr Labrie a confirmé que l'ARNm d'AIBZIP est fortement régulé par le R1881 de manière dose-dépendante (figure 1.17A) [1]. La régulation de l'ARN suite à différents temps d'exposition au R1881 a confirmé la régulation temps-dépendante. Une augmentation de la protéine est également observée lors d'une dose-réponse de R1881 (figure 1.17C). La régulation d'AIBZIP par le RA a été confirmée par l'utilisation du Casodex, un antagoniste du RA, qui bloque l'induction de l'ARNm d'AIBZIP induit par le R1881 (figure 1.17B). Des expériences avec les inhibiteurs de transcription et de traduction, l'actinomycine D et le cycloheximide, de même que le délai dans l'apparition d'AIBZIP suite au traitement R1881, suggèrent une régulation indirecte du facteur par le RA. La régulation par le RA laisse croire en la participation d'AIBZIP dans des processus physiologiques et pathologiques de la prostate [1].

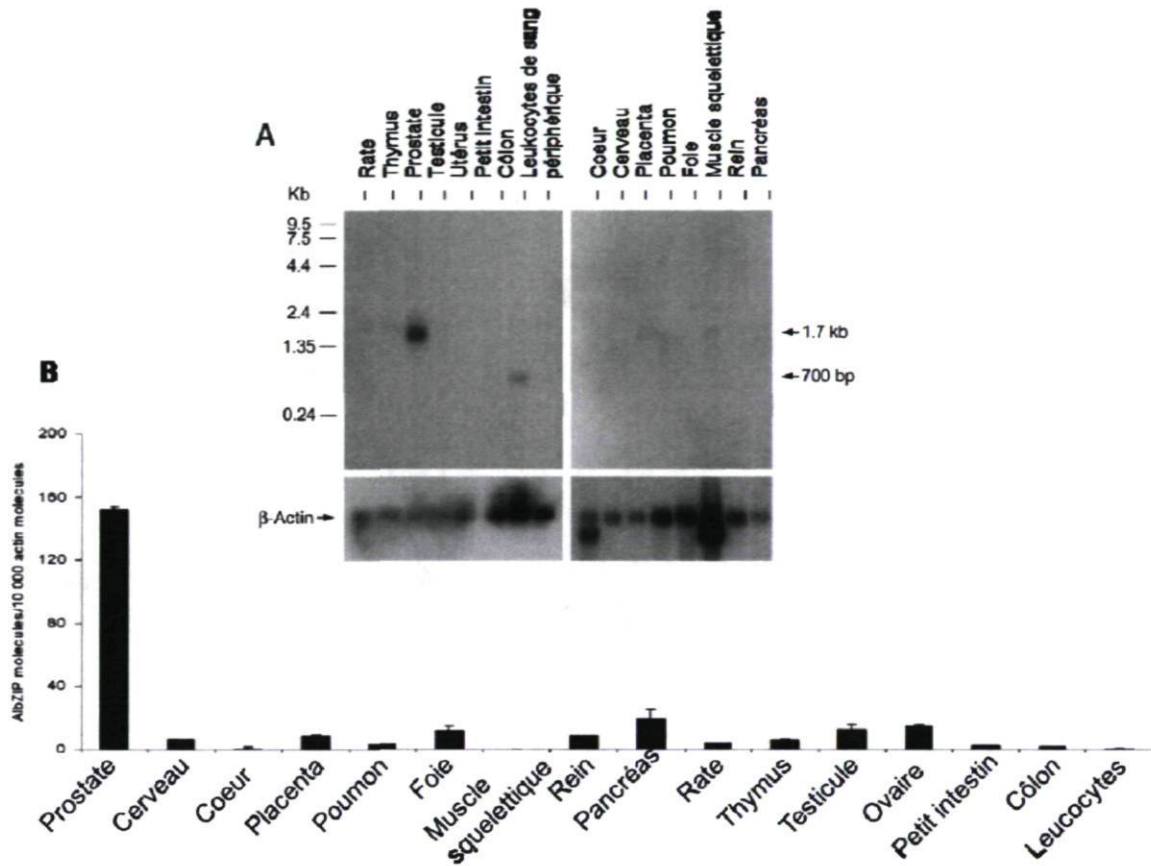


Figure 1.16 : Profil d'expression du facteur de transcription AIBZIP chez l'humain. A) Hybridation de type Northern où la sonde utilisée cible l'ARN correspondant à AIBZIP. B) Résultats de PCR quantitatifs où les transcrits d'AIBZIP sont quantifiés et normalisés par rapport à la quantité de transcrits d'actines. Dans les 2 figures, il est évident qu'AIBZIP est préférentiellement exprimé dans la prostate. Adaptée de Qi et collaborateurs et Cunha et collaborateurs [1, 125].

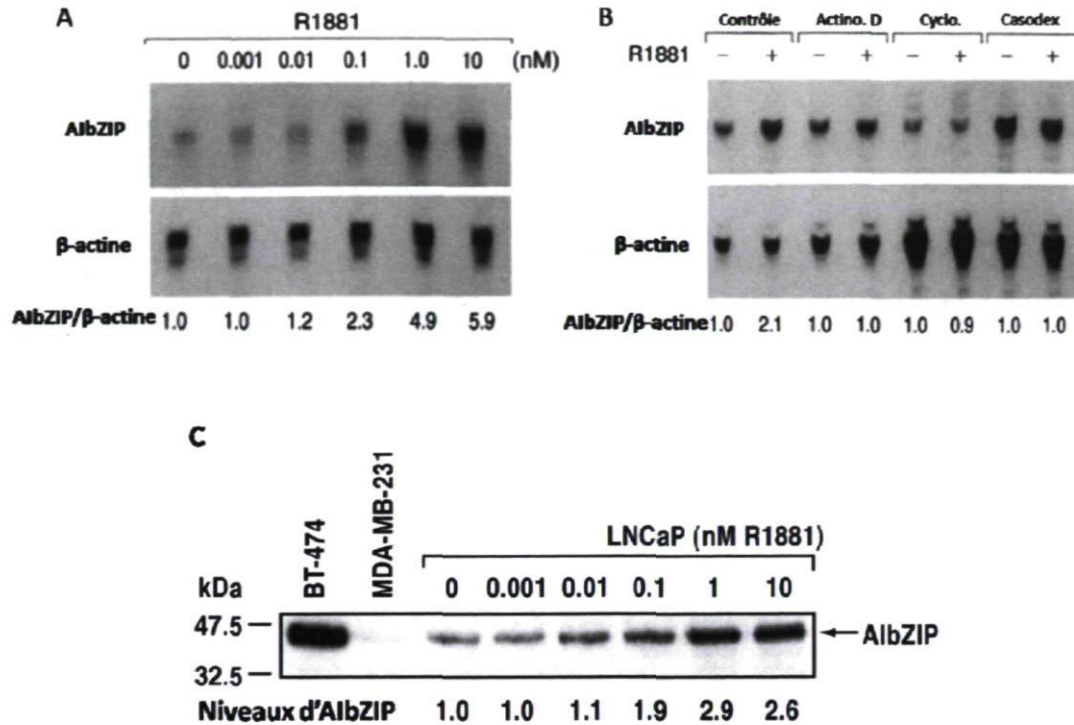


Figure 1.17 : Régulation d'AibZIP par les androgènes. A) Le rapport des niveaux d'ARN d'AibZIP sur les niveaux d'ARN de l'actine lors de traitement avec l'androgène synthétique R1881 permet de conclure que l'ARN d'AibZIP augmente suite au traitement. B) Le même rapport est utilisé en B et permet de voir l'effet des agents Actinomycine D (actinoD), cycloheximide (cyclo) et casodex sur l'ARN d'AibZIP. C) Immunobuvardage démontrant l'augmentation de la protéine AibZIP suite au traitement avec le R1881. Adaptée de Qi et collaborateurs [1].

Des données histologiques appuient grandement l'hypothèse voulant qu'AibZIP soit impliqué dans le développement du cancer de la prostate. En effet, un marquage par hybridation *in situ* révèle que l'ARNm d'AibZIP est plus abondant dans les cellules cancéreuses que dans des cellules prostatiques saines [1]. Il en est de même lors d'immunohistochimies effectuées sur des biopsies de cancers de prostate : un marquage intense correspondant à la protéine AibZIP est présent dans le cytosol de cellules épithéliales prostatique cancéreuses par rapport aux cellules saines adjacentes (figure 1.18) [1].

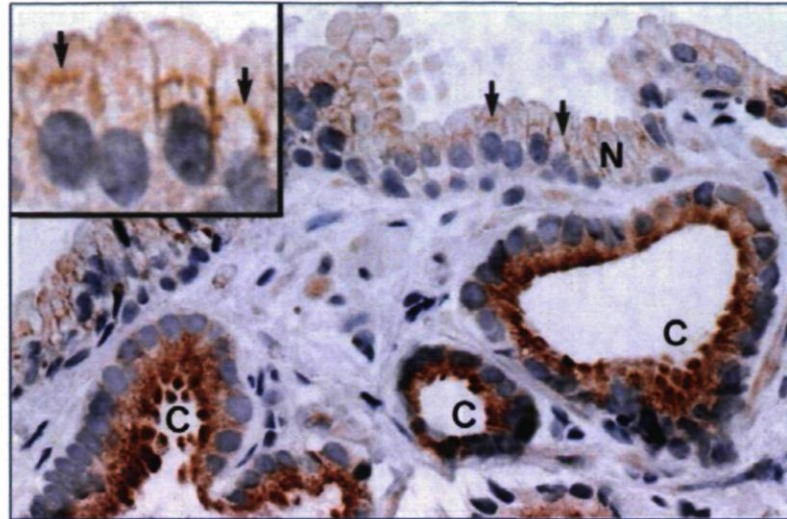


Figure 1.18 : Spécimen de tissu prostatique qui contient des cellules cancéreuses (C) et non-cancéreuses (N) marqué avec un sérum anti-A1bZIP. Le marquage de la protéine A1bZIP est plus intense dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines. Adaptée de Qi et collaborateurs [1].

La présence d'A1bZIP dans le cancer a été validée par d'autres publications. L'une de ces publications avait pour but de quantifier l'expression de neuf transcrits dont l'expression est habituellement élevée dans les tissus prostatiques cancéreux. Parmi ces gènes se trouvait l'antigène spécifique de la prostate, un marqueur couramment utilisé pour dépister précocement le cancer de la prostate. Les travaux visaient à identifier de nouveaux marqueurs de diagnostic pour améliorer le dépistage de ce cancer. Cette équipe a ainsi démontré quantitativement qu'A1bZIP est deux fois plus abondant dans le tissu cancéreux que dans le tissu sain [126]. Une étude semblable, mais réalisée par immunohistochimie, a également confirmé le lien existant entre la présence d'A1bZIP et le cancer. Il est pertinent de constater que la présence d'A1bZIP permet de distinguer un spécimen de cancer bénin par rapport à un spécimen malin [127]. De plus, une légère augmentation des niveaux protéiques d'A1bZIP a également été observée dans les spécimens d'hyperplasie bénigne de la prostate et dans les néoplasies intraépithéliales prostatiques de faible grade qui sont toutes deux des affections de la prostate pouvant progressivement mener au cancer [127]. Le marquage s'intensifie lorsque sont marqués des spécimens de néoplasies intraépithéliales prostatiques de haut grade et des cancers à proprement dit. À ce dernier niveau, A1bZIP ne permet toutefois pas de distinguer les cancers selon leur score de

Gleason, une échelle utilisée pour décrire l'agressivité et l'étendue du cancer. L'intensité de marquage des immunohistochimies a été quantifiée et les résultats sont présentés à la figure 1.19. Il existe donc une corrélation positive entre la présence d'AibZIP et le développement du cancer de la prostate [127].

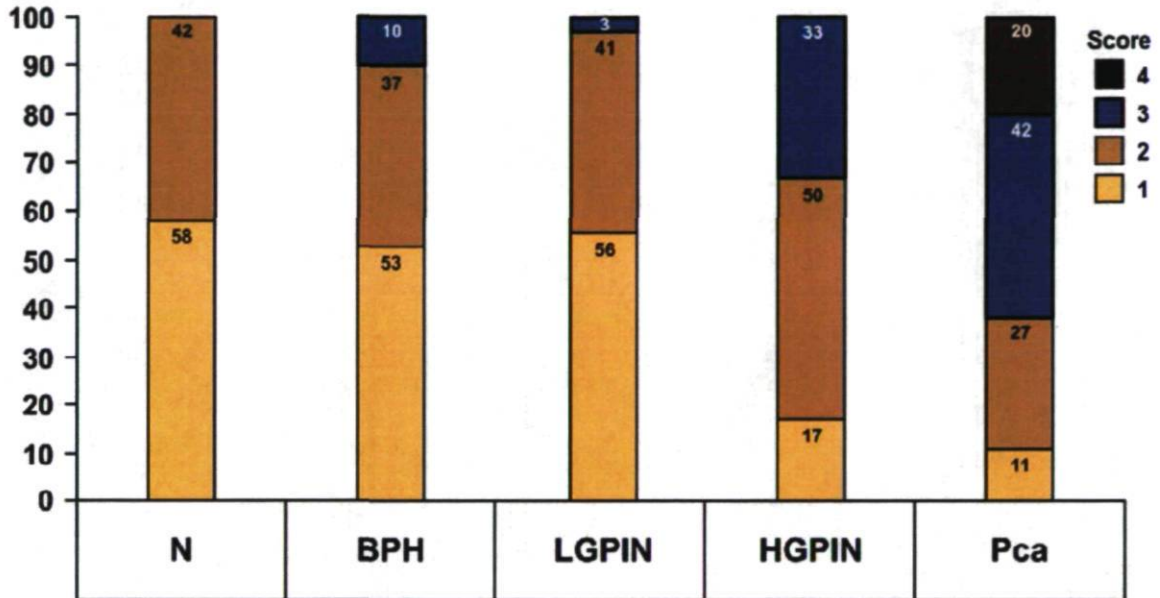


Figure 1.19 : Intensité de marquage avec du sérum anti-AibZIP de spécimens prostatiques. L'intensité de marquage est présentée par les valeurs 1, 2, 3 et 4 signifiant respectivement absence de marquage, marquage faible, modéré et fort. 24 spécimens normaux (N), 30 spécimens d'hyperplasie bénigne (BPH), 32 néoplasies prostatiques de faible grade (LGPIN), 6 néoplasies prostatiques de haut grade (HGPIN) et 69 spécimens de cancer ont été évalués par immunohistochimie. Adaptée de Levesque et collaborateurs [127].

1.3.6.2 Caractéristiques transcriptionnelles et clivage protéolytique d'AibZIP

Tout comme les autres membres de la sous-famille CREB3, la protéine AibZIP recombinante qui ne possède pas son domaine C-terminal est localisée au noyau [1]. Des expériences réalisées avec des gènes rapporteurs ont démontré que cette protéine tronquée nucléaire est transcriptionnellement beaucoup plus active que la forme complète de la protéine. Des délétants de 48 ou 98 acides aminés en N-terminal d'AibZIP suffisent à abolir complètement son activité transcriptionnelle [1]. AibZIP est capable d'activer la transcription via un motif de liaison à ATF6 (TGACGTGG) et via le promoteur de la

chaperonne BiP [39, 128]. Une caractérisation détaillée des sites de liaison d'AlbZIP sur le promoteur du gène BiP n'a toutefois pas été réalisée. AlbZIP possède un site potentiel de clivage pour la protéase S1P qui a été rapporté dans une publication de l'équipe de recherche du Dr Peter O'Hare, connu pour ses travaux sur la sous-famille CREB3. Ses travaux sur AlbZIP, qui datent de 2006, n'ont pas permis d'induire expérimentalement le clivage d'AlbZIP [128]. Le clivage d'AlbZIP murin avait toutefois été rapporté précédemment dans la littérature (2005), alors que les travaux du Dr Nojima avaient démontré que l'utilisation de la drogue brefeldin A permettait de cliver la protéine recombinante sauvage tandis qu'une protéine mutée dans son site S1P résistait au clivage suite au traitement. Ces résultats démontraient que l'isoforme murin est soumise au mécanisme RIP, à l'image des autres facteurs CREB3 [129].

1.3.6.3 AlbZIP chez la souris : Atce1/Tisp40

L'expression d'AlbZIP chez la souris est relativement différente et de nombreux travaux l'ont caractérisée chez cette espèce. La plus grande particularité d'AlbZIP murin par rapport à celui humain est son abondance dans le testicule. De faibles niveaux ont été détectés dans les autres tissus murins, dont des niveaux légèrement plus élevés dans l'épididyme et les ovaires, mais la prostate n'exprime pas des niveaux détectables d'AlbZIP. Le testicule est le site de la spermatogénèse, soit la production et la maturation des spermatozoïdes, suggérant un rôle pour AlbZIP dans ce processus. La spermatogénèse implique 3 étapes distinctes qui se déroulent dans les tubules séminifères des testicules. La première étape est la prolifération mitotique et la différenciation des cellules souches spermatogoniales en spermatocytes primaires diploïdes. La deuxième étape consiste en la méiose des spermatocytes primaires pour l'obtention de spermatides haploïdes. Survient ensuite la dernière étape qui est la maturation des spermatides. Les histones sont alors remplacées par les protamines, ce qui favorise la condensation de la chromatine, le volume cytoplasmique diminue et il y a formation de la queue des spermatozoïdes. L'équipe de recherche du Dr Don a identifié AlbZIP chez la souris, en 2002, alors qu'elle faisait du double hybride pour identifier des partenaires de Tctex2, un gène spécifique aux testicules qui est impliqué dans la méiose. AlbZIP fut alors nommé Atce1 (*Attaching to CRE-like*) [130]. Une seconde équipe, celle du Dr Nojima, a rapporté l'identification d'AbZIP murin,

en 2005, rapportant dans la même publication la régulation d'AlbZIP murin par le mécanisme RIP. L'équipe du Dr Nojima cherchait des transcrits induits au cours de la spermiogénèse. Elle a identifié 80 transcrits régulés qu'elle a appelé TISP1 à TISP80 et celui correspondant à AlbZIP fut désigné TISP40 [129]. Il a été démontré qu'Atce1/Tisp40 est spécifique au stade haploïde de la spermatogénèse, avec une prédominance dans les spermatides ronds dans les tubules des testicules matures [130]. La forme pleine longueur d'Atce1, qui fait 315 acides aminés, est située dans le RE et l'appareil de Golgi lorsque transfectée dans des cellules HeLa en culture, alors que la forme délétante pour le C-terminal est localisée au noyau [130]. Lors de marquages par immunofluorescence des cellules germinales, la protéine Atce1 est localisée dans la membrane de l'acrosome, un organe issu de l'appareil de Golgi qui contient une protéase unique relâchée lors de la réaction de l'acrosome au cours de la fertilisation.

L'équipe du Dr Nojima a précisé qu'il existe deux variants de TISP40 soit les formes α et β qui sont issues de sites distincts d'initiation de la transcription. La forme α correspond à la protéine de 315 acides aminés et donc à la forme identifiée Atce1, alors que la forme β est constituée de 370 acides aminés, possédant un domaine de résidus acides supplémentaires en N-terminale [129]. Dans les deux cas, l'ARNm des deux isoformes est retrouvé dans les testicules de souris, mais Tisp40 α demeure plus abondant. Il n'en est pas de même avec la protéine puisque Tisp40 β semble traduite plus efficacement, ses niveaux étant supérieurs à ceux de Tisp40 α . Les protéines recombinantes sont des protéines de type II glycosylées localisées au RE. L'absence du domaine C-terminal leur confère une localisation nucléaire. L'équipe du Dr Don a rapporté une liaison et une activité transcriptionnelle d'Atce1/Tisp40 α sur le promoteur d'IL-2 qui contient un élément NF- κ B, information qui fut contredite par l'équipe du Dr Nojima. Selon les résultats de l'équipe du Dr Nojima, les deux isoformes lient l'élément de réponse UPRE et non l'élément NF- κ B. Les travaux des deux équipes ont toutefois rapporté l'absence de liaison et d'activité sur l'élément CRE. Bien que l'élément UPRE soit lié par les isoformes α et β , il semble que seule l'isoforme β soit en mesure d'activer la transcription via cet élément. Le domaine acide supplémentaire présent dans l'isoforme β est probablement nécessaire à la transcription. Par contre, la présence de l'un ou l'autre des facteurs augmente les niveaux

de l'ARNm d'EDEM dont le promoteur contient un élément UPRE, l'isoforme α le faisant d'une manière plus modérée. Les deux isoformes ont été testées pour leur capacité à subir un clivage par la protéase S1P, et il ne fait aucun doute qu'Atce1/Tisp40 est soumis au processus de clivage par le mécanisme RIP [129].

Deux modèles de souris déficientes en l'expression de Atce1/Tisp40/Creb3l4 ont été réalisés et mènent aux mêmes conclusions [131-132]. D'abord, les ratios attendus de souris ont été respectés et les souris obtenues sont en bonne santé. Elles ont un phénotype normal, sont fertiles et les tubules séminifères possèdent des cellules germinales de tous les stades. Il y a une augmentation de l'apoptose des cellules germinales postméiotiques, ce qui occasionne une légère diminution du nombre de spermatozoïdes, mais ceux-ci ne présentent aucune anomalie morphologique, ni de défaut dans la motilité et la réaction acrosomale [131-132]. Pour préciser la voie apoptotique, il faut mentionner que la caspase 12, qui est spécifique au stress prolongé du RE, est activée, mais cette voie ne semble pas complètement activée puisque la caspase suivante dans le processus apoptotique, la caspase 9 n'est pas clivée [132]. Cela suggère un mécanisme apoptotique différent de celui généralement rencontré en cas de stress. On a également observé une activation de la voie p53 dans les testicules de souris CREB3L4^{-/-} qui pourrait contribuer à l'apoptose. Il est connu que la spermiogénèse génère la production d'une grande quantité de protéines et que des chaperonnes sont induites durant le processus. Il faut préciser qu'il y a accumulation de la chaperonne BiP dans les testicules de souris CREB3L4^{-/-} et que l'absence de CREB3L4 provoque une augmentation de l'ARNm de RAMP4 (*Ribosome associated membrane protein 4*), une cible connue de XBP1, qui est un stabilisateur de protéines transmembranaires [132]. Ces constatations laissent croire que CREB3L4 serait important dans la réponse au stress durant la spermiogénèse. Les testicules des souris produites par l'équipe du Dr Nojima ont été visualisés au microscope électronique et des noyaux anormalement relâchés au niveau des spermatides dans l'épididyme ont été observés suggérant une fonction pour CREB3L4 dans la condensation de la chromatine [132]. La caractérisation des histones dans les testicules a révélée une augmentation des histones H2A et H4, mais aucun effet sur l'histone H3. Dans le testicule de type sauvage, les histones sont au noyau, alors que dans la souris mutée, il y a des histones au noyau et au

cytoplasme. Normalement, il n'y a plus d'histone sur la chromatine après le stade 9 de développement des cellules germinales, ce qui n'est pas le cas dans la souris déficiente en dans l'expression de CREB3L4 [132]. Lors du processus de condensation de la chromatine qui survient au cours de la spermiogénèse, les histones sont remplacées par les protamines. Dans les souris à l'étude, il y a augmentation de l'acétylation des histones et relâchement de la chromatine, donc un processus de condensation incomplet, suggérant un rôle pour Tisp40 dans la localisation spatiale et temporelle des histones [132].

La spermatogénèse fait appel à des facteurs ATF/CREB connus tels que CREB et CREM, ce dernier étant particulièrement essentiel. L'absence de CREM mène à un arrêt complet de la spermatogénèse. Tisp40 s'avère être une cible directe de CREM puisque son ARNm est augmenté lorsque CREM est exprimé et que l'absence de ce facteur cause également l'absence de Tisp40 [133]. Plusieurs facteurs CREM interviennent dans la spermatogénèse, mais dans les stades où Tisp40 est exprimé, c'est le facteur CREM τ qui est actif. Celui-ci lie le promoteur de TISP40 et active sa transcription en utilisant deux sites CRE présents entre les codons d'initiation de Tisp40 α et β . Le deuxième site CRE est lié préférentiellement par CREM et est essentiel pour la transcription [133]. Les protéines nucléaires Tisp40 α et β sont capables de former des hétérodimères avec CREM τ *in vivo* et *in vitro* [133]. Cette association est très importante pour la spécificité de la transcription. Tel que mentionné précédemment, Tisp40 utilise l'élément UPRE et non l'élément CRE. Or, dans le cas d'une co-expression de Tisp40 β et CREM τ , il y a une inhibition de la transcription de Tisp40 β via l'élément UPRE et une augmentation de la transcription de CREM τ sur CRE, suggérant ainsi que l'hétérodimère formé de Tisp40 β -CREM τ fonctionne via CRE et non UPRE [133]. La recherche de partenaires pour l'hétérodimère a mené à la découverte d'une interaction indirecte avec la chaperonne de l'histone H3.3 HIRA. Dans le testicule de souris déficiente en l'expression de TISP40, il y a une diminution de l'interaction de HIRA sur l'élément CRE, alors que la présence de HIRA augmente considérablement l'activité de Tisp40 β -CREM τ sur l'élément CRE [133]. Les données sur HIRA, qui est impliqué dans l'activité des histones, et son lien avec l'hétérodimère Tisp40 β -CREM τ ajoutent un intérêt quant à la fonction de la protéine Tisp40 dans le mécanisme de condensation de la chromatine [133].

La figure 1.20 résume les connaissances sur Tisp40 et rappelle qu'AlbZIP est, chez la souris, impliqué dans le processus de la spermatogénèse. Son rôle chez l'humain demeure toutefois à éclaircir. Sa relation avec le cancer semble évidente et la confirmation d'un lien de cause à effet pourrait en faire une cible thérapeutique à envisager ou un marqueur pour le diagnostic. Outre le cancer de la prostate, l'amplification du chromosome 1q21, qui contient le gène d'AlbZIP, est fréquemment observée dans le cas de carcinomes hépatocellulaires [134], ce qui laisse supposer qu'AlbZIP pourrait être impliqué dans la progression tumorale de spécimens non prostatiques, fournissant ainsi une motivation supplémentaire à comprendre ses fonctions.

Il est impressionnant de constater à quel point les facteurs CREB3, qui sont assez homologues, sont impliqués dans des mécanismes variés. Une chose est certaine toutefois, tous sont régulés par le mécanisme RIP et sont au cœur de processus physiologiques essentiels. Les résultats issus de la puce de peptides bZIP proposent qu'ils soient susceptibles de collaborer les uns avec les autres et ainsi de diversifier leurs fonctions, ce qui n'a toutefois pas encore été approfondi.

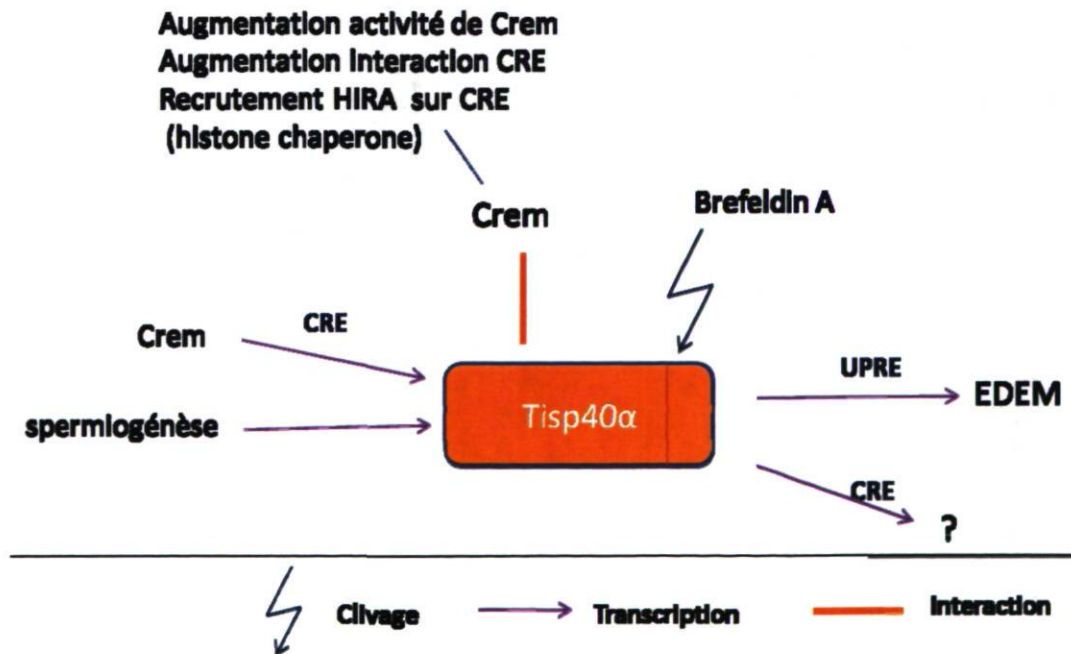


Figure 1.20 : Résumé des connaissances sur Tisp40. La protéine correspondant à l'homologue murin d'AibZIP est impliquée dans la spermiogénèse au niveau du testicule de souris.

1.4 Problématique et objectifs de recherche

Le stress du RE joue un rôle primordial dans l'adaptation des cellules aux perturbations pouvant nuire aux activités physiologiques des cellules. En situation normale de stress, la cellule augmentera sa capacité de repliement et induira, dans le cas où elle est complètement surchargée, sa mort par apoptose. À l'inverse, une dysfonction de la réponse au stress favorisera la survie de cellules qui devraient normalement mourir, causant ainsi un état pathologique chez les cellules touchées.

Tel que mentionné précédemment, l'équipe du Dr Labrie a identifié un facteur de transcription ATF/CREB nommé AibZIP qui s'est avéré être régulé par les androgènes dans les cellules cancéreuses prostatiques. Il a été démontré que le facteur est normalement localisé au cytoplasme et qu'il possède un domaine d'activation de la transcription dans sa portion N-terminale. Peu de temps après que je me sois jointe à l'équipe du Dr Labrie, il a été confirmé qu'AibZIP colocalise avec la chaperonne BiP au RE, ce qui confirmait qu'AibZIP est un facteur ATF/CREB ancré dans la membrane du RE qui pouvait possiblement être régulé par le mécanisme RIP. Alors que je débutais mes études graduées en 2005, l'équipe du Dr Nojima publiait sa découverte de TISP40 et de son clivage par le mécanisme RIP [129]. En 2006, l'équipe du Dr Peter O'Hare publiait un article démontrant qu'AibZIP était une cible potentielle pour la protéase SIP, mais sans avoir réussi à la cliver [128]. Cela confirmait notre hypothèse voulant que la protéine AibZIP humaine soit clivée par RIP et qu'elle participe ainsi, par son activité transcriptionnelle, à la réponse au stress du RE.

En 2006, les travaux sur les facteurs de la sous-famille CREB3 s'orientaient principalement sur les conditions induisant leur clivage et les éléments de réponse via lesquels les facteurs étaient en mesure d'activer la transcription. Les articles publiés qui

démontraient clivage et activité transcriptionnelle se sont succédés pour chacun des facteurs et reprenaient tous les connaissances sur ATF6 pour les transposer aux différents facteurs CREB3. À ce niveau, les équipe de recherche testaient les agents connus pour induire le clivage d'ATF6 pour les essayer sur leur facteur, vérifiaient la capacité d'activer la transcription via les éléments de réponse liés au stress ERSE, ERSE-II, UPR, mais aussi aux éléments associés au facteur ATF/CREB tel que CRE. L'étude de gènes candidats était aussi à l'honneur car les équipes de recherche tentaient de voir si des gènes induits lors de la réponse UPR tels que BiP et EDEM, étaient également modulés par leur facteur CREB3-like. La contribution des facteurs dans des processus physiologiques importants est survenue quelques années plus tard, après que des équipes aient conçu des souris modifiées qui n'exprimaient pas le gène d'intérêt. Les modèles murins permettent la compréhension des fonctions des facteurs ATF/CREB par l'observation du phénotype des souris. Les profils d'expression des organes de souris modifiées sont souvent comparés à ceux des organes de souris sauvages par des expériences de puces à ADN. À l'image des travaux sur les différents facteurs CREB3, l'objectif majeur de mes études était de découvrir le rôle physiologique d'AibZIP dans le stress du RE et dans le contexte du cancer de la prostate, puisqu'il y est particulièrement abondant. Les deux principaux objectifs étaient de **déterminer quelles conditions sont en mesure d'induire le clivage d'AibZIP et d'identifier et de caractériser les cibles transcriptionnelles d'AibZIP**, afin d'y attribuer des fonctions précises dans la physiologie des cellules cancéreuses. Au début de mes études, il n'était effectivement pas connu que les facteurs CREB3 allaient être impliqués dans des processus physiologiques de base tels que la chondrogénèse pour BBF2H7, la formation osseuse pour OASIS et l'inflammation pour CREB-H, alors les travaux ont d'abord été orientés vers le stress du RE dans le but de découvrir ensuite le rôle d'AibZIP dans les cellules prostatiques cancéreuses. Les données expérimentales publiées tout au long de mes études par diverses équipes sur AibZIP murin ont donné des informations pertinentes pour l'avancement de mes travaux, sans toutefois me permettre de comprendre le rôle d'AibZIP dans la prostate. Le profil d'expression d'AibZIP qui est très différent entre l'homme et la souris limitait quelques peu l'avancement des connaissances sur AibZIP humain. Une expression d'AibZIP au niveau de la prostate de souris aurait sans doute contribué à faire avancer grandement les connaissances, mais il n'en est pas le cas!

1.5 Approches expérimentales

Mes expériences ont été réalisées dans le modèle de cellules cancéreuses prostatique les LNCaP. Ces cellules ont servi à la réalisation de lignées cellulaires inductibles qui allaient ensuite être un outil de travail considérablement important dans la poursuite des travaux. Les gènes cibles d'AibZIP ont été identifiés par la technologie de micropuces à ADN avant d'être validés et caractérisés par des techniques courantes de biologie moléculaire.

1.5.1 Le modèle cellulaire de cancer de prostate : les cellules LNCaP

L'introduction portant sur la découverte d'AibZIP relate des travaux réalisés pour la majorité dans les cellules prostatiques cancéreuses LNCaP [135] qui signifie *Lymph Node Carcinoma of the Prostate*, ou en Français : carcinome ganglionnaire de la prostate. Il s'agit donc de cellules métastatiques qui ont quitté la tumeur prostatique primaire pour se nicher dans les ganglions lymphatiques. Depuis 1980, les LNCaP sont des cellules grandement utilisées en endocrinologie pour étudier le cancer de la prostate. Le cancer de la prostate est un cancer hormono-dépendant qui répond à une stimulation par les androgènes et cette réponse aux androgènes est possible car les cellules épithéliales de la prostate expriment le RA, un facteur de transcription important dans le développement et la physiologie de la prostate. Les LNCaP expriment le RA et sont sensibles à l'action des androgènes. L'exposition des LNCaP aux androgènes stimulent leur prolifération d'une manière dose-dépendante : l'exposition à différentes concentrations d'androgène donne une courbe de prolifération dont la forme caractéristique est celle d'une cloche. Il faut mentionner que le RA exprimé dans les LNCaP est muté dans son site de liaison au ligand, ce qui lui procure une certaine particularité au niveau de l'activité de certains stéroïdes et anti-androgènes [135]. Cette particularité ne change en rien le fait que les LNCaP sont un des modèles les plus utilisés dans les études portant sur le cancer de la prostate sensible aux androgènes.

1.5.2 Les systèmes d'expression inductible

Ces systèmes se veulent être très utiles pour étudier spécifiquement les fonctions de protéines en les surexprimant dans les cellules d'intérêt. Il y a trois composantes d'un système inductible, soit le facteur de transcription, son élément de réponse et le ligand qui induit la transcription. Idéalement, ces composantes ne doivent pas être présentes chez le mammifère afin d'éviter toute interférence possible du système sur la machinerie transcriptionnelle de la cellule. Plusieurs systèmes sont disponibles commercialement et ont été testés par notre équipe dans les cellules LNCaP, mais aucun n'a donné les résultats escomptés. Il est important qu'un système n'affecte ni la transcription ni la prolifération des cellules, en plus de fournir une induction efficace, contrôlable et l'absence d'activité basale. Or, les systèmes commercialement disponibles présentent tous certains inconvénients. Une étude comparative a confirmé que le système à la tétracycline possède une activité de base assez élevée puisque le sérum utilisé pour la culture cellulaire peut contenir de l'antibiotique qui active le système [136]. De plus, il a été démontré que l'antibiotique doxycycline qui est fréquemment utilisé par le système à la tétracycline cause la mort des cellules LNCaP [137]. Il existe aussi le système à l'ecdysone, un stéroïde retrouvé chez l'insecte, mais la nature stéroïdienne de ce ligand risque d'affecter des cellules hormonosensible comme les LNCaP. Alors que j'en étais à quelques mois d'études graduées, un article s'est attardé à tester différentes combinaisons des composants du système à l'ecdysone pour déterminer les composantes les plus efficaces afin d'obtenir un système d'expression inductible optimal. Il en a résulté qu'un système formé de facteurs hybrides formant des hétérodimères et activant la transcription suite à l'ajout d'un ligand non stéroïdien offrait de très bons résultats : faible activité de base, forte induction lors de l'ajout du ligand et bon contrôle de type ouvert/fermé [138]. La compagnie New England Biolabs a tiré profit des données fournies dans différentes publications sur le sujet pour commercialiser le système d'expression inductible RheoSwitch pouvant être utilisé dans les cellules de mammifères. Le système original est composé de deux plasmides, l'un codant pour les facteurs de transcription sous le contrôle d'un promoteur constitutivement actif et l'autre codant pour le gène d'intérêt sous contrôle d'éléments GAL4. Ce système, que j'ai par la suite modifié avec l'aide de mes collègues, est fort utile pour contrôler l'expression d'AlbZIP dans les cellules LNCaP. Les modifications et la caractérisation de ce système

sont présentées au chapitre 2, dans l'article intitulé : «*Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format* ».

1.5.3 Identification de cibles transcriptionnelles : les micropuces à ADN

Il existe plusieurs moyens pour identifier les cibles transcriptionnelles d'un facteur de transcription. L'approche ciblant des gènes candidats peut paraître la plus simple, faisant appel aux connaissances actuelles d'un sujet pour émettre des hypothèses quant aux cibles potentielles. Dans le cas des facteurs CREB3, les gènes cibles d'ATF6 et d'autres facteurs impliqués dans le stress (ATF4 et XBP1) ont été investigués, donnant parfois lieu à des résultats intéressants. C'est de cette façon qu'EDEM a été identifiée comme une cible transcriptionnelle de CREB3 [100]. Cette technique fait toutefois quelque peu appel au hasard, car rien n'indique que les membres de cette nouvelle famille agissent de la même manière que les facteurs déjà connus. L'étude d'autres facteurs à mener à la réalisation de souris génétiquement modifiées qui ont été utilisées pour identifier des cibles transcriptionnelles. La souris déficiente en CREB-H a été réalisée à l'aide de la technologie d'interférence à l'ARN et les transcrits de foies de souris déficientes et sauvages ont été analysés par micropuces. Cette expérience a permis de déterminer que SAP et CRP sont des cibles de CREB-H [119]. Les micropuces s'avèrent donc un outil de choix pour l'identification des cibles transcriptionnelles d'un facteur de transcription.

Plusieurs compagnies offrent des produits de micropuces à ADN dont la compagnie Affymetrix. Cette technologie permet de quantifier les niveaux de transcrits présents dans différents échantillons. Dans le cas de facteurs de transcription, il est avantageux d'utiliser une approche assez directe où l'on surexprime le facteur pour comparer les variations des transcrits en présence ou en absence du facteur. C'est à ce niveau que sont utiles les systèmes d'expression inductible qui permettent de contrôler précisément la production d'une protéine recombinante. Outre la surexpression, ce genre de technologie pourrait être utilisé, comme dans l'expérience de CREB-H, avec des niveaux diminués de facteur à l'aide de l'interférence à l'ARN, mais il est à noter que cette technologie ne garantit pas une abolition complète de l'expression du facteur. Dans le cas de facteur clivé comme

ATF6, il aurait pu être envisagé de comparer deux conditions soit le traitement ou non avec une drogue clivant le facteur. Toutefois, ce type d'expérience pourrait inclure l'expression de cibles conséquentes à l'utilisation de la drogue qui peut avoir des effets complexes sur plus d'un facteur et sur plus d'une voie de signalisation.

L'utilisation d'une micropuce couvrant le génome presque en entier est fortement recommandée pour identifier les transcrits, et celle utilisée au cours de mes études est la puce GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 de Affymetrix. Cette puce était, au moment de son utilisation, la toute dernière nouveauté en matière de puces couvrant le génome. Plus de 54 000 sondes y sont représentées et elles correspondent à environ 47 000 transcrits différents dont 38 500 sont des gènes connus. L'analyse par puces Affymetrix est une méthode de choix et à la fine pointe de la technologie pour identifier les cibles du facteur de transcription AlbZIP qui a donné lieu à la publication intitulée « *Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AlbZIP/CREB3L4 in prostate cells* » qui est présentée au chapitre 3.

1.5.4 Caractérisation de gènes cibles

L'utilisation de micropuces génère une quantité astronomique de données qui devront par la suite être validées. Cette étape fait appel à des techniques de biologie moléculaire standard. Tout d'abord, il faut valider certaines données obtenues par micropuce en validant la différence des niveaux d'ARN en présence et en absence du facteur. Cette étape peut être réalisée par utilisation de PCR en temps réel ou quantitatif ou par hybridation de type Northern. Cette dernière technique est celle qui fut sélectionnée dans le cadre de ce projet car elle nécessite moins de mise au point technique et ne requiert pas d'appareil spécialisé et coûteux comme c'est le cas pour le PCR en temps réel.

Après la validation, le projet devait s'orienter vers la régulation des cibles par AlbZIP. Il faut alors puiser dans les gènes validés pour déterminer lesquels seront soumis à une caractérisation plus poussée. La sélection se fait alors selon l'importance de l'induction par micropuces, l'intérêt quant à la relation possible entre le gène cible et AlbZIP et la

disponibilité de certains outils tel que l'existence d'anticorps commerciaux pour faciliter les expériences.

Dans le cadre de mes études, j'ai débuté la caractérisation de quelques gènes pour finalement me concentrer sur la cible CREB3 décrite précédemment à la section 1.3.2. La caractérisation a porté, entre autre, sur l'étude du promoteur de CREB3 en ayant recours à des essais avec le gène rapporteur la luciférase, où le promoteur d'intérêt est cloné en amont du gène de la luciférase. De l'expression de la luciférase résulte une protéine qui produit de la bioluminescence pouvant facilement être quantifiée. Des expériences d'immuno-précipitation de chromatine ont été mises à profit pour identifier des sites de liaison du facteur de transcription A1bZIP sur l'ADN de régions promotrices de gènes cibles. Les résultats obtenus dans le cadre de la caractérisation de CREB3 sont présentés au chapitre 4 dans un manuscrit qui sera soumis sous peu pour publication.

