

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Sylwia Bartoszevska

***Rola mikro-RNA w mechanizmach
komórkowej odpowiedzi na wybrane
czynniki stresu metabolicznego***

GDAŃSK 2015

Wydano za zgodą
Dziekana Wydziału Lekarskiego

Zakład Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej Katedry Analityki Medycznej
Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Gdański Uniwersytet Medyczny

Promotor
dr hab. med. Leszek Kalinowski, prof. nadzw. GUMed

Medical University of Gdańsk 2015

Pracę realizowano:

– w Zakładzie Medycznej Diagnostyki Laboratoryjnej Katedry Analityki Medycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego;

– w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej Wydziału Farmaceutycznego z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w ramach realizacji projektu Narodowego Centrum Nauki OPUS DEC-2011/03/B/NZ3/04387;

– w Department of Cell, Developmental and Integrative Biology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, Alabama, USA, w ramach realizacji projektów *National Institutes of Health* R01HL076587 i DK060065.

Ricie i Rafałowi

SPIS TREŚCI

Wykaz skrótów	6
Wykaz prac wchodzących w skład rozprawy	7
1. Wstęp	8
1.1. mikro-RNA	8
1.1.1. Biogeneza miRNA	8
1.1.2. miRNA a mRNA	10
1.1.3. Rola biologiczna miRNA	11
1.2. Stres metaboliczny	12
1.2.1. Komórkowa odpowiedź na hipoksję	13
1.2.2. Komórkowa odpowiedź na niezwinęte białka ..	15
2. Cele pracy	17
3. Najważniejsze spostrzeżenia z prezentowanych doniesień	18
3.1. Zdefiniowanie wpływu miR-429 na przebieg zależnej od HIF-1 odpowiedzi na hipoksję w ludzkich komórkach śródbłonna	18
3.2. Zdefiniowanie opartego na specyficznej indukcji miR-346 mechanizmu kontroli peptydów do ER podczas UPR	25
3.3. miRNA jako kluczowa składowa mechanizmu odpowiedzi na niezwinęte białka	28
4. Piśmiennictwo	29
5. Streszczenie	36
6. Abstract	39
Podziękowania	42

WYKAZ SKRÓTÓW

ER	<i>endoplasmic reticulum</i>
HIF	<i>hypoxia inducible factors</i>
HRE	<i>hypoxia response element</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>
miR	mikro-RNA
miRNA	mikro-RNA
miRNP	<i>miRNA ribonucleoprotein complexes</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
sXBP1	<i>spliced XBP1</i>
UPR	<i>unfolded protein response</i>
UTR	<i>untranslated regions</i>
VHL	czynnik von Hippel-Lindau

WYKAZ PRAC WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY

A. Bartoszevska Sylwia, Kochan Kinga., Piotrowski Arkadiusz, Kamysz Wojciech, Ochocka J. Renata, Collawn F. James, Bartoszewski Rafal; *The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human endothelial cells through a negative feedback loop*; 2015; *FASEB Journal* 29:1467-1479.

IF₂₀₁₄ = 5,480

Punktacja ministerstwa: 40,000

B. Bartoszewski Rafał., Brewer W. Joseph, Rab Andras, Crossman K. David, **Bartoszevska Sylwia**, Kapoor Niren, Fuller Catherine, Collawn F. James, Bebok Zsuzsa; *The unfolded protein response (UPR)-activated transcription factor X-box-binding protein 1 (XBPI) induces microRNA-346 expression that targets the human antigen peptide transporter 1 (TAP1) mRNA and governs immune regulatory genes*; 2011; *Journal of Biological Chemistry* 286 (48), 41862-41870.

IF₂₀₁₁ = 4,773

Punktacja ministerstwa: 35,000

C. Bartoszevska Sylwia, Kochan Kinga, Madanecki Piotr, Piotrowski Arkadiusz, Ochocka J. Renata, Collawn F. James, Bartoszewski Rafal; *Regulation of the unfolded protein response by microRNAs*; 2013; *Cellular & Molecular Biology Letters* 18 (4), 555-578.

IF₂₀₁₂=1,953

Punktacja ministerstwa: 15,000

Łączna wartość współczynnika IF prezentowanych prac zgodnie z rokiem opublikowania: **12,206**

Łączna punktacja ministerstwa prezentowanych prac: **90,000**

1. WSTĘP

1.1. mikro-RNA

W 1993 roku w niepasozżytniczym nicieniu *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) po raz pierwszy zidentyfikowano krótkie niekodujące RNA o potencjalnej funkcji biologicznej, które nazwano *lin-4* [1]. Poziom *lin-4* zmienia się podczas rozwoju tego nicienia i reguluje jego różnicowanie [1]. *lin-4* wiąże się bowiem z matrycowym RNA (mRNA) kontrolującego różnicowanie *C. elegans* czynnika transkrypcyjnego *lin-14*, redukując ilość tego białka [1,2]. Identyfikacja w *C. elegans* kolejnych krótkich RNA o zbliżonej funkcji biologicznej i mechanizmie działania (m.in. *let-7* [2]) doprowadziła do zdefiniowania nowej klasy RNA nazwanej mikro-RNA (miRNA) [3,4]. Sekwencje miRNA zidentyfikowano następnie w wielu organizmach, także w roślinach i wirusach, jednak przełom w badaniach nad tą klasą RNA nastąpił w 2001 roku, gdy zidentyfikowano pierwsze funkcjonalne mikro-RNA u człowieka – miR-21 (*hsa-miR-21*) [5]. Obecnie w bazie sekwencji mikro-RNA – miRBase (v.21 06.2014) – zdeponowano 35828 sekwencji dojrzałych miRNA (w tym 2588 ludzkich) z 233 gatunków [6].

Za mikro-RNA uznaje się endogenne, jednoniciowe, krótkie (o średniej długości 22 nukleotydów), niekodujące RNA, mogące potranskrypcyjnie regulować ekspresję genów [7]. Powyższa definicja jest konsekwencją omówionych poniżej biogenezy i mechanizmu działania tych RNA.

1.1.1. Biogeneza miRNA

Sekwencje miRNA są lokalizowane zarówno w obrębie eksonów, jak i intronów [7]. Obecność sekwencji mikro-RNA w obrębie obszaru kodującego dany gen nie oznacza jednak, że dane miRNA będzie ekspresjonowane wraz z tym genem [7]. Niektóre sekwencje miRNA lokalizują się w swoim bezpośrednim sąsiedztwie (tzw. klastry miRNA), stanowiąc często odrębne jednostki transkrypcyjne [8].

Do transkrypcji większości mikro-RNA jest wymagana aktywność polimerazy II [9]. W jądrze komórkowym powstają długie (nawet powyżej 1 kb), poliadenylowane cząsteczki pierwotnych transkryptów miRNA – **pri-miRNA** (*primary miRNA*), mogące reprezentować nawet kilka sekwencji dojrzałych miRNA (maksymalnie 6) [10]. pri-miRNA zwijają się w zaawansowane struktury drugorzędowe, złożone z jednego lub więcej motywu „szpilki do włosów” (*hairpin loop*), które determinują dalsze dojrzewanie tych cząsteczek [11].

