#### Camila Bonin Pinto

# Efeito da desregulação da via UPR sobre a expressão da ciclina A1 em linfócitos B humanos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador:

Profa. Dra. Maristela Martins de Camargo

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo 2012

#### **RESUMO**

Pinto BP. Efeito da desregulação da via UPR sobre a expressão de ciclina A1 em linfócitos B humanos. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

A via Unfolded Protein Response (UPR) é uma via de sinalização ativada pelo estresse do Retículo endoplasmático (ER). Existem três sensores presentes no ER que detectam a presença de proteínas não dobradas: IREa, PERK e ATF6. Anteriormente foi descrito um paciente com Imunodeficiência Comum Variável (CVID) que apresenta um atraso na ativação da via UPR associado com o acúmulo de imunoglobulinas dentro do ER. Linfócitos B imortalizados pelo vírus Epsein Barr (EBV-B) desse e de outros pacientes com CVID apresentam uma taxa de proliferação diminuída quando comparados com EBV-B de doadores saudáveis. A Ciclina A1 é uma proteína envolvida na regulação do ciclo celular e tem a expressão aumentada quando ocorre a indução do IRE1α, sugerindo uma regulação entre o ciclo celular e o estresse do ER. Nosso principal objetivo foi analisar se o estresse do ER pode alterar o ciclo celular dos linfócitos B dos pacientes com CVID e de controles saudáveis. Para investigar a relação da UPR com o ciclo celular, estabelecemos um sistema no qual drogas estressoras do ER foram usadas para ativar a via UPR, seguido de análises de ciclo celular, apoptose e expressão relativa de genes associados a via UPR em diferentes linhagens de linfócitos B e em células ex vivo. Cada amostra foi analisada por citometria de fluxo, PCR em tempo real e RT-PCR. Nossos resultados demonstram que a ativação crônica da UPR interrompe o ciclo celular de EBV-B através da quebra da natureza cíclica da Ciclina A1. Sob a ativação crônica do ER, a expressão de Ciclina A1 se manteve elevada por até 24 h de cultura. Como consequência observamos o aumento do número de células nas fase S ou G1 do ciclo celular. Essa parada foi dependente da linhagem EBV-B estudada e da droga utilizada. Além disso, a ativação crônica da UPR aumenta a apoptose através da ativação do braço da PERK da via UPR aumentando a expressão do fator pró-apoptótico CHOP. Células ex vivo e EBV-B do paciente P também foram analisadas e apresentaram uma taxa metabólica muito baixa e número aumentado de células em apoptose. Não foi possível observar as alterações do ciclo celular nas células do paciente devido à falta de resposta proliferativa frente aos diferentes estímulos. Entretanto, observamos que a deficiência da resposta do paciente P frente à ativação da via UPR parece ser no reconhecimento de proteínas não dobradas. Isso porque os linfócitos B do paciente esboçam uma resposta quando o estresse do ER é gerado por drogas como a tapsigargina e a brefeldina A, mas não pelo DTT. Nossos resultados sustentam a hipótese de que a proliferação deficiente observada no paciente P pode ser resultado de uma ativação deficiente da via UPR. Estabelecemos um sistema que nos permite investigar como o stress de ER altera o ciclo celular e vice-versa. A identificação dos mecanismos correguladores que existem entre UPR e componentes do ciclo celular proverá entendimento dos mecanismos que coordenam a resposta de um linfócitos B depois da ativação antigênica

Palavras-chave: UPR. Linfócitos B. CVID. Ciclo celular.

#### **ABSTRACT**

Pinto BP. Effect of the deregulation of the UPR pathway in the expression of cyclin A1 in human B lymphocytes. [Masters Thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2012.

The unfolded protein response (UPR) is a signaling pathway activated by endoplasmic reticulum (ER) stress. Unfolded proteins are sensed by three ER residents, IRE1α, PERK and ATF6. Previously we described a patient (Patient P) with Common Variable Immunodeficiency (CVID) whose delayed activation of the UPR correlates with accumulation of immunoglobulins inside the ER. Epstein Barr virus (EBV)-immortalized B cells (EBV-B) from this and some other CVID patients have a slower rate of proliferation when compared to EBV-B cells from healthy donors. Cyclin A1 is a protein involved in cell cycle regulation and has its expression increased significantly when induced by IRE1a, suggesting an intersection between cell cycle and ER stress. Our main goal is to clarify the deficient proliferation of B lymphocytes from CVID patients, investigating whether ER stress can alter the ability of a B cell to cycle. To investigate the modulation of the UPR through the cell cycle, we established a system where a combination of ER stressors are used to activate the UPR pathway followed by the analysis of the cell cycle, apoptosis and expression of UPR targets in several lineages of B cells as well as ex vivo B cells. Cells from each sample were analyzed by flow cytometry (proliferation, cell cycle and apoptosis), real time PCR and RT-PCR.Our results showed that chronic UPR stress interrupted cell cycling of EBV-B cells through dysruption of the cyclic nature of cyclin A1. Upon chronic ER stress, the expression of cyclin A1 remained high even after 24 hours of culture. As a consequence we observed increased numbers of cells at S and G1 phases, depend of the cell type and drug. Furthermore, chronic ER stress triggered early apoptosis through activation of the PERK branch of the UPR and increased levels of CHOP transcripts, a pro apoptotic factor downstream of PERK. EBV-B and ex vivo cells from patient P were also analyzed and presented low metabolic rate and a high apoptosis rate even in the absence of ER stressors. We were unable to observe cell cycle alterations in this patient's cells due to their lack of proliferative response to several tested stimuli. However we noted that the deficiency of UPR pathway activation by Patient P appears to be on the recognition of unfolded proteins. Patient's P lymphocytes outline a response when the ER stress is generated by drugs such as thapsigargin and brefeldin A, but not with DTT.Our results support the hypothesis that deficient proliferation observed in some CVID patients might be the result of deficient UPR activationWe established a system that allows us to investigate how ER stress interferes with cell cycling and vice-versa. The identification of the co-regulatory mechanisms existing between UPR and cell cycling components will provide us with insights in the mechanisms that coordinate a B cell's response after antigenic activation

Keywords: UPR. B cells. CVID. Cell cycle.

### 1.1 O retículo endoplasmático e o dobramento de proteínas

O retículo endoplasmático (ER) é uma organela exclusiva de células eucarióticas, formado por uma invaginação da membrana plasmática e constituído por um extenso labirinto de ramificações tubulares achatadas (1).

O ER é uma organela chave para a secreção de proteínas, tendo um papel importante em passos que incluem o dobramento, as modificações pós-traducionais e a formação de complexos protéicos. Aproximadamente um terço de todas as proteínas celulares é translocado para dentro do lúmen do ER e este deve assegurar que as proteínas sejam dobradas corretamente (1).