Au cours de mes études graduées, j'ai aussi collaboré à un autre article qui portait sur la protéine A1bZIP chez la souris. Tel que mentionné précédemment, il y a deux isoformes d'A1bZIP chez la souris nommés Tisp40 α et Tisp40 β . Il demeurerait toutefois une ambiguïté quant à l'appariement des deux formes avec leur transcrite respectif dans le testicule murin. J'ai donc démontré que les deux formes sont glycosylées et que c'est l'isoforme α qui est exprimé dans le testicule de souris (Annexe 1).

Chapitre 2: Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format

Lessard Julie, Ben Aicha Sonia, Fournier Andréa, Calvo Ezequiel, Lavergne E, Labrie C.

The Prostate, 2007, 67(8), 808-819.
(utilisé avec permission)

2.1 Résumé

Ce deuxième chapitre présente l'article intitulé «*Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format*» qui été publié dans la revue **Prostate** en décembre 2007. Tel que mentionné précédemment, la génération d'un système d'expression inductible efficace était primordiale à la réalisation de mes objectifs de recherche. Étant la première auteure de cette publication, ma contribution fut relativement importante. J'ai produit la plupart des plasmides ayant servi à générer le système modifié et j'ai fait la plupart des expériences de caractérisation. Le système RheoSwitch est grandement utilisé par l'équipe du Dr Labrie, en plus d'avoir été demandé par des équipes de recherche à travers le monde. Les plasmides que j'ai générés ont gracieusement été envoyés à plusieurs laboratoires qui en ont fait la demande. Ci-dessous se trouve la traduction du résumé publié sur les banques de données scientifiques :

Introduction : Les systèmes d'expression sont très utilisés pour étudier la fonction d'un gène, mais leur utilisation est plutôt limitée dans les cellules cancéreuses prostatiques car les ligands employés ont des effets biologiques indésirables. Le système RheoSwitch utilise le ligand RheoSwitch 1 (RSL1), un analogue non-stéroïdien de l'hormone de l'insecte ecdysone, pour activer le changement de conformation du récepteur nucléaire hétérodimère qui lui contrôle l'expression de gènes cibles via des éléments de réponse GAL4. Ce système n'a pas été testé dans des cellules de cancer de prostate.

Méthode : Nous avons établi une lignée de cellules de cancer de la prostate, les LNCaP, qui expriment les facteurs de transcription RheoSwitch pour quantifier l'expression et les effets

de RSL1 sur la prolifération et l'expression génique endogène. Des gènes répondant potentiellement au RSL1 ont été identifiés par micropuces à ADN Affymetrix et validés par hybridation de type Northern. Le système a été modifié afin qu'un seul vecteur soit nécessaire pour produire une lignée inductible qui exprime conditionnellement une protéine recombinante.

Résultats : Les lignées inductibles démontrent une forte et puissante régulation dépendante de RSL1 dans des cellules inductibles transfectées transitoirement avec le gène rapporteur de la luciférase. RSL1 n'affecte pas la prolifération basale et celle dépendante des androgènes et présente un effet minimal sur l'expression de gènes endogènes. Les lignées inductibles réalisées par la transfection stable d'un seul plasmide exprimant une cassette répondant à RSL1 ont démontré une très forte régulation de l'expression de la protéine recombinante dépendamment de l'ajout de RSL1.

Conclusion : Le système RheoSwitch est un système de choix pour l'expression conditionnelle de gènes dans les cellules de cancer de la prostate. La transfection d'un seul plasmide facilite la production de lignées stables. Ce système sera très pratique pour étudier les protéines impliquées dans les cellules et les modèles animaux de cancer de la prostate.

2.2 Abstract

BACKGROUND: Conditional expression systems are useful tools for the study of gene function but the use of these systems in prostate cancer cells is limited by the undesired biological effects of the inducing ligands. The RheoSwitch system employs RheoSwitch Ligand1 (RSL1), a non-steroidal analog of the insect hormone ecdysone, to activate a modified nuclear receptor heterodimer that controls target gene expression via GAL4 response elements. This system has not been tested in prostate cancer cells.

METHODS. We established LNCaP human prostate cancer cell lines that constitutively express RheoSwitch transcription factors to quantify RSL1-dependent expression and assess the effects of RSL1 on cell proliferation and endogenous gene expression. Potential RSL1-responsive genes were identified using Affymetrix microarrays and validated by

Northern blot hybridization. A single-vector format was developed to establish cell lines that conditionally produce a recombinant protein.

RESULTS. Stable cell lines displayed tight and potent (over several orders of magnitude) RSL1-dependent regulation of a transiently transfected luciferase reporter gene. RSL1 did not affect basal or androgen-stimulated cell proliferation and exerted minimal effects on the expression of endogenous genes. Cell lines established using the single-vector system also displayed strictly RSL1-dependent production of the recombinant protein encoded by the stably integrated RSL1-responsive expression cassette.

CONCLUSIONS. The RheoSwitch system is well suited for conditional gene expression in prostate cancer cells. The single-vector format should facilitate the production of stable cell lines. This system should be useful for the study of proteins involved in prostate cancer in both cell and animal models of the disease.

2.3 Introduction

The importance of conditional expression systems for the study of gene function in mammalian cells is well established. Such systems can be used to assess the effect of a transiently produced gene product on the function of living cells under controlled conditions [1]. Coupled with or complemented by gene inactivation studies, overexpression studies can provide a more thorough understanding of the roles of specific gene products in health and disease. In addition to their value in the laboratory setting, conditional expression systems can also be adapted for therapeutic applications, as evidenced by the development of experimental viral vectors for gene therapy of prostate cancer [2, 3].

The expression systems used to conditionally produce proteins of interest usually rely on three components: a transcription factor-responsive promoter that controls the transcription of the desired coding sequence, one or more ligand-responsive transcription factors that regulate this promoter, and a ligand that modulates the activity of these transcription factors in a specific manner. The ideal ligand is a compound, usually not found in mammals, that exerts minimal effects on cell function. Examples of some

currently used ligands include the antibiotic tetracycline or analogs thereof, the insect steroid hormone ecdysone or analogs thereof, and mifepristone, a progesterone receptor antagonist [4–6]. These compounds modulate the DNA-binding ability of nuclear receptors or bacterial repressor proteins that have been ingeniously engineered to selectively regulate genes of interest while minimizing undesirable off-target effects. The elements of the inducible promoters that confer ligand-dependent activation of transcription have also been selected or modified to ensure that the inducible gene of interest will not be regulated by endogenous transcription factors.

Despite the promise of these systems [7], they have seen rather limited use in human prostate cancer cell lines, particularly in the androgen-sensitive LNCaP cell line. In fact, a recent search of the PubMed database using the term “LNCaP” in combination with either “ecdysone,” “ponasterone,” “doxycycline,” “tetracycline” or “mifepristone” produced fewer than 15 relevant publications. The establishment of conditional stable cell lines can be rendered difficult due to the toxicity of some ligand-activated transcription factors [8], or to the presence of contaminants in serum which can interfere with tetracycline-regulated transcription. Investigators may also be wary of the growth-suppressive effects of mifepristone and doxycycline in prostate cells [9,10], or of potential hormonal effects of steroidal compounds such as ecdysone. There is therefore a need to develop conditional expression systems that are better suited to prostate cancer cells.

The recently introduced RheoSwitch conditional expression system is a modified version of the ecdysone-responsive expression system [11]. Both systems mimic the mechanism of action of the steroidal insect hormone 20-hydroxyecdysone. In *Drosophila melanogaster*, 20-hydroxyecdysone activates a nuclear receptor heterodimer composed of the ecdysonereceptor (EcR) and ultraspiracle, an ortholog of the retinoid X receptor (RXR) [12]. Following its activation, the hormone-bound ultraspiracle-EcR dimer regulates the transcription of genes required for fruitfly metamorphosis.

Despite their similarities, there are significant differences between the two systems. First, the original ecdysone-responsive expression system employs steroidal ligands (e.g.,

ecdysone, ponasterone) to modulate gene expression, whereas the RheoSwitch system uses RheoSwitch Ligand 1 (RSL1), a synthetic non-steroidal analog of 20-hydroxyecdysone. RSL1 is a member of a class of insecticides known as diacylhydrazines [13]. These molecules induce premature molting and larvae death but they are well tolerated in vertebrates.

A second major difference between the two systems resides in the design of the recombinant transcription factors and their corresponding response elements. The original ecdysone system used modified forms of EcR and RXR to regulate gene expression through a specially designed nuclear receptor response element. In contrast, the RheoSwitch system employs hybrid EcR and RXR proteins to regulate the expression of the target gene via GAL4 response elements. The RheoReceptor-1 and RheoActivator transcription factors comprise, respectively, the ligand-binding domain of EcR fused to the carboxy-terminus of the DNA-binding domain of yeast GAL4, and of the ligand-binding domain of RXR fused to the carboxy-terminus of the activation domain of the viral transactivator VP16. In addition, the ligand-binding domains have been engineered to interact specifically with RSL1 [14].

In theory, the combined use of a non-steroidal ligand, recombinant hybrid transcription factors, and yeast regulatory elements should result in tight ligand-dependent regulation of the target gene with minimal effects on the host cell. Transient transfection experiments performed in mouse 3T3 cells showed that RSL1-dependent activation of transcription is dose-dependent and reversible [11]. Importantly, RSL1 is also active following intraperitoneal administration [14], which suggests that RSL1 could be used to modulate gene expression in animal models of prostate cancer. However, the performance of the RheoSwitch system and its effects on host cell biology in stably transfected human cell lines, including prostate, have not been reported.

The purpose of this study was to characterize the RheoSwitch system in human prostate cancer cells. We chose to perform these experiments in the LNCaP cell line [15] because it is one of only a few prostate cancer cell lines that are sensitive to androgens and

it has been widely used as a model for prostate cancer research, with more than 3,000 publications in the PubMed database. To achieve this, we generated cell lines that support RSL1-dependent transcription. We then used these cells to assess the effects of RSL1 on target gene expression as well as on cell proliferation and the expression of endogenous genes. In the course of this work we developed a single vector format of the RheoSwitch system and used this vector successfully to generate cell lines that conditionally produce a recombinant protein. The results show that the RheoSwitch system is well suited for conditional gene expression in hormone-sensitive prostate cancer cells.

2.4 Materials and methods

2.4.1 Cell culture

LNCaP.FGC human prostate cancer cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultivated in medium consisting of RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 2mM L-glutamine, 50 mg streptomycin/ml and 100 IU penicillin/ml at 37°C in 5% CO₂. Stable cell lines were grown in the same medium supplemented with Zeocin (Invitrogen). Stock cultures were maintained in standard plastic culture flasks whereas most experiments were performed in culture dishes coated with polylysine. To assess the effect of RSL1 on cell proliferation, LNCaP cells (passage 30-36) and clone 6-6 cells (passage 37-56) were cultured in triplicate and cell number was determined using a hemacytometer or by quantifying DNA using the DABA assay [16]. Zeocin was omitted from the media of stable clones for the duration of RSL1 stimulation and cell proliferation experiments (approximately 2-10 days from plating to harvest). Monitoring of green fluorescent protein production confirmed that these cultures did not deviate in the absence of Zeocin.

2.4.2 Construction of pZRD

The plasmid pZRD was constructed by combining components of pNEBR-R1 (New England Biolabs) with components of pcDNA3 and pVgRXR (both from Invitrogen), pGL3-Basic (Promega), and pIRES-2a-hrGFP (Stratagene). The construction of pZRD required several cloning intermediates that were generated by PCR or by restriction enzyme digestion (construction details are available upon request). The sequences of all cloning

products were verified using an automated sequencer. The conversion of pNEBR-R1 to pZRD involved two major changes which can be summarized as follows. First, we removed a 3.8 kb Hind III-SnaB I fragment of pNEBR-R1 that contained the neomycin resistance gene, the origin of replication and the ampicillin resistance gene. In its place we inserted a 1.9kb fragment containing the origin of replication and the Zeocin resistance gene of pVgRXXR. During this step we also introduced a unique Age I restriction site that was subsequently used to insert RSL1-responsive expression cassettes (see below). Second, a 1.9 kb fragment containing the coding sequence of humanized recombinant green fluorescent protein (hrGFP) flanked by the human CMV promoter and the bovine growth hormone (BGH) polyadenylation signal was inserted into the unique EcoR V site located between the ubiquitin B and ubiquitin C promoters of pNEBR- R1. This fragment also contained the synthetic polyadenylation signal from pGL3-Basic (downstream of the BGH polyadenylation signal) and a Not I restriction site that served to linearize pZRD (the single Not I site present in pNEBR-R1 was destroyed prior to insertion of this DNA fragment).

2.4.3 Construction of pZRD derivatives containing RSL1-Responsive expression cassettes

An RSL1-responsive expression cassette was constructed by replacing the CMV promoter of plasmid pcDNA3HA [17] with the GAL4-responsive promoter and synthetic intron of plasmid pGene/V5-His A (Invitrogen). The GAL4-responsive promoter contains six copies of the GAL4 upstream activating sequence and the adenovirus E1b TATA box. Protein coding sequences were then inserted between the synthetic intron and sequences encoding a C-terminal HA epitope (YPYDVPDYASL). Expression cassettes were subsequently transferred to the unique Age I and/or Asc I sites of pZRD by PCR. Construction details are available upon request.

2.4.4 Establishment and screening of stable cell lines

The plasmids used to generate stable cell lines were purified by cesium chloride gradient ultracentrifugation, linearized by digestion with Not I, and introduced into LNCaP cells (passage 26-31) by transfection using Lipofectin (Invitrogen). The cells were

transferred to 10 cm dishes 2 days following transfection and selection with Zeocin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was initiated 3 days later. Transfected cells that produced hrGFP were identified using an inverted fluorescent microscope equipped with an I3 filter cube (Leica), isolated using cloning cylinders, and expanded. To confirm that the isolated hrGFP-producing clones also supported RSL1-dependent expression, individual clones were transiently transfected with pGene-mRFP1. This plasmid is derived from pGene/V5-His A (Invitrogen) and contains the monomeric red fluorescent protein mRFP1 [18] under the control of a GAL4-responsive promoter. RSL1 (500 nM) was added to the culture medium and the production of mRFP1 was monitored 24-48 hr post-transfection using an inverted fluorescent microscope equipped with an N2.1 filter cube (Leica).

2.4.5 Luciferase assays

To quantify the ability of clones stably transfected with plasmid pZRD to support RSL1-dependent transcription, cells were transiently transfected with a firefly luciferase reporter construct (pGAL4-Luc) that contains five copies of the GAL4 upstream activating sequence and the adenovirus E1b TATA box. The cells were then cultured in the presence or absence of RSL1 (500 nM) for 24 hr and harvested 48 hr post-transfection. A promoter-less renilla luciferase reporter plasmid (pRL-null, Promega) was co-transfected to monitor transfection efficiency. Firefly and renilla luciferase activities were measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega). Each experiment was performed at least twice in duplicate or triplicate, with similar results.

2.4.6 Immunoblotting

Whole cell extracts of transiently or stably transfected cells were processed for immunoblotting using standard techniques. Full-length A1bZIP was detected using a 1:5,000 dilution of a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 379–392 of the 395-residue human A1bZIP protein [19]. Truncated A1bZIP was detected using a 1:3,000 dilution of a rabbit polyclonal antibody raised against amino acids 52–64 of A1bZIP. HA-tagged A1bZIP was detected using a 1:500 dilution of the Y-11 polyclonal anti-HA antibody (Santa Cruz Biotechnology). hrGFP was detected using a 1:5,000 dilution of the

Vitality hrGFP rabbit polyclonal antibody (Stratagene). Peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories and the antigen-antibody complexes were revealed using a chemiluminescent detection system (Pierce).

2.4.7 Microarray experiment

Clone 6-6 cells (passage 38) were plated in eight 10 cm culture dishes. Half the dishes were incubated with RSL1 (500 nM) and the other half were incubated with an equivalent amount of the RSL1 vehicle (dimethylsulfoxide). After 24 hr, the dishes were pooled two by two to yield four individual samples (2 controls and 2 RSL1-treated). Each sample was processed separately to probes as follows. Total RNA was isolated using TRIZOL (Invitrogen) and 10 mg of total RNA was converted to cDNA using SuperScript reverse transcriptase (Invitrogen) and a T7-oligo-dT primer. The second strand was synthesized using T4 DNA polymerase and E. coli DNA ligase and the product was blunt ended using T4 DNA Polymerase. The cDNA was purified by phenol-chloroform extraction using Phase Lock Gels (Eppendorf Brinkmann) and biotinylated cRNAs were produced by transcribing cDNAs in vitro using the T7 BioArray High Yield RNA Transcript Labelling Kit (Enzo Biochem). Labeled cRNA was purified using the RNeasy Mini Kit column (QIAGEN) and fragmented to 30–200 mer using a fragmentation buffer. The quality of total RNA, cDNA synthesis, cRNA amplification, and cRNA fragmentation was monitored by capillary electrophoresis using a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies). Fifteen micrograms of fragmented cRNA was hybridized to GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 oligonucleotide microarrays (Affymetrix, batch No. 4016840) for 16hr at 45°C with constant rotation. After hybridization, arrays were processed using the Affymetrix GeneChip Fluidics Station 450 according to protocol EukGE-WS2v5. Bound cRNA was fluorescently labeled using streptavidin-conjugated phycoerythrin (SAPE, Molecular Probes) and additional fluors were added using biotinylated anti-streptavidin antibody (Vector Laboratories) and additional SAPE. Arrays were scanned using a GeneChip Scanner 3000 G7 (Affymetrix) enabled for high-resolution scanning and images were extracted using GeneChip Operating Software v1.2 (Affymetrix). Array quality was confirmed using affyQCReport software [20].

2.4.8 Statistical analysis of microarray data

Background subtraction and normalization of probe set intensities were performed using the Robust Multi-array Analysis (RMA) method [21]. To identify differentially expressed genes, probe set intensities were compared using a moderated t-test and a Bayes smoothing approach developed for a low number of replicates [22]. To correct for the effect of multiple testing, the false discovery rate was estimated from P values derived from the moderated t-test statistics [23]. The analysis was performed using the affyGUI graphical user interface for the limma microarray package [24].

2.4.9 Northern Blot analysis

To validate the microarray data, cultures of clone 6-6, 10-1, and 10-9 were exposed to vehicle or RSL1 (500 nM) for 24 hr and total RNA was isolated as described above. These experiments were performed at least twice in clone 6-6 (passage 38-55) and once in clones 10-1 (passage 42) and 10-9 (passage 40). PolyA⁺ RNA was purified using the PolyAtract mRNA isolation kit (Promega) and 2 µg samples were separated on horizontal 1% agarose/37% formaldehyde gels, passively transferred to Hybond-N nylon membranes (Amersham) and cross-linked. Pre-hybridization (2 hr at 42°C) and hybridization (ca .16hr at 42°C) were performed in a hybridization oven (Boekel). The pre-hybridization buffer contained 50% formamide, 5X Denhardt's solution, 100 mg/ml heat-denatured sheared salmon sperm DNA, 5X SSC, and 1% SDS. The hybridization buffer contained 5% dextran sulphate and no salmon sperm DNA. To generate probes for Northern blot analysis, the partial open reading frames of selected candidates were amplified from LNCaP cell RNA by PCR, subcloned into pCR2.1 (Invitrogen), and excised by digestion with EcoR I. The HES1 probe was an 810 bp fragment corresponding to a splice variant of HES1 that contains nucleotides 1-292 and 785-1,076 of NM_005524.2. The JUN probe was a 999 bp fragment containing codons 4-328 of JUN (NM_002228 nts 1053-2029). The SLC16A6 probe was an 1126 bp fragment containing codons 11-380 of SLC16A6 (NM_004694 nts 217-1328). An 1172 bp Xho I fragment of pNEBR-R1 containing codons 75-463 of RheoReceptor-1 served as a loading control. The DNA fragments were radiolabeled with P-dCTP using the Prime-a-Gene Labeling System (Promega) and purified using Bio-Spin 30 chromatography columns (Bio-Rad). Hybridizations were performed using 1x10⁶ cpm

probe/ml hybridization buffer. Following hybridization, the membranes were washed in 2X SSC/0.1% SDS at room temperature and in 0.1X SSC/0.1% SDS at 55°C. The blots were exposed to film at -80°C with intensifying screens.

2.5 Results

2.5.1 Establishment of stable cell lines

The RheoSwitch expression plasmid pNEBR-R1 encodes the RheoActivator and RheoReceptor-1 proteins as well as a neomycin resistance gene (Fig. 2.1). To facilitate the identification and isolation of stably transfected LNCaP cells that would serve to characterize the RheoSwitch expression system, we modified plasmid pNEBR-R1 by adding an expression cassette that produces hrGFP. To accommodate this addition, we replaced the neomycin and ampicillin resistance genes of pNEBR-R1 with the more compact Zeocin resistance gene that can be used for selection in bacteria as well as in mammalian cells. The resulting plasmid was designated pZRD, which stands for Zeocin-resistant RheoSwitch plasmid version D. Thirty-five hrGFP-expressing clones were isolated following transfection of linearized pZRD into LNCaP cells. Sixteen of these clones (46%) produced the monomeric red fluorescent protein mRFP1 when they were transiently transfected with the appropriate plasmid and exposed to RSL1 (data not shown). To more precisely quantify basal as well as RSL1-induced levels of promoter activity in cell lines that produce RheoSwitch transcription factors, three of these clones (6-6, 10-1, and 10-9) were transiently transfected with a luciferase reporter construct containing five copies of the GAL4 response element (pGAL4-Luc). As shown in Table 2.1, low levels of luciferase activity (1561-2130 U, on average) were measured in the absence of RSL1. These basal values are considered negligible since they were slightly lower than those obtained when the same cells were transfected with a luciferase reporter construct (pGL3-Basic) that does not contain any promoter elements (data not shown). In contrast, addition of RSL1 (500 nM) resulted in approximately 5-15 thousand fold increases in luciferase activity. Thus, the RheoSwitch system displays low back-ground and high induced levels of expression in LNCaP cells.

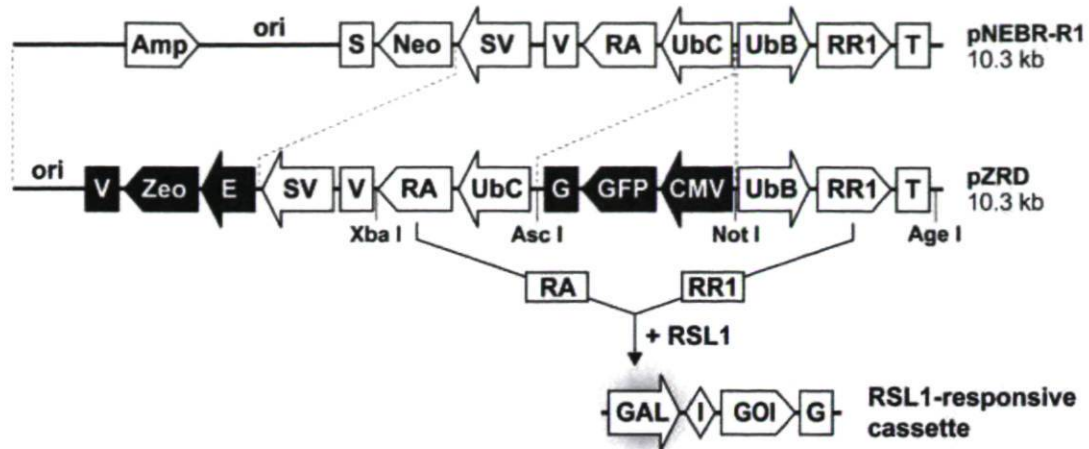


Figure 2.1: Schematic linear representation of RheoSwitch System vectors. The elements that are common to pNEBR-R1 and pZRD appear in white whereas those that are unique to pZRD are shown in black. Promoters are depicted as arrows, open reading frames are depicted as polygons, and polyadenylation signals (polyA) are depicted as boxes. The positions of the unique Age I, Asc I, Not I, and Xba I restriction sites of pZRD are shown. The diagram below the map of pZRD depicts the activation of an RSL1-responsive expression cassette by the RheoActivator (RA) and RheoReceptor-1 (RR1) proteins. The cassette consists of a promoter containing GAL4-binding sites (GAL), a synthetic intron (I), a gene of interest (GOI), and the BGH polyA (G). The other abbreviations used are: Amp, ampicillin resistance protein; CMV, human cytomegalovirus promoter; E, EM7 promoter; GFP, humanized recombinant green fluorescent protein; Neo, neomycin resistance protein; S, synthetic polyA; SV, SV40 promoter; T, thymidine kinase polyA; V, SV40 polyA; UbB, ubiquitin B; UbC, ubiquitin C; Zeo, Zeocin resistance protein.

2.5.2 Effect of RSL1 on cell proliferation

Steroid hormones, especially androgens, regulate numerous aspects of prostate epithelial cell function, including proliferation. Because steroid hormone receptors are structurally related to EcR and RXR, it was important to determine if the LNCaP cell lines that produce RheoSwitch transcription factors display a normal proliferative response to androgens. To this end, clone 6-6 cells were exposed to increasing concentrations of the synthetic androgen R1881 or RSL1, or increasing concentrations of R1881, and a fixed concentration (500 nM) of RSL1. Identical experiments were performed in untransfected

LNCaP cells for comparative purposes. As shown in Figure 2.2, R1881 elicited a characteristic bell-shaped proliferative response in both LNCaP and clone 6-6 cells [25]. The amplitude of the R1881-induced stimulation of cell proliferation was similar in both cell lines. On the other hand, RSL1 alone did not affect cell proliferation up to the highest concentration tested (1 mM). Moreover, 500 nM RSL1 did not alter the effect of R1881 on cell proliferation. Similar experiments performed in clones 10-1 and 10-9 confirmed that RSL1 does not significantly affect basal or androgen-induced proliferation in LNCaP cells (data not shown).

TABLE 2.1: RSL1-DEPENDENT LUCIFERASE REPORTER GENE ACTIVITY IN RHEOSWITCH CELL LINES

CLONE NO.	FIREFLY LUCIFERASE ACTIVITY (U) ^a		FOLD-CHANGE
	CONTROL	RSL1	
6.6			
BRUTE	1579±78 ^b	11039939±574271	6,992
NORMALIZED^c	0.03±0.00	169±5	5,633
10.1			
BRUTE	1561±102 ^b	13395637±150230	8,581
NORMALIZED^c	0.02±0.00	152±4	7,600
10.9			
BRUTE	2130±41 ^b	30289294±331013	14,220
NORMALIZED^c	0.01±0.00	148±3	14,800

^a Mean ± SEM. Cells were transiently transfected with a GAL4-responsive luciferase reporter construct.

^b Similar levels of luciferase activity were obtained with the promoter-less pGL3-basic plasmid.

^c Firefly luciferase/renilla luciferase ratio.

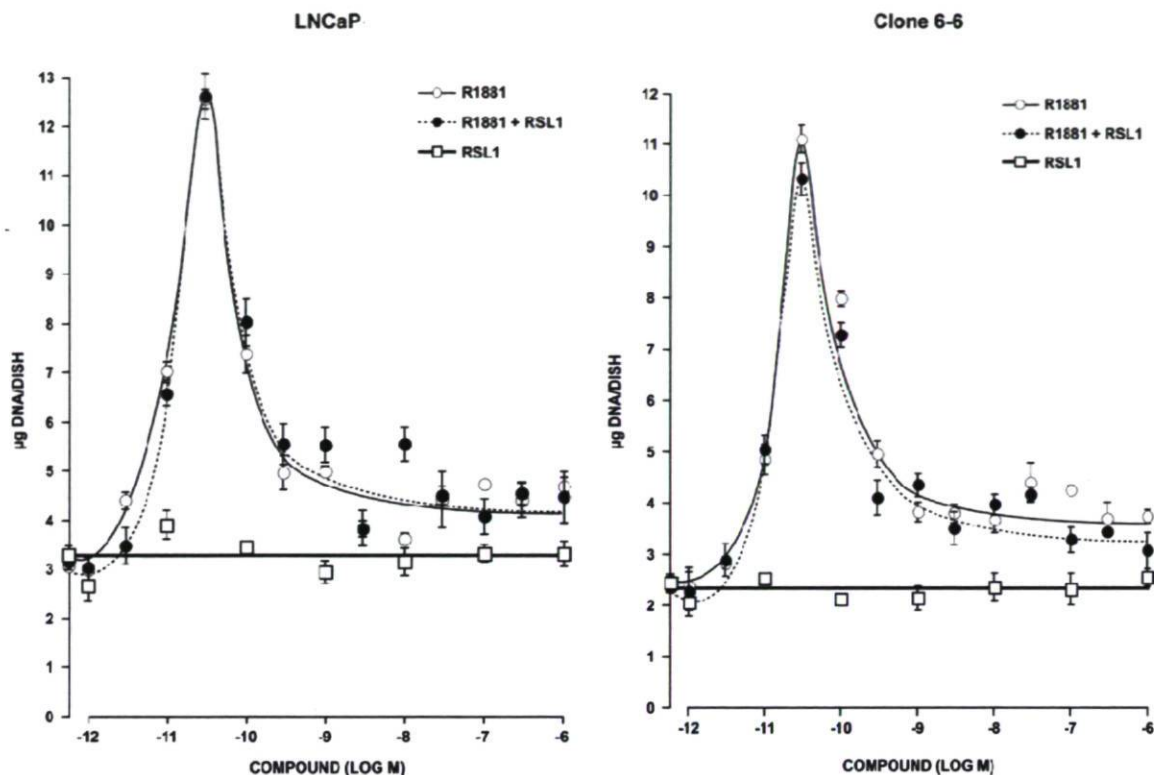


Figure 2.2: Androgen responsive growth of RheoSwitch cell lines. LNCaP human prostate cancer cells (A) and a stable clone of LNCaP cells (clone 6-6) expressing RheoSwitch transcription factors (B) were cultured for 7 days in the presence of 10^{-12} to 10^{-6} M of the androgen R1881 (open circles), 10^{-12} to 10^{-6} M RSL1 (open squares), or 10^{-12} to 10^{-6} M R1881, and 500 nMRSL1 (dark circles). Cell numbers were assessed by quantifying the DNA content of each well and the data were expressed as the mean \pm SEM of triplicate wells. The results presented here are representative of at least three independent experiments performed using some or all of the indicated concentrations of R1881 and/or RSL1.

2.5.3 Effect of RSL1 on endogenous gene expression

To determine if the RSL1-activated RheoSwitch heterodimer affects the expression of endogenous genes in LNCaP cells, we used high-density oligonucleotide microarrays to assess changes in mRNA levels induced by a 24-hr exposure to RSL1 (500 nM). RNA samples were prepared from duplicate cultures of control and RSL1-treated clone 6-6 cells and processed to probes which were then hybridized to Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarrays. Of more than 54,000 probe sets present on the array, only six probe

sets, mapping to four transcripts, detected statistically significant changes in mRNA abundance. These transcripts encode the transcriptional co-repressors HES1 and BCOR (variant 2), the transcription factor JUN, and SLC16A6, a small molecule transporter. The microarray used in this study contained 12 probe sets mapping to these four transcripts. Changes in mRNA abundance were detected by both SLC16A6 probe sets present on the array, 2 of 3 JUN probe sets, 1 of 4 BCOR probe sets (2 probe sets are specific for variant 1), and 1 of 3 HES1 probe sets (Table 2.2). RSL1-induced increases in HES1, JUN and SLC16A6 mRNA levels were also detected in a separate microarray experiment (data not shown). However, the BCOR probe set did not detect a similar change, leading us to conclude that BCOR is not a target of RSL1 in prostate cells. To verify if HES1, JUN, and SLC16A6 were authentic targets of RSL1, Northern blot analyses were performed using polyA⁺ RNA isolated from clone 6-6 and two additional cell lines (clones 10-1 and 10-9) that were exposed to RSL1 (500 nM) or vehicle for 24 hr (Fig. 2.3). HES1 mRNA was detectable in all three cell lines in the absence of RSL1 but no consistent change in HES1 mRNA levels was observed following addition of RSL1. In contrast, JUN mRNA was up-regulated by RSL1 in all three cell lines. SLC16A6 mRNA levels were markedly up-regulated by RSL1 in two of the three cell lines and a slight increase was also observed in clone 10-1.

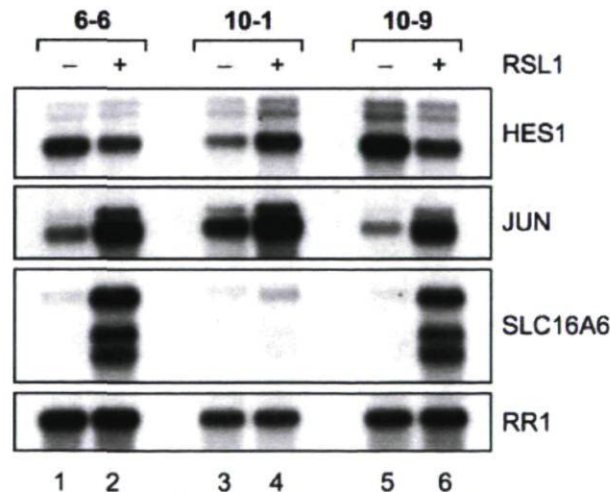


Figure 2.3: Validation of putative RSL1-responsive genes by Northern blot analysis. PolyA⁺ RNA samples (2 µg/lane) were prepared from clone 6-6, 10-1, and 10-9 cells that were exposed to 500 nM RSL1 (+) or vehicle (-) for 24 hr. Duplicate blots were hybridized to radiolabeled probes for HES1, JUN, or SLC16A6. Equal sample loading was confirmed using a probe that detects the RheoReceptor-1 (RR1) mRNA (bottom panel).

TABLE 2.2. MICROARRAY DATA

GENE SYMBOL	DESCRIPTION AND REFERENCE SEQUENCE	PROBE SET DESCRIPTOR ^A	CTL ARRAY ^B			RSL1 ARRAY ^B			FC ^C	P
			A	B	AV G	A	B	AV		
BCOR	BCL6 CO-REPRESSOR	219433_AT _D	67	96	82	167	118	143	1.7	1.00
	VARIANT 1: NM_01774 ₅	219433_AT _D	36	45	41	84	64	74	1.8	1.00
	VARIANT 2: NM_02092 ₆	223566_AT _D	75	73	74	249	247	248	3.4	0.03
		223916_S_AT	14	15	15	27	19	23	1.5	1.00
HES1	HAIRY AND ENHANCER OF SPLIT 1	203393_AT	35	26	31	28	45	37	1.2	1.00
	NM_00552 ₄	203394_S_AT	32	41	37	144	156	150	4.1	0.04
		203395_AT	46	69	58	253	207	230	4.0	0.18
JUN	V-JUN SARCOMA VIRUS 17	201464_X_AT	173	178	176	731	741	736	4.2	0.02
	ONCOGENE HOMOLOG	201465_S_AT	61	85	73	251	271	261	3.6	0.11
	NM_00222 ₈	201466_S_AT	41	50	46	360	319	340	4.0	0.02
SLC16A6	SOLUTE CARRIER FAMILY 16	207038_AT	68	81	75	500	398	449	6.0	0.02
	MEMBER 6 NM_00469 ₄	230748_AT	196	259	228	1226	1085	1156	5.1	0.03

a Includes all the probe-sets present on the HG U133 Plus 2.0 array that detect BCOR, HES1, JUN or SLC16A6 transcripts.

b Normalized intensity.

c Fold change=Average normalized intensity RSL1/Average normalized intensity control.

d This probe set is specific for variant 1.

2.5.4 Development of a single vector format

Like most conditional expression systems, the RheoSwitch system consists of two plasmids, one that encodes the RheoSwitch transcription factors and one that contains the RSL1-inducible gene construct. While designing pZRD we were careful to minimize the size of the plasmid so that it could eventually accommodate the addition of one or more RSL1-responsive expression cassettes. The development of such a single-vector format appeared desirable because it would allow one to generate stable cell lines in a single transfection. An additional advantage of such a vector was that it could enable one to more easily generate cell lines that conditionally produce multiple proteins from one or more plasmids. To test the feasibility of this single-vector system we assembled an RSL1-responsive expression cassette encoding a truncated form of the AIBZIP protein. The transcription of the 305-residue open reading frame was placed under the control of a minimal promoter containing six GAL4 binding sites and the adenovirus E1b TATA box. The cassette also contains a synthetic intron to enhance mRNA stability (Fig. 2.1). A single copy of the AIBZIP cassette was inserted into the Age I site of pZRD in the clockwise, or counter-clockwise, orientation. The resulting plasmids were then transiently transfected into LNCaP cells and the levels of recombinant AIBZIP were evaluated by immunoblotting using an antibody raised against an internal epitope of the protein. Essentially no recombinant protein was detected in the absence of RSL1 whereas addition of RSL1 produced a robust increase in the amount of protein (Fig. 2.4A). Similar inductions were obtained with both plasmids, indicating that the induction was independent of the cassette's orientation with respect to other elements of pZRD. To determine if pZRD could potentially accommodate two cassettes, identical cassettes were inserted into the Age I and Asc I sites of pZRD. As shown in Figure 2.4B, the plasmid with two cassettes produced approximately twice as much AIBZIP as the plasmid with a single cassette. Again, no recombinant protein was detected in the absence of RSL1, indicating that inducible cassettes cloned into the Age I and Asc I sites of pZRD are well shielded from other regulatory elements of pZRD.

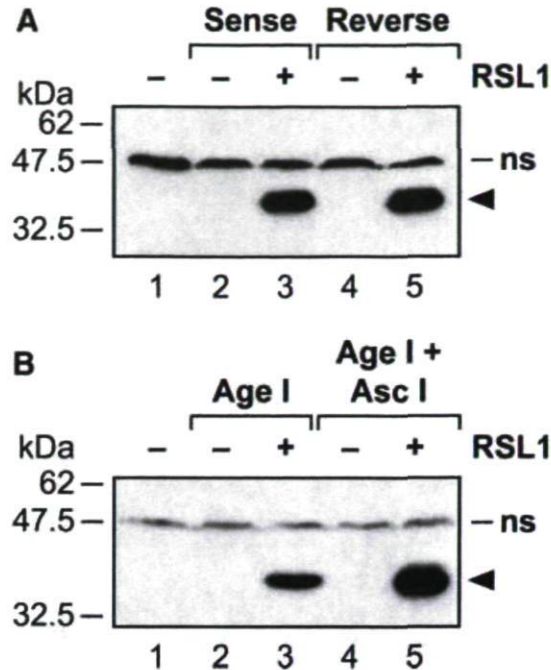


Figure 2.4 : RSL1-dependent production of recombinant proteins from pZRD plasmids containing RSL1-responsive expression cassettes. A: LNCaP cells were transiently transfected with pZRD plasmids containing an RSL1-responsive expression cassette in the clock wise (sense) or counter-clock wise (reverse) orientation. B: LNCaP cells were transiently transfected with pZRD plasmids containing one (AgeI) or two (Age I + Asc I) identical cassettes. The cells were exposed to RSL1 (500 nM) or vehicle for 48 hr. Equal amounts of whole-cell extracts were fractionated by SDS-PAGE and incubated with a polyclonal antibody raised against an internal epitope of the recombinant protein. The first lane of each blot contains an extract of untransfected LNCaP cells. The recombinant protein is indicated by an arrowhead and a cross-reacting polypeptide is labeled “ns” (non-specific). The blots were exposed to film for 60 (A) or 30 (B) sec.

2.5.5 RSL1-dependant regulation of stably integrated expression cassettes

To characterize the regulation of a stably integrated RSL1-responsive gene construct, we transfected LNCaP cells with plasmid pZR395. This derivative of pZRD contains a RSL1-responsive expression cassette that encodes the 395-residue human AIBZIP protein with amino-terminal FLAG and carboxy-terminal HA epitopes. Fifty-four Zeocin-resistant hrGFP-positive clones were isolated and 20 of these clones (37%) displayed RSL1-dependent activation of a transiently transfected mRFP1 reporter

construct. Approximately half of the 20 clones produced appreciable levels of recombinant AIBZIP and three of these (8-8, 8-27, and 8-28) were selected to characterize RSL1-regulated expression in greater detail. To compare the relative abundance of the endogenous and recombinant AIBZIP proteins we used an antibody raised against human AIBZIP [19]. As shown in Figure 2.5A, the amount of endogenous AIBZIP in stable cell lines was similar to that of parental LNCaP cells. Importantly, the recombinant AIBZIP protein was not detected in the absence of RSL1. Although some high molecular weight forms of AIBZIP are visible in untreated clones, these correspond to glycosylated forms of endogenous AIBZIP as we and others have demonstrated that AIBZIP, which localizes to the endoplasmic reticulum, is glycosylated [26]. In fact, the absence of recombinant AIBZIP in control cells was confirmed using an anti-HA antibody (lanes 8 and 9). We first assessed the time course of AIBZIP production using a known effective concentration of RSL1 (500 nM) as recommended by the manufacturer. In all three clones, recombinant AIBZIP was detected at the earliest time point examined (2 hr) following the addition of RSL1 (Fig. 5A). In clone 27, the amount of recombinant AIBZIP equaled that of endogenous AIBZIP following a 2-hr exposure to RSL1. Slightly longer exposures to RSL1 (4-8 hr) were required to observe similar increases (with respect to endogenous AIBZIP) in clones 8 and 28. We then assessed the effects of a range of concentrations of RSL1 (10-500 nM) on the levels of recombinant AIBZIP following a 4-hr exposure to RSL1. A dose-related increase in the amount of recombinant AIBZIP was observed in all three cell lines (Fig. 2.5B). A 50 nM dose of RSL1 was sufficient to double the total amount of AIBZIP present in clones 8 and 27 whereas 250 nM was required to achieve the same effect in clone 28.

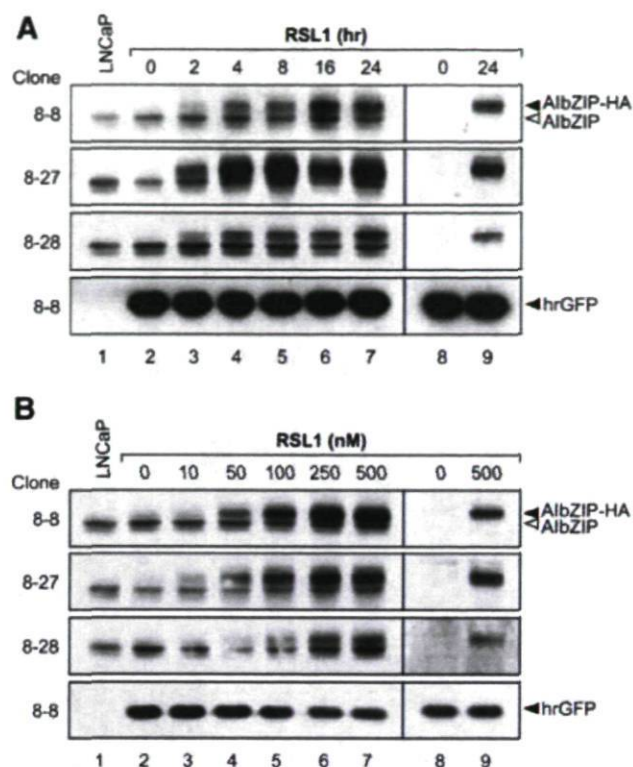


Figure 2.5: RSL1-regulated production of recombinant AIBZIP in stable cell lines. Clones 8-8, 8-27, and 8-28 were generated by transfecting LNCaP cells with pZR395, a pZRD plasmid containing an RSL1-responsive expression cassette that encodes HA-tagged full-length AIBZIP. A: Cells were exposed to 500nM RSL1 for 2-24hr as indicated. Equal amounts of whole-cell extracts were analyzed by immunoblotting using antibodies against the carboxyterminus of AIBZIP (lanes 1-7) or the HA epitope (lanes 8-9). B: Cells were exposed to 10-500nM RSL1 for 4 hr as indicated and whole-cell extracts were analyzed by immunoblotting as described in (A). In panels A and B, clone numbers are indicated to the left of each blot and the positions of endogenous and recombinant AIBZIP are indicated by arrowheads to the right of the uppermost blot. Each panel also contains a representative immunoblot for hrGFP as a loading control. The first lane of each panel contains extracts from LNCaP cells.