U zwierząt z regionów dwuniciowych pri-miRNA (trzonów motywów szpilki do włosów) za pośrednictwem enzymu Drosha (gen *DROSHA*) o aktywności rybonukleazy III są wycinane krótsze (60 do 70 nukleotydów), jednoniciowe fragmenty prekursorowe – **pre-miRNA** – zawierające sekwencje dojrzałych

miRNA, które następnie ponownie zwijają się w struktury szpilki do włosów [10,12]. Za stabilizację wiązania białka Drosha oraz ukierunkowanie jego aktywności proteolitycznej odpowiada przyłączone do regionów jednoniciowych (główek motywów szpilki do włosów) białko Pasha (gen *DGCR8*) [13].

Powstałe pre-miRNA są aktywnie transportowane do cytoplazmy przez białko Eksportynę 5 (gen *XPO5*), zależnie od GTPazy Ran (gen *RAN*) [14].

W cytozolu prekursorowe miRNA ulegają dalszej obróbce proteolitycznej – rejonu jednoniciowe tworzonych przez nie struktur szpilki do włosów są wycinane przez enzym o aktywności RNAzy III – Dicer (gen *DICER1*) [15,16]. Podobnie jak w przypadku obróbki pri-miRNA przez Drosha za ukierunkowane działanie Dicer odpowiadają inne białka zarówno z rodziny Argonaut (*Argonaute*), jak i białka TRBP (gen *TARBP2*) oraz PACT (gen *PRKRA*) [17]. W cytoplazmie białka te wraz z pre-miRNA i rybonukleazą Dicer tworzą kompleks RISC (*RNA-induced silencing complex*), z którego po wycięciu jednoniciowego rejonu pre-miRNA jest uwalniany przejściowy dwuniciowy fragment RNA złożony z dwóch częściowo względem siebie komplementarnych cząsteczek **dojrzałego miRNA (miRNA)**, każda o długości około dwudziestu kilku nukleotydów [17]. Powstały duplex miRNA:miRNA dysocjuje na dwie dojrzałe jednoniciowe cząsteczki miRNA [17]. Początkowo uważano, że tylko jedna z nici duplexu pełni funkcję biologiczną jako dojrzałe mikro-RNA (nić wiodąca), podczas gdy druga (nić pasażerska, oznaczana symbolem *) jest degradowana [17].

Późniejsze badania wykazały jednak, że obie nici duplexu mogą jednocześnie być obecne w komórce i posiadać aktywność biologiczną [18]. Dlatego obecnie nie wyróżnia się nici wiodącej, a dojrzałe miRNA będące składowymi danego duplexu określa się na podstawie kierunku sekwencji (odpowiednio jako sensowne i antysensowne) [6].

Powyżej omówiono kanoniczny szlak biogenezy miRNA. Należy jednak wspomnieć, że cząsteczki niektórych pierwotnych miRNA są transkrybowane przez polimerazę III, natomiast wybrane pri-miRNA, o sekwencjach lokalizowanych w intronach, mimo zachowanej struktury drugorzędowej RNA są procesowane bezpośrednio do pre-miRNA w procesie składania RNA z udziałem białka Dicer (tzw. *mitrons*) [17].

U roślin wszystkie etapy biogenezy miRNA, zaczynając od transkrypcji, a kończąc na utworzeniu duplexu miRNA:miRNA, przebiegają w jądrze [19]. Za obróbkę proteolityczną roślinnych pri-miRNA i pre-miRNA odpowiada bowiem ten sam lokalizowany w jądrze enzym DL1 (*Dicer-like 1*), będący homologiem białka Dicer. Powstałe duplexy miRNA:miRNA, po uprzedniej metylacji na końcach 3', są transportowane do cytoplazmy przez białko będące homologiem Eksportyny 5 [19].

1.1.2. miRNA a mRNA

U zwierząt miRNA wiążą się do komplementarnych lub częściowo komplementarnych sekwencji mRNA lokalizowanych w obrębie ich 3 końcowych regionów nieulegających translacji (3'UTR, 3'*untranslated regions*) mRNA, hamując ekspresję tych transkryptów [20].

To oddziaływanie miRNA z komplementarnym regionem mRNA jest mediowane przez białka i wymaga utworzenia specyficznego kompleksu białko-rybonukleinowego typu RISC [21], zwanego **miRNP** (*miRNA ribonucleoprotein complexes*) [22,23]. W skład kompleksów miRNP wchodzi m.in. związane bezpośrednio z miRNA białko z rodziny Argonaut (u ssaków Ago2, znane też jako eIF₂C₂, *eukaryotic initiation factor 2C*) oraz helikazy Gemin 3 i Gemin 4 (odpowiednio geny *GEMIN3* oraz *GEMIN4*) [23,24]. Funkcją kompleksów miRNP jest zarówno stabilizacja wiązania miRNA z jego sekwencją docelową w obrębie 3'UTR mRNA, jak i degradacja lub zahamowanie translacji związanego transkryptu [17].

Wcześniej sądzono, że o wyborze między degradacją a represją translacji związanego w miRNP mRNA decyduje stopień komplementarności jego zasad z odpowiednim rejonem sekwencji miRNA (około 7 nukleotydów, najczęściej lokalizowana między 2 a 7 nukleotydem od końca 5' miRNA), zwanej sekwencją *seed*. W przypadku wysokiej komplementarności mRNA do sekwencji *seed* miRNP transkrypt ulega degradacji, natomiast częściowe dopasowanie mRNA do sekwencji *seed* prowadzi do zahamowania translacji tego transkryptu [25].

Konsekwencją obu tych kanonicznych mechanizmów działania miRNA jest redukcja ilości białka kodowanego przez docelowe mRNA.

Dopasowanie sekwencji docelowej mRNA do około 7 nukleotydów sekwencji *seed* nie zawsze jednak prowadzi do obniżenia poziomu tego transkryptu oraz białka. Zidentyfikowano inne kluczowe dla efektywnego wiązania miRNA cechy sekwencji docelowej mRNA, jak: duża częstość występowania par A-U (adenozyna-uracyl) w jej bezpośrednim otoczeniu, obecność w bezpośrednim sąsiedztwie miejsc wiązania innych miRNA, występowanie w jej bezpośrednim otoczeniu reszt komplementarnych dla rejonu sekwencji miRNA między 13–16 nukleotydem (od końca 5'), usytuowanie w odległości co najmniej 15 nukleotydów od kodonu STOP oraz z dala od centralnego rejonu 3'UTR [26].

Degradacja mRNA związanego z miRNP jest katalizowana przez białko Ago2, a proces ten zachodzi w cytoplazmatycznych strukturach komórkowych – ciałkach P (*P bodies, processing bodies*) [27].