O dobramento de uma proteína começa assim que sua síntese se inicia, nos ribossomos citosólicos, e só é considerado encerrado quando esta proteína sai do ER (1-3). No caso do ER de mamíferos, o dobramento das proteínas é facilitado por dois sistemas de chaperonas residentes nessa organela: calnexina/calretirulina e BiP (Binding Protein, HSPA5 - heat shock 70 kDa protein 5 ou GRP78 – glucose responsive protein), que se associam com as cadeias polipeptídicas assim que estas emergem no lúmen do ER. A BiP é responsável pela detecção de regiões desdobradas de peptídeos nascentes, sendo o principal sistema de dobramento de proteínas não glicosiladas ou naquelas em que a glicosilação ocorre tardiamente (4). A glicosilação das cadeias polipeptídicas nascentes também aumenta a sua solubilidade e diminui sua agregação (5).

A fim de que apenas proteínas dobradas corretamente possam sair e atingir o seu destino final, o ER possui mecanismos de controle de qualidade dos diferentes estágios de dobramento. Este controle de qualidade, que identifica proteínas mal ou não dobradas e as redireciona para a degradação via ubiquitina/proteassoma é denominado de ERAD (ERassociated protein degradation) (6). Proteínas que apresentam uma mutação ou um domínio estrutural que impede seu dobramento correto, mesmo com a ajuda de chaperonas, devem ser impedidas de entrar na via secretória e se acumulam no ER. Quando proteínas que são exportadas do ER sem o dobramento correto associam-se a algumas doenças humanas como diabetes do tipo I e fibrose cística (6). Além disso, a precipitação de proteínas em formas maldobradas pode levar a morte celular por apoptose. Várias doenças estão associadas a este fenômeno, como por exemplo: Doença de Huntington (7), Mal de Alzheimer (8) e a fibrose cística (9).

O ER deve aumentar a sua capacidade de dobramento de proteínas em células que se encontram em um estágio específico e em tecidos com altos níveis de proteínas secretadas. Os linfócitos B ativados, que secretam grandes quantidades de anticorpos, e as células β-pancreáticas, produtoras de insulina, são alguns exemplos de células que requerem um aumento da capacidade de dobramento de proteínas do ER (10).

O acúmulo de proteínas não dobradas e/ou mal dobradas resulta no estresse do ER. Para resolver estes acúmulos transitórios, o ER pode aumentar sua capacidade de dobrar proteínas e/ou aumentar sua capacidade de destruí-las. Nas células eucarióticas um dos mecanismos que medeia essa regulação na tentativa de resolver o estresse do ER é a via Unfolded Protein Response (UPR). A UPR induz a transcrição de chaperonas do retículo endoplasmático para aumentar o dobramento de proteínas, e atenua a tradução de proteínas para diminuir a sobrecarga do ER. A via UPR também regula a transcrição de genes associados ao ERAD, o que aumenta a degradação protéica, processo no qual proteínas mal dobradas são exportadas para o citosol e degradadas pelo sistema ubiquitina/proteassoma. A via UPR ainda ativa o programa de apoptose se todas essas medidas anteriores falharem (11, 12).

## 1.2 A via Unfolded Protein Response

A Unfolded Protein Response (UPR) é uma complexa via de sinalização que é ativada em todos os organismos eucarióticos em resposta a perturbações no ambiente do ER que possam interferir no dobramento correto de proteínas. A via UPR foi originalmente descrita na levedura Saccharomyces cerevisae e é altamente conservada evolutivamente, e está presente desde fungos a mamíferos (13, 14).

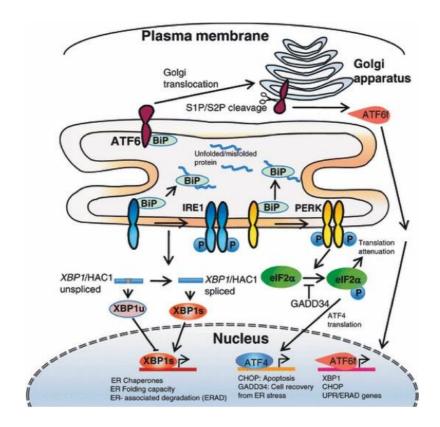
Análises da via UPR iniciaram-se no fim dos anos 80, quando foi verificado que o acúmulo de proteínas não dobradas no retículo endoplasmático induzia a expressão das chaperonas GRP78 e GRP94 (15). O uso da levedura Saccharomyces cerevisae como modelo de estudo da via UPR levou a uma rápida compreensão dos mecanismos moleculares desta via.

O estresse do retículo endoplasmático pode ser causado por várias condições fisiológicas e patológicas que alteram sua homeostasia, tais como um desbalanço de cálcio (16), níveis diminuídos de glicose (17), isquemia tecidual (18), infecções virais (19), mutações que alteram proteínas (20) e a diferenciação terminal de linfócitos B em plasmócitos (21).

Durante a ativação da via UPR em vertebrados, a presença de estresse é detectada por três proteínas transmembranares do ER: PERK (PKR-like ER kinase), ATF6 (Activating

transcription factor 6) e IRE1 (Inositol-requiring enzyme1) (22, 23). Essas proteínas associam-se pelos seus domínios luminais com a chaperona BiP, e quando liberadas, cada proteína inicia um mecanismo regulatório diferente (Figura 1).

Figura 1 - Via de sinalização em resposta às proteínas desdobradas no retículo endoplasmático (via Unfolded Protein Response - UPR)



As proteínas transmembranares IRE1, PERK e ATF6 após se desligarem da BiP são ativadas e induzem a transcrição de genes responsáveis pelo aumento da produção de chaperonas, diminuição da carga de proteínas e pela melhora na capacidade de degradação associada ao retículo (ERAD). O estresse do ER desencadeia a via UPR com o objetivo de aumentar a eliminação de proteínas mal dobradas e consequentemente diminuir o estresse do ER.

Fonte: Adaptado de Costa et al., 2011 (24)

A BiP é uma das chaperonas mais importantes do ER e auxilia o dobramento de proteínas nascentes assim que estas entram no ER pelo canais protéicos Sec 61. Durante a ativação da via UPR, a BiP se dissocia das proteínas transmembranares IRE1, ATF6 e PERK pois possui maior afinidade por proteínas não dobradas que se encontram no lúmen do ER (25). Essa dissociação permite que tanto a IRE1 quanto a PERK se dimerizem e tornem-se ativadas (23, 26). A dissociação da BiP com o ATF6 permite que este migre para o complexo de Golgi (27).

A BiP desliga-se facilmente dos sensores transmembranares, mesmo quando existem baixas concentrações de proteínas não dobradas (26). Entretanto não é sabido o mecanismo que garante que a BiP fique ligada aos sensores na ausência de estresse. O desligamento da BiP das proteínas transmembranares IRE1, PERK e ATF6 poderia por si só ativar a via UPR, idenpendentemente de outros sinais. Entretanto esse não é o caso para a ativação do ATF6. Um sinal desconhecido também é necessário para o transporte do ATF6 do ER para o Golgi (27).