2.6 Discussion

The characteristics of the stable cell lines that were generated using modified RheoSwitch vectors indicate that the RheoSwitch system satisfies the criteria required for

conditional gene expression in hormone-sensitive prostate cancer cells. RSL1-responsive promoters displayed no detectable activity in the absence of RSL1 and high levels of activity in the presence of RSL1. Importantly, RSL1 exerted minimal effects on cell proliferation and endogenous gene expression in LNCaP cells.

We used stable cell lines that support RSL1-dependent expression to quantify the effect of RSL1 on a transiently transfected luciferase reporter gene. These experiments showed that RSL1-responsive promoters are inactive in the absence of RSL1 and that RSL1 can regulate gene expression over a range of several orders of magnitude. Experiments performed in stable cell lines that conditionally produce recombinant AibZIP confirmed that target gene expression is tightly regulated by and dependent upon RSL1. In this case, essentially no recombinant AibZIP was detected in the absence of RSL1 whereas addition of RSL1 produced physiological levels of protein. The induction of recombinant AibZIP by RSL1 was both dose- and time-dependent, which indicates that the amount of recombinant protein that is produced can be adjusted by varying these parameters.

In the present study we used microarrays to assess the effects of RSL1 on gene expression. Although the arrays we used were not designed to detect all possible mRNA splice variants, they do provide a fairly comprehensive assessment of changes in gene expression. The cells were purposely harvested after a 24-hr exposure to RSL1 in order to capture as many changes as possible. While this design precluded the detection of transient early changes in gene expression, it would be expected to detect the consequences of these early events. The fact that only a small number of transcripts were up-regulated at 24 hr signifies that few, if any, biologically significant changes were missed by harvesting cells at 24 hr.

Analysis of the microarray data indicated that only six probe sets (mapping to four transcripts) detected statistically significant changes in mRNA levels. Based on data obtained in a separate study, five of these probe sets (three transcripts) were considered reliable. For comparison, approximately 2,500 probe sets detected statistically significant changes in mRNA abundance in a different RSL1-responsive stable cell line that

conditionally produces a transcription factor (that cell line was also exposed to RSL1 for 24 hr; data not shown). These results confirm that RSL1-activated RheoSwitch transcription factors exert minimal effects on endogenous gene expression, at least in LNCaP cells. Subsequent validation of the microarray data was performed by hybridizing radiolabeled cDNA probes to immobilized RNA. This analysis revealed that only two of the three transcripts, JUN and SLC16A6, were appreciably up-regulated by RSL1. JUN and SLC16A6 were not up-regulated by RSL1 in LNCaP cells that do not produce RheoSwitch transcription factors (data not shown), which signifies that these effects were mediated by RSL1-activated RheoSwitch transcription factors rather than by RSL1 itself.

One of the initial objectives we pursued in modifying pNEBR-R1 was to facilitate the isolation and subsequent monitoring of stably transfected cells by enabling the plasmid to constitutively produce a fluorescent protein. We chose hrGFP for this purpose because it is well tolerated and has been reported to produce fewer changes in endogenous gene expression compared to other fluorescent proteins [27]. While we did not examine the effects of hrGFP itself on LNCaP cell function, the behavior of clones that constitutively produced hrGFP and RheoSwitch transcription factors was indistinguishable from that of control LNCaP cells. At any rate, should the constitutive expression of hrGFP be undesirable for a given application, the hrGFP-producing cassette can be easily excised from pZRD. Alternatively, hrGFP expression could be controlled by an RSL1-responsive promoter. This would permit one to identify clones that support RSL1-dependent expression while restricting hrGFP expression to experimental periods.

We constructed a plasmid that contains all the elements required for RSL1-dependent conditional gene expression, including an RSL1-responsive expression cassette, an easily identifiable marker protein (hrGFP), and an antibiotic resistance gene (Zeocin) that can be used for selection in bacteria and mammalian cells. We anticipate that this vector could also serve to study protein function in vivo (e.g., tumour xenografts in nude mice) since RSL1 (RheoGene compound RG-102240) is absorbed following intraperitoneal administration [14]. The RSL1-responsive expression cassettes that were added to pZRD in the experiments described here did not contain unique restriction sites. We have since

produced modified vectors which contain conveniently placed sites that can be used to insert a desired DNA fragment in a directional manner. The single-vector RheoSwitch system should be applicable to a large number of proteins since the epitope-tagged protein produced by clone 8–27 is 418 residues in length, which is longer than approximately 63% of the 39,560 human proteins currently listed in the Reference Sequence Protein Database [28]. We have not yet tested longer open reading frames in this system.

We showed here that pZRD could support the conditional production of two proteins simultaneously, at least in transient transfection experiments. This feature could permit the co-expression of proteins that are implicated in complex biological processes. A potentially large number of proteins could be produced using multiple plasmids that encode different combinations of RSL1-responsive expression cassettes, selectable markers, and RheoSwitch transcription factors. While the experiments described here focused on the conditional production of proteins, it is conceivable that the RheoSwitch expression system could also be used to conditionally produce one or more short hairpin RNAs [29].

The capacity of pZRD to support multiple expression cassettes could also be exploited to further facilitate the production of stable cell lines. In our experience, stable transfection of pZRD or its derivatives yielded an appreciable number of clones that constitutively produced hrGFP but did not support RSL1-dependent transcription. To identify these clones we performed transient transfections using a plasmid containing an RSL1-responsivered fluorescent protein reporter gene. Ideally, one would like to eliminate undesirable clones as early as possible during the selection process. This could be achieved by developing pZRD-like vectors that co-express a gene of interest along with a protein that can be easily detected, such as a fluorescent protein (as alluded to previously) or a luciferase.

2.7 Conclusion

To summarize, constitutively expressed RheoSwitch transcription factors enable RSL1-dependent gene expression and exert minimal effects on endogenous gene expression and cell proliferation in LNCaP cells. The favorable characteristics of the RheoSwitch system in LNCaP cells suggest that it could also be useful in other cell lines. In addition, the single-vector format described here should facilitate the establishment of cell lines required to study the role of proteins implicated in prostate cancer in both cell and animal models of the disease.

2.8 Acknowledgments

This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP- 53139) to CL, a CIHR training grant (STP-53894) to JL and SbA, and by a salary award from Le Fonds de la Recherche en Santé du Québec to CL. Funding for the microarray facility was provided by Génome Québec and Genome Canada. The authors are grateful to Roger Tsien for graciously providing them RFP1 cDNA and to France Couture and her team for art work.

2.9 References

1. Wu Z, Conaway M, Gioeli D, Weber MJ, Theodorescu D. Conditional expression of PTEN alters the androgen responsiveness of prostate cancer cells. *Prostate* 2006;66:1114–1123
2. Nakagawa S, Massie B, Hawley RG. Tetracycline-regulatable adenovirus vectors: Pharmacologic properties and clinical potential. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:53–60
3. Rubinchik S, Wang D, Yu H, Fan F, Luo M, Norris JS, Dong JY. A complex adenovirus vector that delivers FASL-GFP with combined prostate-specific and tetracycline-regulated

expression. *Mol Ther* 2001;4:416–426

4. Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5547–5551.
5. No D, Yao TP, Evans RM. Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:3346–3351.
6. Wang Y, O'Malley BW Jr, Tsai SY, O'Malley BW. A regulatory system for use in gene transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8180–8184.
7. Gschwend JE, Fair WR, Powell CT. Evaluation of the tetracycline-repressible transactivator system for inducible gene expression in human prostate cancer cell lines. *Prostate* 1997; 33:166–176.
8. Baron U, Gossen M, Bujard H. Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: Novel transactivators with graded transactivation potential. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2723–2729.
9. Lin MF, Kawachi MH, Stallcup MR, Grunberg SM, Lin FF. Growth inhibition of androgen-insensitive human prostate carcinoma cells by a 19-norsteroid derivative agent, mifepristone. *Prostate* 1995; 26:194–204.
10. Fife RS, Sledge GW Jr, Roth BJ, Proctor C. Effects of doxycycline on human prostate cancer cells in vitro. *Cancer Lett* 1998; 127:37–41.
11. Palli SR, Kapitskaya MZ, Kumar MB, Cress DE. Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur J Biochem* 2003; 270:1308–1315.
12. Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM. Functional ecdysone receptor is the product of EcR and ultraspiracle genes. *Nature* 1993; 366:476–479.
13. Dhadialla TS, Carlson GR, Le DP. New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *AnnuRev Entomol* 1998; 43:545–569.
14. Kumar MB, Potter DW, Hormann RE, Edwards A, Tice CM, Smith HC, Dipietro MA, Polley M, Lawless M, Wolohan PR, Kethidi DR, Palli SR. Highly flexible ligand binding pocket of ecdysone receptor: A single amino acid change leads to discrimination between two groups of nonsteroidal ecdysone agonists. *J Biol Chem* 2004; 279:27211–27218.

15. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP. LNCaP model of human prostatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 1983; 43:1809–1818.
16. Fiszler-Szafarz B, Szafarz D, Guevara de Murillo A. A general, fast, and sensitive micromethod for DNA determination application to rat and mouse liver, rat hepatoma, human leukocytes, chicken fibroblasts, and yeast cells. *Anal Biochem* 1981; 110:165–170.
17. Lapointe J, Lachance Y, Labrie Y, Labrie C. A p18 mutant defective in CDK6 binding in human breast cancer cells. *Cancer Res* 1996; 56:4586–4589.
18. Campbell RE, Tour O, Palmer AE, Steinbach PA, Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:7877–7882.
19. Qi H, Fillion C, Labrie Y, Grenier J, Fournier A, Berger L, El-Alfy M, Labrie C. AlbZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 2002; 62:721–733.
20. Gautier L, Cope L, Bolstad BM, Irizarry RA. Affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinformatics* 2004; 20:307–315.
21. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; 4:249–264.
22. Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004;3: Article 3.
23. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* 2001; 125:279–284.
24. Wettenhall JM, Simpson KM, Satterley K, Smyth GK. Affylm- GUI: A graphical user interface for linear modeling of single channel microarray data. *Bioinformatics* 2006; 22:897–899.
25. De Launoit Y, Veilleux R, Dufour M, Simard J, Labrie F. Characteristics of the biphasic action of androgens and of the potent antiproliferative effects of the new pure antiestrogen EM-139 on cell cycle kinetic parameters in LNCaP human prostatic cancer cells. *Cancer Res* 1991; 51:5165–5170.

26. El-Alfy M, Azzi L, Lessard J, Lavergne E, Pelletier M, Labrie C. Stage-specific expression of the Atce1/Tisp40alpha isoform of CREB3L4 in mouse spermatids. *J Androl* 2006; 27:686–694.
27. Stratagene. *Strategies* 2001; 14(3):86–87.
28. Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): A curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: D501–D504.
29. Zhou H, Xia XG, Xu Z. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res* 2005; 33:e62

Chapitre 3: Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AibZIP/CREB3L4 in prostate cells

Sonia Ben Aicha, Julie Lessard, Méliissa Pelletier, Andréa Fournier, Ezequiel Calvo, Claude Labrie.

Physiological Genomics 2007, 31(2), 295-305.
(article utilisé avec permission)

3.1 Résumé

Il sera question, dans ce chapitre, du clivage d'AibZIP et de ses cibles transcriptionnelles identifiées par micropuces Affymetrix. Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication dans la revue **Physiological Genomics** sous le titre « *Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AibZIP/CREB3L4 in prostate cells* ». Ma contribution à cet article a été de démontrer qu'AibZIP pouvait être clivé par certains agents qui affectent les concentrations calciques au RE. J'ai aussi collaboré avec l'auteure principale, Sonia Ben Aicha, à la réalisation et à la validation des résultats des puces Affymetrix, en plus d'avoir réalisé les clones stables inductibles qui permettent la production des facteurs RheoSwitch avec ou sans la cassette d'expression inductible codant pour la forme nucléaire d'AibZIP utilisés lors des expériences de micropuces à ADN. Ci-dessous se trouve la traduction du résumé de l'article publié sur les banques de données scientifiques :

La protéine régulée par les androgènes Androgen-Induced bZIP (AibZIP) est un facteur de transcription bZIP qui est localisé dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Le rôle physiologique d'AibZIP est inconnu, mais d'autres facteurs de transcription liés à la membrane du RE, tel qu'ATF6 et SREBP, jouent un rôle crucial dans la régulation des protéines en formation et dans la synthèse des lipides, respectivement. En réponse à des altérations du milieu intracellulaire, ATF6 et SREBP sont clivés par le mécanisme de régulation de protéolyse intramembranaire. Chez l'humain, l'ARNm d'AibZIP est exprimé dans plusieurs organes tels que le pancréas, le foie et les

gonades, mais est particulièrement abondant dans les cellules épithéliales de la prostate. Nous avons utilisé les cellules humaines de cancer de la prostate, les LNCaP, comme modèle pour identifier des stimuli qui causent l'activation d'AibZIP et pour déterminer les cibles transcriptionnelles de ce facteur. Dans les cellules LNCaP, AibZIP est clivé en sa forme transcriptionnellement active par des agents qui diminuent les concentrations calciques au RE (A23187, caféine), mais n'est pas affecté par un inhibiteur de la glycosylation protéique (tunicamycine). Pour identifier les transcrits régulés par AibZIP, nous avons généré des lignées de cellules LNCaP qui expriment conditionnellement la forme nucléaire d'AibZIP et nous avons utilisé des micropuces Affymetrix pour identifier les transcrits régulés par AibZIP. Les gènes sélectionnés (n=48) ont été validés par hybridation de type Northern. Les résultats révèlent que les cibles d'AibZIP incluent des gènes impliqués dans la production protéique (BAG3, DNAJC12, KDELR3). Une grande quantité de transcrits codent pour des protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle, dans la transduction de signaux et dans le métabolisme et des petites protéines de transport. Ces résultats suggèrent qu'AibZIP joue un rôle dans l'homéostasie cellulaire.

3.2 Abstract

The androgen-regulated protein androgen-induced bZIP (AibZIP) is a bZIP transcription factor that localizes to the membrane of the endoplasmic reticulum (ER). The physiological role of AibZIP is unknown, but other ER-bound transcription factors such as ATF6 and SREBPs play a crucial role in the regulation of protein processing and lipid synthesis, respectively. In response to alterations in the intracellular milieu, ATF6 and SREBPs are processed to their transcriptionally active forms by regulated intramembrane proteolysis. In humans, AibZIP mRNA is expressed in several organs including the pancreas, liver, and gonads, but it is especially abundant in prostate epithelial cells. We therefore used LNCaP human prostate cancer cells as a model to identify stimuli that lead to AibZIP activation and define the transcriptional targets of AibZIP. In LNCaP cells, AibZIP was processed to its transcriptionally active form by drugs that deplete ER calcium

stores (i.e., A23187 and caffeine), but it was unaffected by an inhibitor of protein glycosylation (tunicamycin). To identify AlbZIP regulated genes, we generated LNCaP cell lines that conditionally express the processed form of AlbZIP and used Affymetrix microarrays to screen for AlbZIP-regulated transcripts. Selected genes (n=48) were validated by Northern blot hybridization. The results reveal that the downstream targets of AlbZIP include genes that are implicated in protein processing (e.g., BAG3, DNAJC12, KDELR3). Strikingly, a large number of AlbZIP-regulated transcripts encode proteins that are involved in transcriptional regulation, small molecule transport, signal transduction, and metabolism. These results suggest that AlbZIP plays a novel role in cell homeostasis.

3.3 Introduction

In recent years, transcription factors that localize to the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) have emerged as important players in the regulation of homeostasis. The first such transcription factors to be characterized were the sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs), helix-loop-helix proteins that activate the expression of genes that function in cholesterol and fatty acid biosynthesis (2). Pioneering work led to the discovery that intracellular lipids, signalling through SREBP-associated proteins in the ER membrane, regulate the localization and activity of SREBPs. In cells with low lipid concentrations, the transcription factor translocates to the Golgi apparatus, where it is processed by two proteases designated S1P and S2P. Together, these proteases separate the amino-terminal portion of SREBP, which contains the domains required for transcriptional activity, from its membrane-bound carboxy-terminal portion, thereby allowing the former to travel to the nucleus to activate gene expression. The process whereby membrane-bound transcription factors are activated by proteolysis is referred to as regulated intramembrane proteolysis (RIP) (27).

One of the major functions of the ER is the folding and posttranslational modification of secreted and integral membrane proteins (5). The ER's ability to correctly process proteins is extremely sensitive to alterations in the intracellular environment. For example, protein processing requires adequate supplies of glucose, ATP, and calcium, such

that deficiencies in any of these molecules can lead to the accumulation and aggregation of misfolded proteins in the ER lumen. The unfolded protein response (UPR) is a complex adaptive response that serves to prevent or reverse the accumulation of misfolded proteins by repressing protein biosynthesis and augmenting the protein-processing capacity of the ER (33). One of the key components of this response is ATF6 (activating transcription factor 6), a bZIP transcription factor that regulates the expression of ER chaperones. ATF6 is inserted in the ER membrane as a type II transmembrane protein such that its amino-terminal transcription factor domain resides in the cytoplasm, whereas its carboxy-terminal regulatory domain lies within the ER lumen. In a manner akin to SREBP, ATF6 is retained in the ER membrane by a protein that interacts with its regulatory domain, in this case the chaperone BiP/GRP78/HSPA5 (IgG heavy chain-binding protein; glucose-regulated protein, 78 kDa; heat shock 70 kDa protein 5). When misfolded proteins accumulate in the ER, BiP dissociates from ATF6, and ATF6 is transported to the Golgi apparatus where it is processed by the same proteases that process SREBP.

More recent work revealed that ATF6 is not the sole ER associated bZIP transcription factor. The cAMP responsive element-binding protein-3 (CREB3) subfamily of bZIP proteins consists of five transcription factors that share the same domain structure as ATF6 and are also inserted in the ER membrane as type II transmembrane proteins (9, 20, 22, 23, 25, 32). The existence of multiple ER-associated bZIP proteins raises several important questions regarding their respective roles in cell physiology. While these proteins may serve partially redundant functions, it is conceivable that they could regulate unique subsets of genes in response to diverse physiological stimuli. Indeed, although the tissue distribution patterns of human CREB3 (LZIP/Luman) and the CREB3-like proteins OASIS, BBF2H7, CREBH, and A1bZIP partially overlap, there are some important differences. For instance, CREBH is exclusively expressed in hepatocytes, whereas A1bZIP is most highly expressed in prostate.

Experimentally, the UPR can be triggered by pharmacological compounds that interfere with different aspects of protein processing. Drugs that deplete ER calcium stores, such as thapsigargin, or that inhibit protein glycosylation, such as tunicamycin, have proven

useful tools to probe the role of CREB3-related proteins in the UPR. These experiments have confirmed that CREB3-related proteins can be processed to their transcriptionally active forms in cells in which protein processing has been compromised (14, 15, 26, 31, 34). Moreover, it appears that one of these proteins (OASIS) cooperates with ATF6 in upregulating BiP expression in astrocytes (14). However, although these data are consistent with a role for CREB3-related proteins in the UPR, they do not exclude their implication in other biological pathways.

An alternative approach to defining the role of CREB3 proteins is to identify their transcriptional targets. A major advantage of this approach is that it does not require the use of drugs that profoundly disturb cell function. Having identified genes that are regulated by these transcription factors, one can then work backward to define the physiological context in which said genes might be upregulated. At present, the transcriptional targets of CREB3-related transcription factors are not well defined. Nevertheless, the few published attempts to identify these targets have proven to be quite enlightening. In mice, for instance, CREBH knockdown by short interfering RNA (siRNA) significantly reduced the expression of mRNAs that encode C-reactive protein (CRP) and serum amyloid P-component (SAP), thereby revealing an unsuspected link between CREBH and the acute phase response (34). Using cDNA microarrays, Liang et al. (19) discovered that CREB3 induces transcription of *HERPUD1*, an ER protein that is involved in the degradation of misfolded proteins.

Our laboratory is interested in androgen-induced bZIP (A1bZIP), an androgen-regulated bZIP protein that is most highly expressed in the luminal cells of the prostatic glandular epithelium (25). The primary function of these cells is to produce components of the seminal fluid that enable spermatozoa to fertilize ova. Thus the presence of high amounts of A1bZIP in luminal prostate cells suggests a link between A1bZIP and the secretory function of these cells. It is also important to consider that A1bZIP is overexpressed in prostate tumors (17, 25, 29), which suggests that some of the downstream targets of A1bZIP might contribute to prostate cancer cell survival. In humans, A1bZIP mRNA is also expressed, albeit at lower levels, in other organs such as the pancreas, liver,

testis, ovary, kidney, and placenta, but the specific cell types that express AlbZIP have yet to be determined (6).

In an effort to clarify the role of AlbZIP in prostate cells, we first used a pharmacological approach to confirm that AlbZIP can be processed by RIP in LNCaP cells. We then used a genome-wide approach to identify AlbZIP-regulated genes in LNCaP cells. Interestingly, although some transcriptional targets of AlbZIP are implicated in protein processing, most of the genes that we identified are involved in other aspects of cell function, including transcriptional regulation, small molecule transport, signal transduction, and metabolism.

3.4 MATERIALS AND METHODS

3.4.1 Cell Culture and Treatments

The culture conditions for LNCaP cells and derived stable cell lines have been described previously (16). A23187, brefeldin A, caffeine, thapsigargin, and tunicamycin were purchased from Sigma-Aldrich (St.Louis, MO). RSL1 was purchased from New England Biolabs (Ipswich, MA), and Zeocin was obtained from Invitrogen (Carlsbad, CA).

3.4.2 Cell Lines That Conditionally Produce the Processed Form of AlbZIP

The plasmid used to generate cell lines that support RSL1-dependent expression has been described in detail elsewhere (16). Clone 6-6 was obtained by transfecting LNCaP cells with a plasmid (pZRD) that constitutively produces the RheoSwitch transcription factors, the green fluorescent protein hrGFP, and the Zeocin resistance gene (16). Cell lines that conditionally produce a recombinant form of nuclear AlbZIP (A290HA) were obtained by transfecting LNCaP cells with plasmid pZR290. pZR290 was derived from pZRD by adding an RSL1-responsive cassette that controls the production of the first 290 amino acids of AlbZIP (GenBank accession no. NP_570968) fused to the linker sequence SRGP and a carboxy-terminal HA epitope (YPYDVPDYASL).

3.4.3 Nuclear Extracts

Nuclear extracts were prepared as described previously (26, 28) with slight modifications. The cells were rinsed with ice-cold PBS two to three times, harvested, and centrifuged at 800 *g* for 10 min at 4°C. After centrifugation, the cell pellets were suspended in five packed cell volumes of hypotonic buffer (*buffer H*) and left on ice for 30 min. They were then passed through a 27.5-gauge needle 30 times and centrifuged at 1,000 *g* for 10 min at 4°C. The 1,000 *g* pellet was resuspended in one volume of extraction buffer (*buffer E*), rotated for 60 min at 4°C, and centrifuged at 30,000 *g* for 30 min at 4°C. The supernatant from this spin was used as the nuclear extract. *Buffer H* contained 10 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0.5 mM DTT, and a cocktail of protease inhibitors (Complete, Mini, Roche). *Buffer E* contained 20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 25% glycerol, and 0.5 M NaCl and the same concentrations of MgCl₂, EDTA, EGTA, DTT, and protease inhibitors as in *buffer H*.

3.4.4 Immunoblotting

The full-length AIBZIP protein was detected using an affinity purified rabbit polyclonal antibody (AB150) raised against a carboxyterminal peptide of AIBZIP (25). The endogenous and recombinant forms of nuclear AIBZIP were detected using an affinity-purified rabbit polyclonal antibody (AB515) that was raised against a peptide of mouse AIBZIP (LPSHLPLTKAEERILKK) which is nearly identical (16 of 17 residues) to residues 204–220 of human AIBZIP. Primary antibodies against B23 (C-19) and BiP (H-129) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Peroxidase-conjugated secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA), and the antigen-antibody complexes were revealed using a chemiluminescent detection system (Pierce, Rockford, IL).

3.4.5 RNA Interference

The Kill-1 siRNA used to silence AlbZIP expression was purchased from Qiagen (Valencia, CA). Kill-1 targets codons 335-341 of the AlbZIP coding sequence (GenBank accession no. NM_130898). The siRNA duplex consists of the sense strand r(GAAUAUCCUGACCCACAA) dTdT and the antisense strand r(UUGUGGGUCAGGAUUAUUC) dTdG. Transfections were performed by mixing the siRNA and the RNAiFect transfection reagent in a 1:6 ratio.

3.4.6 Microarray Experiment and Data Analysis

Clone 7-11 cells (passage 42) were plated in 24 10-cm culture dishes. Sixteen dishes were cultured in medium containing RSL1 (500 nM), and eight dishes were cultured in medium containing an equivalent amount of the RSL1 vehicle (DMSO). Eight RSL1-treated dishes were harvested 6 h after addition of RSL1, and another eight dishes were harvested 24 h after addition of RSL1. At each time point, the dishes were pooled two by two to yield a total of 12 individual samples, i.e., 4 controls, 4 exposed to RSL1 for 6 h, and 4 exposed to RSL1 for 24 h. One sample of each group was processed to nuclear extracts to assess the levels of recombinant AlbZIP by immunoblotting. The three other samples of each group were processed separately to cRNA probes that were then hybridized to Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 arrays (batch nos. 4003850 and 4003847). The details of the microarray hybridization and the statistical methods used to identify differentially expressed genes were described previously (16). The data discussed in this publication have been deposited in the National Center for Biotechnology Information Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) and are accessible through GEO series accession number GSE7223 (1). The two-dimensional cluster map was constructed using the standard correlation similarity algorithm of GeneSpring 7.3. Ontology analyses of the genes that were modulated in RSL1-treated cells at 24 h were performed by uploading the corresponding probe sets to the web-based application database for annotation, visualization, and integrated discovery (DAVID) (7). For each data set (1,086 upregulated genes and 852 downregulated genes), two lists were generated using the default parameters of DAVID (Supplemental Tables 3.1–3.4; supplemental data are available at the online version of this article). The “functional annotation chart” highlights

the most relevant Gene Ontology (GO) terms associated with each gene list, whereas “functional annotation clustering” classifies highly related genes into functionally related groups.

3.4.7 Probes for Northern Blot Analysis

The portions of transcripts corresponding to potential AibZIP responsive genes were amplified by RT-PCR from LNCaP cells and subcloned into plasmid pCR2.1 (Invitrogen). The sequences of the resulting plasmids were verified using an automated sequencer. The amplified fragments or portions thereof were excised from pCR2.1 by digestion (usually with EcoRI). The precise coordinates of each probe are available on request.

3.4.8 Candidate Gene Validation

Most of the Northern blots presented herein were performed using RNA isolated from clone 7-11 cells (passage nos. 46-51) that were exposed to 500 nM RSL1 (for 6 or 24 h), 2 μ M A23187 (for 24 h), or vehicle. mRNA was purified from total RNA using the PolyAtract system (Promega, Madison, WI). Some experiments were also performed using total RNA isolated from clones 6-6, 7-8, 7-11, 7-12, and 7-30, which were exposed to RSL1 (500 nM) or vehicle for 24 h. Total RNA (20 μ g) or polyA⁺ RNA (2 μ g) samples were fractionated on 1% agarose-formaldehyde gels, transferred to nylon membranes, and hybridized to radiolabeled cDNA probes as described (16). Following hybridization with the candidate cDNA probe, selected blots were rehybridized (without stripping) with a radiolabeled cDNA probe that detects the constitutively expressed RheoReceptor-1 mRNA. Following autoradiography, the images were captured using a digital camera and imported into PhotoShop (Adobe, San Jose, CA). The images were not altered unless the background was very high, in which case the image contrast was adjusted accordingly.

3.5 RESULTS

3.5.1 A**I**bZIP is a Substrate for Golgi Proteases

The hydrophobic and regulatory domains of human A**I**bZIP contain putative recognition sites for the Golgi proteases S1P and S2P, and previous studies showed that transiently produced recombinant human and mouse A**I**bZIP proteins can be processed by RIP (21, 31). However, the processing of the endogenous A**I**bZIP protein has not been demonstrated. To determine whether A**I**bZIP is a substrate for S1P and S2P in prostate cells, we incubated LNCaP cells with brefeldin A, a compound that mimics RIP by causing Golgi tubules to fuse with the ER, thereby exposing ER-bound bZIP transcription factors to active S1P and S2P proteases (30). The unprocessed form of A**I**bZIP was detected using a polyclonal antibody raised against the regulatory domain of the protein (25). In whole cell extracts of LNCaP cells, this antibody detects three 47.5-kDa polypeptides that correspond to differentially glycosylated forms of A**I**bZIP (Fig. 3.1). In fact, human A**I**bZIP contains putative N-glycosylation sites, and we and others have established that mouse A**I**bZIP is glycosylated *in vivo* (8, 21). Treatment with brefeldin A (10 μ g/ml) caused a rapid decrease in the amount of unprocessed A**I**bZIP, which was reduced to nil within 4 h (Fig. 1A). These results are consistent with A**I**bZIP being a substrate for Golgi proteases.

3.5.2 Dysregulation of ER Calcium Stores Downregulates ER-Associated A**I**bZIP

We then sought to define physiological alterations that induce A**I**bZIP processing. Although the role of A**I**bZIP in the UPR is unproven, we reasoned that drugs that cause ER stress might lead to A**I**bZIP activation. Previous studies indicated that the processing of ER-bound transcription factors is usually accompanied by a discernible decrease in the amount of full length protein (11, 26). We therefore assessed the effects of various compounds on the levels of the full-length ER-bound A**I**bZIP protein. The compound tunicamycin, which causes ER stress by inhibiting N-glycosylation, has been shown to activate ATF6, CREB3, and OASIS (11, 14, 26). Tunicamycin (1 μ M) produced a robust increase in the levels of the ER chaperone BiP, consistent with UPR induction, but it did not produce a notable decrease in the total amount of A**I**bZIP protein (Fig. 3.1B).

Nevertheless, the relative abundance of the three AIBZIP polypeptides was transiently altered in tunicamycin-treated cells, which suggests that the drug interfered with AIBZIP glycosylation. Calcium is a versatile signaling molecule that is stored primarily in the ER, where it is also required by chaperones involved in protein folding (3). We therefore examined whether AIBZIP is affected by drugs that deplete ER Ca^{+2} stores. Thapsigargin inhibits Ca^{+2} uptake by the sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{+2} -ATPase, whereas A23187 is a Ca^{+2} ionophore that sequesters Ca^{+2} in the cytoplasm. Both thapsigargin (1 μM) and A23187 (2 μM) induced ER stress in LNCaP cells, as indicated by the increase in BiP levels (Fig. 1, C and D). In addition, both drugs caused a progressive decrease in the amount of unprocessed AIBZIP, which was completely eliminated by 42 h. Caffeine (10 mM), which stimulates calcium release from ER via ryanodine receptors, also downregulated AIBZIP (Fig. 3.1E). Caffeine produced a very slight increase in BiP protein levels.

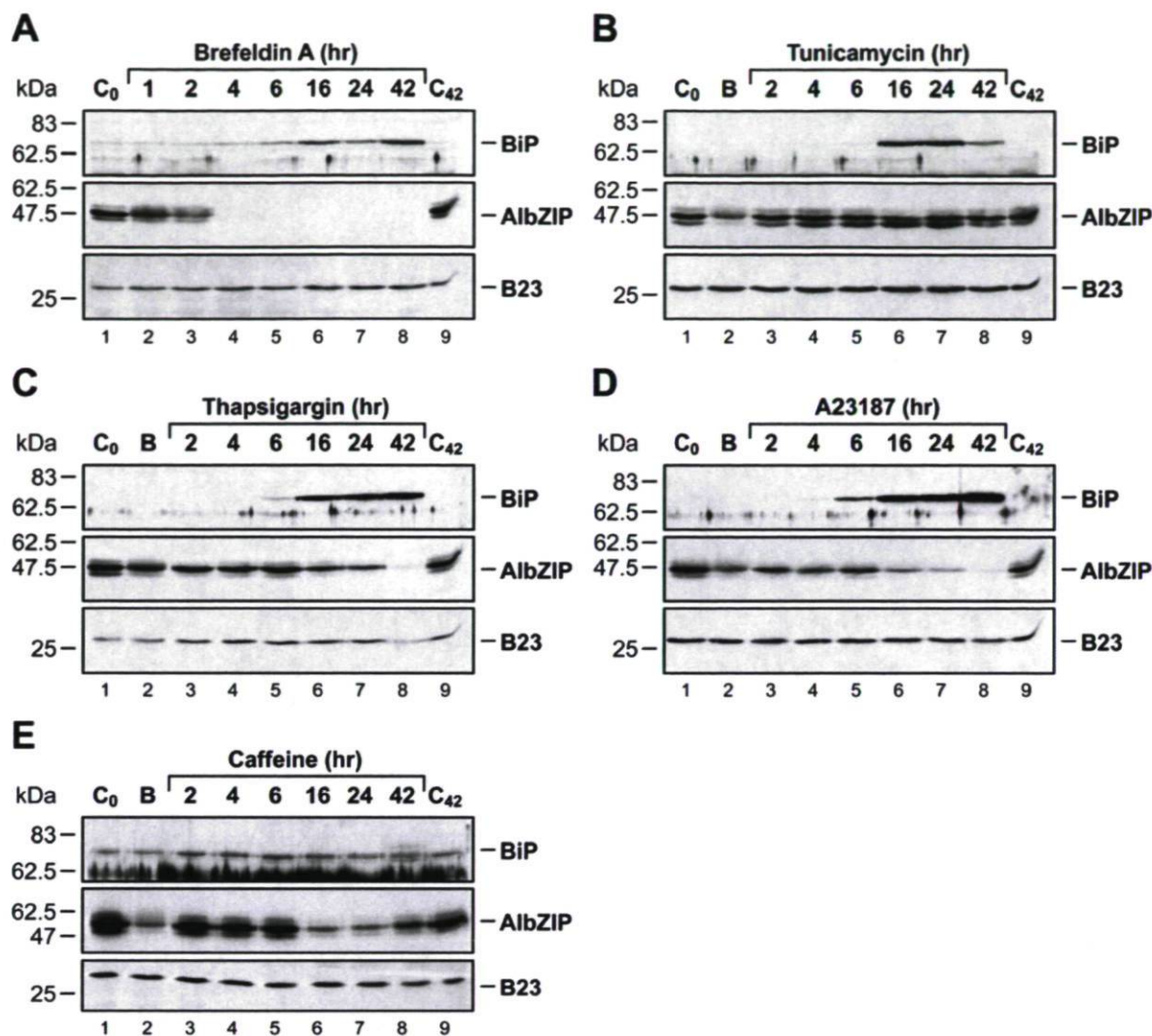


Figure 3.1: Effect of brefeldin A (1 $\mu\text{g/ml}$; *A*), tunicamycin (1 μM ; *B*), thapsigargin (1 μM ; *C*), A23187 (2 μM ; *D*), and caffeine (10 mM; *E*) on androgen-induced bZIP (AIBZIP) and BiP levels in LNCaP cells. Cells were incubated with the different compounds for 1–42 h as indicated. Extracts of control cells harvested at the start (C₀) and end (C₄₂) of each experiment were loaded in *lanes 1* and *9*, respectively, of each gel. *Lane 2* of *B*, *C*, *D*, and *E* contains extracts of cells exposed to brefeldin A for 2 h. The unprocessed form of AIBZIP was detected using AB150. The nuclear protein B23 served as a loading control.

3.5.3 AIBZIP is processed to its transcriptionally active form by drugs that alter ER calcium concentrations

The effects of A23187, thapsigargin, and caffeine on ER associated AIBZIP suggested that AIBZIP was processed by RIP, but we could not exclude the possibility that

this downregulation resulted from an effect on AIBZIP expression, translation, or protein stability. To verify that AIBZIP was indeed processed to its transcriptionally active form in stressed cells, we exposed LNCaP cells to stress-inducing drugs and analyzed nuclear extracts using a polyclonal antibody raised against the transcription factor domain of AIBZIP (Fig. 3. 2A).

As expected, brefeldin A induced the appearance of a 33-kDa polypeptide that was not detected in nuclear extracts of control cells (Fig. 3.2B, compare *lanes 3 and 4*). To verify that this polypeptide was derived from AIBZIP, we transfected LNCaP cells with Kill-1, an siRNA that targets the last coding exon of AIBZIP. Kill-1 reduced the amount of unprocessed AIBZIP by ~95% within 32 h (Fig. 3.2B, compare *lanes 1 and 2*). Depletion of AIBZIP before addition of brefeldin A prevented the appearance of the 33-kDa nuclear polypeptide (Fig. 3.2B, *lane 5*), thereby confirming that this polypeptide corresponds to the processed form of AIBZIP.

In preliminary experiments, we determined that the processed form of AIBZIP was detectable in nuclear extracts as early as 3 h following exposure to A23187 (data not shown). To compare the ability of stress-inducing drugs to induce AIBZIP processing, nuclear extracts were therefore prepared from cells exposed to the drugs for 3 h. Under these experimental conditions, A23187 was the most potent inducer of AIBZIP processing, and doses of A23187 ranging from 2 to 20 μ M produced similar levels of processed AIBZIP. Caffeine also induced AIBZIP processing, whereas a lesser amount of processed protein was observed in thapsigargin-treated cells, and no processed AIBZIP was observed in tunicamycin-treated cells. Overall, the experiments with ER stress-inducing drugs indicate that alterations in calcium homeostasis induce AIBZIP activation.



Figure 3.2: AibZIP is processed to its nuclear form during endoplasmic reticulum (ER) stress in LNCaP cells. *A:* schematic representation of AibZIP. The transcriptional activation (TAD), bZIP, and regulatory (Reg) domains are indicated. The sequence of the transmembrane segment [amino acids (aa) 297–313, depicted as a black rectangle] and the SIP recognition sequence (RNIL) are shown, as are the epitopes of antibodies 150 and 515. *B:* lanes 1 and 2 contain whole cell extracts (WCE), whereas lanes 3–12 contain nuclear extracts. Extracts of control cells (CTL) were loaded in lanes 1 and 3. The cells in lanes 4–12 were exposed to brefeldin A (BA; 1 μ g/ml) for 2 h or to A23187 (2–20 μ M), tunicamycin (Tu; 1 μ M), thapsigargin (Th; 1 μ M), or caffeine (Caf; 10 mM) for 3 h. The cells in lanes 2 and 5 were transfected with the Kill-1 siRNA (K) 32 h before harvest (lane 2) or 48 h before exposure to brefeldin A (lane 5). The processed form of AibZIP (prAibZIP) was detected using AB515. Some unprocessed AibZIP is present in nuclear extracts. B23 served as a loading control.

3.5.4 Microarray-Based Screening for AibZIP-Regulated Transcripts

To begin to understand the biological consequences of AibZIP activation, we sought to identify genes that are regulated by the processed form of AibZIP in LNCaP cells. For this purpose, we generated cell lines that conditionally produce a recombinant form of processed AibZIP. The recombinant protein, hereafter referred to as A290HA,

consists of the transcription factor domain of AlbZIP (amino acids 1-290) fused to a carboxy-terminal HA epitope.

Several independent LNCaP cell lines that conditionally produce A290HA were generated using the RheoSwitch expression system (Fig. 3.3A). This system employs a nonsteroidal analog of the insect hormone ecdysone (RSL1) to activate a heterodimer of chimeric nuclear receptors that regulates the production of A290HA via a GAL4-responsive promoter (24). We have extensively characterized the RheoSwitch system in LNCaP cells and found that RSL1 exerts minimal effects on the expression of endogenous genes (16).

Gene expression profiling experiments were performed in clone 7-11. In this particular cell line, A290HA could be detected in nuclear extracts 2h following the addition of RSL1 (data not shown). To capture as many A290HA-regulated transcripts as possible, we therefore prepared RNA from cells that were exposed to RSL1 for 6 and 24 h. As shown in Fig. 3.3B, A290HA was undetectable before addition of RSL1, whereas addition of RSL1 produced a robust increase in A290HA levels. RNA samples were processed to probes that were hybridized to Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 microarrays containing 54,000 probe sets.

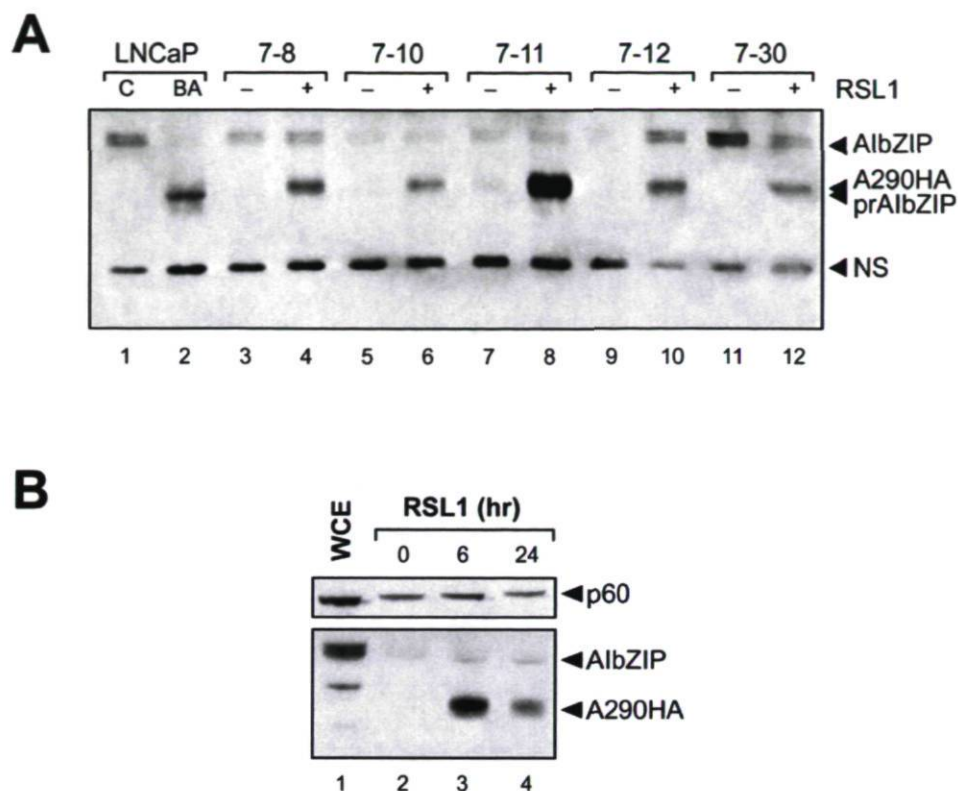


Figure 3.3: RSL1-induced production of A290HA in cells used for gene expression profiling. *A*: clones that conditionally produce A290HA were exposed to RSL1 (500 nM) for 6 h, whereas LNCaP cells were exposed to brefeldin A (1 μ g/ml) for 2 h. Nuclear extracts were analyzed by immunoblotting using AB515. The positions of full-length AlbZIP, A290HA, the brefeldin A-induced processed form of AlbZIP (prAlbZIP), and a cross-reacting polypeptide (NS) are indicated. *B*: for the microarray experiment, clone 7-11 cells were cultured in the presence of vehicle (*lane 2*) or RSL1 (500 nM) as indicated. Nuclear extracts were analyzed by immunoblotting using AB515. Whole cell extracts prepared from standard LNCaP cells are shown in *lane 1*. The positions of full-length AlbZIP, A290HA, and a nuclear protein (p60/GLTSCR2) are indicated.