Represja translacji może zachodzić zarówno na etapie inicjacji, jak i podczas tego procesu, wynikając odpowiednio z: blokowania przez miRNP wiązania do mRNA czynników inicjacji translacji (eIF, *eukaryotic initiation factors*) lub dużej podjednostki rybosomalnej 60S [28], spowolnienia wydłużania struktury pierwszorzędowej oraz przedwczesnego zakończenia tego procesu [29]. Nie

ustalono jak dotąd, czy represja translacji na etapie inicjacji i późniejszych etapach tego procesu wzajemnie się wykluczają.

W świetle ostatnich badań u ssaków głównym mechanizmem działania miRNA jest jednak degradacja docelowych mRNA, w tym również tych o stosunkowo niskiej komplementarności do ich sekwencji *seed* [30]. Ponadto w obrębie 3'UTR danego mRNA mogą lokalizować się zarówno powtórzone sekwencje docelowe dla danego miRNA, jak i sekwencje docelowe dla wielu innych miRNA [31]. O losie danego mRNA (trwałości, wyrażonej czasem połowicznego rozpadu) może więc decydować zestaw miRNA aktualnie związanych z jego rejonem 3'UTR, a jednocześnie siła wzajemnych oddziaływań między sekwencjami docelowymi a sekwencjami *seed* tych miRNA [30,32]. Należy jednak pamiętać, że u ssaków inhibicja translacji prowadzi również do gwałtownej degradacji transkryptu [33]. W obrębie 3'UTR wiąże się również wiele czynników białkowych wpływających na czas połowicznego rozpadu danego mRNA [34,35], a związanie z tym obszarem mRNA kompleksów miRNP może również wpływać na ich funkcje. Toczy się więc dyskusja, czy związana z miRNP i obserwowana u ssaków degradacja mRNA jest konsekwencją zahamowania translacji, czy też jest dominującym mechanizmem działania miRNA [36].

Niezależnie od przyjętego modelu efektem wiązania miRNA do 3'UTR mRNA jest redukcja ilości białka, co często jest odzwierciedlone w obniżonej ilości danego transkryptu.

U roślin natomiast większość sekwencji docelowych dla miRNA jest lokalizowana w rejonach mRNA ulegających translacji i wykazuje pełną komplementarność do sekwencji *seed* [37]. Degradacja transkryptów jest więc podstawowym mechanizmem działania miRNA w komórkach roślinnych [19]. Należy również wspomnieć, że u ssaków sekwencje komplementarne do sekwencji miRNA lokalizuje się również w obrębie regionu 5' UTR i sekwencji mRNA ulegającej translacji, jednak obecność tych sekwencji nie prowadzi do redukcji ilości białka [31].

1.1.3. Rola biologiczna miRNA

Białka są podstawowym składnikiem budulcowym, odpowiadają zarówno za przebieg procesów metabolicznych, jak i za przekazywanie sygnału do i z komórki. Odkrycie miRNA jako cząsteczek, które specyficznie modulują skład proteomu, odsłoniło nowy poziom kontroli procesów komórkowych [38]. Co więcej – miRNA obniżając ekspresję białek, translatowanych z już obecnych w komórce transkryptów, stwarzają możliwość szybkiej i specyficjnej redukcji ilości tych białek. Sekwencje docelowe dla miRNA zlokalizowano już w większości ssaczych mRNA [39]. Poprzez wpływ na ilość i czas trwania poszczególnych protein [40] te krótkie RNA regulują większość witalnych procesów komórkowych, poczynając od podziałów komórkowych, poprzez różnicowanie i starzenie się komórek, przebieg ich metabolizmu, a kończąc na apoptozie [41-

44]. Zaburzenia w obrębie komórkowej puli mikro-RNA mają bezpośredni wpływ na przebieg tych procesów komórkowych, przez co stanowią część patogenyzy wielu ludzkich schorzeń [41].

miRNA to cząsteczki endogenne, a ich ekspresja często podlega regulacji przez białkowe czynniki transkrypcyjne oraz mechanizmy epigenetyczne [45]. Umożliwia to zwrotną integrację działania miRNA z aktualnym stanem życiowym komórki i wpływem jej otoczenia [41]. W zależności od potrzeb komórka modyfikuje swoją pulę miRNA odpowiednio podczas podziałów i różnicowania komórek, przebiegu procesów metabolicznych oraz apoptozy. Czynniki transkrypcyjne komórkowych szlaków przekazywania sygnału w odpowiedzi na wpływy środowiskowe mogą również modyfikować pulę miRNA i tym samym proteom, a także podlegać regulacji przez te RNA. Umożliwiając komórce adaptację do środowiska zewnętrznego lub przetrwanie jego niekorzystnego wpływu, miRNA stanowią ważny element komórkowej odpowiedzi na stres [46,47], co było przedmiotem niniejszych badań.

1.2. Stres metaboliczny

Stres metaboliczny można zdefiniować jako zaburzenie równowagi między organizmem a jego otoczeniem, które ma znaczące konsekwencje dla metabolizmu, zarówno na poziomie całego organizmu, jak i jego komórek [48].

Najczęstsze przyczyny stresu metabolicznego to przewlekłe infekcje i chroniczne stany zapalne, nowotwory, zaburzenie gospodarki hormonalnej, ischemia i związany z nią deficyt tlenowy, zranienia, stres pooperacyjny i pourazowy czy też inne patologie wpływające na przebieg procesów metabolicznych (np. otyłość czy cukrzyca) [48]. Upośledzenie metabolizmu prowadzi do zaburzenia homeostazy glukozy we krwi, spadku kompetencji układu immunologicznego i co za tym idzie – do osłabienia odporności, spadku siły mięśni czy spowolnienia procesów gojenia ran [48].

Przywrócenie równowagi metabolicznej na poziomie komórkowym, kluczowe dla przetrwania organizmu, jest realizowane poprzez aktywację mechanizmów komórkowej odpowiedzi na stres [49-53]. Podstawowym zadaniem tych szlaków przekazywania sygnału jest modyfikacja procesów komórkowych (zarówno na poziomie transkrypcyjnym, jak i potranskrypcyjnym) mająca na celu odpowiednio adaptację do niekorzystnych warunków i odtworzenie homeostazy metabolicznej [53]. Opisanej adaptacyjnej roli komórkowej odpowiedzi na stres towarzyszy jej przeciwstawna funkcja proapoptyczna. Jeśli równowaga metaboliczna komórek nie zostanie przywrócona, to te same szlaki sygnałowe zainicjują śmierć komórek [53].

Zależnie od czynnika stresogennego lub kombinacji tych czynników zostają upośledzone wybrane aspekty metabolizmu komórek, co aktywuje specyficzne dla tych zaburzeń szlaki odpowiedzi komórkowej [53]. Badania przedstawione w niniejszej rozprawie koncentrowały się wokół dwóch z tych mechanizmów

komórkowej odpowiedzi – odpowiednio na hipoksję [50,54] i na niezwinięte białka [55,56].