#### 1.2.1 IRE1

A IRE1 é uma kinase serina/treonina transmembranar do tipo I cujo domínio N-terminal se localiza no lúmen do ER e a porção C-terminal se estende pelo citoplasma (28). Existem dois homólogos do gene ire1 em mamíferos: ire1α, que é expresso na maioria das células e tecidos, e ire1β, cuja expressão está primariamente restrita às células epiteliais intestinais (29).

A porção citosólica da IRE1 contém tanto um domínio kinase quanto um endoribonuclease, ambos são requeridos para o splicing não convencional do RNA mensageiro (mRNA) do XBP1. O XBP1 é um membro da família CREB/ATF de fatores de transcrição, originalmente identificado como importante para a diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos (21).

O domínio endoribonuclease da IRE1 promove uma clivagem sítio específico no mRNA do XBP1, que remove um íntron de 26 nucleotídeos. A remoção deste íntron produz uma mudança de fase de leitura do mRNA do XBP1, resultando numa proteína de 376 aminoácidos que atua como a forma ativa do fator de transcrição XBP1 (XBP1spliced - XBP1s) (30). A forma unspliced do mRNA (XBP1u) atua como dominante-negativo do fator de transcrição. No núcleo, o XBP-1s se liga ao ERSE (ER stress responsive element), induzindo a transcrição de chaperonas, e ao UPRE (unfolded protein responsive element), induzindo a transcrição de genes relacionados à degradação protéica, incluindo o EDEM (ER degradation enhancing a-mannosidade-like protein) (31). O EDEM é uma proteína transmembranar tipo II do ER. Sua superexpressão aumenta a degradação de glicoproteínas mal dobradas que contenham um motivo oligossacarídeo específico, o Man8-(GluNAc-Mannooctaose-di-(N-acetyl-D-glucosamine) (32).

A IRE1 também tem um papel importante na regulação da apoptose dependente da ativação da via UPR. Seu domínio citoplasmático pode recrutar a proteína adaptadora TRAF2

(TNF receptor-associated factor 2), que por sua vez recruta e ativa a caspase-12, um indutor de morte específico para o estresse do ER (33). Durante a ativação da via UPR, TRAF2 se dissocia da IRE1, levando à ativação da JNK kinase (JNKK), que ativa JNK. A ativação de JNK resulta na ativação do fator de transcrição API (activing protein-1), que está envolvido com a morfogênese embrionária, a proliferação e a apoptose (34).

A função da IRE, durante a ativação da via UPR, envolve desde a regulação da expressão de genes relacionados à degradação protéica e a chaperonas, quanto na regulação da apoptose.

### 1.2.2 ATF6

O ATF6 é outro membro da família CREB/ATF de fatores de transcrição (24). Mediante a ativação da UPR, a interação do ATF6 com a BiP é quebrada, e o ATF6 migra para o complexo de Golgi, onde sofre clivagem proteolítica pelas proteases S1P e S2P (site-1 e site-2 proteases), liberando seu fragmento N-terminal, chamado de ATF6f, que então se transloca para o núcleo (35).

No núcleo, o ATF6f ativa o ERSE (ER stress response element), que controla a expressão de genes que codificam para chaperonas residentes do ER como a BiP e GRP94 (33). Além disso, o ATF6 também induz a transcrição de XBP-1 (27, 35).

#### 1.2.3 PERK

O braço sinalizado pela proteína PERK é aquele que possui funções mais diversificadas dentro da via UPR, incluindo a repressão da tradução e a ativação de um fator de transcrição, o ATF4 (37, 38). A PERK também está envolvida tanto na via de sinalização pró-apoptótica quanto na de sobrevivência, sendo importante para decidir o destino das células (39). E, finalmente, a PERK está envolvida com a parada das células do ciclo celular durante o estresse do ER (40).

Assim como a IRE1, a PERK é uma kinase serina/treonina transmembranar do tipo I e possui a sua cauda N-terminal no lúmen do ER (16). Quando ativada, a PERK fosforila a subunidade alfa do fator de iniciação translacional-2 (eIF2α). A fosforilação do eIF2α mantém esse fator na forma inativa e interfere na formação do complexo iniciador da tradução 43S, levando à repressão da tradução (16). Esta inibição da tradução reduz o influxo de proteínas recém sintetizadas no ER (16).

O ATF4 é um fator de transcrição que pertence à família CREB de fatores de transcrição, e pode induzir a transcrição de CHOP/GADD153 (C/EBP homologous protein) e GADD34 (growth-arrest DNA-damage gene 34) (16). O GADD34 é uma proteína citosólica que se associa com a proteína fosfatase 1 (PP1), que por sua vez desfosforila o eIF2α e promove a retomada da síntese protéica, um mecanismo de retroalimentação que assegura que a via não seja hiperativada (42). Em fibroblastos murinos deficientes em PERK, a transcrição de CHOP durante a ativação da via UPR encontra-se diminuída, demonstrando que a CHOP é um alvo dependente da ativação da PERK (37).

Dados experimentais correlacionam a transcrição de CHOP com a apoptose. A superexpressão de CHOP aumenta a apoptose, enquanto que células deficientes de CHOP têm a morte reduzida (43). A CHOP pode induzir a expressão do DR5 (death receptor 5) e do TRB3 (tribbles-related protein 3) de forma estresse-dependente e modular a morte celular associada a UPR (44). O DR5 é um membro da família TNFR e pode mediar a morte celular através do complexo FADD de sinalização (44).

A CHOP também sensibiliza as células à morte induzida por estresse através da supressão do fator antiapoptótico B cell lymphoma-2 (Bcl-2) e a superexpressão de Bim, o único fator pro-apoptótico da família Bcl-2 (45). Além disso, a CHOP pode induzir a apoptose por meio da superexpressão de Ero-1, uma tiol-oxidase que medeia a formação de pontes dissulfeto para promover o dobramento de proteínas no ER, mas também gera como subproduto espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem contribuir para a ativação de uma gama de vias pro-apoptóticas (45).

A PERK tem um papel na ativação de genes apoptóticos, sendo também responsável pela clivagem proteolítica e ativação da procaspase-12, uma caspase associada ao ER (33). É sabido que a caspase-12 não é ativada em MEF (murine embryonic fibroblast) PERK (39). Além disso, células PERK são mais susceptíveis à morte celular durante a ativação da via UPR (39). Essas observações sugerem que a ativação da PERK leva a eventos que protejem a célula da morte enquanto induz, ao mesmo tempo, alguns eventos apoptóticos. Ou seja, a PERK medeia eventos promovendo a sobrevivência e a morte celular simultaneamente, sem se comprometer especificamente com nenhuma das vias (46-48).