Analysis of the microarray hybridization data produced a list of 2,701 probe sets that detected statistically significant ($P=0.001$ vs. control cells) changes in mRNA abundance at 6 and/or 24 h following addition of RSL1. Of the 2,701 regulated probe sets, 1,296 detected increases in mRNA abundance, whereas 1,405 detected decreases in mRNA abundance. These 2,701 probe sets were then subjected to two-dimensional cluster analysis as depicted in Supplemental Fig. 1. This visual representation of the data confirms that the

RSL1/A290HA related changes in mRNA abundance were reproducible across multiple biological replicates.

To begin to understand the biological consequences of AlbZIP activation, we sought to determine whether the transcripts that were modulated at 24 h segregate to specific biological pathways or processes. The lists of probe sets that were significantly regulated at 24 h were uploaded to the DAVID database (7), which processed the microarray data to generate nonredundant lists of 1,086 upregulated genes and 852 downregulated genes. The GO annotations derived from the list of genes with increased expression identified several genes with either DNA-, RNA-, nucleotide-, or protein-binding activity, including genes that bind to unfolded proteins (Supplemental Table 3.1). Functional annotation clustering revealed that the list of A290HA-induced transcripts is most enriched for nuclear proteins (Supplemental Table 3.2). However, several other cellular functions (e.g., RNA and DNA metabolism) were highly enriched. On the other hand, the list of downregulated genes was most enriched for proteins involved in Golgi function and protein transport (Supplemental Tables 3.3 and 3.4). Together these analyses suggest that AlbZIP might be implicated in processes that have not been previously linked to other ER-associated bZIP transcription factors.

Because ER-bound transcription factors are generally thought to activate gene expression in response to physiological stress, we were primarily interested in the probe sets that detected increases in mRNA abundance. A large number of probe sets detected statistically significant increases at 6 h (227 probe sets) and 24 h (1,250 probe sets). Of the 227 probe sets that were upregulated at 6 h, 181 were also upregulated at 24 h. Although most of these probe sets reported relatively small (3-fold) increases in mRNA levels, we identified 25 genes that were upregulated 3- to 5-fold at 6 h and 121 genes that were upregulated 3- to 17-fold at 24 h (Supplemental Table 3.5).

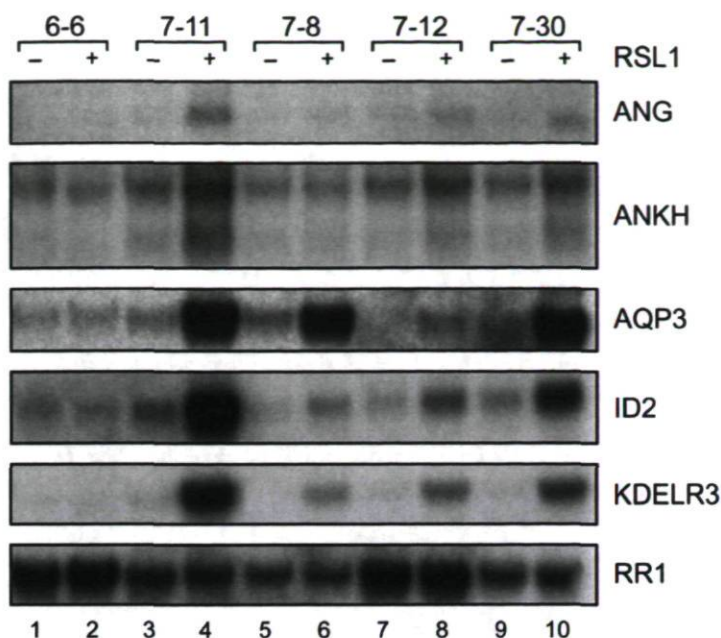


Figure 3.4: Validation of AIBZIP-responsive transcripts in independent A290HA producing clones. Cultures of the indicated clones were exposed to vehicle alone or RSL1 (500 nM for 24 h). Total RNA samples (20 μ g/lane) were analyzed by Northern hybridization. Clone 6-6 is a control cell line that only produces the RheoSwitch transcription factors. Sample loading was verified by detection of the RheoReceptor-1 (RR1) mRNA.

3.5.5 Validation of A290HA-Regulated Transcripts

For validation, we selected 49 genes that we considered of particular interest based on their novelty or on their known or suspected involvement in ER function, metabolic processes, transport, cell stress, transcription, and/or signal transduction (Table 3.1). Nine of the selected genes were upregulated at least threefold at both 6 and 24 h, one gene was upregulated at least threefold at 6 h only, and twenty-nine genes were upregulated at least threefold at 24 h only. The 10 other genes were upregulated 1.7- to 3-fold at 24 h. Representative probe set data for each of these genes are presented in Supplemental Table 3.6. None of the genes that were selected for validation was upregulated by RSL1 in a control RheoSwitch cell line (LNCaP clone 6-6) that does not produce A290HA (16).

Table 3.1. A290HA-regulated genes selected for validation

Transcription	
CREB3	cAMP responsive element binding protein 3
ETS2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2
HYOU1	hypoxia up-regulated 1
ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein
Protein maturation, sorting, degradation	
BAG3	BCL2-associated athanogene 3 (chaperone-binding protein)
CALU	Calumenin (EF-hand calcium-binding protein)
DNAJC12	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12 (co-chaperone)
EDEM1	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 1 (protein degradation)
GALNT3	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (O-glycosylation)
GORASP2	golgi reassembly stacking protein 2, 55kDa (Golgi formation)
HERPUD1	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1 (protein degradation)
KDELR1	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 1
KDELR2	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2
KDELR3	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 3
LMAN1	lectin, mannose-binding, 1 (glycoprotein transport)
Metabolism (lipid or sugar)	
ACSL3	acyl-CoA synthetase long-chain family member 3 (lipid biosynthesis)
GFPT1	glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 (hexosamine pathway)
INSIG1	insulin induced gene 1 (regulation of SREBPs)
LIPA	lipase A (cholesteryl ester and triglyceride hydrolysis)
PGM1	phosphoglucomutase 1 (glucose metabolism)
PGM3	phosphoglucomutase 3 (glucose metabolism)
UGT2B28	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B28
Channels and transporters	
ANKH	ankylosis, progressive homolog (mouse) (pyrophosphate metabolism)
AQP3	aquaporin 3 (water and glycerol channel)
CUZD1	CUB and zona pellucida-like domains 1 (potassium channel)

KCNK1	potassium channel, subfamily K, member 1
SLC26A2	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2
TMCO3	transmembrane and coiled-coil domains 3 (pH regulation)

Signal transduction

ANXA2	annexin A2 (calcium-dependent phospholipid binding protein)
CDC42EP3	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 3
CECR1	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1 (adenosine deaminase)
DUSP1	dual specificity phosphatase 1 (MAP kinase phosphatase)
IKIP	IKK (I kappa B kinase) interacting protein
PLA2G2A	phospholipase A2, group IIA
ST7	suppression of tumorigenicity 7 (low density lipoprotein receptor family)
THBS1	thrombospondin 1 (TGF β signalling)

Miscellaneous

ANG	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5 (tRNA hydrolysis)
CD24	CD24 molecule (surface sialoglycoprotein)
DOM3Z	dom-3 homolog Z (function unknown)
GADD45B	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta
KIAA0774	function unknown
LOX	lysyl oxidase (crosslinks extracellular matrix proteins)
NDRG1	N-myc downstream regulated gene 1 (tunicamycin and oxygen-responsive)
OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like
RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4
SIDT2	SID1 transmembrane family, member 2 (function unknown)
TMEM45A	transmembrane protein 45A (function unknown)
TMPRSS2	transmembrane protease, serine 2
WDFY2	WD repeat and FYVE domain containing 2 (endocytosis)

The genes are identified by their official gene symbol and are grouped by similar function. In cases where the gene name or category is uninformative, additional information is included in brackets.

To validate the microarray data, we performed Northern blot analyses using RNA samples from control and RSL1-treated cells. We initially used total RNA samples from four LNCaP cell lines that conditionally express A290HA. Total RNA samples from

LNcaP clone 6-6 were also analyzed in parallel to ensure that the selected transcripts were not regulated by the inducing agent RSL1. These initial experiments confirmed that five of the more readily detectable transcripts (ANG, ANKH, AQP3, ID2, KDELR3) were upregulated in several A290HA-expressing cells following addition of RSL1 (Fig. 3.4). However, total RNA did not provide the required sensitivity to validate all of the potential AIBZIP-regulated transcripts.

To complete the validation, we therefore performed Northern blot analyses using polyA⁺ RNA samples from control and RSL1-treated clone 7-11 cells. Since we anticipated that some A290HA-regulated transcripts might be induced during ER stress, we also analyzed mRNA samples prepared from clone 7-11 cells that were exposed to A23187. As shown in Fig. 3.5, Northern blot analyses confirmed that the vast majority of the genes that were selected for validation were in fact upregulated in A290HA-expressing clone 7-11 cells.

Transcription factors. Northern blot analysis confirmed that the production of the A290HA transcript was strictly RSL1 dependent in clone 7-11 cells. In agreement with the microarray data, increased levels of mRNAs encoding the transcription factors CREB3, ETS2, and ID2 were observed in A290HA producing cells. On the other hand, the modest increase in HYOU1 mRNA levels that was detected using microarrays was not confirmed by Northern blot analysis. Interestingly, CREB3, HYOU1, and ID2 were upregulated by A23187. This suggests that these transcription factors are solicited during the ER stress response.

Protein processing. Although the microarrays did not identify BiP (heat shock 70 kDa protein 5; HSPA5) as a potential target of A290HA, we evaluated HSPA5 mRNA levels in A23187-treated and A290HA-expressing cells to monitor ER stress. As expected, HSPA5 mRNA levels increased in cells exposed to A23187. On the other hand, HSPA5 was unaffected by exposure to RSL1, which indicates that A290HA and its downstream targets did not induce ER stress. Several genes implicated in protein maturation and sorting were upregulated in A290HA-producing cells. These include the chaperone regulators BAG3 and DNAJC12, the O-glycosylating enzyme GALNT3, the Golgi assembly protein

GORASP2, and the ER sorting receptor KDELR3. Lesser increases in mRNA levels were observed for the chaperone CALU, the ER quality control receptor EDEM1, the lectin LMAN1, and KDELR2. The observed increase in EDEM1 mRNA levels confirms an earlier report showing that EDEM1 was upregulated by transient overexpression of mouse AlbZIP in HeLa cells (21). Several of these transcripts, DNAJC12 in particular, were markedly upregulated by A23187.

Sugar and lipid metabolism. A number of genes implicated in lipid and sugar metabolism were upregulated in A290HA-expressing cells. These include GFPT1, a key enzyme of the hexosamine pathway; LIPA, a triglyceride and cholesterol ester lipase; and PGM1, which interconverts glucose-1-phosphate and glucose-6-phosphate, all of which were upregulated at 6 h. Appreciable increases in mRNAs encoding ACSL3, an enzyme implicated in lipid biosynthesis; INSIG1, a regulator of SREBPs; and UGT2B28, an enzyme that inactivates steroids, were observed at 24 h. GFPT1, INSIG1, and PGM1 were upregulated by A23187.

Channels and transporters. Conditional expression of A290HA resulted in the upregulation of genes that encode membrane proteins that transport small molecules. Robust increases in mRNAs encoding the phosphate transporter ANKH, the water and glycerol channel AQP3, and the potassium channel KCNK1 were detected in cells exposed to RSL1 for 6 h. Substantial increases in mRNAs encoding the potassium channel CUZD1, the sulfate transporter SLC26A2, and the putative ion transporter TMCO3 were observed at 24 h. TMCO3 and, to a lesser extent, AQP3, CUZD1, and KCNK1 were upregulated by A23187.

Signal transduction. Increased levels of mRNAs encoding proteins implicated in a variety of cell signaling pathways were observed in A290HA-producing cells. Substantial increases in mRNAs encoding a phospholipid-binding autocrine factor (ANXA2), a regulator of NF κ B signaling (IKIP), a secreted phospholipase (PLA2G2A), and a protein implicated in TGF β signaling (THBS1) were manifest at 6 and/or 24 h. Lesser increases in mRNAs encoding the Rho GTPase regulator CDC42EP3, the adenosine deaminase CECR1, and the tyrosine phosphatase DUSP1 were observed at 24 h. With the possible exception of DUSP1, none of these transcripts was markedly upregulated by A23187.

Miscellaneous genes. Interestingly, the downstream targets of A290HA include three genes (ANG, DOM3Z, RNASE4) that are implicated in RNA metabolism. Increases in all three transcripts were detected 6 and 24 h following addition of RSL1. The other transcripts that were upregulated at 6 h encode GADD45B, a known stress-induced protein; OASL, a protein of unknown function that interacts with the transcriptional repressor MBD1; two transmembrane proteins of unknown function (SIDT2 and TMEM45A); and KIAA0774. Transcripts encoding a surface sialoglycoprotein (CD24), a lysyl oxidase (LOX), a myc- and stress-responsive gene (NDRG1), an androgen-regulated secreted serine protease (TMPRSS2), and a protein implicated in endocytosis (WDFY2) were upregulated at 24 h. ANG, DOM3Z, GADD45B, RNASE4, TMEM45A, and WDFY2 mRNAs were upregulated in cells exposed to A23187.

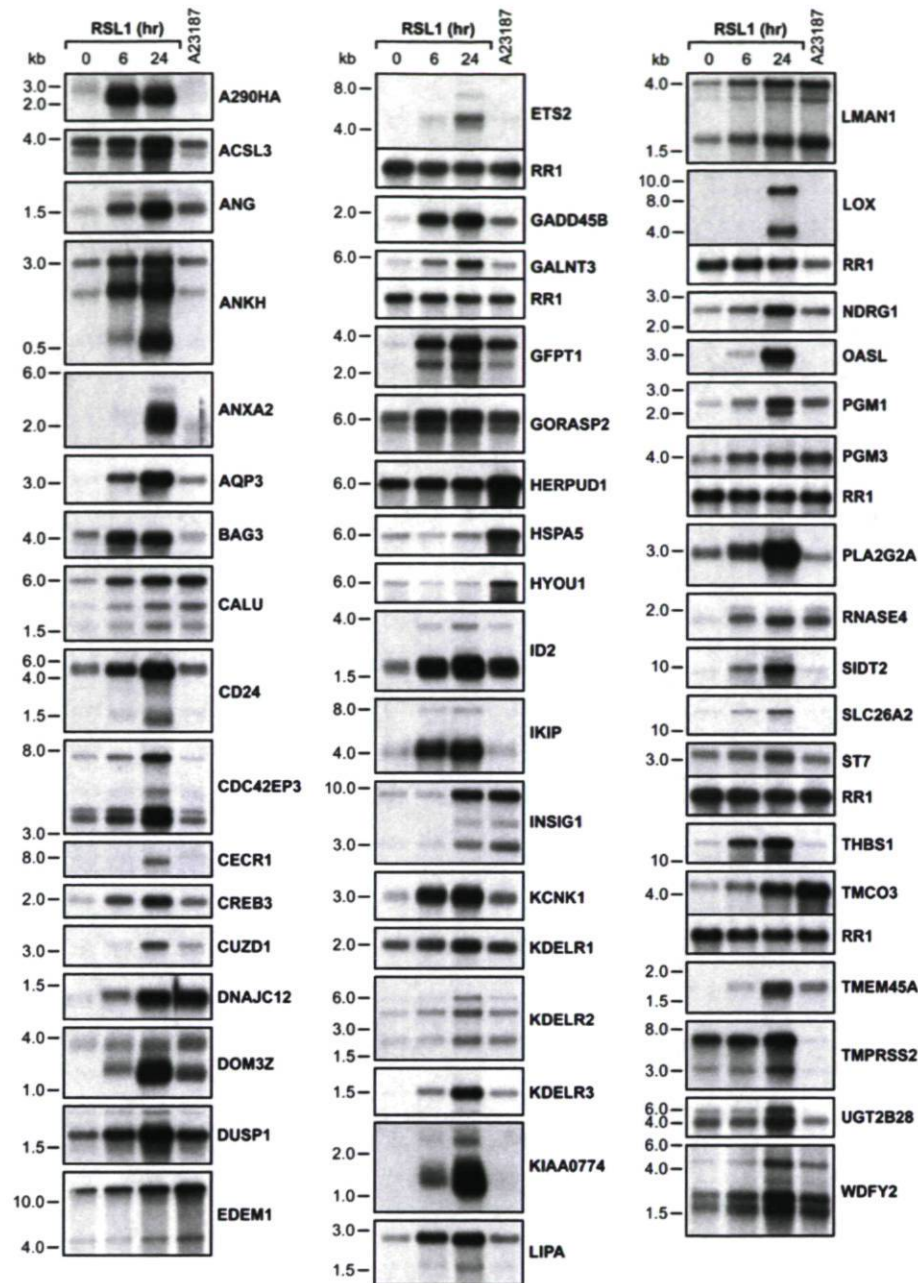


Figure 3.5: Validation of candidate A290HA-responsive genes. The genes are designated by their official symbols and presented in alphabetical order. Cultures of clone 7-11 cells were exposed to vehicle alone, RSL1 (500 nM for 6 or 24 h), or A23187 (2 μ M for 24 h). Polyadenylated RNA samples (2 μ g/lane) were analyzed by Northern hybridization. Equal sample loading was confirmed by hybridizing blots with a probe that detects the RheoReceptor-1 transcript. Representative loading controls are presented for ETS2, GALNT3, LOX, PGM3, ST7, and TMC03.

3.6 Discussion

Identification of the downstream targets of transcription factors is critical to understanding the physiological role of these proteins. To clarify the role of AlbZIP in prostate cells, we used high-density oligonucleotide microarrays to screen for genes that are regulated by a conditionally expressed transcriptionally active form of AlbZIP. The data presented herein reveal that AlbZIP activates a subset of genes that encode proteins that are involved in protein processing. Strikingly, the majority of AlbZIP-regulated genes encode proteins that are implicated in cellular functions that are not related to ER function in an obvious way.

We anticipated that A290HA might upregulate genes implicated in protein processing, because drugs that cause ER dysfunction induced AlbZIP activation. In fact, A290HA upregulated genes that encode ER proteins implicated in protein folding (BAG3, DNAJC12), sorting (KDEL3), and degradation (EDE1). It is important to note that these genes are not known to be regulated by other ER-bound bZIP transcription factors. Conversely, A290HA did not upregulate genes that are known targets of ATF6 and OASIS (e.g., BiP) or of CREB3 (HERPUD1). Thus, while most ER-bound bZIP transcription factors appear to be implicated in the regulation of protein maturation in the ER, it appears that each CREB3-like protein fulfills specific functions.

In addition to identifying A290HA-regulated genes, the present study identified several transcripts that were not previously known to be upregulated during A23187-induced ER stress. These include genes that would be expected to function in the UPR, such as DNAJC12 and KDEL3, as well as genes that encode ribonucleases (ANG, RNASE4), transcription factors (CREB3, ID2), regulators of lipid and sugar metabolism (GFPT1, INSIG1), and proteins of uncertain function (DOM3Z, TMEM45A). These data provide new insight into the complexity of the physiological response to ER dysfunction.

In LNCaP cells exposed to A23187, the processed form of AlbZIP is detectable in nuclear extracts for at least 24 h following exposure to A23187 (data not shown). Interestingly, A23187, which induces AlbZIP processing, did not upregulate all of the A290HA-regulated transcripts. Both physiological and technical explanations can account for this observation. First, the UPR is a complex response that involves more than just AlbZIP activation. Consequently, it is conceivable that the A290HA-regulated transcripts that are irrelevant to the UPR were actually downregulated by A23187, as appears to be the case for TMPRSS2. Second, some transcripts may be differentially regulated by A23187 over time, and the single time point used in this experiment may have missed increases in mRNA abundance. In fact, in subsequent experiments, we found that the abundance of some transcripts peaked after a shorter (i.e., 8 h) exposure to A23187.

A number of transcripts that were upregulated by A290HA in LNCaP cells are also overexpressed in prostate cancer. Previous studies reported that the transcription factor ID2, the ribonuclease angiogenin (ANG), and the phospholipase PLA2G2A are more abundant in preneoplastic lesions and in adenocarcinoma compared with normal prostate (4, 10, 13). Among these proteins, PLA2G2A is especially intriguing from both a physiological and a pathophysiological perspective. The specific role of this secreted phospholipase is uncertain, but it is believed to play a role in fertilization, and it is known to exert bactericidal activity by virtue of its ability to destroy bacterial cell membranes (12). Furthermore, PLA2G2A releases arachidonic acid from cellular membranes, thereby providing the substrate for biosynthesis of eicosanoids, which are known to regulate cell proliferation.

We observed that AlbZIP is processed to its transcriptionally active form by drugs that lower ER Ca^{+2} concentrations and/or increase cytoplasmic Ca^{+2} concentrations. However, the amazing diversity of genes that were upregulated by A290HA in LNCaP cells argues that other physiological disruptions may also lead to AlbZIP processing. How might this occur? It is well established that the activation of ER-associated transcription factors is regulated by proteins, such as BiP (18), that interact with their regulatory domains. We postulate that AlbZIP might interact with different proteins or that multiple

physiological pathways might converge on a single AibZIP binding protein. As of this report, however, the identities of the proteins that interact with the regulatory domains of AibZIP and other CREB3-related proteins remain unknown.

The present study was designed to obtain a global portrait of the consequences of AibZIP activation in LNCaP cells. In this regard, it is of interest to note that three of the validated targets of A290HA (i.e., CREB3, ETS2, and ID2) are transcription factors that could potentially contribute to some of the gene expression changes observed in A290HA-producing cells. However, it is unlikely that CREB3 contributed to the upregulation of the A290HA-regulated genes identified here, since it must be processed by RIP to become transcriptionally active. On the other hand, the fact that CREB3 was induced by both A290HA and A23187 is of considerable interest, since it suggests that AibZIP and CREB3 are solicited during different phases of the UPR. As for ETS2 and ID2, their target genes in prostate cells are unknown, and additional work will be required to clarify their role in AibZIP action.

In summary, our studies demonstrate that AibZIP is a substrate for processing by Golgi proteases and that it is processed to its transcriptionally active form by drugs that deplete ER calcium stores. More importantly, the validated microarray data define a subset of genes, unique to AibZIP, that function in protein processing in the ER. Moreover, the data reveal that AibZIP also activates genes implicated in diverse biological pathways, many of which have not been extensively characterized (e.g., ANKH, IKIP, LOX, OASL). These novel discoveries provide insight into the regulation and activity of AibZIP and will contribute to a better understanding of the physiological role of AibZIP.

3.7 Acknowledgments

We are grateful to M. Auger and M. Royer for art work.

3.8 Grants

This work was supported by an operating grant from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (MOP-53139) to C. Labrie, a CIHR training grant (STP-53894) to S. Ben Aicha and J. Lessard, a CIHR scholarship to J. Lessard, a scholarship from the government of Tunisia to S. Ben Aicha, and a salary award from Le Fonds de la Recherche en Sante' du Que'bec to C. Labrie.

3.9 References

1. Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Edgar R. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles—database and tools update. *Nucleic Acids Res* 35: D760–D765, 2007.
2. Brown MS, Goldstein JL. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 11041–11048, 1999.
3. Burdakov D, Petersen OH, Verkhatsky A. Intraluminal calcium as a primary regulator of endoplasmic reticulum function. *Cell Calcium* 38: 303–310, 2005.
4. Coppe JP, Itahana Y, Moore DH, Bennington JL, Desprez PY. Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression. *Clin Cancer Res* 10: 2044–2051, 2004.
5. Csala M, Banhegyi G, Benedetti A. Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett* 580: 2160–2165, 2006.
6. Cunha AC, Weigle B, Kiessling A, Bachmann M, Rieber EP. Tissue specificity of prostate specific antigens: comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues. *Cancer Lett* 236: 229–238, 2006.
7. Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC, Lempicki RA. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* 4: P3, 2003.

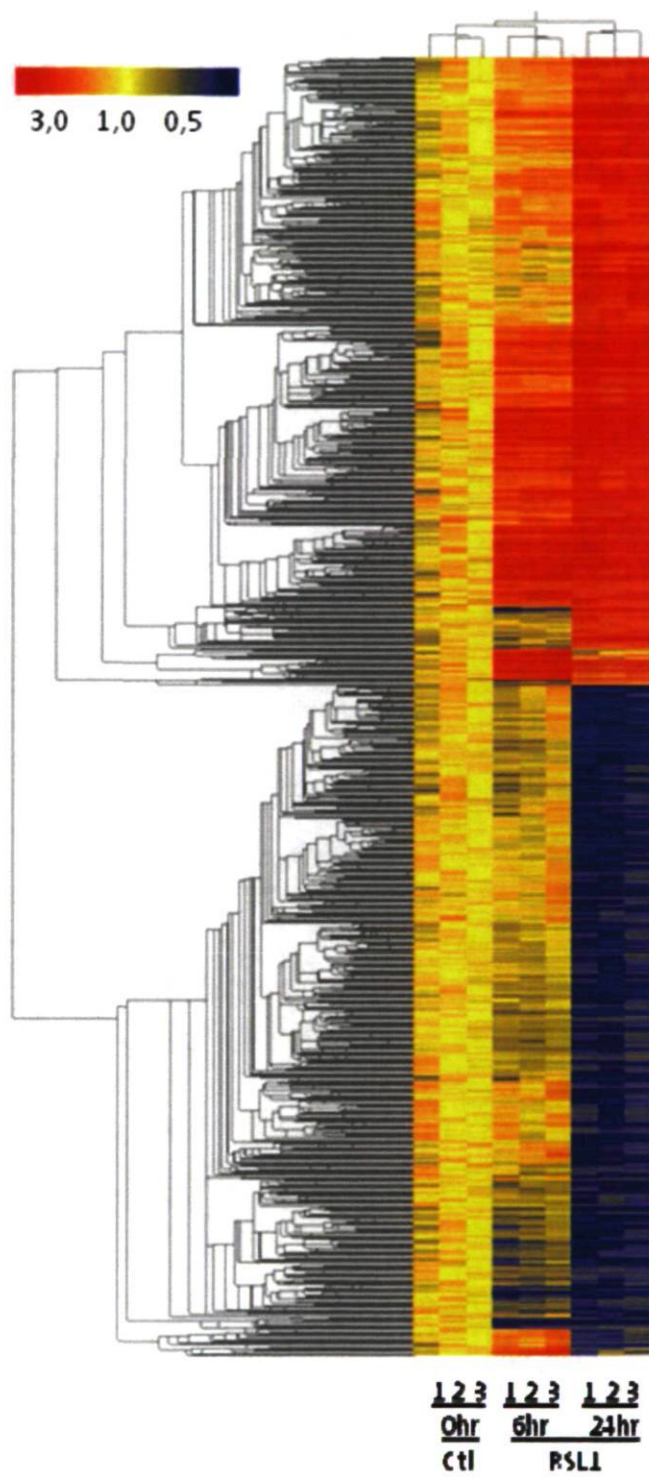
8. El-Alfy M, Azzi L, Lessard J, Lavergne E, Pelletier M, Labrie C. Stage-specific expression of the Atce1/Tisp40alpha isoform of CREB3L4 in mouse spermatids. *J Androl* 27: 686–694, 2006.
9. Freiman RN, Herr W. Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev* 11: 3122–3127, 1997.
10. Graff JR, Konicek BW, Deddens JA, Chedid M, Hurst BM, Colligan B, Neubauer BL, Carter HW, Carter JH. Expression of group IIa secretory phospholipase A2 increases with prostate tumor grade. *Clin Cancer Res* 7: 3857–3861, 2001.
11. Haze K, Yoshida H, Yanagi H, Yura T, Mori K. Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress. *Mol Biol Cell* 10: 3787–3799, 1999.
12. Kallajoki M, Alanen KA, Nevalainen M, Nevalainen TJ. Group II phospholipase A2 in human male reproductive organs and genital tumors. *Prostate* 35: 263–272, 1998.
13. Katona TM, Neubauer BL, Iversen PW, Zhang S, Baldrige LA, Cheng L. Elevated expression of angiogenin in prostate cancer and its precursors. *Clin Cancer Res* 11: 8358–8363, 2005.
14. Kondo S, Murakami T, Tatsumi K, Ogata M, Kanemoto S, Otori K, Iseki K, Wanaka A, Imaizumi K. OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes. *Nat Cell Biol* 7: 186–194, 2005.
15. Kondo S, Saito A, Hino SI, Murakami T, Ogata M, Kanemoto S, Nara S, Yamashita A, Yoshinaga K, Hara H, Imaizumi K. BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer. *Mol Cell Biol* 27: 1716–1729, 2007.
16. Lessard J, Ben Aicha S, Fournier A, Calvo E, Lavergne E, Pelletier M, Labrie C. Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format. *Prostate* 67: 808–819, 2007.
17. Levesque MH, El-Alfy M, Berger L, Labrie F, Labrie C. Evaluation of AibZIP and Cdc47 as markers for human prostatic diseases. *Urology* 69: 196–201, 2007.
18. Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. *Curr Mol Med* 6: 45–54, 2006.

19. Liang G, Audas TE, Li Y, Cockram GP, Dean JD, Martyn AC, Kokame K, Lu R. Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. *Mol Cell Biol* 26: 7999–8010, 2006.
20. Lu R, Yang P, O'Hare P, Misra V. Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor. *Mol Cell Biol* 17: 5117–5126, 1997.
21. Nagamori I, Yabuta N, Fujii T, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y, Nojima H. Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway. *Genes Cells* 10: 575–594, 2005.
22. Omori Y, Imai J, Suzuki Y, Watanabe S, Tanigami A, Sugano S. OASIS is a transcriptional activator of CREB/ATF family with a transmembrane domain. *Biochem Biophys Res Commun* 293: 470–477, 2002.
23. Omori Y, Imai J, Watanabe M, Komatsu T, Suzuki Y, Kataoka K, Watanabe S, Tanigami A, Sugano S. CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression. *Nucleic Acids Res* 29: 2154–2162, 2001.
24. Palli SR, Kapitskaya MZ, Kumar MB, Cress DE. Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system. *Eur J Biochem* 270: 1308–1315, 2003.
25. Qi H, Fillion C, Labrie Y, Grenier J, Fournier A, Berger L, El-Alfy M, Labrie C. AlbZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res* 62: 721–733, 2002.
26. Raggio C, Rapin N, Stirling J, Gobeil P, Smith-Windsor E, O'Hare P, Misra V. Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol Cell Biol* 22: 5639–5649, 2002.
27. Rawson RB. Regulated intramembrane proteolysis: from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Essays Biochem* 38: 155–168, 2002.
28. Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell* 85: 1037–1046, 1996.

29. Schmidt U, Fuessel S, Koch R, Baretton GB, Lohse A, Tomasetti S, Unversucht S, Froehner M, Wirth MP, Meye A. Quantitative multigene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate* 66: 1521–1534, 2006.
30. Sciaky N, Presley J, Smith C, Zaal KJ, Cole N, Moreira JE, Terasaki M, Siggia E, Lippincott-Schwartz J. Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J Cell Biol* 139: 1137–1155, 1997.
31. Stirling J, O'Hare P. CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by S1P. *Mol Biol Cell* 17: 413–426, 2006.
32. Storlazzi CT, Mertens F, Nascimento A, Isaksson M, Wejde J, Brosjo O, Mandahl N, Panagopoulos I. Fusion of the FUS and BBF2H7 genes in low grade fibromyxoid sarcoma. *Hum Mol Genet* 12: 2349–2358, 2003.
33. Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 279: 25935–25938, 2004.
34. Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ. Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124: 587–599, 2006.

3.10 Supplementary material

Supplementary Figure 3.1 : Two-dimensional gene cluster map of the 2817 probe sets which detected transcripts that were up-regulated or down-regulated (relative to control cells) in clone 7-11 cells in which the production of A290HA was induced by a 6 or 24 hr exposure to RSL1. The individual microarrays (each corresponding to an independent biological replicate) are oriented horizontally, and individual genes are oriented vertically. The coloring convention is as follows: yellow intensity correlates with no change in gene expression relative to the median of controls whereas red intensity correlates with increased gene expression and blue intensity correlates with decreased gene expression.



Supplementary tables 1 to 4 are available on Physiological Genomics website:
<http://physiolgenomics.physiology.org/cgi/content/full/00097.2007/DC1>

Ces tables contiennent des valeurs de compte et de p-value pour les gènes régulés positivement ou négativement après 24 heures de RSL1. Les tables 1 et 3 listent les gènes selon leur annotation GO (Gene Ontology), alors que les tables 2 et 4 contiennent les informations regroupées selon les fonctions des gènes.

Supplementary Table 3.1: Genes up-regulated after 24 hr of RSL1 treatment (1086 DAVID IDs). GO annotation by DAVID software.

Supplementary Table 3.2: Genes up-regulated after 24 hr of RSL1 treatment (1086 DAVID IDs). Functional annotation clustering by DAVID software.

Supplementary Table 3.3: Genes down-regulated after 24 hr of RSL1 treatment (852 DAVID IDs). GO annotation by DAVID software.

Supplementary Table 3.4: Genes down-regulated after 24 hr of RSL1 treatment (852 DAVID IDs). Functional annotation clustering by DAVID software.

Supplementary Table 3.5: Genes with at least one probe set that detected an average fold-change ≥ 3.0 :

At 6 hr (n=25) a

ANKH, B4GALT1, BAG3, C20orf74, DDX26, FAM57A, FAM87A, GADD45B, GFPT1, IBRDC2, ID2, IKIP, KCNK1, KIAA0774, KLF4, KM-HN-1, MATN1, MGC17943, MNT, PDGFA, PDGFR1, SEC24D, SIAH2, THBS1, WDFY2

At 24 hr (n=121) b

ACSL3, AFF3, AGR2, AKAP12, ANG, ANKRD37, ANXA2, ANXA5, AQP3, ATP1B1, B3GNT5, BAMBI, BHLHB2, C1orf85, C14orf28, C20orf70, C21orf5, CANT1, CD24, CDC42EP3, CECR1, Cep70, CGREF1, COL1A1, COL9A3, CREB3, CTNNAL1, CUZD1, DATF1, DGKE, DIP13B, DKFZP434B0335, DKFZP434F0318, DNAJC12, DOM3Z, DUSP1, ERBB2, ETS2, F5, FKBP11, FLJ20152, FLJ23514, FLJ30428, FNTB, FSIP1, HGD, HIST1H4H, HOP, ITGB5, ITPR1, JMJD1C, KDEL2, KDEL3, KIAA0268, KIAA0513, KIAA0703, LAMA1, LDLR, LIPA, LMAN1, LOC201895, LOC253264, LOC285463, LOC400960, LOC493869, LOC56901, LOC92689, LOX, LRRC15, MAF, MALL, MAN1A1, MLL, MLLT11, MMP13, NAV3, NDRG1, NSUN6, OASL, PAPSS2, PASK, PDLIM3, PGM1, PHKB, PLA2G2A, PLXNA3, PNLIP, PRKCH, RAB39B, RABAC1, RBM21, RGS2, RNASE4, RNF144, ROR1, RP11-49G10.8, RPS6KA6, RRBP1, SIDT2, SLC16A3, SLC19A2, SLC22A17, SLC26A2, SLC38A4, ST7, STC1, STARD4, STEAP4, SYNGR3, TAGLN, TCMO3, TMEM45A, TMPRSS2, TncRNA, TSC2, TSPAN1, TSPAN8, UNQ6077, VEGF, WIP149, XPO1

a, Genes that are also up-regulated ≥ 3.0 -fold at 24 hr are double-underlined (n=19).

b, Genes that are also statistically significantly up-regulated at 6 hr are underlined (n=31).

Supplementary Table 3.6: Affymetrix data for the candidate AlbZIP-regulated genes selected for validation.

The genes are listed in alphabetical order and the probe sets that reported the greatest fold-change in mRNA levels are shown. Normalized signal intensities are expressed as the mean \pm SEM of three microarrays.

Gene	Affymetrix	Normalized Signal Intensity (Mean \pm SEM) ^a			FC ^b
		Control	6 hr RSL1	24 hr RSL1	
Symbol	Probe Set No.				24/C
ACSL3	201661_s_at	403 \pm 50	478 \pm 16	1137 \pm 90	2.8
ANG	205141_at	131 \pm 6	294 \pm 13	931 \pm 99	7.1
ANKH	223093_at	205 \pm 39	1013 \pm 28	1615 \pm 156	7.9
ANXA2	210427_x_at	70 \pm 3	79 \pm 4	441 \pm 31	6.3
AQP3	39248_at	500 \pm 110	1083 \pm 26	4647 \pm 823	9.3
BAG3	217911_s_at	842 \pm 35	2508 \pm 47	2162 \pm 140	2.6
CALU	214845_s_at	466 \pm 12	792 \pm 42	1007 \pm 24	2.2
CD24	208650_s_at	111 \pm 18	169 \pm 7	707 \pm 77	6.4
CDC42EP3	209288_s_at	263 \pm 40	527 \pm 6	1043 \pm 38	4.0
CECR1	219505_at	53 \pm 5	77 \pm 5	431 \pm 17	8.1
CREB3	209432_s_at	671 \pm 25	1541 \pm 50	2755 \pm 282	4.1
CUZD1	220275_at	49 \pm 4	66 \pm 1	415 \pm 24	8.5
DNAJC12	223721_s_at	191 \pm 10	459 \pm 40	1250 \pm 144	6.5
DOM3Z	215982_s_at	412 \pm 34	751 \pm 27	3081 \pm 198	7.5
DUSP1	201041_s_at	602 \pm 10	1421 \pm 40	2103 \pm 223	3.5
EDEM1	203279_at	226 \pm 4	242 \pm 4	386 \pm 40	1.7
ETS2	201328_at	43 \pm 2	111 \pm 1	275 \pm 23	6.4
GADD45B	207574_s_at	53 \pm 3	171 \pm 9	271 \pm 12	5.1
GALNT3	203397_s_at	596 \pm 34	819 \pm 25	1197 \pm 130	2.0
GFPT1	202721_s_at	757 \pm 67	3243 \pm 22	4658 \pm 671	6.2
GORASP2	207812_s_at	485 \pm 25	970 \pm 36	895 \pm 58	1.9
HERPUD1	217168_s_at	1433 \pm 85	1938 \pm 55	2806 \pm 243	2.0
HYOU1	200825_s_at	1673 \pm 49	1634 \pm 42	2902 \pm 61	1.7

Supplementary Table 6 (cont'd)

Gene	Affymetrix	Normalized Signal Intensity (Mean \pm SEM) ^a			FC ^b
		Control	6 hr RSL1	24 hr RSL1	
Symbol	Probe Set No.				24/C
ID2	201566_x_at	202 \pm 13	669 \pm 7	787 \pm 90	3.9
IKIP	236249_at	27 \pm 4	100 \pm 6	169 \pm 16	6.3
INSIG1	201627_s_at	447 \pm 30	607 \pm 33	1234 \pm 44	2.8
KCNK1	204678_s_at	130 \pm 8	526 \pm 21	663 \pm 49	5.1
KDELR1	200922_at	461 \pm 22	492 \pm 5	900 \pm 52	2.0
KDELR2	200699_at	620 \pm 37	864 \pm 9	1975 \pm 43	3.2
KDELR3	207265_s_at	234 \pm 31	667 \pm 8	2743 \pm 257	12
KIAA0774	214961_at	27 \pm 2	137 \pm 1	375 \pm 41	14
LIPA	201847_at	655 \pm 26	1684 \pm 34	2383 \pm 248	3.6
LMAN1	203294_s_at	495 \pm 17	699 \pm 0	1458 \pm 59	3.0
LOX	204298_s_at	22 \pm 4	21 \pm 3	243 \pm 16	11
NDRG1	200632_s_at	304 \pm 18	439 \pm 26	1511 \pm 104	5.0
OASL	205660_at	46 \pm 1	108 \pm 0	435 \pm 17	9.5
PGM1	201968_s_at	506 \pm 28	672 \pm 1	1723 \pm 109	3.4
PGM3	210041_s_at	255 \pm 6	461 \pm 18	564 \pm 39	2.2
PLA2G2A	203649_s_at	1195 \pm 53	1676 \pm 31	5822 \pm 698	4.9
RNASE4	213397_x_at	76 \pm 19	164 \pm 17	461 \pm 29	6.1
SIDT2	56256_at	759 \pm 94	1842 \pm 69	4533 \pm 530	6.0
SLC26A2	205097_at	285 \pm 23	827 \pm 22	1179 \pm 100	4.1
ST7	207524_at	158 \pm 12	227 \pm 12	1047 \pm 36	6.6
THBS1	201108_s_at	139 \pm 17	546 \pm 14	774 \pm 14	5.6
TMCO3	220240_s_at	285 \pm 18	443 \pm 16	1325 \pm 61	4.6
TMEM45A	219410_at	47 \pm 15	90 \pm 3	780 \pm 57	17
TMPRSS2	211689_s_at	602 \pm 19	1035 \pm 44	2375 \pm 214	4.0
UGT2B28	211682_x_at	3157 \pm 180	3066 \pm 61	7589 \pm 921	2.4
WDFY2	227490_at	131 \pm 1	290 \pm 19	494 \pm 32	3.8

a, Average of three experimental replicates per time point.

b, Fold-change of the signal intensities at 24 hr versus controls (i.e. mean signal intensity at 24 hr divided by the mean signal intensity at 0 hr).

