

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY



**Rola niekodujących RNA w odpowiedzi na stres retikulum
endoplazmatycznego**

Magdalena Gebert

Praca doktorska wykonana
w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor pracy:
Prof. dr hab. Rafał Bartoszewski

Gdańsk 2022

STRESZCZENIE

Deregulacja homeostazy retikulum endoplazmatycznego, określana jako stres ER, jest zjawiskiem często występującym w komórkach ludzkiego organizmu manifestującym się nagromadzeniem białek o nieprawidłowej konformacji w świetle tego organelum. W konsekwencji dochodzi do uruchomienia swoistego mechanizmu adaptacyjnego – odpowiedzi na białka nieprawidłowo zwinięte UPR (*Unfolded Protein Response*). Obejmuje on trzy główne ścieżki sygnałowe (ATF6, IRE-1 oraz PERK), których aktywacja ma na celu przywrócenie homeostazy w komórce poprzez nasilenie procesów zwijania białek, degradację tych niepoprawnie sfałdowanych, nasilenie syntezy białek opiekuńczych i zahamowanie translacji. Jednak, w konsekwencji przewlekłego stresu ER, mimo uruchomienia wspomnianych kaskad sygnałowych nie zawsze możliwe jest przywrócenie homeostazy, co skutkuje śmiercią komórki. Proces apoptozy zależnej od UPR został dotychczas opisany w literaturze, jednak mechanizmy determinujące decyzję o konieczności śmierci komórek nadal są słabo zrozumiane. Co więcej, poza kontrolą przebiegu szlaku UPR na poziomie transkrypcji i translacji, podlega on również regulacji potranskrypcyjnej z udziałem niekodujących cząsteczek RNA. Mając na uwadze, że zaburzona odpowiedź na UPR stanowi przyczynę rozwoju wielu ludzkich schorzeń, pojawia się konieczność poszukiwania nowych celów terapeutycznych, w tym niekodujących RNA.

W toku badaniach rozprawy, w komórkach linii 16HBE14o- (nienowotworowych i nieśmiertelnionych ludzkich komórkach nabłonka oskrzeli), z wykorzystaniem stresorów farmakologicznych, wyodrębniłam trzy fazy UPR: adaptacyjną, decyzyjną oraz śmierci. Konsekwentnie dążyłam do określenia charakterystycznych dla tych etapów UPR profili ekspresji niekodujących RNA, których zmiany mogłyby modulować przebieg tego mechanizmu lub determinować los komórki. Zaobserwowałam, że globalny poziom piRNA wzrasta, podczas gdy całkowita liczba odczytów miRNA znacząco maleje. Równoległe analizy transkryptomyczne umożliwiły natomiast identyfikację czynnika proapoptotycznego – *GADD45A*, którego indukcja w trakcie stresu ER sprzyja apoptozie. W toku dalszych badań wyłoniłam miRNA (hsa-miR-106b oraz hsa-miR-301a) o znacząco obniżonym profilu ekspresji w trakcie UPR, będące potencjalnymi substratami dla endorybonukleazy IRE-1. Następnie postanowiłam określić, jakie konsekwencje dla losów komórek eksponowanych na stres ER, niesie ze sobą degradacja hsa-miR-106b oraz hsa-miR-301a z udziałem tej endorybonukleazy. Posługując się dostępnymi narzędziami bioinformatycznymi zidentyfikowałam w obrębie 3'UTR *GADD45A* miejsce wiązania hsa-miRNA-301a, którego

funkcjonalność potwierdziłam eksperymentalnie wykorzystując *target protector* (cząsteczka z grupy morfolin zapobiegająca interakcji miRNA z właściwym miejscem wiązania w sekwencji transkryptu). Mimo braku możliwości bezpośredniego oddziaływania między hsa-miRNA-106b i *GADD45A*, nadekspresja obu wybranych miRNA (hsa-106b i hsa-miR-301a) prowadziła do obniżenia ekspresji tego genu zarówno na poziomie transkryptu, jak i białka. Analizy przeżywalności komórek w czasie rzeczywistym, w warunkach stresu ER z jednoczesną nadekspresją hsa-miRNA-106b oraz hsa-miRNA-301a wykazały, że obecność analogów tych miRNA zapobiega śmierci komórek wystawionych na stres.