## 1.3 A ativação da via UPR

A ativação dos três sensores da UPR, IRE1, ATF6 e PERK, leva a uma reprogramação transcricional pela indução de três fatores de transcrição: XBP1, ATF6f e ATF4. Cada um desses fatores de transcrição é ativado por um mecanismo exclusivo: o XBP1 é produzido pela IRE1 via o splicing do mRNA do XBP1; ATF6f é ativado por uma clivagem proteolítica do seu precursor o ATF6; e a tradução do ATF4 é aumentada devido a sua associação preferencial com poliribossomos durante a ativação do braço PERK da UPR (4, 6).

O perfil genômico de fibroblastos derivados de embriões de camundongos deficientes para XBP1 ou ATF4, ou tecido deficiente de ATF6f, revelou que, cada fator de transcrição é responsável por uma parcela de genes alvos da UPR (37, 49-52). Por exemplo, a transcrição de EDEM, DnaJ/Hsp40, p58<sup>PK</sup>, ErdJ4, HEDJ, PDI-P5, PAMP4 é regulada por XBP1 (52). A indução transcricional desses genes após a ativação da UPR em células deficientes de XBP1 é reduzida (52). Muitas proteínas codificadas por esses genes estão envolvidas no ERAD, como por exemplo o EDEM (32). O EDEM codifica para a proteína ER degradation enhancing alfamannosidade like, envolvida no reconhecimento de substratos alvos para a degradação. Sendo assim, um papel importante do braço IRE1-XBP1 durante a ativação da UPR é a degradação de proteínas permanentemente não dobradas, via ERAD (11, 12, 37).

Por sua vez o ATF6f é capaz de induzir a transcrição de XBP1 e está possivelmente envolvido com a regulação positiva da chaperona BiP, uma vez que induz a transcrição dessa chaperona (27, 53).

O braço da PERK-ATF4 pode ser responsável pelo destino das células durante a UPR, uma vez que os genes alvos incluem CHOP, MGP, GADD45 e HERP (4, 16, 45).

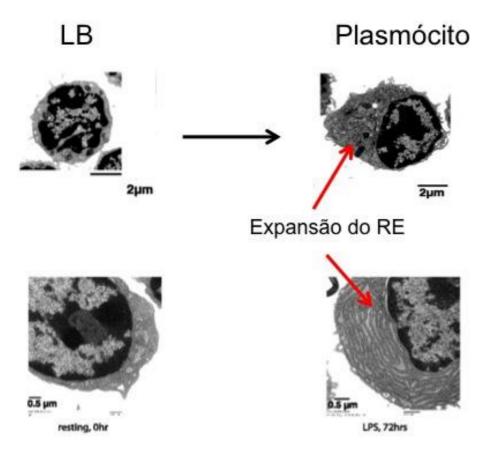
Os três braços sinalizadores da UPR são responsáveis pela ativação de genes envolvidos em aspectos diferentes da própria via, mostrando a complexidade destes mecanismos regulatórios.

Além desta complexidade já conhecida, dados recentes mostram genes alvos dependentes de múltiplos fatores de transcrição. Células deficientes de SP1 ou SP2, proteases responsáveis pela clivagem do ATF6 no Golgi, exibem uma transcrição diminuída de BiP e GRP98 durante a UPR. Este fato evidencia que a ativação do ATF6 também é necessária para indução do ERSE (ER-response element) durante a UPR, assim como é necessária a do XPB1 (27, 34, 49). A indução da transcrição de BiP é também inibida em células PERK<sup>-</sup>/-, sugerindo que a transcrição de chaperonas do ER como BiP e GRP98 pode também depender do braço PERK-ATF4 (43).

## 1.4 O papel da via UPR na diferenciação dos plasmócitos

O papel da via UPR durante a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos foi primeiramente observado quando Reimold e colaboradores demonstraram que o fator de transcrição XBP1 é essencial para a diferenciação terminal dos linfócitos B (21). A diferenciação das células B em plasmócitos envolve a remodelagem da via secretora. O ER sofre um processo de expansão, necessário para acomodar grandes quantidades de moléculas de imunoglobulinas (Igs) recém-sintetizadas e assegurar a maturação e montagem das subunidades monoméricas de Igs em complexos multiméricos (Figura 2). Uma vez que este processo aumenta a quantidade de proteínas a serem dobradas no ER, e o acúmulo de proteínas não dobradas estressa o ER, a ativação da via UPR é requerida durante o desenvolvimento do plasmócito (21, 54).

Figura 2 - Expansão do ER durante a diferenciação de linfócitos B em plasmócitos



É possível observar a expansão do ER durante o processo de diferenciação de linfócitos B em plasmócitos. Tal evento ocorre para acomodar as imunoglobulinas produzidas e depende da ativação da via UPR.

Fonte: Modificado de Skalet et al. (2005) (55).

As funções de XBP1 foram inicialmente estudadas em linhagens de mieloma humano, nas quais se verificou um aumento na proliferação de plasmócitos malignos proporcionalmente à expressão de XBP1 induzida por IL-6. A maior expressão de transcritos de XBP1 foi detectada em infiltrados de plasmócitos presentes em doenças inflamatórias, como artrite reumatóide, e em culturas primárias de linfócitos B de camundongos estimuladas com anti-CD40 ou LPS (21). O efeito de XBP1 sobre a biologia dos linfócitos B tornou-se ainda mais evidente após a demonstração de que animais quiméricos deficientes de XBP1 e RAG (XBP1-/- RAG-2-/-) apresentavam defeitos severos na imunidade humoral (21).

Os linfócitos B dos camundongos quiméricos XBP1 / RAG-2 / mostraram-se menos diferenciados, com expressão aumentada de c-myc e menor expressão da cadeia J de imunoglobulinas, sendo que esta última é necessária para a geração de plasmócitos secretores de IgM e IgA. No entanto, a reintrodução de XBP1s nas células in vitro induziu proliferação, mudança de classe de imunoglobulinas, expressão de moléculas de superfície e secreção normal de citocinas, demonstrando que o XBP1 é essencial para a formação dos plasmócitos (21).

#### 1.5 UPR e CVID

A Imunodeficiência Comum Variável (CVID – common variable immuno deficiency) é a imunodeficiência primária clinicamente importante mais comum em humanos adultos. Estima-se que sua prevalência seja de 1 paciente em 10.000 a 50.000 pessoas (56). O primeiro caso de CVID foi descrito por Janeway e colaboradores em 1953: uma mulher de 39 anos com infecções sinopulmonares recorrentes, bronquite e meningite por Haemophilus influenza (57).

A CVID é definida clinicamente pela presença de três características principais: hipogamaglobulinemia, que é a redução ou ausência nos níveis séricos de dois ou mais isotipos de anticorpos (IgG, IgA ou IgM), infecções recidivantes principalmente do trato respiratório e gastrointestinal e a deficiência na resposta humoral, tanto relacionada à infecção natural quanto à vacinação (58).

A produção de imunoglobulinas pelos plasmócitos envolve uma série de eventos e depende da participação de várias vias. Deste modo a hipogamaglobulinemia observada nos pacientes com CVID, pode resultar de falhas desde a apresentação dos antígenos até a secreção das imunoglobulinas.

