



**WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY
GDAŃSKIEGO UNIWERSYTETU MEDYCZNEGO**

Aleksandra Sobolewska

Rola czynnika XBP1 w odpowiedzi na stres retikulum endoplazmatycznego

*The role of XBP1 factor in endoplasmic reticulum stress
response*

Promotorzy: prof. dr hab. Rafał Bartoszewski i dr hab. Jarosław Króliczewski

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej w ramach projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS: Czy miRNA decydują o losie komórki podczas odpowiedzi na niezwinięte białka 2015/17/B/NZ3/01485.

Gdańsk, 2021

Streszczenie

Badania przedstawione w rozprawie dotyczą zagadnień związanych z deregulacją funkcji retikulum endoplazmatycznego (ER) określanej terminem stresu ER i związanej z nim aktywacji szlaku odpowiedzi na niezwinięte białka (UPR). Głównym zadaniem UPR jest przywrócenie prawidłowego funkcjonowania komórek. Ma on jednak drugą, równie ważną funkcję, ponieważ indukuje apoptozę komórek, gdy stan równowagi w ER nie może zostać przywrócony. Zaburzenia działania UPR i związanej z nim apoptozy spowodowane przez mutacje genetyczne, procesy starzenia bądź czynniki środowiskowe, stanowią część patomechanizmu ludzkich schorzeń.

Dlatego celem mojej pracy doktorskiej było uzyskanie modelu badawczego umożliwiającego ukierunkowaną i potencjalnie odizolowaną od innych składowych odpowiedzi na niezwinięte białka, analizę znaczenia dla decyzji o losie komórki, wybranych kluczowych czynników transkrypcyjnych UPR, takich jak XBP1, ATF4 czy CHOP. Dotychczasowe badania nad mechanizmami UPR opierają się bowiem głównie na modelach badawczych, w których farmakologicznie zakłócono funkcję ER, co prowadzi do gwałtownej i raczej rzadko spotykanej *in vivo* aktywacji UPR. Podczas realizacji rozprawy wprowadziłam geny czynników *XBP1(S)* i *XBP1(U)*, *ATF4* oraz *CHOP* do plazmidów umożliwiających ich ekspresję pod kontrolą systemu Tet-On. Następnie wykorzystując lentiwirusowy system transfekcji komórek uzyskałam stabilne linie komórek HeLa ekspresujące *XBP1(S)* i *XBP1(U)*. Po weryfikacji ekspresji wprowadzonych transgenów, oceniłam wpływ egzogennych *XBP1(S)* i *XBP1(U)* na profil ekspresji genów w komórkach HeLa. Zaobserwowałam, że indukcji transgenu *XBP1(U)* towarzyszyły jedynie zmiany w ekspresji genów niezaangażowanych w odpowiedź na stres. Natomiast, zgodnie z oczekiwaniami, wzrost ilości *XBP1(S)* skutkował przede wszystkim zmianami ilości mRNA genów zaangażowanych w przebieg UPR i regulację apoptozy. Uzyskane wyniki nie tylko potwierdziły użyteczność uzyskanej dla transgenu *XBP1(S)* linii komórkowej HeLa, ale również znaczenie tego czynnika transkrypcyjnego dla przebiegu szlaku UPR i poszerzyły obecny stan wiedzy identyfikując geny, których ekspresja jest regulowana pośrednio bądź bezpośrednio przez *XBP1(S)*.

Abstract

My research was focusing on the deregulation of the endoplasmic reticulum function, referred to as ER stress, and the related activation of the unfolded protein response pathway (UPR). Although the main task of the UPR is to restore normal cell function when ER homeostasis cannot be restored this mechanism can also induce apoptosis. Notably, disturbances of the UPR functions often accompany human diseases. Thus, the development of new, effective therapies for such diseases requires understanding the mechanism that leads to the cells' fate decisions. Therefore, the aim of my dissertation was to obtain a research model that allows direct analysis of the role of UPR transcription factors, such as XBP1, ATF4, or CHOP. Notably, current research models rely on the pharmacological disturbance of the ER function that results in rapid activation of the UPR that does not reflect the in vivo conditions. Hence, I applied the Tet-On system to obtain stable cell lines enabling the controlled expression of these key UPR transcription factors. First, the XBP1(S), XBP1(U), ATF4, and CHOP genes were cloned into plasmids enabling their expression under the control of the Tet-On system. Next, using a lentiviral cell transfection system, I obtained stable HeLa cell lines expressing XBP1(S) and XBP1(U). After verifying the expression of the introduced transgenes, the influence of the exogenic XBP1(S) and XBP1(U) on the transcriptomic profiles of HeLa cells were analyzed. I observed that the induction of the XBP1(U) transgene resulted only in changes of genes that were not ER stress-related. Nevertheless, as expected, the increase in the amount of XBP1(S) affected the expression of genes involved in the UPR and regulation of apoptosis. These results not only confirmed the usefulness of the HeLa cell line obtained for the XBP1(S) but also stressed the importance of this transcription factor for the UPR pathway. Furthermore, my research resulted in the identification of novel genes whose expression is directly or indirectly regulated by XBP1(S).