1.2.1. Komórkowa odpowiedź na hipoksję

Cząsteczka tlenu odgrywa rolę akceptora elektronów w komórkowych procesach uzyskiwania energii, takich jak fosforylacja oksydacyjna, glikoliza, β -oksydacja dla kwasów tłuszczowych, cykl kwasów trikarboksylowych [57]. Obniżenie zawartości tlenu w tkankach skutkujące zaburzeniem przebiegu tych procesów komórkowych określa się terminem hipoksji [58]. Hipoksja aktywuje komórkowe szlaki przekazywania sygnału, których zadaniami są adaptacja metabolizmu komórek do obniżonej podaży tlenu i przywrócenie homeostazy tlenowej [59]. Długotrwała niemożność przywrócenia metabolizmu tlenowego doprowadzi jednak do kierowanej przez te szlaki śmierci komórek [60-63].

Ze względu na genezę tkankowego niedoboru tlenu wyróżnia się wiele rodzajów hipoksji m.in. hipoksemiczną (obniżona dyfuzja gazów w pęcherzykach płucnych), ischemiczną (zakłócenia transportu tlenu przez krew), wysokościową (niskie stężenie tlenu atmosferycznego) czy anemiczną (zmniejszenie pojemności tlenowej krwi) [58]. Hipoksja jest nie tylko cechą stanów patologicznych, jak schorzenia układu krążenia [64] czy nowotworzenie [65,66], lecz także ma znaczenie fizjologiczne, m.in. podczas rozwoju embrionalnego i różnicowania komórek [67,68].

1.2.1.1. Czynniki indukowane przez hipoksję

Komórkowe mechanizmy odpowiedzi na hipoksję umożliwiają adaptację do warunków beztlenowych poprzez aktywację szlaku glikolizy beztlenowej oraz przywrócenie równowagi tlenowej poprzez m.in. stymulację produkcji erytropoetyny oraz indukcję angiogenezy [69-71]. Za koordynację tych procesów na poziomie transkrypcji genów we wszystkich komórkach ssaków odpowiada aktywność kompleksów białkowych czynników indukowanych hipoksją HIF (*hypoxia inducible factors*) [72-74]. Podczas hipoksji kompleksy HIF wiążą się bezpośrednio ze specyficznymi sekwencjami w HRE (*hypoxia response element*) [75], lokalizowanymi w otoczeniu co najmniej ludzkich 217 genów, modulując ich ekspresję [76]. W warunkach homeostazy tlenowej (normoksja) aktywność transkrypcyjna tych kompleksów jest ograniczana degradacją proteasomalną ich podjednostek [77].

Heterodimery HIF są złożone ze stabilnej w normoksji podjednostki β oraz zależnej od tlenu podjednostki α . Podjednostka β (gen *ARNT1*) jest stabilna w warunkach tlenowych, konstytutywnie ekspresjonowana i uniwersalna dla wszystkich kompleksów HIF [78,79]. Podjednostka α natomiast jest degradowana w normoksji i występuje w postaci trzech głównych izoform (HIF-1 α gen *HIF1A*, HIF-2 α gen *EPAS1* i HIF-3 α gen *HIF3A*) [77,80]. Zależna od tlenu aktywność transkrypcyjna kompleksów HIF jest kontrolowana poprzez modyfika-

cje potranslacyjne ich podjednostek α . Właściwymi czujnikami komórkowego stężenia tlenu są bowiem hydroksylazy proliny (PHD, *prolyl hydroxylases*; PHD2 gen *EGLN1*, PHD1 gen *EGLN2* oraz PHD3 gen *EGLN3*) [81,82]. W normoksji enzymy te hydroksylują dwie reszty proliny z C-końca podjednostki HIF- α , prowadząc do jej ubikwitynacji zależnej od czynnika von Hippel-Lindau (VHL) i w konsekwencji do degradacji w proteasomie 26S [81]. Brak tlenu hamuje aktywność PHD, co prowadzi do akumulacji podjednostki α w cytozolu, gdzie po jej dimeryzacji z podjednostką β powstają kompleksy HIF [81]. Kompleksy HIF są następnie transportowane do jądra komórkowego, w którym regulują transkrypcję genów. Aktywność transkrypcyjna kompleksów HIF-1 jest również kontrolowana za pośrednictwem modyfikacji potranslacyjnych. W obecności tlenu hydroksylaza asparylowa (FIH, *factor inhibiting HIF-1*, gen *HIF1AN*) hydroksyluje resztę asparaginy z C końca podjednostki α , co prowadzi do upośledzenia aktywności transkrypcyjnej kompleksu HIF-1 w jądrze komórkowym [83]. Podobnie jak dla PHD, tak i dla FIH tlen jest niezbędny do przeprowadzenia reakcji hydroksylacji, jednak enzym ten jest aktywny przy niższych stężeniach tlenu niż PHD. Umożliwia to szybką inaktywację szlaku HIF-1, również w przypadku częściowego odtworzeniu homeostazy tlenowej [84].

Rodzaj podjednostki α determinuje występowanie i funkcję biologiczną kompleksów HIF. Kompleksy HIF-1 występują we wszystkich typach komórek ssaków i kontrolują pierwszy etap komórkowej odpowiedzi na hipoksję. Kompleksy HIF-2 i HIF-3 występują jedynie w wybranych tkankach (m.in. komórkach śródbłonna), gdzie wykazują aktywność transkrypcyjną na późniejszych etapach odpowiedzi na hipoksję, często również w stężeniu parcjalnemu tlenu wyższym niż dla HIF-1 [85-87]. Czynniki te wykazują zbliżony do HIF-1, lecz węższy zakres regulacji transkrypcyjnej [85-87]. Zarówno HIF-2, jak i HIF-3 mogą również indukować inne niż HIF-1 geny [88,89]. Uważa się, że rolą HIF-1 jest inicjacja globalnego spektrum zmian mających na celu przetrwanie hipoksji i przywrócenie homeostazy tlenowej. Wraz z postępem adaptacji i przywracania homeostazy tlenowej wpływ HIF-1 jest stopniowo ograniczany, a wybrane funkcje transkrypcyjne podejmują, zależnie od tkanki, inne czynniki HIF: HIF-2 i HIF-3 [87].