Podsumowując, rezultaty badań rozprawy ujawniły, że stres ER prowadzi do globalnych zmian ekspresji niekodujących RNA. Wskazałam miRNA, które są degradowane przez IRE-1. Aktywacja IRE-1 podczas UPR obniża ilość tych cząsteczek, co prowadzi do akumulacji proapoptotycznego czynnika *GADD45A* sprzyjającego śmierci komórek. Ze względu na zdolność analogów tych miRNA do zapobiegania śmierci komórek podczas stresu mogą być one nowym obiecującym celem terapeutycznym.

ABSTRACT

Deregulation of the endoplasmic reticulum homeostasis, referred to as ER stress, is a phenomenon that occurs frequently in the human cells and is manifested by the accumulation of misfolded or unfolded proteins in the lumen of this organelle. As a consequence, a specific adaptive mechanism is triggered – the Unfolded Protein Response (UPR). The UPR consist of three main signaling pathways (ATF6, IRE-1 and PERK), the activation of which aims to restore homeostasis by enhancing protein folding, degrading misfolded proteins, enhancing chaperone synthesis as well as inhibiting translation. However, during chronic ER stress, despite the activation of the aforementioned signaling cascades, it is not always possible to restore homeostasis, which results in cell death. The process of UPR-dependent apoptosis has been described in the literature so far, however, the mechanisms determining the decision about the necessity of cell death are still poorly understood. Moreover, although the course of the UPR is controlled at the transcriptional and translation levels, the UPR is also post-transcriptionally regulated by non-coding RNAs as well. Bearing in mind that the impaired response to the UPR accompanies many human diseases, there is a need to search for new therapeutic targets, including non-coding RNAs.

As a research model I used 16HBE14o- cell line (non-cancerous and immortalized human bronchial epithelial cells) that were exposed to pharmacological stressors. In these cells I distinguished three phases of the UPR: adaptive, decision-making and cell death. I have consistently sought to define the non-coding RNAs expression profiles characteristic of these stages of the UPR and I observed that the global level of piRNA increased while the total number of miRNA reads decreased significantly. Parallel transcriptomic analyzes allowed for the identification of a pro-apoptotic factor - *GADD45A*, the induction of which during ER stress promotes apoptosis.

Next, I selected miRNAs (hsa-miR-106b and hsa-miR-301a) that were significantly reduced during the UPR, and which are potential substrates for the endoribonuclease activity of IRE-1. In follow up studies, I decided to determine the consequences of the IRE-1-dependent degradation of hsa-miR-106b and hsa-miR-301a for the fate of cells exposed to ER stress. Furthermore, using bioinformatics tools, I identified the hsa-miRNA-301a binding site within the 3'UTR of *GADD45A*, the functionality of which I confirmed experimentally using a target protector (a morpholine that prevents the interaction of miRNA with the specific binding site in the transcript sequence). Despite the lack of the possibility of a direct interaction between

hsa-miRNA-106b and *GADD45A*, overexpression of both selected miRNAs (-106b and -301a) led to a reduction in the expression of this gene both at the transcript and protein levels. Finally, real-time cell survival analyzes under ER stress conditions with concomitant overexpression of hsa-miRNA-106b and hsa-miRNA-301a showed that the presence of these miRNA analogs prevents the death of stressed cells.

Taken together, the results of presented research showed that ER stress leads to global changes in the expression of non-coding RNAs. Furthermore, I have identified miRNAs that are degraded by IRE-1. Activation of IRE-1 during the UPR reduces the amount of these miRNAs, which leads to the accumulation of the apoptotic factor *GADD45A* promoting cell death. Due to the ability of these miRNA analogs to prevent the death of stressed cells, they may be a novel promising therapeutic target.