

**CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE *DROSOPHILA* XBP1 :
A TRANSCRIPTION FACTOR REGULATED BY UNFOLDED
PROTEIN RESPONSE PATHWAY (UPR)**

NONGLUK PLONGTHONGKUM

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2004

ISBN 974-04-5344-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การศึกษาโปรตีน XBP1 ที่คาดว่าทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีนซึ่งตอบสนองในกระบวนการ unfolded protein response (UPR) ในเซลล์แมลงหวี่ (CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE *DROSOPHILA* XBP1: A TRANSCRIPTION FACTOR REGULATED BY UNFOLDED PROTEIN RESPONSE PATHWAY (UPR))

นางลักษณ์ ปล้องทองคำ 4536665 MBMG/M

วท.ม. (อนุพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : วิฑูรย์ ธีระโสภณ, Ph.D., วราภรณ์ อัครปทุมวงศ์, Ph.D., กุศล ภูชนกกิจ, Ph.D., ลิลี่ เอื้อวิไลจิตร, Ph.D.

บทคัดย่อ

สิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอตมีการตอบสนองต่อภาวะเครียดซึ่งเกิดจากการสะสมของโปรตีนที่ไม่ม้วนพับในเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม โดยการกระตุ้นการส่งสัญญาณที่เรียกว่า unfolded protein response (UPR) กระบวนการนี้นำไปสู่การเพิ่มการถอดรหัสของยีนสำหรับโปรตีนที่อยู่ในเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม ขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการนี้คือ การตัดต่อนิวคลีโอไทด์บางช่วงอย่างจำเพาะของ *XBP1* mRNA ทำให้เกิดการเลื่อนลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการแปลรหัสที่ตำแหน่งหลังบริเวณนิวคลีโอไทด์ที่ถูกตัด โปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นนี้จัดอยู่ในประเภท bZIP ซึ่งทำหน้าที่กระตุ้นการถอดรหัสของยีนที่ทำหน้าที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการการม้วนพับของโปรตีนในเอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม จากการศึกษาในเซลล์ของมนุษย์ หนู และ หนอนตัวกลมพบว่ากระบวนการนี้ถูกควบคุมโดยตัวตอบรับ Ire1 ซึ่งทำหน้าที่ตัด mRNA ของ *XBP1* อย่างจำเพาะ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายเพื่อศึกษากระบวนการ UPR ในเซลล์แมลง โดยค้นหาและศึกษาโปรตีนที่คาดว่าจะทำหน้าที่เป็น XBP1 ในเซลล์แมลงหวี่ *XBP1* mRNA ที่คาดว่าจะเป็นส่วนหนึ่งของโปรตีน Ire1 ของเซลล์แมลงหวี่ถูกโคลนโดยวิธีการรีเวอร์ส ทรานสคริปชัน พีซีอาร์ (RT-PCR) จากเซลล์ถาวรสายพันธุ์ CRL 1963 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดภาวะเครียด เมื่อทำการอ่านลำดับของดีเอ็นเอพบว่า 23 นิวคลีโอไทด์ถูกตัดออกจาก *XBP1* mRNA อย่างจำเพาะ ทำให้เกิดการเลื่อนลำดับของนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการแปลรหัสเช่นกันและปรากฏการณ์นี้จำเพาะต่อภาวะเครียดเท่านั้น นอกจากนั้นโดยวิธีการตัด *XBP1* mRNA ของเซลล์แมลงหวี่ด้วยโปรตีน Ire1 α ของเซลล์มนุษย์ในหลอดทดลองแสดงให้เห็นว่า mRNA นี้ถูกตัดอย่างจำเพาะในบริเวณที่คาดไว้ จากการศึกษาในเซลล์แมลงหวี่พบว่าการถอดรหัสโปรตีน XBP1 เกิดขึ้นในสภาวะเครียดเท่านั้น โดยถูกแปลรหัสจาก mRNA ที่ถูกตัดต่อเท่านั้น จากการศึกษาหน้าที่ของโปรตีน XBP1 ที่ถูกแปลรหัสจาก *XBP1* mRNA สายปกติและสายที่ถูกตัด (*XBP1*^u และ *XBP1*^s ตามลำดับ) โดยวิธี luciferase reporter assay แสดงให้เห็นว่าเฉพาะ *XBP1*^s ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัสของยีนเป้าหมายโดยการจับอย่างจำเพาะบริเวณ ER stress response element (ERSE) ผลการทดลองนี้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า การตัดอย่างจำเพาะของ *XBP1* mRNA ทำให้เกิดการสร้างโปรตีนที่เป็นตัวกระตุ้นการถอดรหัส และเป็นกลไกหนึ่งซึ่งเซลล์แมลงใช้ตอบสนองในกระบวนการ UPR

CHARACTERIZATION OF A PUTATIVE *DROSOPHILA* XBP1 :
A TRANSCRIPTION FACTOR REGULATED BY UNFOLDED PROTEIN
RESPONSE PATHWAY (UPR)

NONGLUK PLONGTHONGKUM 4536665 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : WITON TIRASOPHON, Ph.D.,
VARAPORN AKKARAPATUMWONG, Ph.D., KUSOL POOTANAKIT, Ph.D.,
LILY EURWILAICHITR, Ph.D.

ABSTRACT

In response to the accumulation of unfolded protein in the endoplasmic reticulum (ER), eukaryotic cells activate an intracellular signaling pathway termed unfolded protein response (UPR) by increasing transcription induction of ER-resident proteins such as molecular chaperones and folding enzymes. A key step of this pathway is an unconventional splicing of *X-box binding protein-1* (*XBPI*) mRNA encoding a basic leucine zipper (bZIP) transcription factor that activates the transcription of the UPR responsive genes. Interestingly, the unconventional splicing of the *XBPI* mRNA results in a frame shift of its translation Open Reading Frame (ORF) downstream of the splicing junction. This leads to amino acid changes at the C-terminal region that exhibits higher transcriptional activation properties. Transcription induction of *XBPI* mRNA during ER stress has been reported in various species as intermediate event of the UPR.

In this study, we identified and characterized a putative XBP1 in insect cells using *Drosophila melanogaster* CRL 1963 as a model organism. RT-PCR analysis and DNA sequencing revealed the splicing of the potential 23 nt intron from the putative *dXBPI* mRNA. Moreover, *in vitro* cleavage approach was employed to demonstrate that *dXBPI* was specifically cleaved by hIre1 α IP *in vitro* at the predicted splicing junction. Unlike mammalian *XBPI*, transcription of *dXBPI* itself is not induced during ER stress. Endogenous dXBPI protein (from spliced *dXBPI*) was expressed exclusively in ER stress condition similar to those observed in mammalian species. Luciferase reporter assay was used to demonstrate that only dXBPI^s functions as transcriptional activator to activate the UPR responsive genes through ERSE *cis*-acting element. This result supported the hypothesis that ER stress regulated splicing of intron from *dXBPI* mRNA leading to production of a transcription factor is a mechanism to moderate insect UPR.

KEY WORDS: UNFOLDED PROTEIN RESPONSE/ ER STRESS/ *DROSOPHILA*
MELANOGASTER/ XBP1

128 P. ISBN 974-04-5344-9