1.2.1.2. HIF-1 a miRNA

HIF-1 ma kluczową rolę w regulacji adaptacyjnej komórkowej odpowiedzi na hipoksję, miRNA potranskrypcyjnie obniżają poziom tego czynnika, a tym samym umożliwiają ograniczenie jego aktywności transkrypcyjnej w warunkach hipoksji. Zatem mimo upośledzenia aktywności PHD i FIH miRNA mogą kontrolować przebieg szlaku HIF-1. Wzrasta liczba znanych miRNA, których poziom zmienia się pod wpływem hipoksji, wpływając na przebieg mechanizmów odpowiedzi komórkowej [90-92]. Obserwowane podczas hipoksji zmiany ilości miRNA były jednak często tkankowo specyficzne i identyfikowane jedynie w

komórkach nowotworowych lub na skutek chemicznej aktywacji szlaku HIF [91]. Wpływ na poziom HIF-1 podczas hipoksji zaobserwowano dotychczas dla dwunastu miRNA: miR-210, miR-20a, miR-20b, miR-199a, miR-155, miR-424, miR-130a, miR-130b, miR-155, miR-200b, miR-200c oraz miR-429 [91,93]. Jednak bezpośrednia regulacja ilości HIF-1 za pośrednictwem wiązania miRNA do 3'UTR jego mRNA dotyczy jedynie pięciu z nich: miR-20a, miR-20b, miR-199a, miR-155 [91,93] i miR-429 (jeden z aspektów tej rozprawy) [94]. Jednocześnie HIF-1 może bezpośrednio indukować ekspresję miRNA jak w przypadku miR-210 [95], miR-155 [96] oraz miR-429 (jeden z aspektów tej rozprawy) [94]. miR-155 oraz miR-429 regulują więc poziom HIF-1 na podstawie mechanizmu negatywnego sprzężenia zwrotnego i umożliwiają eliminację tego czynnika w warunkach długotrwałego niedotlenienia [94,96].

1.2.2. Komórkowa odpowiedź na niezwinęte białka

Czynniki stresu metabolicznego, jak infekcje i chroniczne stany zapalne, hipoksja, nowotwory, otyłość czy cukrzyca (zarówno typu pierwszego, jak i drugiego) oraz schorzenia neurodegeneracyjne, często prowadzą do zakłócenia funkcji retikulum endoplazmatycznego (ER, *endoplasmic reticulum*) [97]. ER jest centralnym organellum dla syntezy lipidów, zwijania, potranslacyjnych modyfikacji i kierowania białek błonowych i sekrecyjnych, odpowiada za utrzymanie homeostazy redox, regulację komórkowego poziomu jonów Ca^{2+} oraz przebieg komórkowych szlaków przekazywania sygnału [98]. ER kontroluje więc metabolizm komórek, modulując zależnie od ich potrzeb syntezę białek i lipidów [98,99]. Jednocześnie lokalizowane w ER szlaki przekazywania sygnału regulują przebieg procesów metabolicznych zarówno na poziomie komórkowym (m.in. przebieg procesów w mitochondriach), jak i całego organizmu (za pośrednictwem hormonów, m.in. insuliny) [97,99-101]. Niemożność dostosowania przebiegu procesów zachodzących w ER do potrzeb organizmu lub ich upośledzenie określa się terminem stresu ER (*ER stress*). Jedną z głównych konsekwencji zaburzenia homeostazy ER jest upośledzenie procesów zwijania i kierowania białek, prowadzące do ich akumulacji w tym organellum [102]. W celu przywrócenia homeostazy ER jest aktywowany adaptacyjny mechanizm odpowiedzi na niezwinęte białka (UPR, *unfolded protein response*) [103,104].

Głównym zadaniem UPR jest usunięcie tych niezwinętych białek poprzez intensyfikację procesów ich zwijania i degradacji białek w ER, zahamowanie syntezy nowych białek oraz zwiększenie pojemności tego organellum [102]. UPR ma drugą – równie ważną – funkcję: mechanizm ten indukuje apoptozę komórek, gdy stan równowagi w ER nie może zostać przywrócony [102]. U ssaków głównymi receptorami stresu ER są trzy białka przezbłonowe: **ATF6** (*activating transcription factor 6*, gen *ATF6*), **IRE1 α** (*inositol-requiring and ER-to-nucleus signaling protein*, gen *ERN1*) i **PERK** (*protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase*, gen *EIF2AK3*) [105].

W warunkach homeostazy ER białka te są nieaktywne i związane w świetle ER z białkiem **BiP** (*binding immunoglobulin protein*, gen *HSPA5*) [99].

Na skutek stresu ER białka te ulegają aktywacji i podejmują działania mające na celu przetrwanie przez komórkę niekorzystnych warunków i przywrócenie homeostazy ER. Aktywna forma IRE1 ma właściwości endorybonukleazy i odpowiada m.in. za składanie mRNA **XBP1** (*X-box binding protein 1*, gen *XBP1*), tworząc aktywną transkrypcyjnie formę tego białka (sXBP1, *spliced XBP1*) [106]. Aktywne białko PERK fosforyluje eIF-2 α (*eukaryotic initiation factor 2 alpha*, gen *eIF2*), który odpowiada za aktywację **ATF4** (*activating transcription factor 4*, gen *ATF4*) oraz inhibicję translacji i tym samym za zmniejszenie ilości białek w ER [106]. Aktywne formy ATF6 i XBP1 są odpowiedzialne za zwiększenie ekspresji białek opiekuńczych, foldaz oraz innych składowych błony ER, przyczyniając się do zwiększenia jego rozmiaru i pojemności. ATF4 reguluje transkrypcję genów odpowiedzialnych m.in. za metabolizm aminokwasów [99]. Zarówno sXBP1, jak i ATF6 modulują transkrypcyjnie przebieg procesów glukogenezy i lipogenezy [97].

Jeśli opisane działania mające na celu przywrócenie równowagi w ER okażą się niewystarczające, UPR inicjuje apoptozę komórek. IRE1 i PERK biorą udział w aktywacji proapoptycznej kinazy JNK (*c-JunNH2-terminal kinase*), a ATF4 odpowiada za aktywację proapoptycznego czynnika transkrypcyjnego CHOP (*growth arrest and DNA-damage-inducible protein 153*, gen *GADD153*). W komórkach ludzkich stres ER odpowiada również za aktywację kaspazy 4 [107,108].

1.2.2.1. UPR a miRNA

W zależności od modelu badań (organizmu, tkanki czy linii komórkowej) stres ER zmieniał ekspresję nawet do kilkudziesięciu miRNA, jednak znaczenie tych zmian dla komórkowej odpowiedzi na niezwinęte białka wyjaśniono jedynie dla około dwudziestu z nich [109]. Zależnie od funkcji tych RNA w przebiegu UPR miRNA klasyfikuje się jako adaptacyjne bądź proapoptyczne [110,111]. Związane ze stresem ER zmiany w ilości adaptacyjnych miRNA umożliwiają akumulację czynników transkrypcyjnych i białek odpowiedzialnych za zwiększenie rozmiaru ER, nasilenie procesów zwijania białek, zmniejszenie ilości białek w ER oraz obniżenie poziomu czynników proapoptycznych [109]. Zmiany w ekspresji **proapoptycznych** miRNA redukują ilość białek antyapoptycznych i umożliwiają akumulację czynników indukujących apoptozę [109]. Zmiany profili ekspresji miRNA podczas UPR mogą być częściowo spowodowane przez specyficzne dla stresu ER czynniki transkrypcyjne (m.in. ATF4, ATF6 oraz XBP1) [112]. Przykładowo: wykazano, że kluczowy czynnik adaptacyjnej odpowiedzi UPR – sXBP1 – indukuje miR-346 (jeden z aspektów tej pracy) [113], a sam jest degradowany za pośrednictwem miR-30c-2* [114]

2. CELE PRACY

Celem pracy było poszerzenie stanu wiedzy o roli miRNA w regulacji adaptacyjnych aspektów komórkowych mechanizmów odpowiedzi na hipoksję oraz niezwinięte białka. Zrealizowane badania umożliwiły:

1. zdefiniowanie wpływu miR-429 na przebieg zależnej od HIF-1 odpowiedzi na hipoksję w ludzkich komórkach śródbłonna,
2. zdefiniowanie opartego na specyficznej indukcji miR-346 mechanizmu kontroli wewnątrzkomórkowego transportu peptydów do ER podczas UPR.