Chapitre 4: The Endoplasmic Reticulum (ER)-Bound Transcription Factor CREB3 is Up-regulated by the Processed Forms of AIBZIP and CREB3 During ER Stress

Julie Lessard, Sonia Ben Aicha, Andréa Fournier, Mélissa Pelletier, Claude Labrie

4.1 Résumé

Ce dernier chapitre présente des résultats qui portent sur la caractérisation de la régulation de CREB3 par AIBZIP et le stress du RE. Alors que les cibles d'AIBZIP étaient identifiées par notre équipe, il était déjà connu que CREB3 était régulé par le mécanisme de clivage protéolytique RIP [101], ce qui en faisait une cible intéressante à approfondir. Le manuscrit présenté ici sera soumis sous peu pour publication. Les données qu'il contient représentent une très grande part de mes travaux de doctorat et ma contribution à cet article est majeure puisque j'y ai réalisé toutes les expériences présentées dans les résultats, avec évidemment, la précieuse aide de mes collègues. Le résumé qui accompagnera l'article est celui-ci :

Les facteurs de transcription bZIP de la sous-famille CREB3 qui sont localisés dans la membrane du réticulum endoplasmique (RE) joueraient un rôle important dans l'homéostasie du RE et dans la réponse cellulaire à une variété de stress, mais leur rôle demeure indéfini. Nous avons préalablement démontré qu'AIBZIP (*Androgen-Induced bZIP*) est un facteur lié au RE qui est régulé par le stress et nous avons constaté avec intérêt qu'AIBZIP régule l'expression d'un autre facteur régulé par le stress, CREB3, dans les cellules prostatiques. Dans le présent article, nous étudions les mécanismes moléculaires par lesquels AIBZIP régule l'expression de CREB3 et clarifions la relation fonctionnelle entre les deux protéines. Nous avons démontré qu'AIBZIP et CREB3 sont activées séquentiellement dans les cellules suite au stress. Il est intéressant de constater que les deux facteurs interagissent avec le promoteur CREB3 et activent la transcription via ce promoteur. Cela suggère qu'AIBZIP et CREB3 maintiennent la production de CREB3

durant la réponse au stress. Ces résultats relatent ainsi une nouvelle interaction fonctionnelle entre deux facteurs régulés par les stress du RE.

4.2 Abstract

The CREB3 family of bZIP transcription factors that localize to the endoplasmic reticulum (ER) is believed to play an important role in ER homeostasis and in the cellular response to various forms of stress but its role is not well defined. We previously demonstrated that AIBZIP (Androgen-Induced bZIP) is a *bona fide* ER stress-regulated transcription factor and reported that AIBZIP regulates the expression of another stress-regulated transcription factor, CREB3, in prostate cells. In the present report, we investigated the molecular mechanisms whereby AIBZIP regulates CREB3 expression and clarified the functional relationship between the two proteins. We found that AIBZIP and CREB3 are activated sequentially in cells undergoing ER stress. Interestingly, both AIBZIP and CREB3 interact with and activate the CREB3 promoter, suggesting that AIBZIP and CREB3 ensure the sustained production of the CREB3 protein during ER stress. These results identify a novel functional interaction between two stress-regulated transcription factors.

4.3 Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is the site of several specialized processes that support a wide range of cellular functions. These processes include the synthesis and maturation of membrane and secretory proteins, calcium storage, as well as lipid and sterol biosynthesis (1). Transcription factors that localize to the ER membrane play critical roles in ER homeostasis. One of these proteins is the bZIP transcription factor Activating Transcription Factor 6 (ATF6). When misfolded proteins accumulate in the ER lumen, ATF6 undergoes a tightly regulated activation process before travelling to the nucleus where it up-regulates the expression of ER chaperones. The activation of ATF6 is a major component of the unfolded protein response (UPR a.k.a. ER stress response), a complex adaptive response that serves to restore the ER's ability to process nascent polypeptides (2).

The processing of ATF6 to its transcriptionally active form involves inter-organelle shuttling and partial proteolysis (2). Full-length ATF6 is inserted in the ER membrane as a type II transmembrane protein such that its C-terminal portion protrudes within the ER lumen whereas its N-terminal portion - which contains its transcription activation, DNA binding and dimerization domains - lies in the cytoplasm. Under normal conditions the intraluminal portion of ATF6 interacts with the ER chaperone BiP/GRP78. In response to ER stress, BiP dissociates from ATF6 and ATF6 moves to the Golgi apparatus where proteases separate the N-terminal portion of ATF6 from its membrane-bound C-terminal domain. This processing, which is referred to as Regulated Intramembrane Proteolysis (RIP), releases the transcriptionally active N-terminal fragment of ATF6 that is then free to travel to the nucleus.

In recent years, the combined work of different laboratories led to the discovery of a family of five genes that encode bZIP transcription factors which are structurally related to ATF6. CREB3 (a.k.a. LZIP, Luman) and the CREB3-like proteins OASIS, BBF2H7, CREBH and AIBZIP also localize to the ER membrane and are presumed to function in the ER stress response (3,4). However, their physiological roles and the mechanisms that regulate their activity are not well defined. The human AIBZIP (Androgen-Induced bZIP) gene is expressed in several organs of the digestive, endocrine and reproductive systems (5,6). The abundance of AIBZIP mRNA is greatest in the prostate, an accessory gland of the male reproductive system whose primary function is to produce seminal fluid. In the prostate, AIBZIP is primarily found in the secretory luminal cells that line the glandular acini. Abnormal proliferation of these cells is characteristic of prostate cancer and prostate tumour cells have elevated levels of AIBZIP compared to their normal counterparts (5,7,8).

We have been using the LNCaP human prostate cancer cell line as a model to define the physiopathological role of AIBZIP. In the course of these studies we found that the processing of AIBZIP to its transcriptionally active form is triggered by drugs that reduce intra-ER Ca^{2+} concentrations. These drugs include A23187, a Ca^{2+} ionophore, and thapsigargin, an inhibitor of the sarcoplasmic/ER Ca^{2+} ATPase (SERCA) that transports

Ca²⁺ from the cytoplasm to the ER. In an effort to identify the target genes of AibZIP we performed a genome-wide screen for AibZIP-regulated transcripts in a cell line that was engineered to conditionally express the N-terminal fragment of AibZIP (9). Intriguingly, one of the AibZIP-regulated genes we identified is CREB3.

The objective of the present study was to clarify the functional relationship between AibZIP and CREB3 in LNCaP cells. To this end we examined the effects of AibZIP and ER stress on CREB3 protein levels, CREB3 promoter activity and transcription factor binding to the CREB3 promoter. We report that the transcriptionally active fragment of AibZIP interacts with and activates the CREB3 promoter. Interestingly, the promoter elements that mediate activation by AibZIP are also involved in the stress-induced up-regulation of CREB3. Moreover, we found that AibZIP and CREB3 are processed sequentially in stressed cells and that the transcriptionally active fragment of CREB3 is a potent activator of the CREB3 promoter.

4.4 Materials and methods

4.4.1 Cell lines

LNCaP cells were obtained from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and cultured as described (10). The stably transfected LNCaP cell lines that conditionally express AibZIP or CREB3 were generated using the modified RheoSwitch conditional expression system (10). The control cell line 6-6 that only expresses the RheoSwitch transcription factors was generated by stably transfecting LNCaP cells with plasmid pZRD (10). Cell line 7-11 that conditionally produces AibZIP aa 1-290 fused to a C-terminal HA epitope (YPYDVDPDYASL) was generated using plasmid pZR-290 (9). Cell line 70-2 that conditionally produces AibZIP aa 2-290 fused to two N-terminal HA epitopes was generated using plasmid pRZ-2H290. Cell line 48-5 that conditionally produces CREB3 aa 2-371 fused to an N-terminal FLAG epitope (MDYKDDDDDK) was generated using plasmid pZX-FC3. Cell line 63-6 that conditionally produces CREB3 aa 1-228 fused to a C-terminal HA epitope was generated using plasmid pRZ-L228. Plasmid

construction details are available upon request. The inducing agent RSL1 and the calcium ionophore A23187 were purchased from New England Biolabs and Calbiochem, respectively.

4.4.2 Immunoblotting

Whole-cell or nuclear extracts were prepared as described (9). Protein samples were resolved on 6 or 10% SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes and the proteins of interest were revealed using a chemiluminescent detection system (Pierce) with the appropriate secondary antibodies. The full-length and N-terminal fragments of CREB3 were detected using a rabbit polyclonal antibody (M14) that was generously provided by Dr. Vikram Misra (11). This antibody does not cross-react with AIBZIP, ATF6, BBF2H7, CREBH or OASIS (Supplementary Figure 1). The N-terminal fragment of AIBZIP was detected using a rabbit polyclonal antibody AB515 developed by us (9) or mouse monoclonal antibody M01, clone 3E3 (Abnova). Epitope-tagged proteins were detected using the rabbit polyclonal anti-HA Y-11 antibody (Santa Cruz) or the mouse monoclonal anti-FLAG M2 antibody (SIGMA). GLTSCR2 (p60) was detected using an antibody provided by Dr. B. Roizman (12).

4.4.3 Transcription Factor Expression Vectors

The plasmids used to transiently express transcription factors were constructed by cloning the corresponding open reading frame of the major human variant of each protein into a modified version of pcDNA3 (Invitrogen). Except for full-length CREB3, the transiently expressed proteins were tagged with a C-terminal HA epitope. The N-terminal fragments of the ER-bound bZIP proteins used in this study correspond to AIBZIP aa 1-290, ATF6 aa 1-378, BBF2H7 aa 1-366, CREB3 aa 1-228, CREBH aa 1-316 and OASIS aa 1-372. The sequence of each construct was verified using an automated sequencer.

4.4.4 Promoter constructs and transient transfection assays

A CREB3 genomic fragment containing nts -1680 to -4 relative to the CREB3 ATG was amplified from LNCaP cell DNA by PCR using oligonucleotides 5'-GGGTAGCTAAAGCCAGAACGCTAGCCTGA-3' and 5'-GGGACGACCATGGTGGA CAACTACGGAAAGGGTGGGCCA-3'. The sequence of the cloned fragment is identical to the March 2006 (hg18) assembly of the human genome (UCSC Genome Browser) except for eight nucleotides located between -1680 and -800 relative to the ATG. The fragment was cloned into the KpnI and NcoI sites of the luciferase reporter plasmid pGL3-Basic (Promega) to place the CREB3 gene immediately upstream of the luciferase ORF. Because the CREB3 gene does not contain an NcoI site at the ATG, the last three nucleotides of the CREB3 5'UTR (CAA) were replaced by ACC. The resulting plasmid was designated pGL3-C1680. Shorter and/or mutated versions of pGL3-C1680 were made using convenient restriction sites and/or by PCR. For transient transfection experiments, cells in 3.8 cm² dishes were transfected using Lipofectin with 1.375 µg DNA/well: 250 ng reporter plasmid, 50 ng pA3-A290HA or pA3-L228HA, 125 ng pRL-null (to correct for transfection efficiency) and carrier DNA. Firefly and renilla luciferase activities were determined using the Dual Luciferase Reporter Assay System (Promega) and promoter activity was expressed as firefly luciferase/renilla luciferase values.

To examine the effect of A23187 on CREB3 expression, we replaced the luciferase ORF in pGL3-C1680 with sequences encoding CREB3 aa 2-371 fused to an N-terminal HA epitope (MAYPYDVPDYASLGS). Plasmid pGL3-HC3 contains the wild-type promoter construct whereas plasmid pGL3-HC3-BX contains mutations in the A1bZIP-responsive elements of the promoter (see text). For transient transfection experiments, cells in 6 cm culture dishes were transfected using Lipofectin with 6 µg DNA/well: 5 µg pGL3 plasmid, 1 µg pA3-GAL4-HA. pA3-GAL4-HA encodes the DNA binding domain of the transcription factor GAL4 fused to an HA epitope and it served to monitor transfection efficiency.

4.4.5 Chromatin immunoprecipitation assays

The cells were fixed in 1% formaldehyde for 60 min. The chromatin was then sonicated in a 15 ml conical tube with a microtip attached to a Fisher Scientific Model 550 Sonic Dismembrator (setting 2.5, 15 X 30 seconds) to obtain DNA fragments 300-2000 bp in length. Chromatin preparations were precleared with Protein A Sepharose (GE) blocked 18 hours with BSA (Sigma) for 4 hr at 4°C. One half of the resulting supernatant was incubated with an antibody against the protein of interest and the other half was incubated with an equivalent amount of IgG. HA-tagged proteins were immunoprecipitated using an anti-HA mouse monoclonal antibody (clone F-7, Santa Cruz Biotechnology) whereas endogenous AIBZIP was immunoprecipitated using an anti-Creb314 mouse monoclonal antibody (Abnova). Immunoprecipitations were performed at 4°C for 18 hr and protein-DNA complexes were recovered with Protein A Sepharose at 4°C for 4 hours. A 164-bp fragment of CREB3 exon 1 (-294 to -131 relative to the ATG) was amplified by PCR using oligonucleotides 5'-TACATTTGCATAGCCCCTGG-3' and 5'-TTTCCATAGCCCTCTCCGGA-3' with HotStarTaq DNA polymerase (Qiagen) for 32 cycles with an annealing temperature of 50°C. A fragment of the β -actin gene (nucleotides -212 to -48 relative to the ATG) (13) served as internal control. PCR reactions containing either no DNA or 4 ng of genomic DNA served as negative and positive controls, respectively. PCR products were loaded onto 2% agarose gels and stained with ethidium bromide. The identity of PCR products was verified by sequencing.

4.4.6 Short interfering RNA

Stealth short interfering RNA duplexes (siRNAs) were purchased from Invitrogen. The CREB3 siRNA targets nts 302-326 (5'-GGACCCAGATGACTCCACAGCATAT-3') of the CREB3 ORF (NCBI RefSeq NM_006368). The effectiveness of this siRNA against a transiently expressed CREB3-GFP fusion protein was previously demonstrated (14) and we verified that it could also silence a transiently expressed FLAG-tagged CREB3 protein (Supplementary Figure 2). The AIBZIP siRNA targets nts 984-1008 (5'-GCCTCACGGAGTGACTTCCAGAAAT-3') of the AIBZIP ORF (NCBI RefSeq NM_130898). This target partially overlaps that of the previously described Kill-1 siRNA

(9). A Stealth siRNA targeting firefly luciferase was used as a control. 200 pmol of siRNAs were transfected in 6-cm culture dishes using Lipofectamine 2000 (Invitrogen).

4.5 Results

4.5.1 AibZIP up-regulates CREB3 protein levels

To clarify the role of AibZIP in the transcriptional programme that is activated by ER stress we have developed LNCaP cell lines that conditionally produce a recombinant form of processed AibZIP. These cell lines contain a stably integrated RheoSwitch expression construct that produces a transcriptionally active fragment of AibZIP when cells are exposed to the inducing agent RSL1 (10). The recombinant protein produced by these clones consists of the first 290 amino acids of human AibZIP fused to either one carboxy-terminal or two amino-terminal HA epitopes. The corresponding proteins are designated as A290HA and 2H290, respectively.

We previously observed that the conditional expression of A290HA in a RheoSwitch prostate cell line results in an increase in CREB3 mRNA levels (9). To further characterize the regulation of CREB3 by AibZIP we first sought to verify if the AibZIP-induced increase in CREB3 mRNA levels is accompanied by an appreciable change in CREB3 protein levels. Cells that conditionally produce A290HA were incubated in the presence or absence of RSL1 for 24 hours after which whole-cell extracts were prepared and analyzed by immunoblotting. The full-length CREB3 protein was detected using an antibody raised against the N-terminal portion of the protein.

As shown in Fig. 4.1, cells exposed to RSL1 contained a 50 kDa protein that was not present in cells that don't produce A290HA (compare lanes 1 and 2). The fact that this RSL1-induced polypeptide co-migrated with transiently expressed full-length CREB3 (lane 7) suggested strongly that it was CREB3. To further confirm the protein's identity we used a siRNA that has been shown to silence the production of a CREB3-GFP fusion protein

(14). The cells were transfected with siRNA prior to the addition of RSL1 and cell extracts were analyzed by immunoblotting. The CREB3 siRNA effectively blocked the appearance of the 50 kDa protein in RSL1-treated cells (lane 4) whereas a siRNA directed against firefly luciferase did not (lane 6), thereby confirming that the A290HA-regulated protein is CREB3.

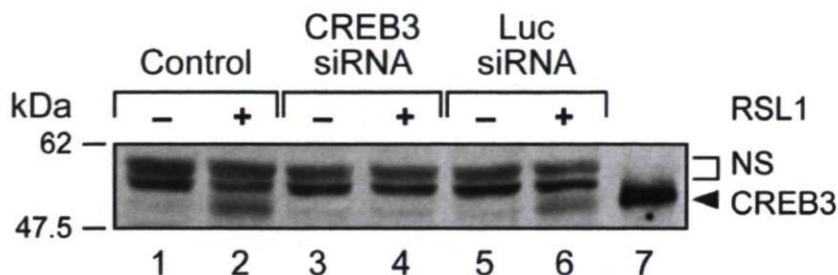


Figure 4.1: AIBZIP up-regulates CREB3 protein levels. LNCaP cells (clone 7-11) that conditionally express A290HA were cultured in the absence (-) or presence (+) of the RheoSwitch inducing agent RSL1 (500 nM) for 24 hr. Some cultures were transfected with siRNA targeting CREB3 or luciferase (Luc) as indicated. Whole-cell extracts were analyzed by immunoblotting using a polyclonal antibody against CREB3. The position of full-length CREB3 is indicated by an arrowhead. Extracts prepared from cells that were transfected with a plasmid expressing full-length recombinant CREB3 protein served as a positive control (lane 7). The non-specific bands (NS) are not visible in lane 7 because a lesser amount of protein was loaded in that lane. The data presented here are representative of at least three different experiments.

4.5.2 AIBZIP activates the CREB3 promoter via proximal response elements

Having established that AIBZIP up-regulates CREB3 mRNA and protein levels, we next sought to determine if AIBZIP regulates CREB3 promoter activity. The start codon of the CREB3 open reading frame (ORF) is located within the first exon of the gene (Fig. 4.2A). To mimic the structure of the natural CREB3 gene we amplified a 1.7 kb fragment of genomic DNA that contains the 5' untranslated region of CREB3 exon 1 and cloned it immediately upstream of the firefly luciferase ORF in the pGL3-Basic reporter plasmid. This reporter construct was transiently transfected into LNCaP cells along with a plasmid

that expresses A290HA or an empty expression vector. A plasmid that produces Renilla luciferase was co-transfected to monitor transfection efficiency.

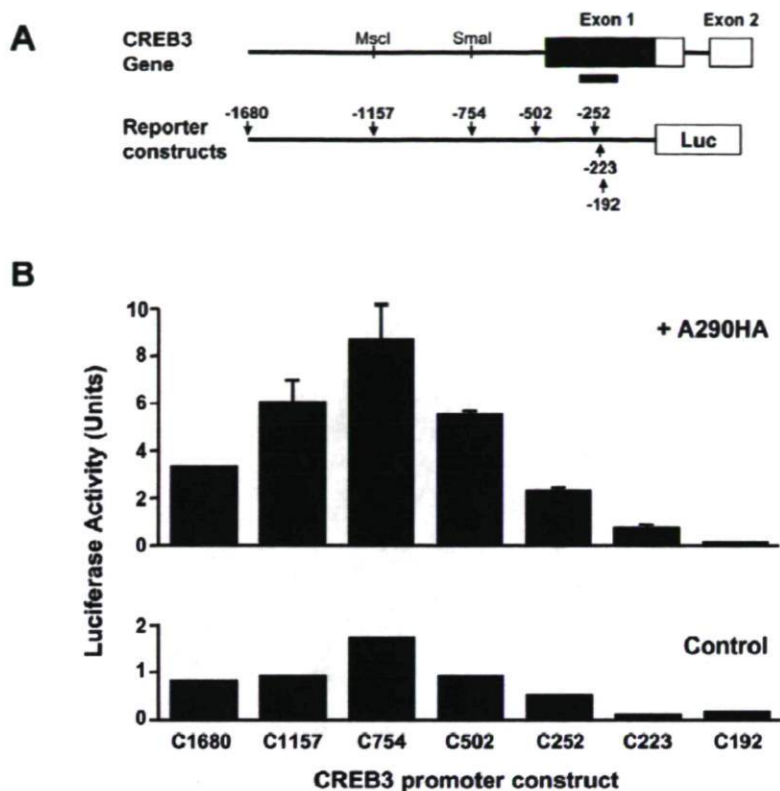


Figure 4.2: A1bZIP activates the CREB3 promoter. **(A)** Structure of the proximal CREB3 gene and promoter constructs (approximately to scale). The untranslated portion of exon 1 is represented as a black box whereas the coding portions of exons 1 and 2 are depicted as white boxes. The positions of the Msc I and Sma I sites are indicated. The portion of exon 1 that was amplified in ChIP experiments is depicted as a solid black bar below exon 1. The luciferase ORF (Luc) is positioned immediately downstream of the 5' untranslated region of the CREB3 mRNA. The 5' end of each reporter construct is indicated by an arrowhead where each number corresponds to the distance (in bp) from the CREB3/luciferase ORF. **(B)** LNCaP cells were transiently transfected with promoter constructs and a plasmid expressing the transcription factor domain of A1bZIP (+A290HA, top) or empty vector (Control, bottom). Normalized luciferase activity is expressed as the means \pm SEM of triplicate dishes (note the different scales of each graph). Only the SEM values greater than 0.1 luciferase activity units are shown. The data presented here are representative of at least three different experiments.

As shown in Fig. 2B, the full-length CREB3 promoter construct (C1680) was activated approximately 4-fold by A290HA (3.3 vs 0.8 luciferase units). To map the AlbZIP-responsive region of the promoter we then constructed a series of 5' deletion mutants and tested their response to A290HA. Deletions up to -252 relative to the ORF did not markedly reduce promoter activity or its response to A290HA: the basal activity of constructs C1157 to C252 ranged from 0.5 to 1.7 luciferase units and these constructs were activated 4.6- to 6.7-fold by A290HA. However, deletion of a discrete region within the 5' untranslated region of exon 1 noticeably reduced promoter activity. In fact, the basal activities of constructs C223 and C192 were considerably lower (0.08 and 0.14 luciferase units) than those of the longer promoter constructs. In addition, while construct C223 was activated slightly by A290HA (to 0.7 luciferase unit), construct C192 was totally unresponsive to A290HA (0.12 vs 0.14 luciferase unit).

The region of the CREB3 gene located between -223 and -192 bp relative to the ORF contains two elements that could potentially mediate transactivation by A290HA (Fig. 4.3A). The first, a CCACG sequence centered at -214, is present in three elements that are known to mediate the activation of other gene promoters during the UPR. These are the sense strands of the ER stress response element (ERSE, 5'-CCAAT-N₉-CCACG-3') (15) and the ERSE-II (16) element (5'-ATTGG-N-CCACG-3'), as well as the complementary strand of the UPR element (UPRE, 5'-TGACGTGG-3') (17, 18)). The second, a TGACG sequence centered at -199 on the complementary strand of the CREB3 promoter, corresponds to a partial ATF/CREB binding site. To determine if these elements are responsible for mediating CREB3 promoter activation by AlbZIP, they were mutated, singly and in combination, in the full-length C1680 promoter construct. The CCACG element was replaced by a Bgl II site (mutant B) whereas the TGACG element was replaced by an Xho I site (mutant X).

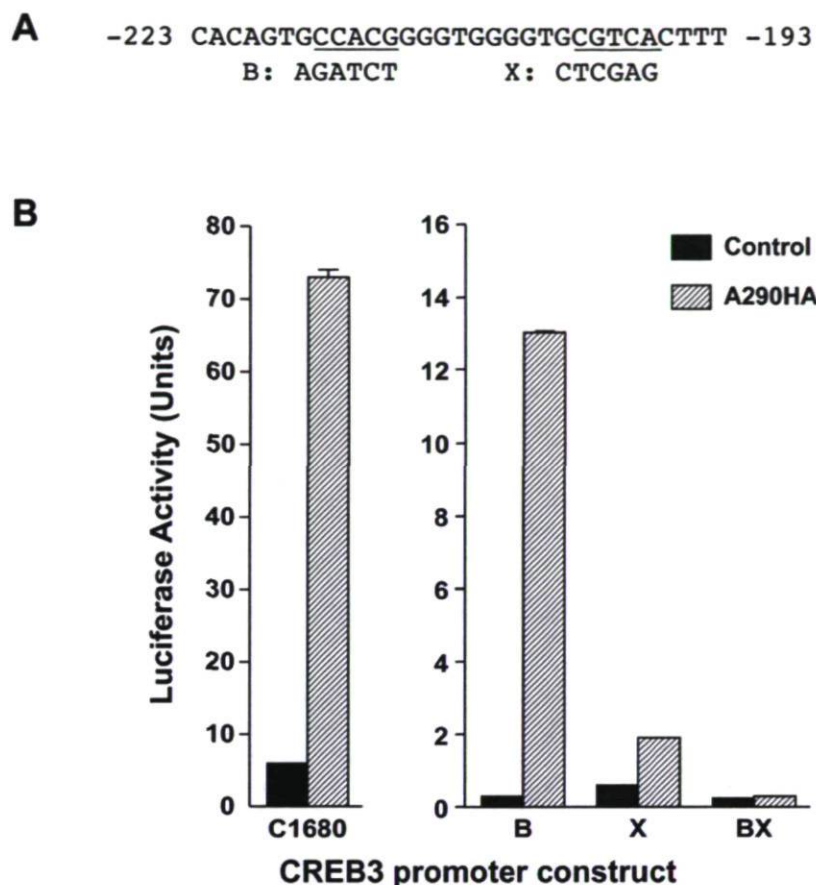


Figure 4.3: AlbZIP response elements are located in the 5' untranslated region of the CREB3 gene. **(A)** Sequence of the CREB3 gene located 193 to 223 bp upstream of the CREB3 ORF. The CCACG (sense strand) and TGACG (complementary strand) elements are underlined. These were replaced by Bgl II (mutant B) and Xho I (mutant X) restriction sites, respectively. **(B)** The wild-type CREB3 promoter construct (C1680) or the same construct containing mutation B and/or mutation X were tested as described in Fig. 2B. Only the SEM values greater than 1 (left) or 0.2 (right) luciferase activity units are shown (note the different scales of each graph). The data presented here are representative of at least three different experiments.

Mutation of the CCACG element reduced both the basal and A290HA-induced activity of the full-length promoter but the mutated promoter was still strongly activated by A290HA (Fig. 4.3B). On the other hand, mutation of the TGACG element reduced basal promoter activity by 90% and essentially abolished activation by A290HA. In fact, the induced activity of this promoter construct was approximately 70% lower than the basal

activity of the wild-type construct. Mutation of both elements simultaneously (mutant BX) reduced basal promoter activity by 96% and completely abrogated activation by A290HA. These results indicate that the TGACG element and, to a lesser extent, the CCACG element, are involved in CREB3 promoter activation by A290HA.

4.5.3 The AlbZIP-responsive region of the CREB3 promoter mediates CREB3 promoter activation in response to ER stress

We previously reported that CREB3 mRNA levels are up-regulated in A23187-treated LNCaP cells (9). To determine if the AlbZIP-responsive elements of the CREB3 promoter are implicated in the stress-induced up-regulation of CREB3, we evaluated the effect of A23187 on CREB3 promoter activity. For this purpose we constructed a plasmid that contains an HA-tagged version of CREB3 downstream of the C1680 promoter fragment, thereby placing HA-CREB3 under the control of its own promoter. A similar plasmid containing the BX mutation was also constructed and the plasmids were then transiently transfected into LNCaP cells along with a plasmid expressing the HA-tagged DNA binding domain of GAL4 (to monitor transfection efficiency). The production of HA-CREB3 was evaluated by immunoblotting. As shown in Fig. 4.4, low levels of HA-CREB3 were detected in cells transfected with the wild-type promoter construct (HC3) and a 24-hr exposure to A23187 (2 μ M) produced a marked increase in the amount of HA-CREB3. In contrast, HA-CREB3 was not detected in cells transfected with the mutated reporter construct (HC3-BX) either in the absence or presence of A23187, indicating that the AlbZIP-responsive elements of the promoter also mediate CREB3 promoter activation during A23187-induced ER stress.

4.5.4 AlbZIP binds to the CREB3 promoter *in vivo*

To confirm that AlbZIP interacts with the AlbZIP-responsive region of the CREB3 promoter *in vivo* we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) experiments in cells that conditionally express 2H290. RSL1-treated cells were fixed with formaldehyde and the chromatin associated with 2H290 was immunoprecipitated using a monoclonal anti-HA antibody. As a negative control for this experiment, identical ChIP assays were performed

in a stable line of LNCaP cells (cell line 6-6) that express the RheoSwitch transcription factors but no HA-tagged AIBZIP (10). The CREB3 promoter fragment amplified by PCR was a 164-bp fragment of exon 1 that contains both the CCACG and TGACG elements (its position is shown in Fig. 4.2A).

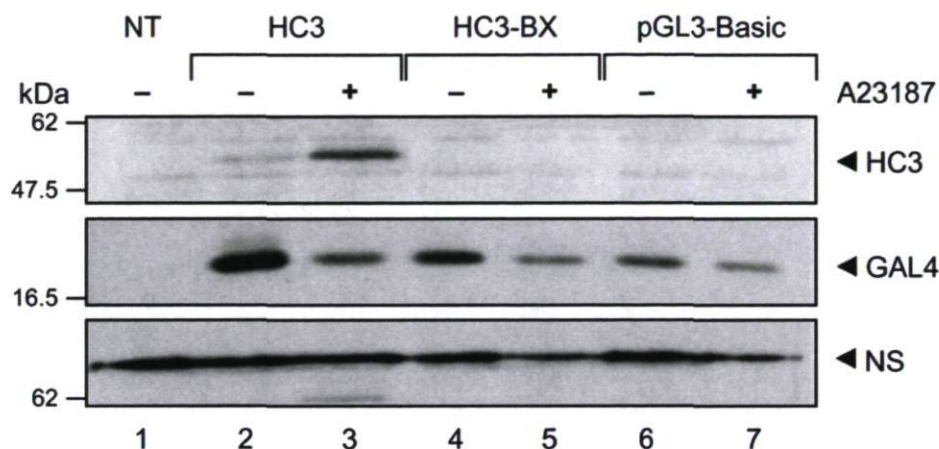


Figure 4.4: The AIBZIP-responsive elements of the CREB3 promoter mediate CREB3 induction by A23187. LNCaP cells were transiently transfected with plasmids that contain either the wild-type (HC3) or mutated (HC3-BX) 1680-bp CREB3 promoter upstream of HA-tagged CREB3. A plasmid expressing the DNA-binding domain of GAL4 fused to an HA epitope was co-transfected to monitor transfection efficiency. Whole-cell extracts were prepared after a 24 hr exposure to 2 μ M A23187 (+) or vehicle (-) and HA-tagged proteins were detected by immunoblotting using an anti-HA antibody. A non-specific band (NS) served as a loading control. The experiment shown here is representative of at least three separate experiments.

As shown in Fig. 4.5A, both the CREB3 promoter and an irrelevant promoter (the actin promoter) were present in the chromatin prior to immunoprecipitation. Neither promoter was detected when the anti-HA antibody was used to immunoprecipitate the chromatin of control cells. On the other hand, a DNA fragment corresponding to the size of the CREB3 promoter target was amplified from anti-HA immunoprecipitates of 2H290-expressing cells (lane 6). This fragment was subcloned and sequenced to confirm that it

corresponds to the CREB3 promoter. As expected, the CREB3 promoter was not immunoprecipitated by mouse serum. Similar results were obtained using a cell line that produces A290HA (data not shown).

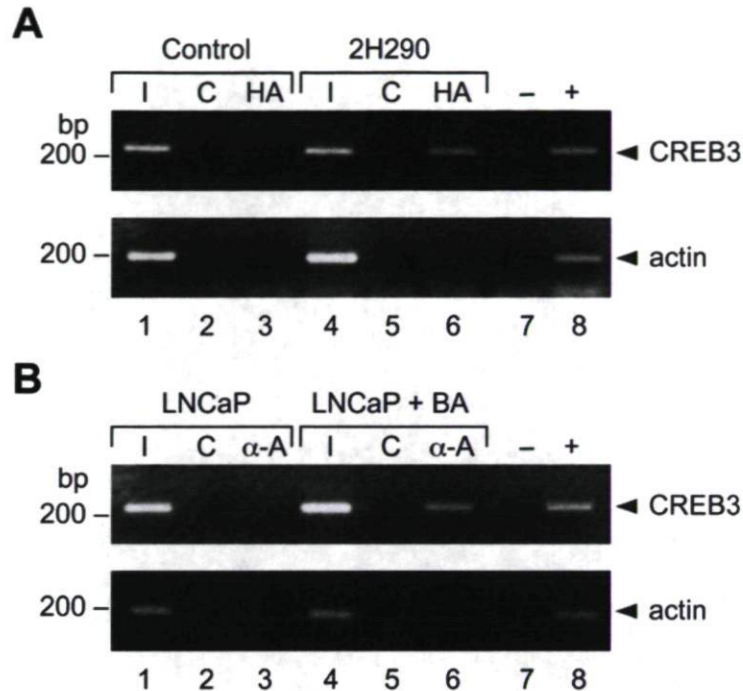


Figure 4.5: AibZIP binds to the CREB3 promoter *in vivo*. **(A)** Chromatin immunoprecipitation experiments were performed in a RheoSwitch cell line that does not produce any HA-tagged protein (Control) and in a cell line that produces a recombinant form of the N-terminal fragment of AibZIP fused to two N-terminal HA epitopes (2H290). The production of 2H290 was induced with RSL1 and the proteins were cross-linked to DNA using formaldehyde. Fragments of the CREB3 and actin promoters were amplified by PCR using cross-linked chromatin alone (I, input) or following immunoprecipitation with control (C) or anti-HA (HA) antibodies. Lane 7 is a negative control in which the PCR reactions were performed without chromatin. Lane 8 shows the CREB3 and actin promoter fragments amplified from genomic DNA. **(B)** Same as in A except that the experiments were performed in LNCaP cells or LNCaP cells exposed to brefeldin A (BA) for 5 hr (to induce the processing of endogenous AibZIP). Immunoprecipitations were performed using a mouse IgG antibody as control or a polyclonal antibody raised against the N-terminal fragment of AibZIP (α -A).

We then sought to determine if the endogenous AlbZIP protein binds to the CREB3 promoter in stressed cells. To generate the transcriptionally active form of endogenous AlbZIP we exposed LNCaP cells to brefeldin A, a drug that induces the processing of ER-bound transcription factors by RIP (19, 20). AlbZIP-chromatin complexes were immunoprecipitated using an antibody raised against the amino-terminal portion of AlbZIP (9). As shown in Fig. 4.5B, the CREB3 promoter fragment was enriched in immunoprecipitates from brefeldin A-treated LNCaP cells. These experiments demonstrate that AlbZIP associates with the proximal CREB3 promoter in LNCaP cells.

4.5.5 AlbZIP and CREB3 are activated sequentially during ER stress

To further define the sequence of events that occur during ER stress we conducted time-course experiments to compare changes in the abundance of the full-length and processed forms of AlbZIP and CREB3. LNCaP cells were exposed to A23187 (2 μ M) and harvested at regular intervals over a 24 hr period. Whole-cell or nuclear extracts were prepared at each time point and then analyzed by immunoblotting. As shown in Figs. 4.6A and 4.6B, the full-length AlbZIP protein was present at all time-points and its processed form was detected in nuclear extracts at the earliest time point examined. In contrast, the full-length and processed forms of CREB3 only became detectable after a 14-18 hr exposure to A23187. The fact that the processed form of AlbZIP precedes the appearance of full-length CREB3 is consistent with the notion that AlbZIP contributes to CREB3 up-regulation during ER stress.

To determine if AlbZIP is the sole mediator of stress-induced CREB3 up-regulation we examined the consequences of depleting AlbZIP on CREB3 protein levels in A23187-treated LNCaP cells. The cells were exposed to A23187 (2 μ M) alone or following transfection of siRNAs that target either AlbZIP or luciferase. As expected, A23187 produced a robust increase in CREB3 protein levels at 16 and 24 hr (Fig. 4.6C). While the AlbZIP siRNA reduced the amount of full-length AlbZIP protein by approximately 90% compared to control cells or cells transfected with the luciferase siRNA (compare lanes 1, 4 and 7), this reduction did not markedly affect the induction of CREB3 by A23187 (compare

lanes 2, 3, 5 and 6). These results suggest that the up-regulation of CREB3 during ER stress is not entirely dependent on AibZIP.

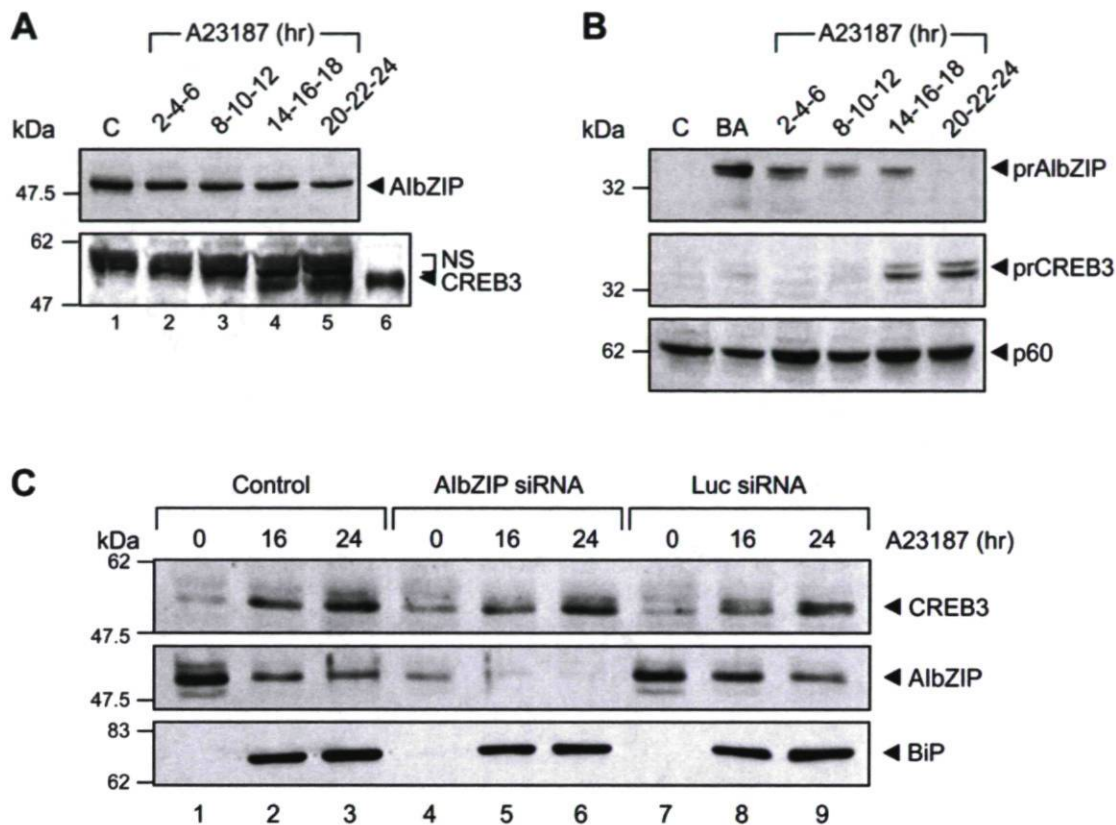


Figure 4.6: AibZIP processing precedes CREB3 up-regulation during A23187-induced ER stress. **(A)** LNCaP cells were exposed to A23187 (2 μ M) and harvested at 2-hr intervals for 24 hr. Whole-cell extracts were pooled three by three as indicated and analyzed by immunoblotting. The positions of full-length AibZIP and CREB3 are indicated. A transiently expressed full-length recombinant CREB3 protein served as a positive control for CREB3 (lane 6). **(B)** Same experiment as in A except that nuclear extracts were analyzed by immunoblotting. As a positive control, some cultures were treated with brefeldin A (BA). The positions of processed (pr) AibZIP and CREB3 are indicated. The nucleolar protein GLTSCR2 (p60) served as a loading control. **(C)** LNCaP cells were transiently transfected with AibZIP or luciferase (Luc) siRNAs as indicated and subsequently exposed to A23187 (2 μ M) for 16 or 24 hr. The full-length AibZIP and CREB3 proteins were detected by immunoblotting. The ER chaperone BiP served as a marker of A23187-induced ER stress as well as a loading control.

4.5.6 CREB3 activates its own promoter via the AIBZIP-responsive element

To identify potential regulators of CREB3 expression we examined the effects of other transcription factors that are known to be involved in the ER stress response in various cell types. ATF4 (2), the spliced form of XBP-1 (2) and the N-terminal fragments of ATF6, BBF2H7, CREB3, CREBH and OASIS were transiently expressed in LNCaP cells along with the CREB3 promoter construct. Most interestingly, this experiment revealed that CREB3 itself is a potent activator of the CREB3 promoter, increasing promoter activity approximately 40-fold (Fig. 4.7A). CREBH activated the CREB3 promoter to the same extent as did AIBZIP whereas the other transcription factors either had no effect (ATF4, BBF2H7, OASIS) or slightly reduced (ATF6, XBP-1) promoter activity. In keeping with the fact that the AIBZIP-responsive region of the CREB3 promoter mediates stress-induced promoter activation, we found that CREB3 activates the CREB3 promoter via the same elements that mediate activation by AIBZIP (Fig. 4.7B, C). In fact, mutation of the CCACG and TGACG elements, alone or in combination, significantly impaired promoter activation by CREB3. To confirm that CREB3 can interact with the CREB3 promoter *in vivo* we performed chromatin immunoprecipitation experiments in an LNCaP cell line that conditionally expresses a recombinant form of the transcriptional active fragment of CREB3 (referred to as L228HA). CREB3-chromatin complexes were immunoprecipitated using an anti-HA antibody. As shown in Fig. 4.7D, the CREB3 promoter fragment was recovered in immunoprecipitates of cells that express the N-terminal fragment of CREB3.