Nosso grupo identificou anteriormente um paciente com CVID (Paciente P) que

apresenta a ativação do eixo IRE1α/XBP1 atrasada quando comparado com um controle saudável. Dada a importância do XBP1s na ativação da maquinaria secretória de imunoglobulinas por plasmócitos, foi postulado que esse defeito poderia estar relacionado à hipogamaglobulinemia apresentada pelo paciente.

Células B imortalizadas com EBV ou obtidas ex vivo do Paciente P e de um indivíduo saudável foram tratadas com LPS ou Brefeldina A. Foi constatado que o splicing de XBP1 e a transcrição dos genes HSPA5 (codifica para BiP) e IRE1A ocorria de maneira muito mais lenta nas células do Paciente P após o tratamento do que nas células do controle. Além disso, foi observado nos linfócitos B obtidos do sangue periférico do Paciente P, que a IgM colocalizava com a BiP no interior do retículo endoplasmático, diferentemente do esperado e do observado nas células do controle nas quais a IgM encontrava-se na superfície celular. Essa observação indica a retenção das cadeias de imunoglobulinas no lúmen do ER. O sequenciamento do XBP1 e dos domínios quinase e endonuclease da IRE1α do Paciente P não mostrou mutações que poderiam explicar a ativação defeituosa. Foi também demonstrado que o tratamento destas células com DMSO, uma chaperona química, foi capaz de resgatar parcialmente a homeostasia do ER nestas células, levando ao desligamento da via UPR e alguma secreção de IgM e IgG (59).

Durante a execução desse trabalho, foi observado que as células imortalizadas com EBV do Paciente P demostravam uma proliferação reduzida em relação às células imortalizadas do controle saudável. Foi realizada uma curva de crescimento na qual as duas culturas foram semeadas com o mesmo número de células e quantificadas na presença de Azul de Trypan (Figura 3).

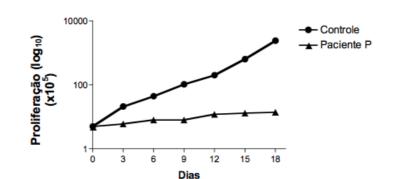


Figura 3 - Cinética de proliferação das células imortalizadas do controle e do Paciente P

Os linfócitos B imortalizados do Paciente P possuem uma proliferação reduzida quando comparados com os de um controle saudável. \*\* p = 0.02.

Fonte: Kuribayshi (2006) (60)

Em acordo com esta observação, Guo e colaboradores também verificaram que as células imortalizadas com EBV de alguns pacientes com CVID possuíam uma taxa de proliferação reduzida quando comparadas com as células imortalizadas por EBV provenientes de indivíduos saudáveis (61).

Ao longo dos anos, alguns estudos têm surgido relacionando a via UPR com o ciclo celular. Em princípio, o estresse do ER poderia indiretamente impedir a progressão do ciclo celular, interferindo na maturação de receptores de fatores de crescimento ou outros moduladores mitóticos/mitogênicos. Além disso, o estresse do ER poderia impedir as células de completar a divisão celular em circunstâncias nas quais o dobramento apropriado de proteínas estivesse prejudicado.

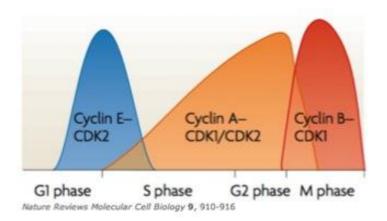
#### 1.6 UPR e o ciclo celular

Nas células eucarióticas há uma rede complexa de regulação que governa a progressão do ciclo celular. O ciclo celular é dividido nas fases G1, S (onde ocorre a duplicação do DNA), G2 e M (onde ocorre agregação cromossômica e a divisão celular) (62).

As proteínas kinases cdks (cyclin-depend kinases) fazem parte do sistema de controle do ciclo celular. As ciclinas são proteínas reguladoras das cdks, e têm esse nome pois são sintetizadas e degradadas a cada ciclo celular. A ativação do complexo cdk-ciclina desencadeia os eventos do ciclo celular (62, 63)

A ativação da cdk4 ou da cdk6 e a ativação da cdk2 são requeridas para a transição G1 para S do ciclo celular e a ativação da kinase cdc2 (cdk1) é necessária para a transição da fase G2 para a M (64). A cdk2 pode se ligar com as ciclinas A ou E, e o cdc2 com as ciclinas A ou B. A atividade kinase do complexo ciclina A-cdk2, cujo pico ocorre em G1-S, é requerida para a entrada na fase S (62). Além disso, a ciclina A também forma um complexo com a cdc2 cujo pico de ativação ocorre na transição de G2 para a mitose. A atividade kinase do complexo cdc2-ciclina A é requerida para a entrada na mitose (65) (Figura 4).

Figura 4 - Esquema da atividade dos complexos ciclinas - cdks durante a progressão do ciclo celular



De acordo com o modelo clássico da regulação do ciclo celular, as ciclinas D e as kinases cdk4 e cdk6 regulam os eventos envolvidos com o início da fase G1. O complexo ciclina E-cdk2 inicia a fase S, e os complexos ciclina A-cdk2 e ciclina A-cdk1 regulam o final da fase S. Enquanto o complexo ciclina B -cdk1 é responsável pelo início da mitose.

Fonte: Adaptado de Hochegger et al.(2008) (66)

Alguns autores têm explorado a relação entre o ciclo celular e o estresse do ER. Em 1991, mesmo antes da descrição da ativação da via UPR, Gosh e colaboradores (67) observaram que o tratamento de linhagens celulares musculares de hamster com tapsigargina, um estressor farmacológico do ER, bloqueava o ciclo celular e inibia a síntese de DNA.

A tapsigargina bloqueia a entrada de Ca<sup>+</sup> no ER aumentando a concentração de cálcio citosólicos e depletando o cálcio de dentro do retículo. A depleção de cálcio provoca o estresse do ER ativando a via UPR (67).

Brewer e colaboradores demonstraram que a tunicamicina induz a perda de ciclina D1 e a parada do ciclo celular em G1 (40). A tunicanicina é outro estressor conhecido do ER que bloqueia a N-glicosilação de proteínas pela inibição de transferência de N-acetilglicosamina fosfato para dolicol fosfato, o primeiro passo na síntese do precursor oligossacarídico (68). A não glicosilação das cadeias polipeptídicas diminui a sua solubilidade e a aumenta sua agregação, o que provoca a ativação da via UPR (5). Nesse estudo, fibroblastos murinos NIH 3T3 foram incubados na presença de 0,5 ug/ml de tunicamicina resultando na parada das células em G0-G1 após 16 h, embora ainda fosse possível observar células nas fases S e G2 do ciclo celular. O tratamento com tunicamicina também foi capaz de induzir o acúmulo das proteínas BiP e CHOP e a diminuição dos níveis de ciclina D1 (69).