3. NAJWAŻNIEJSZE SPOSTRZEŻENIA Z PREZENTOWANYCH DONIESIEŃ

3.1. Zdefiniowanie wpływu miR-429 na przebieg zależnej od HIF-1 odpowiedzi na hipoksję w ludzkich komórkach śródbłónka

The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human endothelial cells through a negative feedback loop; 2015, FASEB Journal 29:1467-1479.

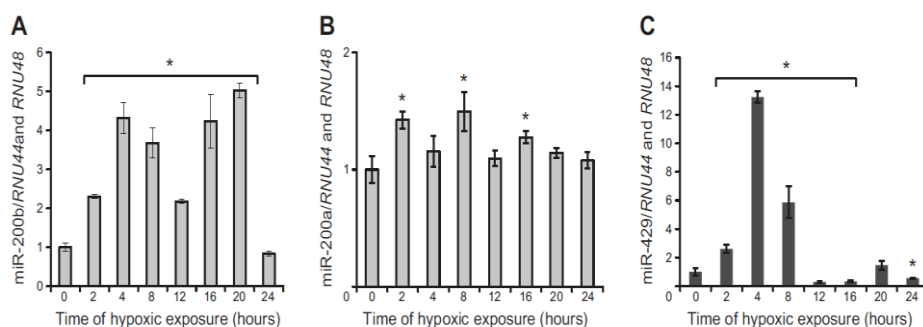
miR-429 jest członkiem rodziny mikro-RNA miR~200, do której należą również lokalizowane w jego bezpośrednim sąsiedztwie na chromosomie 1 miR-200b oraz miR-200a, a także lokalizowane na chromosomie 12 miR-200c oraz miR-141. miRNA z tej rodziny były już wcześniej klasyfikowane jako hypoxamiR (miRNA, których poziom zmienia się pod wpływem hipoksji). Mimo doniesień literaturowych nie udało się jednak jednoznacznie określić wpływu hipoksji na ich ekspresję oraz ich potencjalnej roli w regulacji komórkowej odpowiedzi na niedotlenienie. Co prawda identyfikowano zmiany w ilości miR-429 podczas hipoksji [94,95], jednak ischemia mysich komórek nerwowych prowadziła do akumulacji tego mikro-RNA, natomiast hipoksja w ludzkich komórkach śródbłónka naczyń włosowatych skutkowałą spadkiem ilości miR-429 [96]. W konsekwencji zaproponowano odmienne modele opisujące rolę tego miRNA podczas niedotlenienia.

Akumulacja poziomu miR-429 podczas ischemii miałyby prowadzić do obniżenia ekspresji PHD2, tym samym stabilizując białka HIF [94]. Opisanemu modelowi działania miR-429 trudno jednak przypisać znaczenie fizjologiczne, ponieważ obecność tlenu jest konieczna dla aktywności hydroksylaz proliny. Ekspresja PHD2 podczas niedotlenienia częściowo jest indukowana przez HIF-1, jednak zakumulowana PHD2 jest nieaktywna i nie wpływa na stabilność podjednostki HIF- α . Ponadto w prezentowanych badaniach wykluczyliśmy bezpośredni wpływ mi-429 na ekspresję PHD2 w ludzkich komórkach śródbłónka. Redukcja ilości miRNA z rodziny miR~200 (miR-200b) w ludzkich pierwotnych komórkach śródbłónka naczyń włosowatych mogłaby stabilizować mRNA pro-angiogenego genu *ETS1*, a tym samym stymulować unaczynienie [115]. Jednak poziom miR-429 w badanych komórkach śródbłónka okazał się zbyt niski, aby miał realny wpływ na ten proces, a nasze badania wykluczyły bezpośrednio oddziaływanie między miR-429 a mRNA genu *ETS1* [115].

Co więcej – przeprowadzone przez nas analizy bioinformatyczne rozpoznawanych miRNA z rodziny miR~200 sekwencji docelowych w 3' UTR mRNA wykazały, że ta rodzina miRNA mogłaby regulować szerokie spektrum białek ważnych dla odpowiedzi na hipoksję i związaną z nią angiogenezę, jak: podjednostka α czynnika HIF-1, podjednostka α czynnika HIF-3, inhibitor podjednostki α czynnika indukowanego niedotlenieniem (HIF1-AN), hydroksylazy proliliny 2 i 3 (PHD 2 i 3) i śródbłonkowo-naczyniowy czynnik wzrostu A (VEGF-A *vascular endothelial growth factor*).

Mając na względzie rozbieżności co do wpływu niedotlenienia na poziom miRNA z rodziny miR~200, postawiliśmy hipotezę, że **poziom tych RNA ulega dynamicznej modulacji podczas hipoksji. Ma to na celu precyzyjną kontrolę ilości białek ważnych dla komórkowej odpowiedzi na niedotlenienie.**

Aby zweryfikować tę hipotezę w pierwotnych komórkach ludzkiego endotelium żyły pępowinowej (komórki HUVEC, *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), określiliśmy przebieg ekspresji miRNA z rodziny miR~200 zlokalizowanych na chromosomie 1 zależnie od czasu trwania hipoksji: miR-200a, miR-200b oraz miR-429 (rycina 1). Podczas dobowej hipoksji poziom tych miRNA ulegał dynamicznym zmianom, szczególnie dla miR-429 (rycina 1 C). Na wczesnych etapach niedotlenienia zaobserwowaliśmy gwałtowną akumulację tego miRNA, natomiast na późniejszych – spadek poniżej poziomu obserwowanego w normoksji.