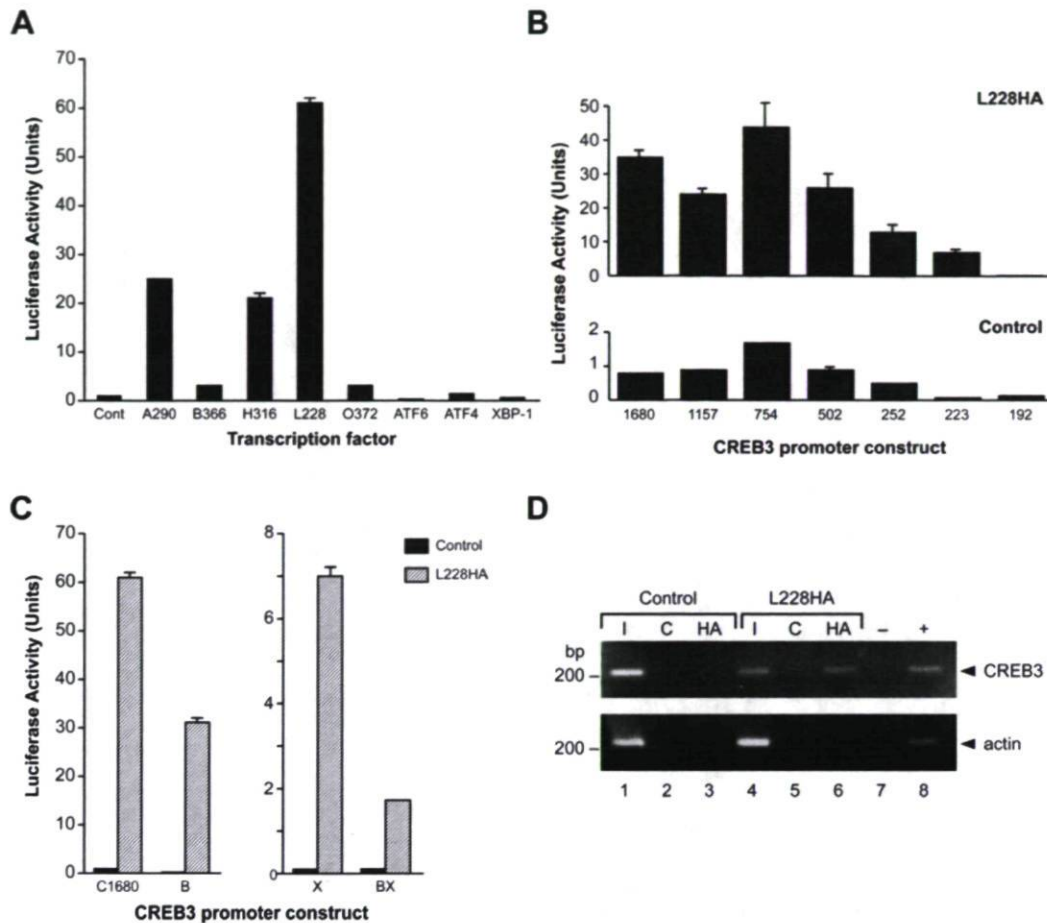


Figure 4.7: CREB3 activates the CREB3 promoter via the AlbZIP-responsive elements. (A) LNCaP cells were transiently transfected with the 1680-bp CREB3 luciferase reporter construct and plasmids expressing full-length ATF4, spliced XBP-1 or the N-terminal fragments of AlbZIP (A290), BBF2H7 (B366), CREB-H (H316), CREB3 (L228), OASIS (O372) and ATF6. (B) The CREB3 promoter constructs described in Fig. 2A were transiently transfected into LNCaP cells with a plasmid expressing the N-terminal fragment of CREB3 fused to a C-terminal HA epitope (L228HA). The data are presented as described in Fig. 2B. (C) The CREB3 promoter constructs described in Fig. 3A were transiently transfected into LNCaP cells with a plasmid expressing L228HA. The data are presented as described in Fig. 4.3B. (D) Chromatin immunoprecipitation experiments similar to those presented in Fig. 4.5A were performed in an LNCaP cell line that conditionally produces L228HA.

4.6 Discussion

The present study was undertaken to verify the hypothesis that the ER stress-regulated transcription factor AlbZIP participates in the up-regulation of CREB3 during the response to ER stress in human prostate cells. This hypothesis is supported by several observations: first, AlbZIP is processed to its transcriptionally active form during the early hours of the UPR; second, the processing of AlbZIP precedes the up-regulation of full-length CREB3; third, recombinant AlbZIP activates the CREB3 promoter; and finally, both recombinant and endogenous AlbZIP interact with the CREB3 promoter in chromatin immunoprecipitation assays. We also found that the processed form of CREB3 is generated in LNCaP cells exposed to A23187 and that the protein is capable of binding to and activating the CREB3 promoter. These observations provide a working model for the role of CREB3-like transcription factors in prostate cells. In this model, stress-induced activation of AlbZIP leads to the up-regulation of CREB3 which maintains its own expression in a self-sustaining loop (Fig. 4.8).

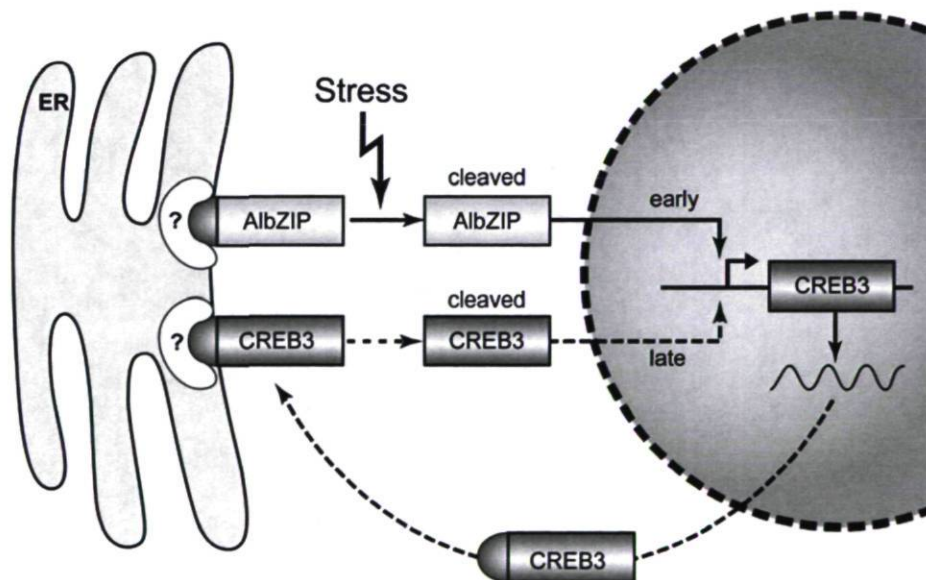


Figure 4.8: Model for CREB3 regulation by AlbZIP. The C-terminal portion of full-length AlbZIP interacts with an as yet unidentified protein in the ER. ER stress caused by a reduction in intra-ER Ca^{2+} concentration results in processing of AlbZIP by RIP. The N-terminal fragment of AlbZIP enters the nucleus where it transactivates the promoter of the CREB3 gene. CREB3 mRNA is translated to the full-length protein which subsequently

undergoes activation by RIP and moves to the nucleus to transactivate the CREB3 promoter via the same elements that mediate activation by AibZIP.

CREB3 was originally discovered as a binding partner for Host Cell Factor, a transcriptional coregulator that is recruited by viral transactivators during herpes simplex infection (21, 22). Shortly following the demonstration that ATF6 is activated by RIP, Raggio et al. reported that a transiently expressed recombinant form of CREB3 could be processed in a similar manner (23). More recently, Liang et al. demonstrated that the endogenous CREB3 protein is processed to its transcriptionally active form in cells exposed to thapsigargin (14). Taken together, the fact that AibZIP up-regulates CREB3 mRNA levels and that both AibZIP and CREB3 are activated by drugs which deplete ER Ca^{+2} stores suggests that the two proteins contribute to the cellular response to ER stress in prostate cells.

The regulation of transcription factor activity plays a key role in restoring ER homeostasis in response to ER stress. The mechanisms implicated in the activation of ATF6, ATF4 and XBP-1 and the respective roles of these transcription factors are well understood. All three transcription factors are activated when the chaperone BiP dissociates from ATF6 and two other ER-bound proteins, the endoribonuclease IRE1 and the kinase PERK (2). Activated IRE1 splices the XBP-1 transcript to yield a more potent form of XBP-1 whereas PERK augments the synthesis of ATF4 by enhancing the translation of the ATF4 transcript. On the other hand, considerably less is known regarding the role of the CREB3 family of transcription factors in this response. For instance, we do not know the identity of the proteins that bind to the C-terminal domains of CREB3-like proteins and how these regulatory proteins control their activity, nor do we know how the actions of CREB3-like proteins are coordinated with those of other stress-regulated transcription factors in different cell types.

In this regard, the present study provides novel insight into the sequence of events that occur in prostate cells that undergo ER stress. In cells exposed to A23187, stress-induced processing of AibZIP is an early event whereas processing of CREB3 is detected

approximately 12 hr later. Interestingly, the processed forms of AibZIP and CREB3 co-exist temporarily in the nucleus whereas only CREB3 is present at later time points. These observations suggest that AibZIP and CREB3 target distinct subsets of genes that are activated during the early and late phases of the ER stress response, respectively. However, it is also possible that the two proteins could regulate a common set of genes and that AibZIP might function to 'prime' some genes for subsequent regulation by CREB3. Given the structural similarity between AibZIP and the liver-specific protein CREBH (5), it would be of interest to determine if CREBH activates CREB3 expression in hepatocytes.

A key finding of the present study is that the N-terminal fragment of CREB3 activates the CREB3 promoter. The appearance of the processed form of CREB3 in nuclear extracts coincided with the appearance of the full-length protein, which suggests that the latter is rapidly processed to its transcriptionally active form in cells exposed to A23187, thereby ensuring continued production of CREB3 in cells continuously exposed to a stress-inducing agent. Interestingly, while both the CCACG and TGACG elements of the CREB3 promoter are involved in activation by AibZIP and CREB3, the TGACG element seems to be the more important of the two elements as evidenced by the fact that mutation of this element had a more profound influence on promoter activity than mutation of the CCACG element. Additional studies will be required to determine how these sites are occupied by the processed forms of AibZIP and CREB3 during the ER stress response.

The elements involved in the activation of the CREB3 promoter during ER stress are distinct from those involved in CREB3 up-regulation by Lkn-1 in monocytes (24). The finding that CCACG-containing and CRE-like elements mediate transactivation by the processed form of CREB3 is consistent with previous reports. It has been demonstrated that CREB3 binds to the CRE element *in vitro* and activates CRE-containing promoters (22, 25). CREB3 can also activate transcription through UPRE (26) and ERSE-II elements. The ERSE-II element has been reported to be the important response element in Herp regulation by CREB3 (14). Herp is a protein involved in ER stress associated protein degradation (ERAD). As far as AibZIP is concerned, both the human protein (our unpublished data) and the mouse homolog of AibZIP, referred to as Tisp40, can bind to the UPRE and

activate transcription through this element (27). Interestingly, when Tisp40 is associated with CREM τ during spermiogenesis, the complex only binds to CREs (28).

Although the bulk of the data presented here supports a role for AibZIP in the induction of CREB3 expression, silencing of AibZIP using siRNA did not abrogate the up-regulation of CREB3 in A23187-treated prostate cells. There are several possible explanations for this observation. First, it is possible that the amount of full-length AibZIP that remained in siRNA-treated cells was sufficient to induce the production of full-length CREB3 which could then generate the potent N-terminal fragment of CREB3. Although we could not detect the N-terminal fragment of AibZIP in nuclear extracts of siRNA-transfected cells following exposure to A23187 (data not shown), the possibility that undetectable amounts of nuclear AibZIP could induce CREB3 expression cannot be excluded. Second, it is possible that LNCaP cells contain undetectable levels of CREB3 which, given the potency of its N-terminal fragment, are sufficient to induce CREB3 expression. Finally, it is possible that other stress-regulated transcription factors might activate CREB3 expression via portions of the CREB3 gene that were not examined in this study. Such redundancy would not be unexpected in such a critical biological pathway.

Considering that CREB3 activates its own expression, it is interesting to consider how AibZIP might contribute to CREB3 expression in cells that express CREB3 under basal conditions. The answer to this may lie in the fact that cellular CREB3 inhibitors could potentially interfere with the up-regulation of CREB3 during ER stress. Indeed, a number of proteins have been shown to interact with the N-terminal fragment of CREB3 and inhibit its transcriptional activity. These include Zhangfei (29), host cell factor-like kelch repeat protein-1 (30) and Luman/CREB3 recruitment factor (LRF) (31). Thus, under conditions where CREB3 activity is antagonized by one or more of these inhibitors, it is reasonable to speculate that the activation of CREB3 expression by AibZIP would allow the cell to produce enough CREB3 to ensure an appropriate response to ER stress.

To conclude, the results of this study provide novel insight into the organization of the ER stress response and open the way to a more detailed investigation of the gene

networks that are regulated by different CREB3-like transcription factors during the response to ER stress.

4.7 Funding

This work was supported by a Canadian Institutes of Health Research (CIHR) operating grant (MOP-77599) to CL and a CIHR studentship (MDR-85336) to JL.

4.8 Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the generosity of Vikram Misra who provided the CREB3 antibody and the helpful advice of Ian de Belle and Alexandre Blais for chromatin immunoprecipitation assays.

4.9 References

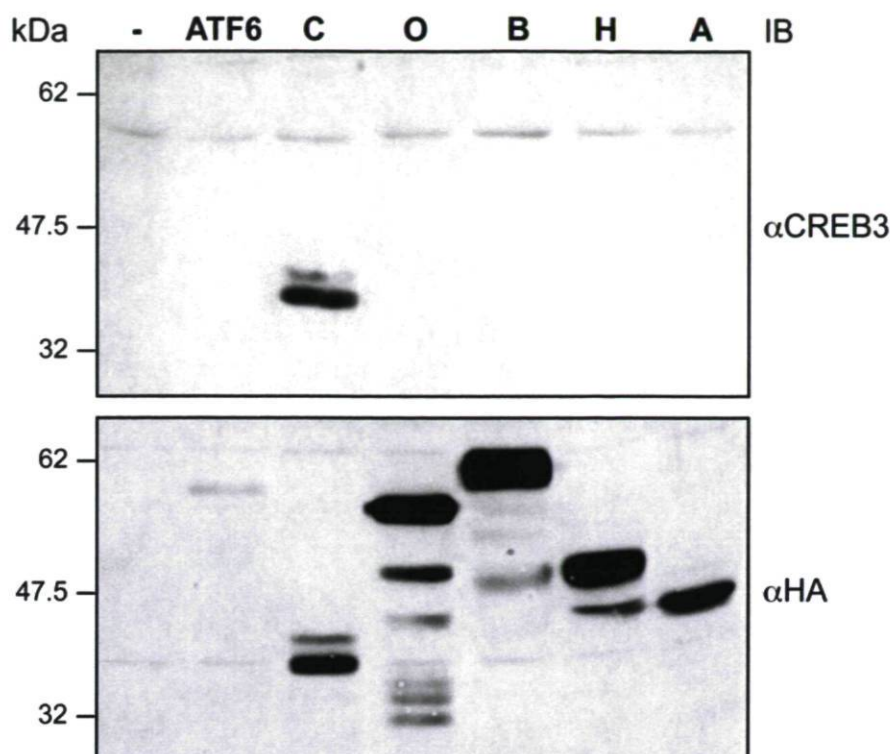
1. Csala,M., Banhegyi,G. and Benedetti,A. (2006) Endoplasmic reticulum: a metabolic compartment. *FEBS Lett.*, **580**, 2160-2165.
2. Malhotra, J.D. and Kaufman R.J. (2007) The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Semin. Cell Dev. Biol.*, **18**, 716-731.
3. Bailey,D. and O'Hare, P. (2007) Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signalling and the unfolded protein response. *Antioxid. Redox. Signal.*, **9**, 2305-2321.
4. Labrie,C., Lessard,J., Ben Aicha,S., Savard,M.P., Pelletier,M., Fournier,A., Lavergne,E. and Calvo,E. (2008) Androgen-regulated transcription factor A1bZIP in prostate cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **108**, 236-244.
5. Qi,H., Fillion,C., Labrie,Y., Grenier,J., Fournier,A., Berger,L., El-Alfy,M. and Labrie,C. (2002) A1bZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res.*, **62**, 721-733.

6. Cunha,A.C., Weigle,B., Kiessling,A., Bachmann,M. and Rieber,E.P. (2006) Tissue-specificity of prostate specific antigens: Comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues. *Cancer Lett.*, **236**, 229-238.
7. Lévesque,M.H., El-Alfy,M., Berger,L., Labrie,F. and Labrie,C. (2007) Evaluation of AIBZIP and Cdc47 as markers for human prostatic diseases. *Urology*, **69**, 196-201.
8. Schmidt,U., Fuessel,S., Koch,R., Baretton,G.B., Lohse,A., Tomasetti,S., Unversucht,S., Froehner,M., Wirth,M.P. and Meye,A. (2006) Quantitative multigene expression profiling of primary prostate cancer. *Prostate*, **66**, 1521-1534.
9. Ben Aicha,S., Lessard,J., Pelletier,M., Fournier,A., Calvo,E. and Labrie,C. (2007) Transcriptional profiling of genes that are regulated by the endoplasmic reticulum-bound transcription factor AIBZIP/CREB3L4 in prostate cells. *Physiol. Genomics*, **31**, 295-305.
10. Lessard,J., Ben Aicha,S., Fournier,A., Calvo,E., Lavergne,E., Pelletier,M. and Labrie,C. (2007) Characterization of the RSL1-dependent conditional expression system in LNCaP prostate cancer cells and development of a single vector format. *Prostate*, **67**, 808-819.
11. Lu, R. and Misra, V., (2000) Potential role for Luman, the cellular homologue of Herpes Simplex virus VP16 (α -gene trans-inducing factor) in Herpesvirus latency, *J. Virol.*, **74**, 934-943.
12. Bruni,R., Fineschi,B., Ogle,W.O. and Roizman,B. (1999) A novel cellular protein, p60, interacting with both herpes simplex virus 1 regulatory proteins ICP22 and ICP0, is modified in a cell-type-specific manner and is recruited to the nucleus after infection, *J. Virol.*, **5**, 3810-3817.
13. Takahashi, Y., Rayman, J.B. and Dynlacht B.D. (2000) Analysis of promoter bonding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression, *Genes Dev.*, **14**, 804-816.
14. Liang,G., Audas,T.E., Li,Y., Cockram,G.P., Dean,J.D., Martyn,A.C., Kokame,K. and Lu,R. (2006) Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 7999-8010.

15. Yoshida, H., Haze, K., Yanagi, H., Yura, T. and Mori, K. (1998) Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 33741-33749.
16. Kokame, K., Kato, H. and Miyata, T. (2001) Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **12**, 9199-9205.
17. Wang, Y., Shen, J., Arenzana, N., Tirasophon, W., Kaufman, R.J. and Prywes, R. (2000) Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J. Biol. Chem.* **275**, 27013-27020.
18. Yoshida, H., Matsui, T., Hosokawa, N., Kayfman, R.J., Nagata, K. and Mori, K. (2003) A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell.* **4**, 265-271.
19. DeBose-Boyd, R.A., Brown, M.S., Li, W.-P., Nohturfft, A., Goldstein, J.L. and Espenshade, P.J. (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from golgi to ER obviates the need for SREBP transport to golgi. *Cell.* **99**, 703-712.
20. Sciaky, N., Presley, J., Smith, C., Zaal, K.J., Cole, N., Moreira, J.E., Terasaki, M., Siggia, E. and Lippincott-Schwartz, J. (1997) Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells. *J. Cell Biol.*, **139**, 1137-1155.
21. Freiman, R.N. and Herr, W. (1997) Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP. *Genes Dev.*, **11**, 3122-3127.
22. Lu, R., Yang, P., O'Hare, P. and Misra, V. (1997) Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 5117-5126.
23. Raggio, C., Rapin, N., Stirling, J., Gobeil, P., Smith-Windsor, E., O'Hare, P. and Misra, V. (2002) Luman, the cellular counterpart of Herpes Simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 5639-5649.
24. Jang, S.W., Kim, Y.S., Kim, Y.R., Sung, H.J. and Ko, J. (2007) Regulation of human LZIP expression by NF- κ B and its involvement in monocyte cell migration induced by Lkn-1. *J. Biol. Chem.*, **282**, 11092-11100.

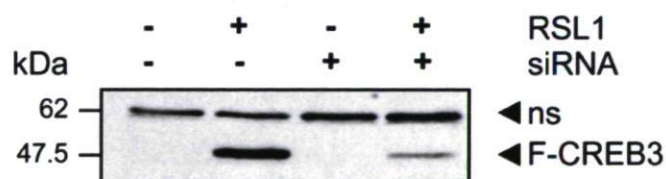
25. Lu, R., Yang,P., Padmakumar, S and Misra V. (1998) The herpesvirus transactivator VP16 mimics a human basic domain leucine zipper protein, Luman, in its interaction with HCF. *J. Virol.*,**72**, 6291-6297.
26. DenBoer, L.M., Hardy-Smith,P.W., Hogan, M.R., Cockram,G.P, Audas,T.E. and Lu,R. (2005) Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **331**, 113-119.
27. Nagamori,I., Yabuta,N., Fujii,T.,Tanaka,H., Yomogida,K., Nishimune,Y. and Nojima,H. (2005) Tisp40, a spermatid specific bZIP transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via RIP pathway. *Genes Cells*, **6**, 575-594.
28. Nagamori,I., Yomogida,K., Adams,P.D., Sassone-Corsi,P. and Nojima,H. (2006) Transcription factors, cAMP-responsive element modulator (CREM) and Tisp40, act in concert in postmeiotic transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.*, **281**, 15073-15081.
29. Misra,V., Rapin,N., Akhova,O., Bainbridge,M. and Korchinski,P. (2005) Zhangfei is a potent and specific inhibitor of the host cell factor-binding transcription factor Luman. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15257-15266.
30. Zhou,H.J., Wong,C.M., Chen,J.H., Qiang,B.O., Yuan,J.G. and Jin,D.Y. (2001) Inhibition of LZIP-mediated transcription through direct interaction with a novel host cell factor-like protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 28933-28938.
31. Audas,T.E., Li,Y., Liang,G. and Lu,R. (2008) A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response. *Mol. Cell. Biol.*, **28**, 3952-3966.

4.10 Supplementary material



Supplementary Figure 1: CREB3 antibody specificity

LNCaP cells were transiently transfected with plasmids that express HA-tagged versions of the transcription factor domains (N-terminal fragments) of (from left to right) ATF6, CREB3 (C), OASIS (O), BBF2H7 (B), CREBH (H) or AIBZIP (A). Protein blots were incubated with anti-CREB3 (top) and anti-HA (bottom) antibodies.



Supplementary Figure 2: CREB3 siRNA specificity

A RheoSwitch clone of LNCaP cells (clone 48-5) that conditionally expresses a FLAG-tagged version of full-length CREB3 (F-CREB3) was cultured with or without RSL1 and/or the Stealth siRNA (siRNA755) as indicated. The position of F-CREB3 is indicated by an arrowhead.

Chapitre 5 : Discussion et conclusion

5.1 Discussion

Pour résumer brièvement les chapitres précédents, je dirais que mes travaux ont donné lieu à des publications pertinentes dans le contexte du rôle d'AibZIP dans l'adaptation au stress des cellules prostatiques cancéreuses. D'abord, le système RheoSwitch modifié est très utile et employé quotidiennement pour exprimer une protéine d'intérêt dans les LNCaP, ce qui constitue un outil important pour l'atteinte de nos objectifs de recherche. Il fut d'ailleurs utilisé pour les deux chapitres suivants où sont présentés des résultats concernant le clivage d'AibZIP, ses cibles transcriptionnelles et la caractérisation plus approfondie de la régulation de CREB3 par AibZIP et le stress du RE. AibZIP est donc un facteur de transcription clivé en réponse à certains agents qui diminuent les concentrations calciques au RE et il est en mesure d'activer la transcription de plusieurs cibles variées. AibZIP module l'expression de CREB3 via des éléments semblables à ERSE et CRE. CREB3 est également soumis au clivage par RIP dans les LNCaP traitées avec l'ionophore de calcium A23187, le même agent qui provoque fortement le clivage d'AibZIP. Cette discussion apportera des éléments de réflexion supplémentaires aux résultats déjà présentés et traitera également de quelques résultats non publiés qui sont pertinents à la poursuite des travaux. J'ajouterai au cours de cette section des perspectives de travail qui pourront être investiguées ultérieurement par l'équipe du Dr Labrie.

L'article portant sur le système d'expression inductible RheoSwitch présente l'élaboration et la caractérisation d'un système inductible modifié qui s'est avéré simple d'utilisation et d'une grande efficacité. Il faut rappeler que la transfection d'un seul plasmide exprimant à la fois les facteurs de transcription, sous le contrôle d'un promoteur constitutif et le gène d'intérêt, sous le contrôle du promoteur inductible GAL4, facilite grandement le processus de génération de la lignée inductible. La plupart des systèmes nécessitent deux transfusions consécutives de plasmides, mais le système RheoSwitch modifié limite les manipulations et les risques de mortalité cellulaire. Il s'agit d'un grand avantage quand on sait que bon nombre de lignées cellulaires résistent très difficilement à la toxicité des agents transfectants.

Toutes les expériences réalisées avec le système confirment qu'il répond aux caractéristiques d'un bon système, soit un effet minimal sur les cellules, une expression importante de la protéine d'intérêt et l'absence d'expression basale. Il est très satisfaisant de constater que sur les 54 000 sondes contenues sur les puces Affymetrix, seulement 6 sondes ont révélé une augmentation significative de leur expression suite à l'ajout de RSL1 aux cellules LNCaP qui expriment les facteurs RheoSwitch (clone 6.6). Après validation par buvardage de type Northern, seulement 2 gènes ont présenté une augmentation de l'ARN après traitement avec RSL1. Ces gènes sont *JUN* et *SLC16A6*. L'induction de JUN peut amener quelques interrogations quant à ses effets possibles dans les cellules. JUN est un facteur de transcription bZIP ayant un potentiel oncogénique documenté et impliqué dans le contrôle d'un grand nombre de fonctions cellulaires. Par exemple, il a été rapporté que JUN favorise l'invasion des cellules mammaires cancéreuses [139] et qu'il affecte aussi la prolifération des cellules prostatiques cancéreuses [140]. Il ne semble pas que l'augmentation des niveaux d'ARNm de JUN constitue un véritable obstacle à l'utilisation du système inductible RheoSwitch pour identifier les cibles d'AlbZIP. D'abord, il est important de considérer que la prolifération des LNCaP soumises à l'effet de RSL1 n'est pas affectée de même que celle de clones stables exprimant les facteurs RheoSwitch. Cela suggère que JUN ne cause pas de prolifération anormale des cellules. De plus, les micropuces à ADN réalisées ont été hybridées avec du matériel ayant été exposé pendant 24 heures au ligand RSL1. Il est donc fort raisonnable de croire qu'une induction de cibles transcriptionnelles de JUN aurait été observée dans ces conditions, ce qui n'a pas été le cas et qui nous permet de conclure en un effet extrêmement négligeable de RSL1 sur la transcription dans les cellules LNCaP. Dernier élément à souligner, la démonstration de l'induction de JUN a été réalisée sur l'ARN et rien n'indique que la protéine soit traduite et présente, ce qui expliquerait l'absence de cibles de JUN dans nos résultats de puces. Au sujet du second gène régulé par RSL1, les membres de la famille SLC16A permettent le transport des monocarboxylates [141] et seulement deux articles publiés portent sur le transporteur SLC16A6. L'un de ces articles rapporte que SCL16A6 est régulé par les androgènes dans les cellules humaines prostatiques [142], ce qui m'interpelle un peu compte tenu du contexte cellulaire qui est le même que celui des présents travaux. Toutefois, aucune donnée ne démontre le rôle physiologique de SLC16A6 dans la prostate

et l'impact de la surexpression d'un transporteur de petites molécules dans la cellule risque d'y être assez mineur. Comme il a été démontré que les cellules se comportent normalement, il n'y a pas eu lieu de douter du système pour la poursuite des travaux.

Le troisième chapitre aborde le clivage d'AlbZIP, qui est à la base de toute son activité et de ses fonctions potentielles. Toutes les équipes de recherche travaillant sur les facteurs CREB3 ont voulu démontrer que ces protéines sont clivées par le mécanisme RIP. La découverte des agents et conditions causant le clivage est la première étape logique à la caractérisation de ces facteurs. Les travaux sur la réponse UPR et ATF6, qui ont précédé dans le temps ceux portant sur les facteurs CREB3, ont guidé le choix des agents et des approches. La brefeldin A est la drogue de choix et agit quelque peu en tant que contrôle positif du clivage par RIP, car elle provoque la relocalisation des protéases S1P et S2P de l'appareil de Golgi au RE. L'étape subséquente est d'identifier des agents, autre que la brefeldin A, pouvant causer un stress telles que le DTT, la tunicamycine et la thapsigargine. Afin de confirmer que le clivage est conséquent à l'activité de la protéase S1P, des expériences de cotransfection avec la protéase S1P dotée d'un signal de localisation au RE ont couramment été réalisées avec les facteurs CREB3. Une seconde approche dans le cas de la protéase S1P consiste à muter une forme recombinante d'un facteur de transcription dans son site de clivage pour S1P, soit la séquence RXXL. Toutes ces approches ont permis à plusieurs équipes de confirmer le clivage des facteurs CREB3, OASIS, BBF2H7, CREB-H et AlbZIP par la protéase S1P et par des agents qui causent un stress du RE.

Parmi les facteurs de la famille CREB3, le clivage d'AlbZIP me semble le moins bien documenté. À ce sujet, il y a eu description du clivage de la protéine Tisp40 α recombinante dans des cellules HEK293, des cellules couramment utilisées pour effectuer des transfections. En 2005, l'équipe du Dr Nojima a démontré qu'une forme murine d'AlbZIP recombinante, la protéine Tisp40 α , est clivée par une forme recombinante de S1P-KDEL, qui est localisée au RE, alors qu'elle ne l'est pas par une forme S1P-KDAS qui n'est pas au RE. Ils ont également publié le clivage d'une forme recombinante de Tisp40 α sous l'effet de la brefeldin A, mais ce clivage était relativement faible et peu visible par immunobuvardage [129]. L'équipe du Dr O'Hare a, pour sa part, publié des données concernant le clivage de la forme humaine d'AlbZIP, mais leurs travaux n'ont pas

démontré un clivage d'AlbZIP. Ils ont plutôt décrit un phénomène de résistance au clivage lors de la transfection d'une forme recombinante d'AlbZIP. La figure 5.1 présente les résultats qu'ils ont obtenus suite à leurs expériences de clivage. On y voit qu'ils n'ont pas réussi à cliver AlbZIP, mais qu'ils ont toutefois clivé CREB3. Cette équipe a ensuite produit une protéine hybride d'AlbZIP couplée au domaine C-terminal de CREB3 (incluant le site S1P et le domaine transmembranaire) et a obtenu le clivage de l'hybride par la brefeldin A. Un second hybride, qui ne possède pas la portion C-terminal d'AlbZIP, mais possédant toujours le site S1P d'AlbZIP, a également été clivé par la brefeldin A, suggérant ainsi un rôle de régulateur de clivage pour le C-terminal d'AlbZIP [128].

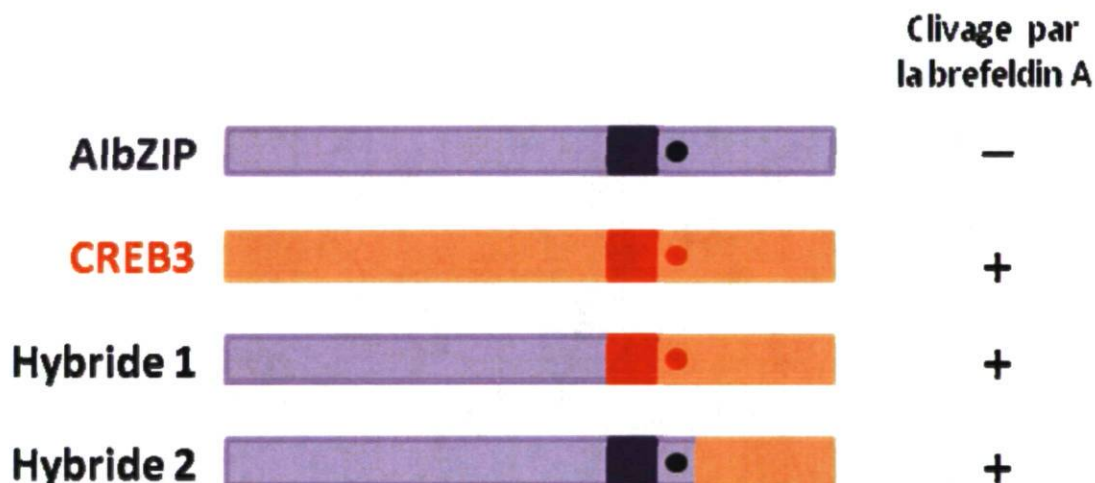


Figure 5.1 : Résultats des tests de clivage obtenus par l'équipe du Dr O'Hare sur AlbZIP et CREB3 et deux hybrides AlbZIP-CREB3. La forme recombinante d'AlbZIP n'a pas été clivée suite à un traitement avec la brefeldin A, alors que CREB3, et les deux hybrides AlbZIP-CREB3 ont été clivés par les effets de la drogue. L'hybride 1 contient la portion C-terminale de CREB3 (incluant le domaine transmembranaire et le site S1P-●), alors que l'hybride 2 est constitué de la portion C-terminale de CREB3 excluant les domaines transmembranaires et le site S1P, qui demeurent ceux d'AlbZIP (●). (Adapté de Stirling et al. [128])

Suite à ces informations, il devenait primordial pour mes travaux de documenter davantage le clivage d'AibZIP par des agents qui affectent l'état de stress du RE, mais aussi d'investiguer le clivage de la protéine endogène. Les expériences réalisées à ce sujet dans mon équipe ont permis de conclure qu'il est essentiel d'utiliser des extraits nucléaires pour s'assurer de ne pas omettre des informations importantes ou de perdre du temps à tenter de mettre en évidence des formes clivées qui pourraient être diluées dans des extraits totaux. Les extraits nucléaires ont été essentiels pour démontrer que la protéine AibZIP endogène est clivée, dans les cellules de cancer de prostate LNCaP, par des agents qui affectent les concentrations calciques au RE. Pour revenir sur les travaux du Dr O'Hare, il est possible qu'une forme recombinante d'AibZIP, transfectée dans des cellules qui ne l'expriment normalement pas, ne se comporte pas comme elle le ferait normalement dans son contexte naturel. Les cellules ayant des fonctions spécifiques et un profil d'expression en conséquence, il se pourrait, dans certains contextes cellulaires, qu'un ou plusieurs cofacteurs impliqués dans une fonction bien précise au type cellulaire soient absents. Par exemple, il est intéressant de noter que dans un article portant sur l'activité transcriptionnelle du facteur CREB3, celui-ci était en mesure d'activer la transcription via CRE uniquement lorsqu'il était présence de HCF [90], alors que d'autres ouvrages ont ensuite décrit son activité transcriptionnelle indépendante du HCF via différents éléments (UPRE [100], ERSE-II [102]). Je crois donc que les équipes des Drs Nojima et O'Hare auraient eu intérêt à travailler avec les protéines endogènes dans leur contexte naturel et à enrichir les protéines nucléaires.

Il est surprenant de constater que peu d'équipes se sont attardées, ou ont réussi, à démontrer le clivage des formes endogènes dans des contextes physiologiques. L'équipe du Dr Nojima a mentionné, dans la discussion de son article portant sur le clivage de Tisp40 α [129], que « Tisp40 est clivé par le mécanisme RIP au stade intermédiaire de la spermiogénèse ». Sans être complètement erroné, il me semble que ce ne soit pas tout à fait juste. Tisp40 est bien exprimée au stade intermédiaire de la spermiogénèse [130, 143] et Tisp40 est bien clivé par le mécanisme RIP [129], mais aucune évidence ne démontre que la forme nucléaire de la protéine Tisp40 est présente au stade indiqué de la spermiogénèse. Il est important de distinguer l'expression et le clivage, deux événements pouvant survenir suite à des stimuli différents. Cet aspect a été relativement bien développé dans un article

portant sur OASIS [108] où il a été démontré que son expression est augmentée suite à l'expression de BMP2 et ils ont également montré un clivage d'OASIS suite à cette induction. Lorsqu'on s'attarde aux connaissances connues sur AIBZIP dans la prostate, les expériences de localisation précédemment décrites dans l'introduction [1, 127] ont été réalisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre la partie C-terminale d'AIBZIP, donc qui cible la forme pleine longueur. Ces travaux permettent donc de dire que la protéine pleine longueur AIBZIP est plus abondante dans des tissus prostatiques cancéreux par rapport aux tissus sains, mais ces résultats ne révèlent rien quant à la présence de la forme nucléaire dans le cancer de la prostate. C'est en songeant à cet aspect que j'ai tenté d'observer la forme nucléaire d'AIBZIP dans des cellules LNCaP traitées avec l'androgène R1881. Après avoir fait des extraits nucléaires, j'ai été incapable de détecter la forme nucléaire d'AIBZIP, sans néanmoins pouvoir nier toute absence de cette protéine, ma méthode n'étant peut-être pas assez sensible. Une question se pose alors : quel stimulus est en mesure de cliver la forme endogène d'AIBZIP suite à son induction par les androgènes dans des cellules cancéreuses prostatiques? C'est une question que j'ai longuement investiguée tout en ayant en tête qu'un stress susceptible de perturber les cellules peut l'être en fonction du type et des fonctions cellulaires.

J'ai démontré qu'AIBZIP est clivé par des agents qui affectent les concentrations calciques au RE. Bien que ces données confirment le clivage de la protéine endogène, les effets d'une déplétion de calcium sont assez généraux et ne nous renseignent pas sur les fonctions d'AIBZIP dans les cellules prostatiques cancéreuses. C'est pourquoi j'ai tenté d'identifier d'autres conditions pouvant induire le clivage d'AIBZIP. Les résultats obtenus n'ont pas été publiés, mais les figures sont incluses dans cette section pour faciliter la compréhension des résultats (figures 5.2 et 5.3).

Pour tenter de cliver AIBZIP, j'ai traité les LNCaP avec différents agents de manière à affecter le RE sur le plan de sa synthèse de lipides, de son apport en oxygène, etc. De plus, suite à l'obtention des résultats de micropuces identifiant les cibles d'AIBZIP, je me suis attardé sur leur fonction possible et j'ai tenté de perturber des voies de signalisation impliquant des gènes cibles dans les LNCaP. Comme on sait que le RE est un site de synthèse de lipides et que le facteur de transcription « *Sterol Regulatory Element Binding*

Protein » (SREBP) est soumis à la régulation par RIP lorsqu'il y a un déséquilibre de la synthèse de lipides [144-145], j'ai vérifié si AlbZIP pouvait aussi être clivé en réponse à un manque de lipides. Tel que démontré aux figures 5.2 et 5.3, la culture de LNCaP avec du sérum sans lipides (*Lipid-depleted serum-LDS*) a permis d'observer une diminution de la protéine AlbZIP pleine longueur mais la forme nucléaire n'a pas été mise en évidence après 24 heures sans lipide. Comme l'effet sur la protéine pleine longueur est davantage marqué après 48 heures sans lipide, il serait envisageable de réaliser une expérience sur une plus longue période de temps.

J'ai également traité des cellules avec les métaux lourds chlorure de cadmium (CdCl_2) et chlorure de cobalt (CoCl_2), un composé qui mime l'hypoxie, car il est rapporté que l'expression de la cible d'AlbZIP BAG3 est induite par ces substances [146]. L'expression de BAG3 est également augmentée par un traitement thermique [146], condition qui fut également testée dans mes travaux. BAG3 est une chaperonne ayant un effet anti-apoptique qui module l'activité de la chaperonne Hsp70. L'effet du CdCl_2 sur la forme pleine longueur fut négligeable, mais un effet a été observé sur AlbZIP pleine longueur avec le CoCl_2 sans toutefois obtenir un effet important sur l'apparition d'une forme nucléaire. Les résultats avec le CoCl_2 ont ouvert une voie intéressante qui pourrait faire l'objet d'expériences supplémentaires. En effet, il serait intéressant de démontrer à l'aide d'une chambre hypoxique que c'est bien l'hypoxie qui affecte la protéine AlbZIP et de quelle manière la protéine pleine longueur est affectée par cette condition, ce qui permettrait de faire un lien avec le cancer. En ce qui concerne le traitement à la chaleur (42°C - Heat Shock), la figure D.3B révèle un effet potentiellement très important sur AlbZIP, dont l'anticorps reconnaît plusieurs formes. Il sera intéressant d'employer un siRNA dirigé contre AlbZIP pour confirmer l'identité des bandes observées.

La figure D.2A présente aussi l'effet des agents pharmacologiques AA861, ETYA, Ibuprofen et MK886 qui sont toutes des substances qui affectent les voies de synthèse des eicosanoïdes qui sont médiées par les enzymes COX et LOX. La cible d'AlbZIP PLA2G2A est une phospholipase qui rend disponible l'acide arachidonique pour les enzymes COX et LOX. Cette cible est intéressante dans le contexte du cancer de la prostate car les phospholipases A2 sont responsables de la libération d'acide arachidonique à partir

de phospholipides membranaires. Ces acides ainsi disponibles sont convertis par les enzymes LOX et COX en eicosanoïdes susceptibles de favoriser la croissance et la survie des cellules. Il a été démontré qu'une inhibition de l'enzyme LOX par la drogue MK668 favorise l'apoptose des cellules humaines de cancer de la prostate [147]. Les agents AA861 et ETYA inhibent également l'enzyme LOX, alors que l'ibuprofène inhibe l'enzyme COX [148]. De plus, l'expression de PLA2G2A serait plus abondante dans les cancers colorectaux [149] et intestinaux [150]. L'inhibition des enzymes COX et LOX n'a toutefois pas donné les résultats escomptés puisque la forme pleine longueur d'A1bZIP n'a pas été affectée par les agents testés. Des extraits nucléaires n'ont pas été réalisés pour tenter d'y voir l'apparition de la forme nucléaire, ce qui devra être réalisé dans le futur.

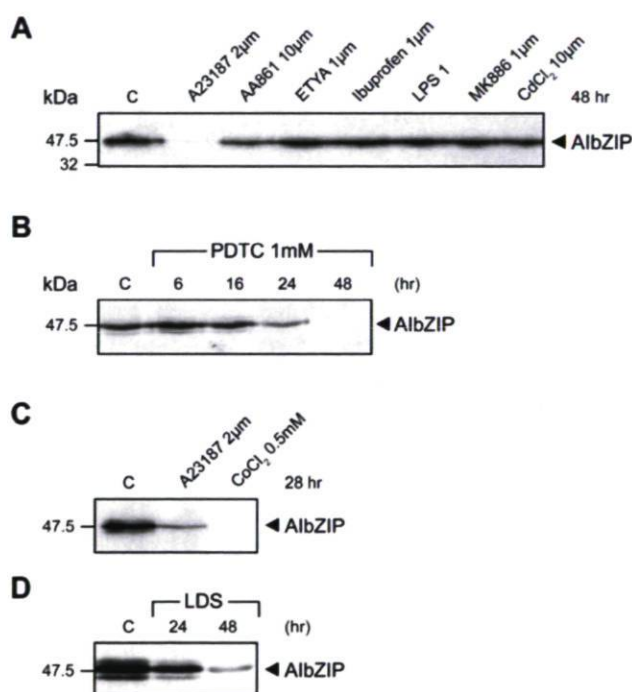


Figure 5.2 : Effet de différents agents pharmacologiques et conditions sur la forme pleine longueur d'A1bZIP. Les cellules LNCaP ont été traitées avec différents agents afin de déterminer si elles affectaient la forme pleine longueur d'A1bZIP. Les cellules ont été récoltées pour en extraire les protéines totales. Un anticorps dirigé contre la partie C-terminale d'A1bZIP a été utilisé pour visualiser la protéine par immunobuvardage.