Foi demonstrado também que a fosforilação do eIF2α, que dependente da ativação da PERK, leva à inibição da síntese de proteínas em geral e leva à degradação ubiquitina-

dependente da ciclina D1 pelo proteassoma 26S (70). A ciclina D1 funciona como uma subunidade regulatória de haloenzimas que controlam a progressão através da fase G1 do ciclo celular (71).

Em 2009, outra ciclina foi associada com a ativação da via UPR. Thorpe e colaboradores identificaram a IRE1α como uma reguladora de proliferação de linhagens celulares derivadas de câncer de próstata humana. Estes autores demonstraram que em circunstâncias onde a atividade da IRE1α estivesse prejudicada, as células proliferavam vagarosamente, mesmo na ausência de estresse do ER. Em contraste, quando sua atividade estava elevada havia uma estimulação da proliferação celular. Utilizando RNA de interferência para XBP-1 total verificou-se que as células com níveis reduzidos de XBP-1 apresentavam a capacidade de proliferação diminuída. A fim de identificar os genes alvos dependentes de IRE1α/XBP1, estes autores compararam a expressão de genes em células controles com células que superexpressavam IRE1α. O gene que codifica para Ciclina A1 teve sua expressão aumentada significativamente, sugerindo sua indução por IRE1α (72).

A Ciclina A1 humana é altamente expressa em linhagens celulares leucêmicas mielóides, nos testículos e no cérebro, e em baixos níveis em muitas linhagens celulares de diversos tecidos. Tem um importante papel durante a meiose nos testículos, entretanto seu papel durante a mitose ainda não está totalmente esclarecido (73).

Yang e colaboradores encontraram em humanos uma sequência protéica homóloga à Ciclina A1 encontrada em camundongos (84% de similaridade), que também possui homologia e maior similaridade com a Ciclina A1 encontrada em Xenopus (59% de similaridade) do que com a Ciclina A de humanos (48% de similaridade). Estes autores demonstraram que a Ciclina A1 também é capaz de associar-se a cdk2 e regular a entrada da célula na fase S (74).

Em contraste, em 2012 Li e colaboradores observaram que em hepatócitos HepG2 a superexpressão da IRE1α inibe, enquanto o silenciamento por RNA de interferência (siRNA) aumenta, a proliferação celular (75). A superexpressão de IRE1α inibiu a expressão endógena da kinase PLK1 (Pólo-like kinase 1). A PKL1 pertence à família de kinases serina/treonina com o domínio polo Box, e é importante para assegurar a mitose, uma vez que atua na maturação do centrossomo durante a fase tardia do G2 e no início da prófase no estabelecimento do fuso mitótico (62, 75). Portanto níveis reduzidos de PKL1 provocados pela superexpressão de IRE1α, atrasariam a mitose provocando a inibição da proliferação. Após o tratamento com tunicamicina, as células que superexpressavam IRE1α tiveram o número de células em G1 aumentado e na fase S diminuídos. Em contraste, as células

deficientes para IRE1α tiveram o número de células aumentado na fase S, sugerindo que o nível de ativação da IRE1α poderia influenciar na fase do ciclo celular que as células acumulam durante o estresse da via UPR (75).

Embora os trabalhos mencionados apresentem mecanismos de ação diferentes quanto à ativação da via UPR sobre o ciclo celular, todos apontam para uma regulação do ciclo dependente da via UPR.

Consideramos que estudar a interação da ativação da via UPR com o ciclo celular possa nos fornecer mais dados sobre os aspectos imunológicos da relação da CVID, UPR o defeito na proliferação dos linfócitos B imortalizados do Paciente P. Além de tentar identificar mecanismos responsáveis pela hipogamaglobulinemia presente no subgrupo de pacientes acometidos pela CVID.

Os nossos resultados mostraram que a ativação da via UPR pela incubação com o DTT provoca o acúmulo dos transcritos de ciclina A1 e a parada do ciclo celular. A fase de parada do ciclo celular é dependente da droga estressora e da linhagem celular, corroborando a nossa hipótese de que a ativação da via UPR altera o ciclo celular de maneira estressorespecífica. No entanto, o contrário não se mostrou verdadeiro, a parada no ciclo celular provocada por nocodazol não ativou a via UPR. A alteração do ciclo celular provocada pela ativação da via UPR está correlacionada com o acúmulo dos transcritos de ciclina A1 e a interrupção da natureza cíclica dessa proteína.

Em relação aos experimentos realizados com os linfócitos B do Paciente P, observouse que a via UPR do Paciente P não é ativada em resposta ao DTT, mas sim em resposta a outros estressores conhecidos do ER como a tapsigargina, brefeldina A e o LPS. Uma vez que o DTT não causa nenhum dano estrutural nos sensores do ER este resultado sugere que defeito no braço da IRE1α, verificado no Paciente P, impede à ativação da UPR causada pelo DTT.

## REFERÊNCIAS\*

- 1. Simon SM, Peskin CS, Oster GF. What drives the translocation of proteins? Proc Natl Acad Sci U S A. 1992;89(9):3770-4.
- 2. Gilmore R. Protein translocation across the endoplasmic reticulum: a tunnel with toll booths at entry and exit. Cell. 1993;75(4):589-92.
- 3. Simon SM, Aderem A. Myristoylation of proteins in the yeast secretory pathway. J Biol Chem. 1992;267(6):3922-31.
- 4. Otero JH, Lizak B, Hendershot LM. Life and death of a BiP substrate. Semin Cell Dev Biol. 2010;21(5):472-8.
- 5. Aebi M, Bernasconi R, Clerc S, Molinari M. N-glycan structures: recognition and processing in the ER. Trends Biochem Sci. 2010;35(2):74-82.
- 6. Ellgaard L, Helenius A, Quality control in the endoplasmic reticulum. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003;4:181-191
- 7. Lajoie P, Snapp EL. Changes in BiP availability reveal hypersensitivity to acute endoplasmic reticulum stress in cells expressing mutant huntingtin. J Cell Sci. 2011;124(Pt 19):3332-43.
- 8. Liu Y, Lee SY, Neely E, Nandar W, Moyo M, Simmons Z, et al. Mutant HFE H63D protein is associated with prolonged endoplasmic reticulum stress and increased neuronal vulnerability. J Biol Chem. 2011;286(15):13161-70.
- 9. Bartoszewski R, Rab A, Fu L, Bartoszewska S, Collawn J, Bebok Z. CFTR expression regulation by the unfolded protein response. Methods Enzymol. 2011;491:3-24.
- 10. Mitchell CA, Beall JA, Wells JR, Gray PP. Growth and protein production kinetics of a murine myeloma cell line transfected with the human growth hormone gene. Cytotechnology. 1991;5(3):223-31.
- 11. Werner ED, Brodsky JL, McCracken AA. Proteasome-dependent endoplasmic reticulum-associated protein degradation: an unconventional route to a familiar fate. Proc Natl Acad Sci U S A. 1996;93(24):13797-801.
- 12. Harding HP, Zhang Y, Ron D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. Nature. 1999;397(6716):271-4.
- 13. Harding HP, Calfon M, Urano F, Novoa I, Ron D. Transcriptional and translational control in the Mammalian unfolded protein response. Annu Rev Cell Dev Biol. 2002;18:575-99.