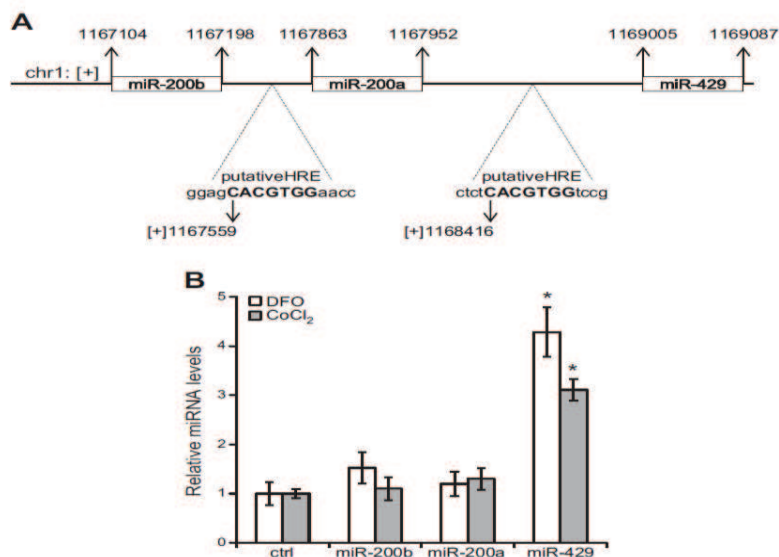


Rycina 1. Wpływ niedotlenienia (1% O₂) komórek HUVEC na ekspresję odpowiednio: **A.** miR-200b, **B.** miR-200a oraz **C.** miR-429. Zmiany w ilości miRNA odniesiono do ich poziomu w normoksji. Słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe, a symbolem * oznaczono istotne statystycznie zmiany (P<0,05). Szczegółowy opis metodyki i analizy statystycznej zawarto w omawianej pracy.

Figure 1. Hypoxia-induced changes in expressions profile of miR-200b (A); miR-200a (B) and miR-429 (C) in HUVECs cells. Significant (p<0.05) changes are marked with an "*".

Obserwowane zmiany w profilach ekspresji analizowanych miRNA mogły być bezpośrednią konsekwencją wiązania specyficznych dla niedotlenienia czynników transkrypcyjnych. W otoczeniu sekwencji miR-200a - miR-200b - miR-429 zlokalizowaliśmy dwie sekwencje HRE mogące potencjalnie wiązać czynniki HIF (rycina 2A).

Po chemicznej indukcji aktywności transkrypcyjnej HIF w komórkach HUVEC zaobserwowaliśmy znaczący wzrost ekspresji miR-429 (rycina 2B). We wspomnianych eksperymentach celem stabilizacji podjednostki HIF-1 α inhibowaliśmy aktywność hydroksylaz proliny, hodując komórki HUVEC w obecności chlorku kobaltu (CoCl₂) lub deferoksaminy (DFO). Jony kobaltu zastępują jony żelaza w centrum aktywnym hydroksylaz proliny inaktywując te enzymy [116]. Deferoksamina chelatuje jony żelaza w komórce, obniżając jego dostępność i tym samym upośledzając działanie hydroksylaz proliny [117]. Opisane metody chemicznej inhibicji aktywności tych enzymów prowadzą w konsekwencji do zahamowania degradacji podjednostek HIF- α i utworzenia aktywnych kompleksów HIF [117].

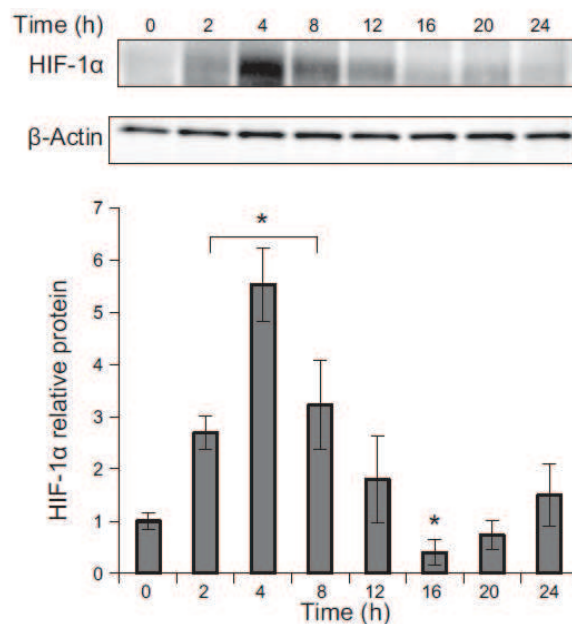


Rycina 2. A. Lokalizacja potencjalnych sekwencji HRE w otoczeniu badanych miRNA. **B.** Wpływ chemicznej indukcji aktywności transkrypcyjnej HIF w komórkach HUVEC na ekspresję miR-200b, miR-200a oraz miR-429. DFO – deferoksamina (w stężeniu końcowym 100 μ M, przez 6 godzin), CoCl₂ – chlorek kobaltu (w stężeniu końcowym 200 μ M, przez 12 godzin). Zmiany w ilości miRNA odniesiono do ich poziomu w warunkach kontrolnych. Słupki błędem reprezentują odchylenie standardowe, a symbolem * oznaczono istotne statystycznie zmiany (P<0,05). Szczegółowy opis metodyki i analizy statystycznej zawarto w omawianej pracy.

Figure 2. (A) The localization of putative HRE sequences in miR: 200b~200a~429 cluster **(B)** HUVECs cells were treated with hypoxia mimetics (100 μ M DFO for 6h – white -

grey and 200 μM CoCl_2 for 12h) and miRNA levels were monitored. The miRNA levels results are expressed as a fold change over the untreated control. Significant ($p < 0.05$) changes are marked with an "**").

Mając na uwadze, że miR-429 był akumulowany na wczesnych etapach hipoksji, a więc w czasie, gdy za regulację adaptacji komórkowej odpowiada czynnik HIF-1, porównaliśmy jego profil ekspresji ze zmianami ilości miRNA (rycina 3). Dynamika zmian ilości białka HIF-1 podczas niedotlenienia odzwierciedlała poziom miR-429. Co więcej – poziom HIF-2 nie zmieniał się w tym samym czasie. Uzyskane wyniki wskazują, że zmiany ilości miR-429 są bezpośrednią konsekwencją aktywności transkrypcyjnej HIF-1.



Rycina 3. Wpływ niedotlenienia (1% O_2) komórek HUVEC na ekspresję podjednostki α czynnika HIF-1 (HIF-1 α). Zmiany w ilości HIF-1 α po uprzedniej normalizacji do poziomu β -Aktyny odniesiono do ich poziomu w normoksji. Słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe, a symbolem * oznaczono istotne statystycznie zmiany ($P < 0,05$). Szczegółowy opis metodyki i analizy statystycznej zawarto w dyskutowanej pracy.

Figure 3. Hypoxia induces dynamic changes of protein levels of HIF-1 α in HUVECs cells. The bar graphs below show the relative protein amounts at each time point. The protein levels of were detected with SDS-PAGE and Western Blot and related to beta actin levels. 2 The protein levels (bar graphs) are normalized to normoxic control. Significant ($p < 0.05$) changes are marked with an "**").

Nasza hipoteza zakładała, że zmiany ilości miRNA podczas niedotlenienia powinny być odzwierciedlone w ilości kluczowych białkowych regulatorów komórkowej odpowiedzi na hipoksję. Analiza bioinformatyczna wskazała *EGLN1*, *HIF1AN*, *HIF1A* oraz *VEGFA* jako potencjalne mRNA mogące wiązać miR-429. Każde z kodowanych przez te geny białek pełni ważną funkcję w komórkowej odpowiedzi na hipoksję, a czynniki te wzajemnie regulują swoją ekspresję zarówno transkrypcyjnie, jak i potranskrypcyjnie.