J'ai tenté d'établir un lien entre la voie NFκB et AibZIP. Je m'y suis intéressée car l'un des gènes cibles d'AibZIP identifiés par puces est le gène IKIP, qui signifie *I kappa B kinase interacting protein*. Ce gène a d'abord été rapporté dans un article qui décrivait son induction par p53 et son effet proapoptotique dans des cellules endothéliales [151]. Afin de perturber la voie NFκB, j'ai utilisé l'inhibiteur pirrolidine dithiocarbamate (PDTC). Lorsqu'inactives, les sous-unités du facteur NFκB sont au cytosol liées à la sous-unité IκB qui est dégradée lors de l'activation de la voie NFκB. Le PDTC inhibe la dégradation de la sous-unité IκB empêchant ainsi NFκB de se rendre au noyau pour activer ses gènes cibles [152-153]. La perturbation pharmacologique de la voie NFκB par le PDTC a causé une diminution d'AibZIP pleine longueur après 48 heures, mais il n'y a pas eu d'apparition marquée de la forme nucléaire dans les premières 24 heures de traitement. Tout comme la condition sans lipide, il serait pertinent de prolonger la condition pour une expérience d'extraits nucléaires, bien que 48 heures soit un délai relativement long pour une réponse à un stress.

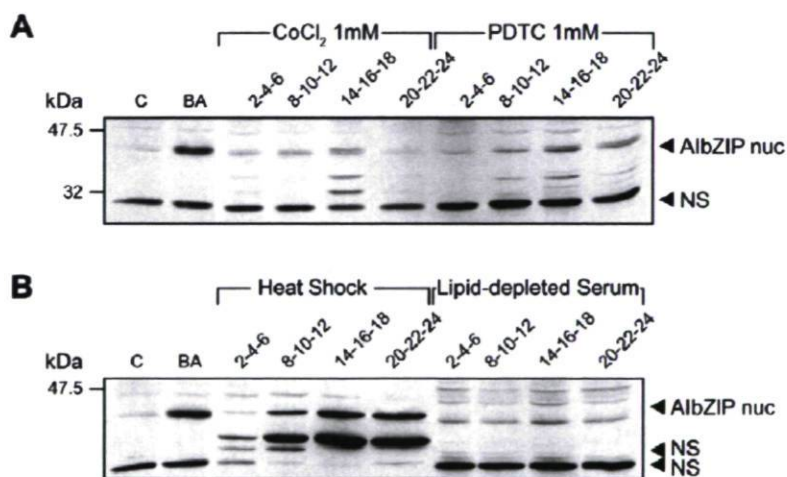


Figure 5.3 : Effet de différents agents pharmacologiques et conditions sur la forme nucléaire d'AibZIP. Les cellules LNCaP ont été traitées avec différents agents et conditions afin de déterminer si elles induisaient l'apparition de la forme nucléaire d'AibZIP. Les cellules ont été récoltées pour en extraire les protéines nucléaires. Un anticorps dirigé contre la partie N-terminale d'AibZIP a été utilisé pour visualiser la protéine par immunobuvardage. C : Extrait nucléaire contrôle, BA : Brefeldin A, NS : non spécifique

La régulation du clivage d'AibZIP pourra grandement nous renseigner sur le rôle physiologique d'AibZIP dans les cellules prostatiques cancéreuses. AibZIP est exprimé dans les cellules sécrétrices de la prostate, ce qui suggère qu'il puisse avoir un rôle spécifique dans ces cellules. Ces cellules produisent, entre autre, l'antigène spécifique de la prostate, une protéine sécrétée qui est une cible du récepteur des androgènes et qui est le marqueur de choix pour diagnostiquer le cancer de la prostate. Il se pourrait donc que la surexpression du PSA crée une accumulation de protéines au RE pouvant mener à l'engorgement de l'organelle et à une situation de stress. Des expériences sont d'ailleurs prévues pour tenter de découvrir la condition physiologique menant au clivage d'AibZIP.

Il a été brièvement question des cibles d'AibZIP dans les paragraphes précédents ce qui m'amène à discuter des cibles et du choix de CREB3 dans la poursuite des travaux. Il faut mentionner que le profil de gènes cibles d'AibZIP est complexe à décrypter, car il n'y a pas une voie de signalisation qui se démarque particulièrement par une induction marquée de plusieurs gènes liées entre eux ou de gènes connus pour être des éléments essentiels dans une voie donnée. Il est à noter que la chaperonne BiP n'est pas une cible d'AibZIP, suggérant qu'une surexpression d'AibZIP ne cause pas une situation de stress dans les LNCaP. Comme le rôle d'AibZIP demeure inconnu dans les cellules prostatiques, aucune des cibles ne peut être rayée des choix envisageables pour des études futures. Il faut d'ailleurs toujours garder en tête les résultats obtenus et y revenir à l'occasion pour tenter de comprendre davantage la signification des résultats.

J'ai d'abord débuté mes travaux sur plusieurs cibles pour finalement me concentrer sur CREB3. Après avoir cloné les cadres de lectures des cibles dans un vecteur d'expression, j'ai utilisé des anticorps pour tenter de mettre en évidence la régulation des protéines par AibZIP. L'utilisation d'anticorps amène son lot de complications quand ceux-ci ne reconnaissent pas ce qu'ils devraient, ce qui fut le cas pour certaines cibles. Il faut également noter que certaines cibles étaient des gènes peu caractérisés et que les anticorps commerciaux disponibles étaient plutôt rares. J'avais alors choisi de travailler sur l'aquaporine 3 (AQP3), l'inhibiteur de différenciation ID2, la chaperonne DNAJC12, la phospholipase PLA2G2A et le facteur de transcription CREB3. Il s'agit là de gènes assez

variés sur le plan fonctionnel et ils avaient été choisis par intérêt pour leurs fonctions potentielles ou par l'importance de leur induction par AIBZIP. La validation de ces gènes par buvardage de type Northern a révélé qu'ils sont tous fortement modulés par AIBZIP dans le clone stable qui produit la forme nucléaire recombinante d'AIBZIP. Au moment d'orienter les travaux sur les cibles, les données sur AQP3 étaient relativement limitées. Quelques années plus tard, on sait maintenant que les AQP jouent un rôle dans certains cancers. Par exemple, AQP3 est exprimée dans l'épiderme et surexprimée dans les carcinomes des cellules basales de la peau. De plus, des souris déficientes en AQP3 sont résistantes au cancer de la peau [154]. Au niveau de la prostate, il est rapporté qu'une inhibition d'AQP3 augmente la sensibilité des cellules prostatiques cancéreuses à la cryothérapie [155]. ID2 était très intéressant du fait que c'est un facteur de transcription, suggérant ainsi que certaines cibles d'AIBZIP identifiées à l'aide des puces Affymetrix pourraient être régulées par ID2. Il était alors bien documenté qu'ID2 jouait un rôle dans la progression du cancer de la prostate. Le facteur ID2 est surexprimé dans les cancers de prostate hautement agressifs et est en mesure d'augmenter la prolifération et le caractère invasif des cellules LNCaP [156]. ID2 est aussi légèrement régulé par l'androgène dihydrotestostérone dans les cellules LNCaP et son inhibition par siRNA dans ces mêmes cellules favorise l'apoptose [157]. Pour ce qui est de la co-chaperonne DNAJC12, un article a rapporté une corrélation entre le récepteur des oestrogènes et l'expression de DNAJC12 [158], et je m'y suis attardée en raison de son caractère hormono-sensible. Mis à part le projet sur CREB3, les autres projets ont été arrêtés suite à des problèmes techniques (AQP3 et ID2), tel que le manque d'anticorps fonctionnels, ou assignés à un autre membre de l'équipe (DNAJC12 et PLA2G2A). Assurément, ces cibles initialement choisies avaient le potentiel de fournir de renseignements intéressants quant à la fonction d'AIBZIP.

Étant un facteur de la même famille qu'AIBZIP et étant aussi régulé par le mécanisme RIP, le gène CREB3 était un candidat fort intéressant à étudier. Il a été mentionné précédemment que les facteurs bZIP sont, du moins théoriquement, capables d'interagir entre eux, ce qui laisse croire qu'une coexistence au noyau de CREB3 et AIBZIP pourrait favoriser leur hétérodimérisation et la transcription de cibles communes. D'abord, le clivage des deux facteurs par la même drogue, A23187, permet de croire qu'ils sont

impliqués dans un même processus physiologique. Le caractère ubiquitaire de CREB3 en fait sans doute un cofacteur multifonctionnel impliqué dans plusieurs processus.

J'ai démontré une chronologie dans l'activation des facteurs AIBZIP et CREB3 que je pourrais décrire en trois étapes, soit précoce, intermédiaire et tardive. La phase précoce débute par le clivage d'AIBZIP qui permet la transcription de cibles d'AIBZIP, dont CREB3. L'étape intermédiaire se produit quand la forme pleine longueur de CREB3 est clivée et qu'on remarque la présence des deux facteurs simultanément au noyau. Finalement, après 22 heures de stress, seule la forme nucléaire de CREB3 est détectable par immunobuvardage. Une chronologie d'activation de facteurs en réponse au stress a déjà été soulevée dans la littérature. En démontrant que le gène EDEM était une cible de XBP1 et non d'ATF6, Yoshida et ses collaborateurs ont supposé qu'il y avait deux phases à la réponse, une première impliquant ATF6 qui est rapide due à la présence de la protéine en attente de clivage [40]. Celle-ci permet la transcription de chaperonnes favorisant ainsi le repliement protéique, alors que la seconde phase implique le facteur XBP-1, dont l'activation est légèrement plus lente, qui participe ensuite au repliement et à la dégradation protéique [40]. À l'image de ces facteurs, AIBZIP est rapidement clivé, mais ses cibles transcriptionnelles ne sont pas majoritairement des chaperonnes, alors que CREB3 est actif plus tardivement et transcrit également des gènes associés au mécanisme ERAD. Une différence demeure dans le fait qu'AIBZIP induit CREB3 et que CREB3 active sa propre transcription par la suite, et cette relation transcriptionnelle n'étant pas observée entre ATF6 et XBP-1, bien que XBP-1 puisse lier l'élément ERSE présent dans son promoteur [159].

Ceci m'amène à discuter des éléments de réponse utilisés par les facteurs de transcription en situation de stress. Il aurait été très intéressant d'identifier pour AIBZIP un élément ERSE, ERSEII ou UPRE dans le promoteur des gènes cibles étudiés, mais il n'en fut pas le cas. Les travaux sur CREB3 m'ont permis de démontrer qu'AIBZIP agit sur le promoteur de CREB3 via une séquence correspondant à CCACGGGGTGGGGTGCGTCA, où les deux séquences soulignées correspondent à des séquences similaires à ERSE et CRE. Lorsqu'on s'attarde aux séquences complémentaires de cette région, on retrouve des séquences semblables à UPRE. J'ai comparé cette séquence à celles utilisées par les facteurs CREB3 est il ne semble pas que l'un d'eux utilise la même séquence pour

transcrire ses cibles connues. Les données actuelles sont insuffisantes pour parler d'un nouvel élément de réponse, mais il n'est pas impossible qu'il soit celui de facteurs CREB3.

Dans l'intérêt d'identifier des éléments de réponse propres à AlbZIP, j'ai réalisé, très récemment, des expériences préliminaires de CHIP-CHIP, où j'ai utilisé des puces Affymetrix de promoteurs. Cela m'a permis d'obtenir différentes sondes sur lesquelles s'est fixé le facteur AlbZIP et certaines d'entre elles ont été validées par immunoprécipitation de chromatine. L'analyse des résultats, qui est en cours, n'a pas permis d'identifier une séquence identique à celle obtenue par essai luciférase et CHIP sur le promoteur de CREB3, mais plusieurs des sondes se trouvaient à proximité de séquences CCACG ou CGTCA. Les travaux sur les éléments de réponse employés par AlbZIP sont assez récents et seront poursuivis afin d'en apprendre davantage sur les séquences qui lui sont nécessaires pour activer ses gènes cibles.

Les éléments de réponse d'un promoteur ne sont pas les seules et uniques composantes nécessaires à la transcription d'un gène; encore faut-il que ces séquences soient disponibles pour les facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle. L'exposition des promoteurs est possible par la modification des histones qui permettent ainsi le relâchement de la chromatine. Une relation entre CREB3 et l'état de modification des histones a été publiée tout récemment. L'équipe du Dr Yoon a décrit une interaction entre CREB3 et l'histone désacétylase 3 (HDAC3) [160]. La présence de HDAC3 simultanément avec CREB3 réprime son activité transcriptionnelle sur des gènes impliqués dans la voie NF κ B et sur le récepteur de chimiokines CXCR4. Le récepteur CXCR4 est une nouvelle cible de CREB3 dans les cellules mammaires cancéreuses. L'inhibition de l'expression de CXCR4 par HDAC3 a eu comme effet de bloquer la migration de cellules de cancer du sein, suggérant un rôle pour CREB3 dans l'invasion tumorale [160]. Le contexte cellulaire du cancer du sein se rapproche du contexte à l'étude dans cette thèse, soit le cancer de la prostate, et il serait pertinent de vérifier l'implication de CREB3 dans l'invasion et la tumorigénèse des cellules prostatiques cancéreuses et de voir si AlbZIP y participe également.

Il faut aussi se rappeler que Tisp40 joue un rôle dans la condensation de la chromatine en induisant la chaperonne d'histone HIRA dans le testicule de souris, ce qui

permet de croire qu'AibZIP, tout comme Tisp40 et CREB3, soit impliqué dans la modification des histones. Outre l'acétylation qui est permise par les histones acétyl transférases (HAT) et renversée par les HDAC, les histones peuvent être phosphorylées par des phosphatases. Il est d'ailleurs connu que l'histone 3 peut être phosphorylée sur la sérine 10 par la phosphatase PP2A. Il a été démontré que le traitement des cellules HepG2 avec l'ionophore du calcium A23187 cause une déphosphorylation de la sérine 10 de l'histone H3 permettant ainsi une régulation transcriptionnelle de certains gènes [161]. Cette optique amène une nouvelle perspective de travail et un intérêt supplémentaire pour la drogue A23187 dont l'action va au-delà de la déplétion de calcium et qui est, à ce jour, le meilleur agent identifié pour causer le clivage d'AibZIP et une drogue dont l'effet sur l'expression et le clivage de CREB3 est tout aussi important.

L'effet d'A23187 sur AibZIP et CREB3 me pousse à discuter de la régulation de CREB3 par A23187. L'utilisation d'un siRNA dirigé contre AibZIP suivi d'un traitement avec le A23187 n'a pas permis de bloquer l'induction de la protéine CREB3 suite au stress induit par la déplétion de calcium. Les effets du A23187 sur la transcription génique sont assurément multiples et d'autres facteurs pourraient réguler l'expression de CREB3 qu'un siRNA dirigé contre AibZIP n'a pas permis d'abolir. Le siRNA dirigé contre AibZIP a montré une très grande efficacité, mais des extraits nucléaires ont permis de déceler des traces d'AibZIP nucléaires dans les LNCaP transfectées avec le siRNA. Pour tenter d'identifier d'autres facteurs pouvant induire l'expression de CREB3, j'ai testé des facteurs impliqués dans le stress et mes résultats ont montré qu'AibZIP, CREB-H et CREB3 peuvent activer le promoteur de CREB3. Il est peu probable que CREB-H puisse être impliqué dans la régulation de CREB3 dans les cellules prostatiques puisque CREB-H n'est pas exprimé dans la prostate. Pour ce qui est de CREB3, il peut assurément induire sa propre transcription, mais je suis assez limitée dans les expériences qui pourraient montrer le rôle de CREB3 dans sa propre induction suite au traitement avec l'A23187. En effet, pour démontrer que CREB3 est impliqué dans sa transcription suite au traitement avec le A23187, il faudrait trouver un inhibiteur spécifique de CREB3 qui n'affecte pas la production de l'ARN, mais bien la capacité transcriptionnelle du facteur. Le problème qui se pose alors est qu'il est très difficile d'affecter CREB3 sans affecter AibZIP, les protéines étant beaucoup trop similaires. Par exemple, des peptides liant le motif de fermeture à

leucines ont été réalisés dans le laboratoire, mais ceux qui inhibent l'activité de CREB3 affectaient aussi l'activité d'AlbZIP. Il en fut de même avec la co-transfection de la protéine Zhangfei ou du *Luman-Recruitment Factor* (LRF) qui perturbait AlbZIP dans ses fonctions. Il fut donc plutôt difficile d'investiguer et de comprendre le rôle de CREB3 sur sa propre régulation en situation de stress.

5.2 Conclusion

Les travaux présentés dans cette thèse ont assurément permis de comprendre davantage le rôle d'AibZIP sans toutefois percer le mystère de son implication dans le cancer de la prostate. Mes travaux ont laissé dans le laboratoire un système d'expression inductible grandement efficace dans les cellules LNCaP qui est à la base des découvertes subséquentes. C'est avec beaucoup de plaisir que j'ai contribué à la réalisation du système RheoSwitch et je suis fière de constater qu'il est un outil de travail important pour notre équipe et pour d'autres équipes internationales. De plus, j'ai contribué aux connaissances sur une nouvelle famille de facteurs en émergence en démontrant qu'AibZIP est clivé par des agents qui affectent les concentrations calciques au RE et en ayant caractérisé la régulation de CREB3 par le stress et AibZIP. Les facteurs associés au RE sont, par leur localisation et leur mécanisme d'activation, des senseurs essentiels au bon fonctionnement cellulaire et les travaux sur la famille CREB3 permettront de comprendre davantage leurs fonctions dans les processus physiologiques et physiopathologiques.

Bien que je quitte maintenant cette équipe de recherche, j'ai espoir que les travaux se poursuivent dans la même optique et j'espère lire éventuellement une publication qui révélera un rôle clé d'AibZIP dans le processus de tumorigénèse des cellules prostatiques et qu'il pourra peut-être être utilisé comme outil diagnostique ou cible thérapeutique.

Annexe 1: Stage-Specific Expression of the Atce1/Tisp40a Isoform of CREB3L4 in Mouse Spermatids

Mohamed El-Alfy, Lamia Azzi, Julie Lessard, Éliane Lavergne, Mélissa Pelletier, Claude Labrie.

Journal of Andrology, 2006, 27(5), 686-694.

A.1 Résumé

Cette annexe présente ma collaboration aux travaux portant sur AibZIP murin (Atce1/Tisp40). Les articles portant sur Atce1/Tisp40 mentionnent l'existence de deux isoformes d'AibZIP chez la souris soient Tisp40 α et Tisp40 β . Il demeurerait toutefois une ambiguïté à savoir laquelle des formes est exprimée dans le testicule de souris. À l'aide d'homogénats de testicules de souris et des formes recombinantes Tisp40 α et Tisp40 β transfectées, j'ai démontré que les deux formes sont glycosylées et que c'est l'isoforme α qui est exprimé dans le testicule de souris. Voici le résumé de l'article :

La maturation de spermatides haploïdes en spermatozoïdes dépend de la production, au bon moment, de protéines requises pour la différenciation des spermatides. Le gène CREB3L4 (*cAMP responsive element binding protein 3-like 4*) code, chez les mammifères, pour un facteur de transcription bZIP qui est associé à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). CREB3L4 jouerait un rôle important dans la maturation protéique via son implication dans la réponse cellulaire au stress du RE. Chez la souris, il résulte deux ARNm distincts de la transcription du gène *Creb3l4* via l'utilisation de promoteurs alternatifs. Le premier transcrit, dont la transcription commence au début de l'exon 1 code pour une protéine de 370 acides aminés qui est désignée Tisp40 β , alors que le second transcrit débute plus loin dans l'exon 1 et code pour Atce1/Tisp40 α , une forme tronquée de Tisp40 β (315 acides aminés). Dans le testicule de souris, les transcrits sont exprimés exclusivement dans les spermatides postméiotiques, mais la présence de la protéine dans les spermatides n'a pas été formellement démontrée. Nous avons produit un anticorps dirigé contre la portion C-terminale de *Creb3l4* de souris et l'avons utilisé dans des expériences d'immunohistochimie pour démontrer l'accumulation de CREB3L4 dans les spermatides

postméiotiques d'une manière stage-spécifique. De plus, nous avons démontré qu'Atce1/Tisp40 α est la forme majoritairement exprimée dans le testicule de souris. Ces résultats suggèrent que les isoformes spécifiques aux testicules de CREB3L4 pourraient jouer un rôle important dans la différenciation des spermatides.

A.2 Abstract

The maturation of haploid spermatids into spermatozoa relies on the timely production of proteins required for spermatid differentiation. The mammalian CREB3L4 (cAMP responsive element binding protein 3-like 4) gene encodes a bZIP transcription factor that associates with the membrane of the endoplasmic reticulum. CREB3L4 is presumed to play an important role in protein maturation via its involvement in the cellular response to endoplasmic reticulum stress. In mice, the Creb3l4 gene gives rise to 2 distinct classes of mRNAs through the use of alternate promoters. Transcripts that initiate upstream of the first coding exon encode a 370-amino acid (aa) protein designated Tisp40 β , whereas transcripts that initiate downstream of the first coding exon encode Atce1/Tisp40 α , a truncated (315-aa) form of Tisp40 β . In the mouse testis, CREB3L4 transcripts are known to be expressed exclusively in postmeiotic spermatids but the presence of CREB3L4 protein in spermatids has not been formally demonstrated. We produced an antibody directed against the carboxy terminus of mouse CREB3L4 and used it in immunostaining experiments to document that CREB3L4 protein accumulates in postmeiotic spermatids in a stage-specific manner. Moreover, we show that Atce1/Tisp40 α is the major form of CREB3L4 in mouse testis. These findings suggest that testis-specific isoforms of CREB3L4 could play an important role in spermatid differentiation.

A.3 Introduction

Spermiogenesis is the phase of male germ cell development during which spermatids mature into spermatozoa. During this phase, haploid round spermatids that are embedded in the epithelium of the mammalian seminiferous tubule undergo a fascinating series of profound genetic and morphological changes. These changes include nuclear condensation, acrosome formation, a reduction in cytoplasmic volume, and the formation of a flagellum to impart motility.

The molecular processes that result in the formation of mature spermatozoa are not fully understood, but they ultimately rely on the timely production of proteins that are involved in spermatid differentiation. One transcription factor that has been shown to play a crucial role in spermiogenesis is the bZIP (basic region-leucine zipper) transcription factor CREM (cAMP-response element modulator). Inactivation of the *Crem* gene in mice causes an arrest of spermatogenesis at the round spermatid stage and, consequently, infertility (Blendy et al, 1996; Nantel et al, 1996). Infertility in these mice has been attributed to the failure of the germ cells to express CREM-responsive genes, such as the protamines that replace histones to allow DNA compaction (Kimmins et al, 2004).

The early phases of spermiogenesis are characterized by intense transcriptional activity (Eddy, 2002), which implies that the endoplasmic reticulum (ER) must function optimally to ensure that the required proteins are properly synthesized and processed. An important regulatory mechanism implicated in the maintenance of ER function is the “unfolded protein response” (UPR) (also known as “ER stress response”), an adaptive response that serves to re-establish normal ER function following disruptions such as the accumulation of unfolded or misfolded proteins (Zhang and Kaufman, 2004). This is achieved by promoting the degradation of misfolded proteins, by attenuating protein translation to reduce the amount of nascent proteins, and by increasing the production of the ER chaperones that are required to ensure the proper processing of nascent proteins.

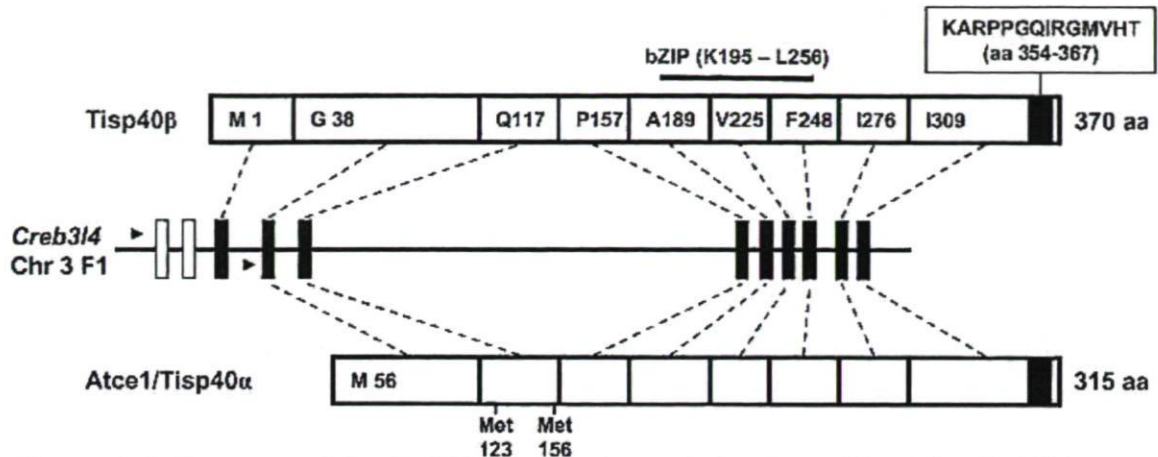


Figure A.1: Structure of the *Creb3l4* gene and encoded polypeptides. The *Creb3l4* gene on mouse chromosome 3 is depicted as a solid line. The 2 5' non-coding exons are represented as white vertical rectangles whereas the 9 coding exons are shown as black rectangles. The approximate positions of the transcription start sites of mRNAs that encode the Tisp40 β and Atce1/Tisp40 α proteins are indicated by arrows above and below the gene, respectively. The 2 proteins are depicted as rectangles which are further subdivided to illustrate the contribution of each coding exon to the protein sequence. The first complete codon encoded by each exon is indicated within the Tisp40 β diagram (these have been omitted from the Atce1 diagram for simplicity). The positions of the bZIP domain and that of the peptide used to immunize rabbits are shown above the Tisp40 β diagram. Note that the first AUG of the Atce1/Tisp40 α cDNA corresponds to Met 56 of Tisp40 β . The GenBank accession numbers for the *Creb3l4* gene, the full-length mouse CREB3L4 protein, and the Atce1 mRNA are NC_000069, NM_030080, and AF287260, respectively.

bZIP transcription factors that associate with the ER serve an important role in the UPR by activating the transcription of genes that code for ER proteins, such as chaperones (Zhang and Kaufman, 2004). In order to do so, ER bZIP proteins must first transit through the Golgi apparatus, where they are processed by proteases that separate their amino-terminal transcription factor domains from their carboxy-terminal membrane-associated regulatory domains. The transcription factor domains of ER bZIP proteins then travel to the nucleus to regulate gene expression. CREB3L4 (CRE binding protein 3-like 4) is an ER-associated bZIP protein that was independently isolated as AIBZIP (Androgen-Induced-

bZIP) in human prostate cancer cells (Qi et al, 2002); as Tisp40 (Transcript induced in spermiogenesis 40), a spermatid-specific transcript in mouse (Fujii et al, 2002); and as Atce1 (Attaching to CRE-like 1), a protein identified in a 2-hybrid screen for proteins that interact with Tctex2 (t-complex-associated testis expressed 3), a protein implicated in fertility (Stelzer and Don, 2002). Although the role of CREB3L4 in ER function has not been fully characterized, the studies conducted to date have established that CREB3L4 localizes to the ER and can be processed by Golgi proteases and that its nuclear form can activate gene expression via regulatory elements that are common to genes induced during the UPR (Nagamori et al, 2005).

In humans, CREB3L4 is most abundant in prostate (Qi et al, 2002), but standard as well as quantitative RTPCR assays have revealed the presence of appreciable amounts of CREB3L4 mRNA in testis (Cao et al, 2002; Cunha et al, 2005). In the mouse, on the other hand, CREB3L4 mRNA is most abundant in testis (Nagamori et al, 2005) and CREB3L4 transcription is up-regulated during mouse spermiogenesis (Fujii et al, 2002). Together these observations support the concept that CREB3L4 could potentially play an important role in assuring ER function during spermiogenesis. However, it is important to note that the *Creb3l4* gene encodes at least 2 distinct transcripts that initiate from different transcription start sites (Figure A.1). The first transcript to be identified in mouse testis initiates in intron 3 of the gene and contains 8 of the 9 coding exons (Stelzer and Don, 2002; Nagamori et al, 2005). This mRNA codes for a 315-residue protein designated Atce1/Tisp40 α which contains codons 56 to 370 of the larger Tisp40 β protein. Transcripts that encode Tisp40 β initiate upstream of exon 1 or 2 and contain all 9 coding exons of the gene.

The discovery of 2 distinct CREB3L4 isoforms in mouse is significant because Tisp40 β is a potent transcriptional activator, whereas Atce1/Tisp40 α is not (Nagamori et al, 2005). In order to understand the role of CREB3L4 in mammalian reproduction, it is therefore of paramount importance to determine precisely which CREB3L4 isoform is present in testis. In this report, immunostaining experiments performed using an antibody raised against the carboxy terminal portion of mouse CREB3L4 documented that the

CREB3L4 protein is expressed in a stage-specific manner in differentiating spermatids. Moreover, we found that the most abundant forms of CREB3L4 present in mouse testis lack the amino terminal activation domain of mouse CREB3L4. These findings have important implications for future studies of CREB3L4 in reproduction.

A.4 Materials and Methods

A.4.1 Animals

The use of animals was approved by our institutional animal care committee. The animals used in this study (male C57BL/6 mice and New Zealand rabbits) were housed under standard conditions in a CCAC (Canadian Council on Animal Care) and AAALAC (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care)-certified animal facility. Mice were anesthetized prior to tissue collection.

A.4.2 Antibody Production and Purification

A peptide corresponding to amino acids 354–367 (KARPPGQIRGMVHT) of mouse CREB3L4 (GenBank accession number NM_030080) was synthesized in our facility and conjugated to KLH via a cysteine residue appended to its amino terminus. This particular peptide was selected because its sequence is not present in other proteins of the mouse CREB3 family and it did not match any other known mouse protein in the GenBank database. Antibodies were produced by injecting the conjugated peptide to 3 rabbits using standard procedures. Antiserum from rabbit number 1462 (AB1462) was selected on the basis of its performance in immunoblotting experiments and subsequently purified by affinity chromatography after immobilizing the immunogenic peptide to Sulfo-Link Coupling Gel (Pierce Biotechnology, Rockford, Ill). All the immunostaining and immunoblotting experiments presented in this report were performed using affinity-purified AB1462 antibody.

A.4.3 Mouse Tissue Preparation

For immunostaining experiments, 4 3-month-old and 2 6-week-old male mice were perfused through the left ventricle with 10% buffered formalin for 15 minutes. Following perfusion, the testes were collected and immersed in the same fixative for 24 hours and then embedded in paraffin blocks. Testes used for immunoblotting were collected from sexually mature male mice, snap-frozen in liquid nitrogen, and homogenized using a tissue grinder in lysis buffer (6 mol urea, 20 mmol Tris pH 6.8, 1% SDS) supplemented with protease inhibitors (Roche Applied Science, Indianapolis, Ind). Protein extracts were stored at -80°C prior to use.

A.4.4 Immunostaining

Paraffin sections (4 mm) were deparaffinized in toluene and rehydrated through ethanol. Endogenous peroxidase activity was eliminated by preincubation in 3% H₂O₂ in methanol for 30 minutes. A microwave retrieval technique using citrate buffer was applied (Tacha and Chen, 1994) and nonspecific binding was blocked using 10% (v/v) goat serum diluted in Dako antibody diluent (DakoCytomation California, Carpinteria, Calif). The sections were incubated with antibody 1462 (diluted 1:1000) for 75 minutes at room temperature, washed in PBS buffer, and incubated with biotinylated anti-rabbit secondary antibody for 10 minutes and then with streptavidinperoxidase for another 10 minutes. Under microscope monitoring, diaminobenzidine was used as the chromogen to visualize the biotin/streptavidin-peroxidase complexes. Counterstaining was performed using #2 Gill hematoxylin. As a negative control, an excess (5-fold) of the synthetic peptide was coincubated with the primary antibody for 3 hours at room temperature.

A.4.5 Expression Vectors

The full-length mouse CREB3L4 open reading frame (ORF) was isolated from mouse prostate RNA by reverse transcription polymerase chain reaction (PCR) amplification. The PCR product was then cloned in frame with sequences encoding a C-terminal haemagglutinin (HA) epitope in a modified pcDNA3 (Invitrogen, Carlsbad, Calif) expression plasmid. The recombinant protein contains amino acids 1–370 of CREB3L4

(GenBank accession number NM_030080) followed by amino acids SRGP and the HA epitope (YPYDVDPDYASL). This plasmid was then used as a template for PCR amplification to generate plasmids producing an untagged form of Tisp40 β as well as HA-tagged and untagged forms of Atce1/Tisp40 α (mouse CREB3L4 codons 56–370). Tisp40 α HA also contains the SRGPYPYDVDPDYASL extension at its C terminus. The sequences of all PCR products and cloning junctions were verified using an automated sequencer. Plasmid DNA for transfection experiments was purified by gravity-flow anion exchange (Qiagen, Valencia, Calif).

A.4.6 Transient Transfections and Immunoblotting

Mouse CREB3L4 expression plasmids were transfected into human kidney 293 cells using ExGen 500 transfection reagent (Fermentas Life Sciences, Hanover, Md). The cells were harvested 48 hours posttransfection and whole-cell extracts were prepared in lysis buffer (see above). Protein extracts from mouse testis (30 mg/lane) and transfected 293 cells (4 mg/lane) were immobilized on nitrocellulose following electrophoresis through 10% denaturing polyacrylamide gels. The blots were preincubated for 1 hour at room temperature in TBS (0.9% NaCl, 10 mmol Tris-HCl, pH 8.0) containing 5% (w/v) powder milk and then incubated overnight at 4uC in fresh TBS/milk containing a 1:1000 dilution of AB1462. The blots were washed in TBS containing 0.05% Tween-20 and 0.05% NP-40 (4 times 15 minutes at room temperature) and then incubated for 1 hour at room temperature in TBS/milk containing a 1:10 000 dilution of peroxidase-conjugated AffiniPure goat antirabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, Pa). After another series of washes, antigen-antibody complexes were revealed using the Western Lightning Chemiluminescence Reagent Plus (Perkin Elmer, Wellesley, Mass).

A.4.7 Deglycosylation Experiments

Extracts from mouse testis and from transfected 293 cells prepared in lysis buffer were denatured in 1X Glycoprotein denaturing buffer (5% (w/v) SDS, 0.4 mol DTT) at 100°C for 10 minutes. Denatured testis (30 mg) and 293 cell (4 mg) extracts were then incubated in 50 mmol sodium citrate buffer alone or buffer containing 1000 units of

Endoglycosidase H (New England BioLabs, Ipswich, Mass) for 16 hours at 37°C prior to electrophoresis.

A.5 Results

Newly synthesized ER-bound bZIP transcription factors such as CREB3L4 initially localize to the ER and only translocate to the nucleus following removal of their C-terminal regulatory domains. To determine the distribution and cellular localization of unprocessed CREB3L4 proteins in mouse testis we required an antibody that recognizes the C-terminal domain of mouse CREB3L4. We therefore generated polyclonal antibodies against a 14-residue C-terminal peptide of mouse CREB3L4 (aa 354–367) in rabbits (Figure 1). This antibody would be expected to detect both Tisp40 β and Atce1/Tisp40 α in immunostaining experiments but should be able to discriminate between the 2 polypeptides in immunoblotting experiments.

Testes were collected from sexually mature 3-month old C57BL/6 mice, and cross sections were processed for immunostaining using affinity-purified antiserum number 1462 (AB1462). As shown in Figure A1.2, AB1462 stained the epithelium of the seminiferous tubules, whereas interstitial cells and Leydig cells were unlabeled. The staining reaction was completely abolished when an excess of the immunogenic peptide was used to immunoabsorb the antiserum. Close examination of stained seminiferous tubules revealed that only the postmeiotic cells (round or elongated spermatids) were labeled, whereas spermatocytes, spermatogonia, and Sertoli cells were not labeled. Interestingly, some seminiferous tubules displayed little or no staining, whereas other tubules showed a strong staining reaction.

The staining pattern observed with AB1462 in mouse testis strongly suggested that the abundance of CREB3L4 might fluctuate as a function of mouse spermatid development. To quantitatively assess differences in CREB3L4 abundance during the cycle of the seminiferous epithelium, we staged the seminiferous tubules present on the cross section shown in Figure A.2 and captured high-magnification photomicrographs of representative

tubules. These photographs were then arranged in sequence according to the mouse testis epithelial cycle as presented in Figure A1.3 (Russell et al, 1990). The first observation we made was that round and elongating spermatids displayed exclusively cytoplasmic staining, thereby indicating that newly synthesized CREB3L4 localizes to the cytoplasm of postmeiotic germ cells. Interestingly, the intensity of the cytoplasmic staining reaction varied markedly in both round and elongated spermatids at different stages of spermatogenesis.

At stage I of the cycle, a weak staining reaction was detectable in step 1 round spermatids as well as in step 13 elongated spermatids (Figure A.3a). At stage III of the cycle, a staining reaction of similar intensity was observed in step 2–3 round spermatids, whereas step 14 elongated spermatids displayed a reduction in staining intensity (Figure A.3b). By stage IV of the cycle, step 15 elongated spermatids showed practically no staining. In contrast, the staining of step 4 round spermatids was much more pronounced than that observed in earlier steps (Figure A.3c). The intensity of the labeling of round spermatids increased progressively through stage VI (Figure A.3d) to achieve maximal intensity at stage VII in step 7 round spermatids (Figure A.3e). At this point of the cycle, step 16 spermatids were unlabeled. A strong labeling reaction persisted in step 9 elongating spermatids (Figure A.3f), but its intensity decreased progressively thereafter through steps 10 and 11 (Figure A.3g and h). At stage XII, the labeling of step 12 spermatids was comparable to that observed at step 13 of stage I (Figure A.3i). This stage-specific staining pattern was observed in all 4 3-month-old male mice examined, as well as in 6-week-old C57BL/6 mice (data not shown).

To verify if both Tisp40 β and Atcel/Tisp40 α are present in the testes of sexually mature mice we performed immunoblotting experiments using AB1462. Two abundant polypeptides with apparent molecular weights of 42 and 36 kd, hereafter referred to as p42 and p36, were detected in mouse testes (Figure A.4a). The apparent molecular weights of these proteins are similar to the 44- and 38-kd polypeptides that were previously detected in mouse testis extracts using a polyclonal antibody raised against the N-terminal portion common to Tisp40 α and Tisp40 β (Nagamori et al, 2005). Based on the electrophoretic

mobility of in vitro-synthesized Tisp40 proteins, Nagamori et al deduced that the 44- and 38- kd polypeptides correspond to Tisp40 β and Tisp40 α , respectively. However, the 42-44- kd polypeptide is much more abundant than the 36-38- kd polypeptide in testis extracts, which is inconsistent with the observation that the Tisp40 β mRNA is less abundant than the Tisp40 α mRNA (Nagamori et al, 2005). Moreover, Nagamori et al also showed that recombinant Tisp40 proteins are glycosylated when they are transiently produced in human HeLa cells, suggesting that p42-44 and p36-38 might correspond to differentially glycosylated forms of the same polypeptide.

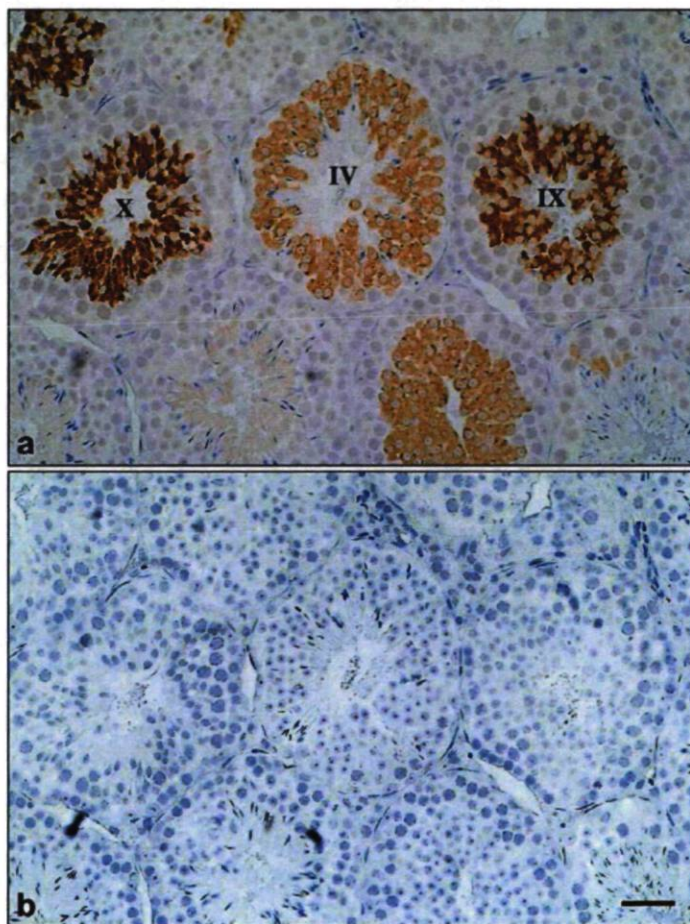


Figure A.2: Localization of CREB3L4 protein in mouse testis. (a) Paraffin-embedded cross section of mouse testis immunostained with an affinity purified rabbit polyclonal antibody (AB1462) directed against the C-terminus of mouse CREB3L4. Seminiferous tubules at stages IV, IX, and X of the epithelial cycle are labeled. (b) A consecutive serial section was processed as in (a) except that an excess of the immunogenic peptide was used to immunoabsorb the antiserum. Scale bar = 40 μ m.