<sup>\*</sup> De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011Jul 15]. Available from: http://www.icmje.org

- 14. Shamu CE. Splicing together the unfolded-protein response. Curr Biol. 1997;7(2):R67-70.
- 15. Hendershot LM, Ting J, Lee AS. Identity of the immunoglobulin heavy-chain-binding protein with the 78,000-dalton glucose-regulated protein and the role of posttranslational modifications in its binding function. Mol Cell Biol. 1988;8(10):4250-6.
- 16. Schroder M, Kaufman RJ. The mammalian unfolded protein response. Annu Rev Biochem.2005;74:739-789
- 17. Ritter C, Helenius A. Recognition of local glycoprotein misfolding by the ER folding sensor UDP-glucose:glycoprotein glucosyltransferase. Nat Struct Biol. 2000;7(4):278-80.
- 18. Glembotski CC. The role of the unfolded protein response in the heart. J Mol Cell Cardiol. 2008;44(3):453-9.
- 19. Tardif KD, Mori K, Siddiqui A. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. J Virol. 2002;76(15):7453-9.
- 20. Ryu JC, Kim YJ, Chai YG. Mutation spectrum of 1,2-dibromo-3-chloropropane, an endocrine disruptor, in the lacI transgenic Big Blue Rat2 fibroblast cell line. Mutagenesis. 2002;17(4):301-7.
- 21. Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravallese EM, et al. Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. Nature. 2001;412(6844):300-7.
- 22. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. Trends Cell Biol. 2004;14(1):20-8.
- 23. Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP, Ron D. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. Nat Cell Biol. 2000;2(6):326-32.
- 24. Costa CZ, da Rosa SE, de Camargo MM. The unfolded protein response: how protein folding became a restrictive aspect foi innate immunity and B lymphocytes. Scand J Immunol. 2001;73(5) 436-48.
- 25. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. Mt Sinai J Med. 2004;71(5):289-97.
- 26. Kimata Y, Oikawa D, Shimizu Y, Ishiwata-Kimata Y, Kohno K. A role for BiP as an adjustor for the endoplasmic reticulum stress-sensing protein Ire1. J Cell Biol. 2004;167(3):445-56
- 27. 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. 1999;10(11):3787-99

- 28. Kaufman RJ. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. Genes Dev. 1999;13(10):1211-33.
- 29. Tirasophon W, Lee K, Callaghan B, Welihinda A, Kaufman RJ. The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response. Genes Dev. 2000;14(21):2725-36.
- 30. Niwa M, Sidrauski C, Kaufman RJ, Walter P. A role for presenilin-1 in nuclear accumulation of Ire1 fragments and induction of the mammalian unfolded protein response. Cell. 1999;99(7):691-702.
- 31. Yoshida H, Matsui, T., Yamamoto, A., Okada, T., Mori, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. Cell. 2001;107(7):881-91.
- 32. Oda Y, Hosokawa N, Wada I, Nagata K. EDEM as an acceptor of terminally misfolded glycoproteins released from calnexin. Science. 2003;299(5611):1394-7.
- 33. Nakagawa T, Zhu H, Morishima N, Li E, Xu J, Yankner BA, et al. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. Nature. 2000;403(6765):98-103.
- 34. Urano F, Wang X, Bertolotti A, Zhang Y, Chung P, Harding HP, et al. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. Science. 2000;287(5453):664-6.
- 35. Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Dave UP, Prywes R, et al. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. Mol Cell. 2000;6(6):1355-64.
- 36. Shen X, Ellis RE, Lee K, Liu CY, Yang K, Solomon A, et al. Complementary signaling pathways regulate the unfolded protein response and are required for C. elegans development. Cell. 2001;107(7):893-903.
- 37. Scheuner D, Song B, McEwen E, Liu C, Laybutt R, Gillespie P, et al. Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis. Mol Cell. 2001;7(6):1165-76.
- 38. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell. 2000;6(5):1099-108.
- 39. Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, et al. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. Mol Cell. 2000;6(5):1099-108.
- 40. Brewer JW, Hendershot LM, Sherr CJ, Diehl JA. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D1 translation and cell-cycle progression. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(15):8505-10.

- 41. You KR, Liu MJ, Lee ZW, Kim DG. Transcriptional regulation of the human transferrin gene by GADD153 in hepatoma cells. Hepatolygy . 2003; 38:745-755
- 42. Boyce M, Yuan J. Cellular response to endoplasmic reticulum stress: a matter of life or death. Cell Death Differ. 2006;13(3):363-73.
- 43. Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Jungreis R, Harding HP, Ron D. Stress-induced gene expression requires programmed recovery from translational repression. EMBO J. 2003;22(5):1180-7.
- 44. Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A, Bookwalter A, Murray J, Hood L. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. Immunity. 1997;7(6):821-30.
- 45. Daniel NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. Cell. 2004; 116:205-219
- 46. Barone MV, Crozat A, Tabaee A, Philipson L, Ron D. CHOP (GADD153) and its oncogenic variant, TLS-CHOP, have opposing effects on the induction of G1/S arrest. Genes Dev. 1994;8(4):453-64.
- 47. Zinszner H, Kuroda M, Wang X, Batchvarova N, Lightfoot RT, Remotti H, et al. CHOP is implicated in programmed cell death in response to impaired function of the endoplasmic reticulum. Genes Dev. 1998;12(7):982-95.
- 48. Amundson SA, Myers TG, Fornace AJ, Jr. Roles for p53 in growth arrest and apoptosis: putting on the brakes after genotoxic stress. Oncogene. 1998;17(25):3287-99.
- 49. Yoshida H, Okada T, Haze K, Yanagi H, Yura T, Negishi M, et al. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. Mol Cell Biol. 2000;20(18):6755-67.
- 50. Lee K, Tirasophon W, Shen X, Michalak M, Prywes R, Okada T, 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):452-66.
- 51. Lee AH, Iwakoshi NN, Glimcher LH. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. Mol Cell Biol. 2003;23(21):7448-59.
- 52. Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Harding HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. Nature. 2002;415(6867):92-6.
- 53. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined action of ATF6alpha and XBP1. Dev Cell. 2007;13(3):365-76.
- 54. Iwakoshi NN, Lee AH, Vallabhajosyula P, Otipoby KL, Rajewsky K, Glimcher LH. Plasma cell differentiation and the unfolded protein response intersect at the transcription factor XBP-1. Nat Immunol. 2003;4(4):321-9.