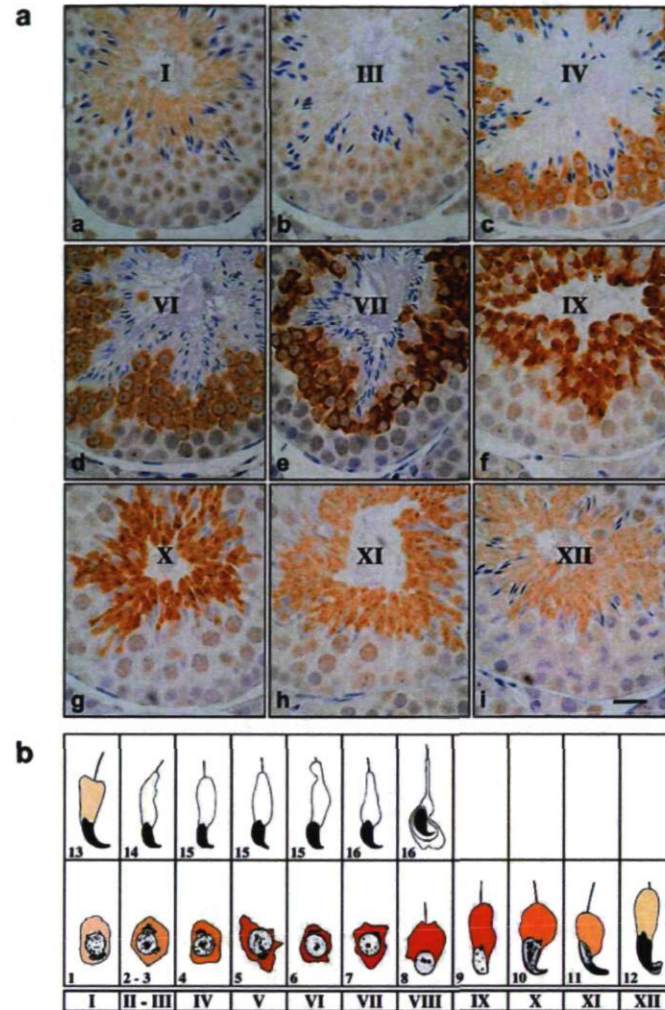


Figure A.3: Stage-specific expression of CREB3L4 during spermiogenesis. (a) Representative cross sections of seminiferous tubules at stages I (a), III (b), IV (c), VI (d), VII (e), IX (f), X (g), XI (h), and XII (i) of spermiogenesis were immunostained with affinity-purified AB1462. The cytoplasmic staining pattern is best seen in panel e (Stage VII), in which the pale bluish nuclei of step 7 spermatids are surrounded by a dark brown staining reaction. The seminiferous tubules shown here were selected from the same testis cross section. Scale bar = 30 mm. (b) Schematic representation of CREB3L4 expression in mouse spermatids. The stages of the seminiferous epithelium cycle are identified by Roman numerals, whereas the steps of spermatid development are indicated by Arabic numerals (modified from Russell et al, 1990). The color reflects the intensity of the immunostaining reaction.

In an attempt to resolve this issue we transiently produced HA epitope-tagged versions of Tisp40 β and Atce1/Tisp40 α in human 293 cells and compared their apparent molecular weights to those of p42 and p36. As shown in Figure A.4A, the apparent molecular weight of Tisp40 β HA was considerably greater than that of p42. In addition, transiently expressed Tisp40 β HA also generated polypeptides with apparent molecular weights similar to those observed in cells transfected with Tisp40 α or Tisp40 α HA. It is possible that these could result from internal initiation or from degradation. Most importantly, the high-molecular-weight forms observed with Tisp40 β HA were not present in cells transfected with Tisp40 α HA or in testis. The apparent molecular weight of HA-tagged Atce1/Tisp40 α was only slightly greater than that of p42, suggesting that p42 might correspond to Atce1/Tisp40 α . In agreement with this prediction, a recombinant untagged form of Atce1/Tisp40 α comigrated precisely with p42. Interestingly, transiently expressed Tisp40 α also produced a 36-kd polypeptide.

The results of these immunoblotting experiments suggested that Atce1/Tisp40 α could give rise to the 42- and 36-kd proteins present in mouse testis, but they did not clarify the nature of these polypeptides. The Tisp40 α mRNA contains 2 internal methionines (see Figure 1) which could potentially give rise to a 36-kd protein. We therefore inactivated methionine codons 123 and 156 to determine if internal initiation could explain the production of p36 in cells transfected with Tisp40 α mRNA, but the mutated expression plasmid still produced p42 and p36 (data not shown).

To determine if p42 corresponds to a glycosylated form of p36, we incubated testis extracts as well as extracts of 293 cells expressing untagged recombinant Tisp40 α or Tisp40 β with endoglycosidase H. As shown in Figure 4b, transiently expressed Tisp40 β produced a migration pattern distinct from that observed in testis extracts, whereas the migration pattern obtained with transiently expressed Tisp40 α was similar to that seen in testis. Addition of endoglycosidase H to testis extracts converted p42 to p36, indicating that p42 is indeed a glycosylated form of p36. Endoglycosidase H also converted the 42-kd protein produced by Tisp40 α to the 36-kd form. In cells producing Tisp40 β , endoglycosidase H reduced the abundance of high-molecular-weight forms. The lower-

molecular-weight polypeptides seen in cells transfected with Tisp40 β mRNA could correspond to degradation products or the products of internal initiation (this has not been investigated further). In fact, lysates programmed with Tisp40 β mRNA give rise to a polypeptide that co-migrates with *in vitro*-translated Tisp40 α (Nagamori et al, 2005). Whether this occurs *in vivo* remains to be determined. Taken together, these results indicate that Tisp40 α is the major CREB3L4 protein product in mouse testis and that Tisp40 α exists as an abundant glycosylated form and a less abundant unglycosylated form.

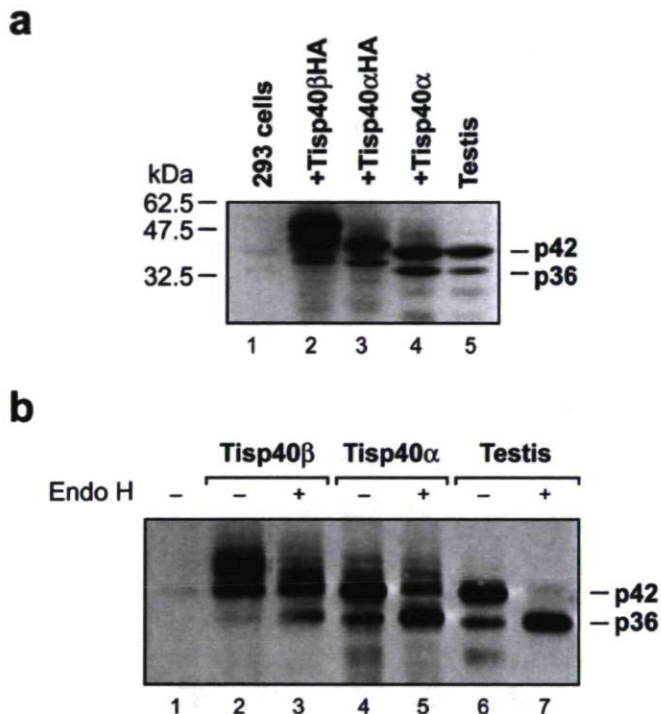


Figure A.4: Characterization of glycosylated and non-glycosylated forms of Atce1/Tisp40a in mouse testis. (a) Extracts prepared from mouse testis (lane 5), untransfected human kidney 293 cells (lane 1), and 293 cells transiently transfected with plasmids encoding HA-tagged Tisp40 β (lane 2), HA-tagged Tisp40 α (lane 3) or untagged Tisp40 α (lane 4) were probed with AB1462. The positions of the 42- and 36-kd polypeptides are indicated. (b) Testis extracts (lanes 6-7) and extracts of 293 cells transiently transfected with plasmids encoding untagged forms of Tisp40 β (lanes 2-3) and Tisp40 α (lanes 4-5) were incubated in the absence (2) or presence (+) of endoglycosidase H and then analyzed by immunoblotting using AB1462. Untransfected 293 cell extracts are in lane 1. The immunoblots presented here are representative of independent experiments performed using extracts from different mouse testes and independent transfections.

A.6 Discussion

This study of CREB3L4 proteins in mouse testis confirmed and extended previous observations regarding CREB3L4 expression in mouse testis and, importantly, revealed crucial new information regarding the identity of testis CREB3L4 proteins. These findings should have a determining influence on the orientation of future studies that will address the role of CREB3L4 in reproduction.

Previous studies employing *in situ* hybridization detected CREB3L4 mRNA exclusively in spermatids (Stelzer and Don, 2002; Nagamori et al, 2005). However, the distribution and relative abundance of CREB3L4 protein(s) in mouse testis had not yet been examined. The immunostaining data presented here confirm that CREB3L4 proteins are produced in differentiating spermatids and provide direct evidence that the abundance of CREB3L4 proteins varies during spermatid differentiation. The abundance of CREB3L4 increases gradually through steps 1-6, peaks at step 7, and decreases thereafter through step 12. During spermiogenesis, transcription occurs until the midpoint of the postmeiotic phase, ie, steps 7-8 (Eddy, 2002). Thus, the presence of CREB3L4 coincides with a phase during which the ER would be solicited to process a large number of proteins. The fact that CREB3L4 is not detected in spermatocytes and in elongated spermatids indicates that the protein is dispensable at these stages of male germ cell differentiation.

In view of the fact that genes can give rise to multiple isoforms, some of which are endowed with unique functional properties, it is important that we know the tissue-specific distribution of such isoforms. The presently available antibodies do not allow us to distinguish between the 2 Tisp40 isoforms. We therefore used transiently expressed recombinant Tisp40 proteins combined with deglycosylation experiments to determine, with a reasonable degree of certainty, that the 315- aa Atce1/Tisp40 α protein is the major CREB3L4 protein produced in mouse testis and that it exists as glycosylated and unglycosylated forms. The observation that Atce1/Tisp40 α , rather than Tisp40 β , is detected

in mouse testis is consistent with the fact that several genes encode testis-specific transcripts which result from the use of alternative promoters (Kleene, 2001; Sassone-Corsi, 2002).

Our findings appear to contradict a recent study which concluded that both Tisp40 β and Tisp40 α are present in testis (Nagamori et al, 2005). Although Nagamori et al demonstrated that Tisp40 proteins are glycosylated when they are expressed in HeLa cells, they did not specifically examine the glycosylation state of endogenous Tisp40 proteins in testis. Because the testis proteins detected by Nagamori et al are indistinguishable in size from p42 and p36 reported in this study, we would anticipate that their p44 is a glycosylated form of p38. Interestingly, Nagamori et al recently reported that Creb3l4 is a target of CREM and that CREM activates transcription of the Tisp40 α mRNA via response elements located between the transcription start sites of the Tisp40 β and Tisp40 α mRNAs (Nagamori et al, 2006). In their assays, CREM did not activate the promoter region located upstream of the Tisp40 β mRNA. Taken together, these data from Hiroshi Nojima's laboratory, combined with those reported here, support the conclusion that Tisp40 α is the major CREB3L4 protein in testis.

The realization that Tisp40 β is not produced in differentiating spermatids has important implications regarding the role of CREB3L4 in male reproduction. Indeed, Atce1/Tisp40 α lacks a large portion of the transcription activation domain present in Tisp40 β , and a recent report demonstrated that Tisp40 β could activate transcription via an unfolded protein response element, whereas Tisp40 α failed to activate transcription via this same element (Nagamori et al, 2005). Thus, one might be tempted to conclude that Atce1/Tisp40 α (and p36) actually serves as a transcriptional repressor, possibly by interfering with the activity of other bZIP transcription factors. On the other hand, it is also possible that Atce1/Tisp40 α could regulate gene expression via other unidentified response elements, or that it could only act as a transcriptional activator when dimerized with another bZIP protein.

Hiroshi Nojima's laboratory recently reported that the nuclear form of Tisp40 α is capable of dimerizing with CREM and that this interaction augments the interaction between CREM and a CRE (Nagamori et al, 2006). Such an association seems somewhat counterintuitive, as a bZIP protein that is implicated in ER stress would not be expected to contribute to the activity of a transcription factor whose actions could ultimately stress the ER. Possibly, the CREM-Tisp40 α dimer regulates a subset of genes that serve to protect the ER and/or the CREM-Tisp40 α dimer fulfills a specialized function in spermatids. In fact, Nojima's laboratory discovered that the CREM-Tisp40 α dimer recruits a histone chaperone. The functional significance of this interaction remains to be determined.

The importance of CREB3L4 in mammalian reproduction is supported by a recent report which described alterations in the reproductive system of male mice in which the Creb3l4 gene was inactivated by replacement with a green fluorescent protein (Adham et al, 2005). Although the resulting mice were fertile, inactivation of Creb3l4 resulted in a significant reduction in the number of spermatozoa in the epididymis. This reduction was attributed to increased apoptosis of haploid spermatids, which is consistent with a protective role of CREB3L4 in ER function.

In summary, the data presented herein indicate that the Atce1/Tisp40 α isoform of CREB3L4 is expressed in a stage-specific manner during spermatid differentiation in mice. Future studies focussing on the regulation and action of this testis-specific CREB3L4 variant will allow us to better understand the function of this potentially important gene in mammalian reproduction.

A.7 Acknowledgments

The authors are grateful to Patrick Bujold for assistance with tissue collection and processing, to Josée Grenier and Sonia Ben Aicha for plasmids, and to Marie-Claude Bouthot and Marc Auger for artwork.

A.8 References

Adham IM, Eck TJ, Mierau K, Müller N, Sallam MA, Paprotta I, Schubert S, Hoyer-Fender S, Engel W. Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 2005;25:7657–7664.

Blendy JA, Kaestner KH, Weinbauer GF, Nieschlag E, Schutz G. Severe impairment of spermatogenesis in mice lacking the CREM gene. *Nature.* 1996;380:162–165.

Cao G, Ni X, Jiang M, Ma Y, Cheng H, Guo L, Ji C, Gu S, Xie Y, Mao Y. Molecular cloning and characterization of a novel human cAMP response element-binding (CREB) gene (CREB4). *J Hum Genet.* 2002;47:373–376.

Cunha AC, Weigle B, Kiessling A, Bachmann M, Rieber EP. Tissue specificity of prostate specific antigens: Comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues. *Cancer Lett* 2006;236:229–238.

Eddy EM. Male germ cell expression. *Recent Prog Horm Res.* 2002;57: 103–128.

Fujii T, Tamura K, Masai K, Tanaka H, Nishimune Y, Nojima H. Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis. *EMBO Rep.* 2002;3:367–372.

Kimmins S, Kotaja N, Davidson I, Sassone-Corsi P. Testis-specific transcription mechanisms promoting male germ-cell differentiation. *Reproduction.* 2004;128:5–12.

Kleene KC. A possible meiotic function of the peculiar patterns of gene expression in mammalian spermatogenic cells. *Mech Dev.* 2001;106:3–23.

Nagamori I, Yabuta N, Fujii T, Tanaka H, Yomogida K, Nishimune Y, Nojima H. Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway. *Genes Cells*. 2005;10:575–594.

Nagamori I, Yomogida K, Adams P, Sassone-Corsi P, Nojima H. Transcription factors CREM and Tisp40 act in concert in postmeiotic transcriptional regulation. *J Biol Chem*. 2006;281: 15073–15081.

Nantel F, Monaco L, Foulkes NS, Masquillier D, LeMeur M, Henriksen K, Dierich A, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Spermiogenesis deficiency and germ-cell apoptosis in CREM-mutant mice. *Nature*. 1996;380:159–162.

Qi H, Fillion C, Labrie Y, Grenier J, Fournier A, Berger L, El-Alfy M, Labrie C. AlbZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2002;62:721–733.

Russell LD, Ettlin RA, Sinha Hikim AP, Clegg ED. Histological and histopathological evaluation of the testis. Clearwater, Fla: Cache River Press; 1990:119–161.

Sassone-Corsi P. Unique chromatin remodeling and transcriptional regulation in spermatogenesis. *Science*. 2002;296:2176–2178.

Stelzer G, Don J. Atce1: a novel cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element-binding protein-like gene exclusively expressed in postmeiotic spermatids. *Endocrinology*. 2002;143: 1578–1588.

Tacha DE, Chen T. Modified antigen retrieval procedure: calibration technique for microwave ovens. *J Histotechnol*. 1994;17:365–366.

Zhang K, Kaufman RJ. Signaling the unfolded protein response from the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2004;279:25935–25938.

Bibliographie

1. Qi, H., et al., *AibZIP, a novel bZIP gene located on chromosome 1q21.3 that is highly expressed in prostate tumors and of which the expression is up-regulated by androgens in LNCaP human prostate cancer cells*. *Cancer Res*, 2002. **62**(3): p. 721-33.
2. Lu, R., et al., *Luman, a new member of the CREB/ATF family, binds to herpes simplex virus VP16-associated host cellular factor*. *Mol Cell Biol*, 1997. **17**(9): p. 5117-26.
3. Honma, Y., et al., *Identification of a novel gene, OASIS, which encodes for a putative CREB/ATF family transcription factor in the long-term cultured astrocytes and gliotic tissue*. *Brain Res Mol Brain Res*, 1999. **69**(1): p. 93-103.
4. Omori, Y., et al., *CREB-H: a novel mammalian transcription factor belonging to the CREB/ATF family and functioning via the box-B element with a liver-specific expression*. *Nucleic Acids Res*, 2001. **29**(10): p. 2154-62.
5. Kondo, S., et al., *BBF2H7, a novel transmembrane bZIP transcription factor, is a new type of endoplasmic reticulum stress transducer*. *Mol Cell Biol*, 2007. **27**(5): p. 1716-29.
6. Abel, T., R. Bhatt, and T. Maniatis, *A Drosophila CREB/ATF transcriptional activator binds to both fat body- and liver-specific regulatory elements*. *Genes Dev*, 1992. **6**(3): p. 466-80.
7. Skach, W.R., *The expanding role of the ER translocon in membrane protein folding*. *J Cell Biol*, 2007. **179**(7): p. 1333-5.
8. Voeltz, G.K., M.M. Rolls, and T.A. Rapoport, *Structural organization of the endoplasmic reticulum*. *EMBO Rep*, 2002. **3**(10): p. 944-50.
9. Zhang, K. and R.J. Kaufman, *The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease*. *Neurology*, 2006. **66**(2 Suppl 1): p. S102-9.
10. Bommiasamy, H., et al., *ATF6alpha induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum*. *J Cell Sci*, 2009. **122**(Pt 10): p. 1626-36.
11. Van Der Kelen, K., et al., *Translational control of eukaryotic gene expression*. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2009. **44**(4): p. 143-68.
12. Wek, R.C., H.Y. Jiang, and T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control*. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**(Pt 1): p. 7-11.
13. Swanton, E. and N.J. Bulleid, *Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane*. *Mol Membr Biol*, 2003. **20**(2): p. 99-104.
14. Greenfield, J.J. and S. High, *The Sec61 complex is located in both the ER and the ER-Golgi intermediate compartment*. *J Cell Sci*, 1999. **112** (Pt 10): p. 1477-86.
15. Osborne, A.R., T.A. Rapoport, and B. van den Berg, *Protein translocation by the Sec61/SecY channel*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2005. **21**: p. 529-50.
16. Dejgaard, K., et al., *Organization of the Sec61 translocon, studied by high resolution native electrophoresis*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(4): p. 1763-71.
17. Lederkremer, G.Z., *Glycoprotein folding, quality control and ER-associated degradation*. *Curr Opin Struct Biol*, 2009. **19**(5): p. 515-23.
18. Caramelo, J.J. and A.J. Parodi, *Getting in and out from calnexin/calreticulin cycles*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(16): p. 10221-5.

19. Maattanen, P., et al., *Protein quality control in the ER: The recognition of misfolded proteins*. Semin Cell Dev Biol, 2010.
20. Hatahet, F. and L.W. Ruddock, *Protein disulfide isomerase: a critical evaluation of its function in disulfide bond formation*. Antioxid Redox Signal, 2009. **11**(11): p. 2807-50.
21. Solda, T., et al., *Substrate-specific requirements for UGT1-dependent release from calnexin*. Mol Cell, 2007. **27**(2): p. 238-49.
22. Malhotra, J.D. and R.J. Kaufman, *The endoplasmic reticulum and the unfolded protein response*. Semin Cell Dev Biol, 2007. **18**(6): p. 716-31.
23. Kampinga, H.H. and E.A. Craig, *The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(8): p. 579-92.
24. Ni, M. and A.S. Lee, *ER chaperones in mammalian development and human diseases*. FEBS Lett, 2007. **581**(19): p. 3641-51.
25. Mayer, M.P. and B. Bukau, *Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism*. Cell Mol Life Sci, 2005. **62**(6): p. 670-84.
26. Brostrom, M.A. and C.O. Brostrom, *Calcium dynamics and endoplasmic reticular function in the regulation of protein synthesis: implications for cell growth and adaptability*. Cell Calcium, 2003. **34**(4-5): p. 345-63.
27. Parodi, A.J., *Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation*. Biochem J, 2000. **348 Pt 1**: p. 1-13.
28. Ma, Y. and L.M. Hendershot, *The role of the unfolded protein response in tumour development: friend or foe?* Nat Rev Cancer, 2004. **4**(12): p. 966-77.
29. Szegezdi, E., et al., *Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis*. EMBO Rep, 2006. **7**(9): p. 880-5.
30. Lytton, J., M. Westlin, and M.R. Hanley, *Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps*. J Biol Chem, 1991. **266**(26): p. 17067-71.
31. Kong, H., et al., *Caffeine induces Ca²⁺ release by reducing the threshold for luminal Ca²⁺ activation of the ryanodine receptor*. Biochem J, 2008. **414**(3): p. 441-52.
32. Liu, C. and T.E. Hermann, *Characterization of ionomycin as a calcium ionophore*. J Biol Chem, 1978. **253**(17): p. 5892-4.
33. Reed, P.W. and H.A. Lardy, *A23187: a divalent cation ionophore*. J Biol Chem, 1972. **247**(21): p. 6970-7.
34. Jamsa, E., M. Simonen, and M. Makarow, *Selective retention of secretory proteins in the yeast endoplasmic reticulum by treatment of cells with a reducing agent*. Yeast, 1994. **10**(3): p. 355-70.
35. Leavitt, R., S. Schlesinger, and S. Kornfeld, *Tunicamycin inhibits glycosylation and multiplication of Sindbis and vesicular stomatitis viruses*. J Virol, 1977. **21**(1): p. 375-85.
36. Lippincott-Schwartz, J., et al., *Rapid redistribution of Golgi proteins into the ER in cells treated with brefeldin A: evidence for membrane cycling from Golgi to ER*. Cell, 1989. **56**(5): p. 801-13.
37. Yoshida, H., et al., *Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors*. J Biol Chem, 1998. **273**(50): p. 33741-9.

38. Kokame, K., H. Kato, and T. Miyata, *Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response*. J Biol Chem, 2001. **276**(12): p. 9199-205.
39. Wang, Y., et al., *Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27013-20.
40. Yoshida, H., et al., *A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response*. Dev Cell, 2003. **4**(2): p. 265-71.
41. Ron, D. and S.R. Hubbard, *How IRE1 reacts to ER stress*. Cell, 2008. **132**(1): p. 24-6.
42. Tirasophon, W., A.A. Welihinda, and R.J. Kaufman, *A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells*. Genes Dev, 1998. **12**(12): p. 1812-24.
43. Ron, D. and P. Walter, *Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007. **8**(7): p. 519-29.
44. Calton, M., et al., *IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA*. Nature, 2002. **415**(6867): p. 92-6.
45. Yamamoto, K., et al., *Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II*. J Biochem, 2004. **136**(3): p. 343-50.
46. Lee, K., et al., *IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response*. Genes Dev, 2002. **16**(4): p. 452-66.
47. Kokame, K., et al., *Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem, 2000. **275**(42): p. 32846-53.
48. Dickhout, J.G., S.K. Sood, and R.C. Austin, *Role of endoplasmic reticulum calcium disequilibria in the mechanism of homocysteine-induced ER stress*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(11): p. 1863-73.
49. Guthikonda, S. and W.G. Haynes, *Homocysteine: role and implications in atherosclerosis*. Curr Atheroscler Rep, 2006. **8**(2): p. 100-6.
50. Hori, O., et al., *Role of Herp in the endoplasmic reticulum stress response*. Genes Cells, 2004. **9**(5): p. 457-69.
51. Hollien, J., et al., *Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells*. J Cell Biol, 2009. **186**(3): p. 323-31.
52. Harding, H.P., et al., *Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells*. Mol Cell, 2000. **6**(5): p. 1099-108.
53. Marciniak, S.J., et al., *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum*. Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3066-77.
54. Oyadomari, S. and M. Mori, *Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress*. Cell Death Differ, 2004. **11**(4): p. 381-9.
55. Novoa, I., et al., *Feedback inhibition of the unfolded protein response by GADD34-mediated dephosphorylation of eIF2alpha*. J Cell Biol, 2001. **153**(5): p. 1011-22.
56. Tavender, T.J. and N. Balleid, *Molecular mechanisms regulating oxidative activity of the Ero1 family in the endoplasmic reticulum*. Antioxid Redox Signal, 2010.

57. Haze, K., et al., *Mammalian transcription factor ATF6 is synthesized as a transmembrane protein and activated by proteolysis in response to endoplasmic reticulum stress*. *Mol Biol Cell*, 1999. **10**(11): p. 3787-99.
58. Sommer, T. and E. Jarosch, *BiP binding keeps ATF6 at bay*. *Dev Cell*, 2002. **3**(1): p. 1-2.
59. Shen, J., et al., *ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals*. *Dev Cell*, 2002. **3**(1): p. 99-111.
60. Schindler, A.J. and R. Schekman, *In vitro reconstitution of ER-stress induced ATF6 transport in COPII vesicles*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(42): p. 17775-80.
61. Shen, J. and R. Prywes, *Dependence of site-2 protease cleavage of ATF6 on prior site-1 protease digestion is determined by the size of the luminal domain of ATF6*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(41): p. 43046-51.
62. Ye, J., et al., *ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs*. *Mol Cell*, 2000. **6**(6): p. 1355-64.
63. Hai, T. and M.G. Hartman, *The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis*. *Gene*, 2001. **273**(1): p. 1-11.
64. Adachi, Y., et al., *ATF6 is a transcription factor specializing in the regulation of quality control proteins in the endoplasmic reticulum*. *Cell Struct Funct*, 2008. **33**(1): p. 75-89.
65. Lee, A.S., *The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress*. *Methods*, 2005. **35**(4): p. 373-81.
66. Avezov, E., et al., *Endoplasmic reticulum (ER) mannosidase I is compartmentalized and required for N-glycan trimming to Man5-6GlcNAc2 in glycoprotein ER-associated degradation*. *Mol Biol Cell*, 2008. **19**(1): p. 216-25.
67. Gonzalez, D.S., et al., *Identification, expression, and characterization of a cDNA encoding human endoplasmic reticulum mannosidase I, the enzyme that catalyzes the first mannose trimming step in mammalian Asn-linked oligosaccharide biosynthesis*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(30): p. 21375-86.
68. Kanehara, K., S. Kawaguchi, and D.T. Ng, *The EDEM and Yos9p families of lectin-like ERAD factors*. *Semin Cell Dev Biol*, 2007. **18**(6): p. 743-50.
69. Olivari, S. and M. Molinari, *Glycoprotein folding and the role of EDEM1, EDEM2 and EDEM3 in degradation of folding-defective glycoproteins*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(19): p. 3658-64.
70. Hosokawa, N., et al., *Human OS-9, a lectin required for glycoprotein endoplasmic reticulum-associated degradation, recognizes mannose-trimmed N-glycans*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(25): p. 17061-8.
71. Kamiya, Y., et al., *Molecular basis of sugar recognition by the human L-type lectins ERGIC-53, VIPL, and VIP36*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(4): p. 1857-61.
72. Navon, A. and A. Ciechanover, *The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(49): p. 33713-8.
73. Fribley, A., K. Zhang, and R.J. Kaufman, *Regulation of apoptosis by the unfolded protein response*. *Methods Mol Biol*, 2009. **559**: p. 191-204.

74. Yamaguchi, H. and H.G. Wang, *CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells*. J Biol Chem, 2004. **279**(44): p. 45495-502.
75. Ohoka, N., et al., *TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death*. EMBO J, 2005. **24**(6): p. 1243-55.
76. Sok, J., et al., *CHOP-Dependent stress-inducible expression of a novel form of carbonic anhydrase VI*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(1): p. 495-504.
77. Morishima, N., et al., *Translocation of Bim to the endoplasmic reticulum (ER) mediates ER stress signaling for activation of caspase-12 during ER stress-induced apoptosis*. J Biol Chem, 2004. **279**(48): p. 50375-81.
78. Puthalakath, H., et al., *ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim*. Cell, 2007. **129**(7): p. 1337-49.
79. Zong, W.X., et al., *Bax and Bak can localize to the endoplasmic reticulum to initiate apoptosis*. J Cell Biol, 2003. **162**(1): p. 59-69.
80. Yoneda, T., et al., *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*. J Biol Chem, 2001. **276**(17): p. 13935-40.
81. Urano, F., et al., *Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1*. Science, 2000. **287**(5453): p. 664-6.
82. Hetz, C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK modulate the unfolded protein response by a direct interaction with IRE1alpha*. Science, 2006. **312**(5773): p. 572-6.
83. Hotamisligil, G.S., *Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease*. Cell, 2010. **140**(6): p. 900-17.
84. Salminen, A., et al., *ER stress in Alzheimer's disease: a novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology*. J Neuroinflammation, 2009. **6**: p. 41.
85. Healy, S.J., et al., *Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy*. Eur J Pharmacol, 2009. **625**(1-3): p. 234-46.
86. Newman, J.R. and A.E. Keating, *Comprehensive identification of human bZIP interactions with coiled-coil arrays*. Science, 2003. **300**(5628): p. 2097-101.
87. Burbelo, P.D., et al., *LZIP-1 and LZIP-2: two novel members of the bZIP family*. Gene, 1994. **139**(2): p. 241-5.
88. Freiman, R.N. and W. Herr, *Viral mimicry: common mode of association with HCF by VP16 and the cellular protein LZIP*. Genes Dev, 1997. **11**(23): p. 3122-7.
89. Akhova, O., M. Bainbridge, and V. Misra, *The neuronal host cell factor-binding protein Zhangfei inhibits herpes simplex virus replication*. J Virol, 2005. **79**(23): p. 14708-18.
90. Lu, R., et al., *The herpesvirus transactivator VP16 mimics a human basic domain leucine zipper protein, human, in its interaction with HCF*. J Virol, 1998. **72**(8): p. 6291-7.
91. Misra, V., et al., *Zhangfei is a potent and specific inhibitor of the host cell factor-binding transcription factor Luman*. J Biol Chem, 2005. **280**(15): p. 15257-66.
92. Jin, D.Y., et al., *Hepatitis C virus core protein-induced loss of LZIP function correlates with cellular transformation*. EMBO J, 2000. **19**(4): p. 729-40.
93. Blot, G., et al., *Luman, a new partner of HIV-1 TMgp41, interferes with Tat-mediated transcription of the HIV-1 LTR*. J Mol Biol, 2006. **364**(5): p. 1034-47.

94. Zhou, H.J., et al., *Inhibition of LZIP-mediated transcription through direct interaction with a novel host cell factor-like protein*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 28933-8.
95. Ko, J., et al., *Human LZIP binds to CCR1 and differentially affects the chemotactic activities of CCR1-dependent chemokines*. FASEB J, 2004. **18**(7): p. 890-2.
96. Jang, S.W., et al., *Regulation of human LZIP expression by NF-kappaB and its involvement in monocyte cell migration induced by Lkn-1*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11092-100.
97. Jang, S.W., et al., *Role of human LZIP in differential activation of the NF-kappaB pathway that is induced by CCR1-dependent chemokines*. J Cell Physiol, 2007. **211**(3): p. 630-7.
98. Sung, H.J., et al., *Human LZIP induces monocyte CC chemokine receptor 2 expression leading to enhancement of monocyte chemoattractant protein 1/CCL2-induced cell migration*. Exp Mol Med, 2008. **40**(3): p. 332-8.
99. Lu, R. and V. Misra, *Potential role for luman, the cellular homologue of herpes simplex virus VP16 (alpha gene trans-inducing factor), in herpesvirus latency*. J Virol, 2000. **74**(2): p. 934-43.
100. DenBoer, L.M., et al., *Luman is capable of binding and activating transcription from the unfolded protein response element*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **331**(1): p. 113-9.
101. Raggo, C., et al., *Luman, the cellular counterpart of herpes simplex virus VP16, is processed by regulated intramembrane proteolysis*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(16): p. 5639-49.
102. Liang, G., et al., *Luman/CREB3 induces transcription of the endoplasmic reticulum (ER) stress response protein Herp through an ER stress response element*. Mol Cell Biol, 2006. **26**(21): p. 7999-8010.
103. Audas, T.E., et al., *A novel protein, Luman/CREB3 recruitment factor, inhibits Luman activation of the unfolded protein response*. Mol Cell Biol, 2008. **28**(12): p. 3952-66.
104. Baumann, C.T., et al., *The glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) localizes in discrete nuclear foci that associate with ND10 bodies and are enriched in components of the 26S proteasome*. Mol Endocrinol, 2001. **15**(4): p. 485-500.
105. Kondo, S., et al., *OASIS, a CREB/ATF-family member, modulates UPR signalling in astrocytes*. Nat Cell Biol, 2005. **7**(2): p. 186-94.
106. Sekiya, H., et al., *Effects of the bisphosphonate risedronate on osteopenia in OASIS-deficient mice*. J Bone Miner Metab, 2009.
107. Nikaido, T., et al., *Expression of the novel transcription factor OASIS, which belongs to the CREB/ATF family, in mouse embryo with special reference to bone development*. Histochem Cell Biol, 2001. **116**(2): p. 141-8.
108. Murakami, T., et al., *Signalling mediated by the endoplasmic reticulum stress transducer OASIS is involved in bone formation*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(10): p. 1205-11.
109. Luo, S., et al., *Induction of Grp78/BiP by translational block: activation of the Grp78 promoter by ATF4 through and upstream ATF/CRE site independent of the endoplasmic reticulum stress elements*. J Biol Chem, 2003. **278**(39): p. 37375-85.
110. Omori, Y., et al., *OASIS is a transcriptional activator of CREB/ATF family with a transmembrane domain*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(1): p. 470-7.

111. Schubert, S.W., et al., *bZIP-Type transcription factors CREB and OASIS bind and stimulate the promoter of the mammalian transcription factor GCMa/Gcm1 in trophoblast cells*. *Nucleic Acids Res*, 2008. **36**(11): p. 3834-46.
112. Storlazzi, C.T., et al., *Fusion of the FUS and BBF2H7 genes in low grade fibromyxoid sarcoma*. *Hum Mol Genet*, 2003. **12**(18): p. 2349-58.
113. Panagopoulos, I., et al., *The chimeric FUS/CREB3L2 gene is specific for low-grade fibromyxoid sarcoma*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2004. **40**(3): p. 218-28.
114. Panagopoulos, I., et al., *Characterization of the native CREB3L2 transcription factor and the FUS/CREB3L2 chimera*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2007. **46**(2): p. 181-91.
115. Lui, W.O., et al., *CREB3L2-PPARgamma fusion mutation identifies a thyroid signaling pathway regulated by intramembrane proteolysis*. *Cancer Res*, 2008. **68**(17): p. 7156-64.
116. Saito, A., et al., *Regulation of endoplasmic reticulum stress response by a BBF2H7-mediated Sec23a pathway is essential for chondrogenesis*. *Nat Cell Biol*, 2009. **11**(10): p. 1197-204.
117. Chin, K.T., et al., *The liver-enriched transcription factor CREB-H is a growth suppressor protein underexpressed in hepatocellular carcinoma*. *Nucleic Acids Res*, 2005. **33**(6): p. 1859-73.
118. Luebke-Wheeler, J., et al., *Hepatocyte nuclear factor 4alpha is implicated in endoplasmic reticulum stress-induced acute phase response by regulating expression of cyclic adenosine monophosphate responsive element binding protein H*. *Hepatology*, 2008. **48**(4): p. 1242-50.
119. Zhang, K., et al., *Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response*. *Cell*, 2006. **124**(3): p. 587-99.
120. Vecchi, C., et al., *ER stress controls iron metabolism through induction of hepcidin*. *Science*, 2009. **325**(5942): p. 877-80.
121. Danno, H., et al., *The liver-enriched transcription factor CREBH is nutritionally regulated and activated by fatty acids and PPARalpha*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010. **391**(2): p. 1222-7.
122. Bailey, D., C. Barreca, and P. O'Hare, *Trafficking of the bZIP transmembrane transcription factor CREB-H into alternate pathways of ERAD and stress-regulated intramembrane proteolysis*. *Traffic*, 2007. **8**(12): p. 1796-814.
123. Llarena, M., et al., *Different mechanisms of recognition and ER retention by transmembrane transcription factors CREB-H and ATF6*. *Traffic*, 2010. **11**(1): p. 48-69.
124. Chan, C.P., et al., *N-linked glycosylation is required for optimal proteolytic activation of membrane-bound transcription factor CREB-H*. *J Cell Sci*, 2010. **123**(Pt 9): p. 1438-48.
125. Cunha, A.C., et al., *Tissue-specificity of prostate specific antigens: comparative analysis of transcript levels in prostate and non-prostatic tissues*. *Cancer Lett*, 2006. **236**(2): p. 229-38.
126. Schmidt, U., et al., *Quantitative multi-gene expression profiling of primary prostate cancer*. *Prostate*, 2006. **66**(14): p. 1521-34.
127. Levesque, M.H., et al., *Evaluation of AlbZIP and Cdc47 as markers for human prostatic diseases*. *Urology*, 2007. **69**(1): p. 196-201.

128. Stirling, J. and P. O'Hare, *CREB4, a transmembrane bZip transcription factor and potential new substrate for regulation and cleavage by SIP*. *Mol Biol Cell*, 2006. **17**(1): p. 413-26.
129. Nagamori, I., et al., *Tisp40, a spermatid specific bZip transcription factor, functions by binding to the unfolded protein response element via the Rip pathway*. *Genes Cells*, 2005. **10**(6): p. 575-94.
130. Stelzer, G. and J. Don, *Atcel1: a novel mouse cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-responsive element-binding protein-like gene exclusively expressed in postmeiotic spermatids*. *Endocrinology*, 2002. **143**(5): p. 1578-88.
131. Adham, I.M., et al., *Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(17): p. 7657-64.
132. Nagamori, I., et al., *The testes-specific bZip type transcription factor Tisp40 plays a role in ER stress responses and chromatin packaging during spermiogenesis*. *Genes Cells*, 2006. **11**(10): p. 1161-71.
133. Nagamori, I., et al., *Transcription factors, cAMP-responsive element modulator (CREM) and Tisp40, act in concert in postmeiotic transcriptional regulation*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(22): p. 15073-81.
134. Inagaki, Y., et al., *CREB3L4, INTS3, and SNAPAP are targets for the 1q21 amplicon frequently detected in hepatocellular carcinoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 2008. **180**(1): p. 30-6.
135. Horoszewicz, J.S., et al., *LNCaP model of human prostatic carcinoma*. *Cancer Res*, 1983. **43**(4): p. 1809-18.
136. Meyer-Ficca, M.L., et al., *Comparative analysis of inducible expression systems in transient transfection studies*. *Anal Biochem*, 2004. **334**(1): p. 9-19.
137. Xie, J., A. Nair, and T.W. Hermiston, *A comparative study examining the cytotoxicity of inducible gene expression system ligands in different cell types*. *Toxicol In Vitro*, 2008. **22**(1): p. 261-6.
138. Palli, S.R., et al., *Improved ecdysone receptor-based inducible gene regulation system*. *Eur J Biochem*, 2003. **270**(6): p. 1308-15.
139. Jiao, X., et al., *c-Jun induces mammary epithelial cellular invasion and breast cancer stem cell expansion*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(11): p. 8218-26.
140. Kajanne, R., et al., *Transcription factor AP-1 promotes growth and radioresistance in prostate cancer cells*. *Int J Oncol*, 2009. **35**(5): p. 1175-82.
141. Morris, M.E. and M.A. Felmlee, *Overview of the proton-coupled MCT (SLC16A) family of transporters: characterization, function and role in the transport of the drug of abuse gamma-hydroxybutyric acid*. *AAPS J*, 2008. **10**(2): p. 311-21.
142. Barbier, O. and A. Belanger, *Inactivation of androgens by UDP-glucuronosyltransferases in the human prostate*. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2008. **22**(2): p. 259-70.
143. Fujii, T., et al., *Use of stepwise subtraction to comprehensively isolate mouse genes whose transcription is up-regulated during spermiogenesis*. *EMBO Rep*, 2002. **3**(4): p. 367-72.
144. Sakai, J., et al., *Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(10): p. 5785-93.

145. Rawson, R.B., *Control of lipid metabolism by regulated intramembrane proteolysis of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs)*. Biochem Soc Symp, 2003(70): p. 221-31.
146. Pagliuca, M.G., et al., *Regulation by heavy metals and temperature of the human BAG-3 gene, a modulator of Hsp70 activity*. FEBS Lett, 2003. **541**(1-3): p. 11-5.
147. Ghosh, J. and C.E. Myers, *Inhibition of arachidonate 5-lipoxygenase triggers massive apoptosis in human prostate cancer cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13182-7.
148. Ghosh, J. and C.E. Myers, *Arachidonic acid stimulates prostate cancer cell growth: critical role of 5-lipoxygenase*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **235**(2): p. 418-23.
149. Buhmeida, A., et al., *PLA2 (group IIA phospholipase A2) as a prognostic determinant in stage II colorectal carcinoma*. Ann Oncol, 2009. **20**(7): p. 1230-5.
150. Fijneman, R.J. and R.T. Cormier, *The roles of sPLA2-IIA (Pla2g2a) in cancer of the small and large intestine*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 4144-74.
151. Hofer-Warbinek, R., et al., *A highly conserved proapoptotic gene, IKIP, located next to the APAF1 gene locus, is regulated by p53*. Cell Death Differ, 2004. **11**(12): p. 1317-25.
152. Ziegler-Heitbrock, H.W., et al., *Pyrrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes*. J Immunol, 1993. **151**(12): p. 6986-93.
153. Schreck, R., et al., *Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells*. J Exp Med, 1992. **175**(5): p. 1181-94.
154. Verkman, A.S., M. Hara-Chikuma, and M.C. Papadopoulos, *Aquaporins--new players in cancer biology*. J Mol Med, 2008. **86**(5): p. 523-9.
155. Ismail, M., et al., *Inhibition of the aquaporin 3 water channel increases the sensitivity of prostate cancer cells to cryotherapy*. Br J Cancer, 2009. **100**(12): p. 1889-95.
156. Coppe, J.P., et al., *Id-1 and Id-2 proteins as molecular markers for human prostate cancer progression*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(6): p. 2044-51.
157. Asirvatham, A.J., M.A. Schmidt, and J. Chaudhary, *Non-redundant inhibitor of differentiation (Id) gene expression and function in human prostate epithelial cells*. Prostate, 2006. **66**(9): p. 921-35.
158. De Bessa, S.A., et al., *JDPI (DNAJC12/Hsp40) expression in breast cancer and its association with estrogen receptor status*. Int J Mol Med, 2006. **17**(2): p. 363-7.
159. Acosta-Alvear, D., et al., *XBPI controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks*. Mol Cell, 2007. **27**(1): p. 53-66.
160. Kim, H.C., et al., *HDAC3 selectively represses CREB3-mediated transcription and migration of metastatic breast cancer cells*. Cell Mol Life Sci, 2010.
161. Huang, W., et al., *Increases in intracellular calcium dephosphorylate histone H3 at serine 10 in human hepatoma cells: potential role of protein phosphatase 2A-protein kinase CbetaII complex*. J Cell Physiol, 2005. **205**(1): p. 37-46.