- 55. Sckalet AH, Isler JA, King LB, Harding HP, Ron D, Monroe JG. Rapid B cell receptor-induced unfolded protein response in nonsecretory B cells correlates with pro-versus antiapoptotic cell fate. J Biol Chem. 2005; 280(48): 39762-71.
- 56. Notarangelo LD. Primary immunodeficiencies (PIDs) presenting with cytopenias. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2009:139-43.
- 57. Janeway CA, Apt L and Gitlin D. Agammaglobulinemia. 1953. Trans Assoc Am Phys 66: 200–204.
- 58. Lu W, Liu ZY, Li TS. [Common variable immunodeficiency: report of 12 cases and review of literature]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi. 2008;47(5):378-81.
- 59. Kuribayashi JS, Bombardieri CR, Baracho GV, Aliberti J, Machado FS, Kalil J, et al. Slower rescue of ER homeostasis by the unfolded protein response pathway associated with common variable immunodeficiency. Mol Immunol. 2008;45(10):2990-7.
- Kuribayashi, Juliana Sayuri. A desregulação da via UPR associada à imunodeficiência comum variável. Dissertação de Mestardo- Universidade de São Paulo. 2007
- 61. Guo BC, Saxon A. B cell lines from a subset of patients with common variable immunodeficiency undergo enhanced apoptosis associated with an increased display of CD95 (Apo-1/fas), diminished CD38 expression, and decreased IgG and IgA production. Cell Immunol. 1995;166(1):83-92.
- 62. Heichman KA, Roberts JM. Rules to replicate by. Cell. 1994;79(4):557-62.
- 63. Matsushime H, Ewen ME, Strom DK, Kato JY, Hanks SK, Roussel MF, et al. Identification and properties of an atypical catalytic subunit (p34PSK-J3/cdk4) for mammalian D type G1 cyclins. Cell. 1992;71(2):323-34.
- 64. Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. cdc2 protein kinase: structure-function relationships. Ciba Found Symp. 1992;170:30-41; discussion -9.
- 65. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(11):910-6.
- 66. Hochegger H, Takeda S, Hunt T. Cyclin-dependent kinases and cell-cycle transitions: does one fit all? Nat Rev Mol Cell Biol. 2008;9(11):910-6
- 67. Ghosh TK, Bian JH, Short AD, Rybak SL, Gill DL. Persistent intracellular calcium pool depletion by thapsigargin and its influence on cell growth. J Biol Chem. 1991;266(36):24690-7...
- 68. Eriksen SH, Jensen B, Olsen J. Effect of N-linked glycosylation on secretion, activity, and stability of alpha-amylase from Aspergillus oryzae. Curr Microbiol. 1998;37(2):117-22.
- 69. Brewer JW, Diehl JA. PERK mediates cell-cycle exit during the mammalian unfolded protein response. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000;97(23):12625-30.

- 70. Hamanaka RB, Bennett BS, Cullinan SB, Diehl JA. PERK and GCN2 contribute to eIF2alpha phosphorylation and cell cycle arrest after activation of the unfolded protein response pathway. Mol Biol Cell. 2005;16(12):5493-501.
- 71. Raven JF, Baltzis D, Wang S, Mounir Z, Papadakis AI, Gao HQ, et al. PKR and PKR-like endoplasmic reticulum kinase induce the proteasome-dependent degradation of cyclin D1 via a mechanism requiring eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. J Biol Chem. 2008;283(6):3097-108.
- 72. Thorpe JA, Schwarze SR. IRE1alpha controls cyclin A1 expression and promotes cell proliferation through XBP-1. Cell Stress Chaperones. 2010;15(5):497-508.
- 73. Pagano M, Pepperkok R, Verde F, Ansorge W, Draetta G. Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. EMBO J. 1992;11(3):961-71.
- 74. Yang R, Morosetti R, Koeffler HP. Characterization of a second human cyclin A that is highly expressed in testis and in several leukemic cell lines. Cancer Res. 1997;57(5):913-20.
- 75. Li X, Zhu H, Huang H, Jiang R, Zhao W, Liu Y, et al. Study on the effect of IRE1a on cell growth and apoptosis via modulation PLK1 in ER stress response. Mol Cell Biochem. 2012;365(1-2):99-108.
- 76. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods. 2001; 25(4):402-8.
- 77. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcuim signalling. Nature. 1993; 361:315-325.
- 78. Healy SJ, Gorman AM, Mousavi-Shafaei P, Gupta S, Samali A. Targeting the endoplasmic reticulum-stress response as an anticancer strategy. Eur J Pharmacol. 2009;625(1-3):234-46.
- 79. Bagratuni T, Wu P, Gonzalez de Castro D, Davenport EL, Dickens NJ, Walker BA, et al. XBP1s levels are implicated in the biology and outcome of myeloma mediating different clinical outcomes to thalidomide-based treatments. Blood. 2010;116(2):250-3.
- 80. Zhang J, Jiang Y, Jia Z, Li Q, Gong W, Wang L, et al. Association of elevated GRP78 expression with increased lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric cancer. Clin Exp Metastasis. 2006;23(7-8):401-10.
- 81. Li J, Lee AS. Stress induction of GRP78/BiP and its role in cancer. Curr Mol Med. 2006;6(1):45-54.
- 82. Lee E, Nichols P, Spicer D, Groshen S, Yu MC, Lee AS. GRP78 as a novel predictor of responsiveness to chemotherapy in breast cancer. Cancer Res. 2006;66(16):7849-53. Epub.
- 83. Gass JN, Gifford NM, Brewer JW. Activation of an unfolded protein response during differentiation of antibody-secreting B cells. J Biol Chem. 2002;277(50):49047-54..

- 84. Ma Y, Shimizu Y, Mann MJ, Jin Y, Hendershot LM. Plasma cell differentiation initiates a limited ER stress response by specifically suppressing the PERK-dependent branch of the unfolded protein response. Cell Stress Chaperones. 2010;15(3):281-93.
- 85. Kuppers R. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. Nat Rev Immunol. 2003;3(10):801-12.
- 86. Lam N, Sandberg ML, Sugden B. High physiological levels of LMP1 result in phosphorylation of eIF2 alpha in Epstein-Barr virus-infected cells. J Virol. 2004;78(4):1657-64.
- 87. Lee DY, Sugden B. The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. Blood. 2008;111(4):2280-9.
- 88. Melnick J, Aviel S, Argon Y. The endoplasmic reticulum stress protein GRP94, in addition to BiP, associates with unassembled immunoglobulin chains. J Biol Chem. 1992;267(30):21303-6.
- 89. Yoshida H, Matsui T, Hosokawa N, Kaufman RJ, Nagata K, Mori K. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. Dev Cell. 2003;4(2):265-71.
- 90. Jenney B Durose, Arvin B T, Niwa M. Instrinsic capacities of molecular sensors of the unfolded protein response to sense alterante forms of endoplasmic reticulum stress. Mol Biol Cell. 2006; 17(7)3095-3107