Istnienie tej sieci wzajemnych oddziaływań utrudniało jednoznaczne określenie roli miR-429 w komórkowej odpowiedzi na hipoksję. Dlatego też pierwszym etapem naszych prac mających na celu określenie funkcji biologicznej miR-429 było określenie, które ze wspomnianych czynników podlegają bezpośredniej regulacji przez to miRNA. Mechanizm działania miRNA polega na obniżeniu ilości białka, któremu towarzyszy obniżenie ilości mRNA; można więc oczekiwać, że akumulacja miRNA będzie prowadzić do redukcji ekspresji jego docelowego mRNA oraz białka, a spadek ilości miRNA wywoła odwrotny efekt. Innymi słowy – przebieg ekspresji docelowego mRNA powinien negatywnie korelować z poziomem miRNA. Niestety podczas hipoksji ekspresja żadnego z postulowanych białek nie spełniała tych założeń.

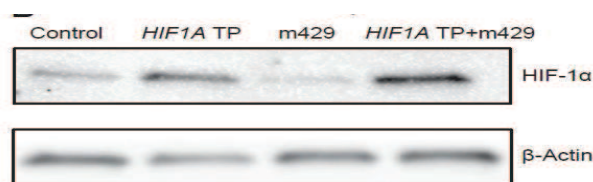
Nasz uproszczony model pomijał jednak fakt, że podczas hipoksji białka te regulują wzajemnie swoją ekspresję oraz że ich ilość wynika też z działania wielu innych czynników transkrypcyjnych. Dlatego też skoncentrowaliśmy się na określeniu wpływu miRNA na te czynniki w wybranych warunkach eksperymentalnych: zarówno w normoksji, jak i po czasie hipoksji, gdy obserwowano maksymalną indukcję miR-429 (po 4 i 8 godzinach). W tych warunkach określiliśmy zmiany w ilości mRNA *EGLN1*, *HIF-1AN*, *HIF1A* oraz *VEGFA* spowodowane zwiększeniem oraz obniżeniem komórkowego poziomu miR-429 (odpowiednio sztuczny analog miR-429 i jego inhibitor).

Zgodny z naszym modelem kierunkowy wpływ miR-429 zaobserwowaliśmy jedynie dla *HIF1A* (analog obniżał poziom mRNA, a inhibitor prowadził do akumulacji mRNA). Co więcej – ekspresja *VEGFA* była również specyficznie modulowana przez miR-429, ale jedynie w warunkach beztlenowych. Uzyskane wyniki sugerowały bezpośrednie oddziaływanie miR-429 z sekwencjami docelowymi mRNA w 3'UTR *HIF1A* oraz *VEGFA*.

Jednak to jedynie dla *HIF1A* zaobserwowaliśmy kierunkowy wpływ miR-429 w normoksji. Ponadto HIF-1 transkrypcyjnie indukuje ekspresję *VEGFA* w warunkach niedotlenienia [118]. Wywołane przez miR-429 zmiany w ilości mRNA *VEGFA* mogły być więc konsekwencją zmian w ilości HIF-1, bezpośredniego oddziaływania miR-429 z sekwencją docelową w mRNA *VEGFA* lub wypadkową obu tych mechanizmów. Można było przyjąć, że wywołane przez miR-429 zmiany w ilości HIF-1 są krytyczne dla przebiegu adaptacyjnej odpowiedzi na hipoksję. Określiliśmy więc wpływ miR-429 na poziom białka HIF-1,

wykazując, że zależne od miR-429 zmiany w mRNA *HIF1A* są odzwierciedlone w ilości HIF-1 α .

Bezpośrednie wiązanie miR-429 z zidentyfikowaną sekwencją w 3'UTR mRNA *HIF1A* udowodniliśmy, wykorzystując specyficzną dla niej cząsteczkę *target protector*. Cząsteczki *target protector* to zmodyfikowane chemicznie syntetyczne RNA komplementarne do sekwencji wiązania miRNA i jej bezpośredniego otoczenia w obrębie danego 3'UTR. Przyłączenie cząsteczki *target protector* do mRNA nie prowadzi do degradacji lub zahamowania translacji danego transkryptu, a jednocześnie blokuje wiązanie miRNA do danej sekwencji. Specyficzna dla zidentyfikowanego w 3'UTR mRNA *HIF1A* miejsca wiązania miR-429 cząsteczka *target protector* chroniła ten transkrypt przed związaniem z tym miRNA degradacją, w konsekwencji stabilizując białko HIF-1 (rycina 4).



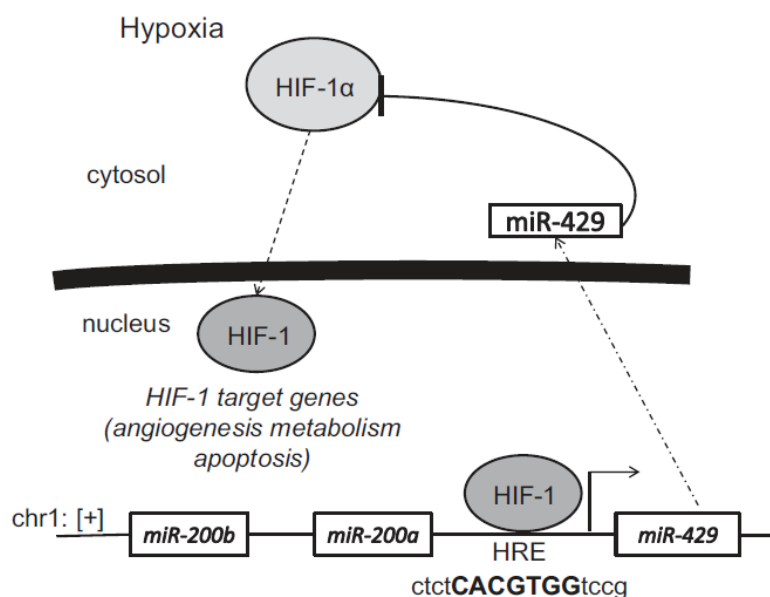
Rycina 4. Wpływ zmian wewnątrzkomórkowego poziomu miR-429 na ekspresję podjednostki α czynnika HIF-1 (HIF-1 α) po 4 godzinach hipoksji (1% O₂). Akumulacja miR-429 (m429) w komórkach HUVEC obniża poziom HIF-1 α . Obecność cząsteczki *target protector* (HIF1A TP) znosi efekt miR-429. Szczegółowy opis metodyki w dyskutowanej pracy.

Figure 4. miR-429 binds to predicted target sequence at *HIF1A* 3'UTR. HUVEC cells were transfected with *HIF1A* target sequence-specific target protector and/or miR-429 analog (Mimic 429). The corresponding changes of HIF-1 α protein levels were detected with SDS-PAGE and Western Blot and related to Beta Actin levels.

Okazało się natomiast, że specyficzna cząsteczka *target protector* dla sekwencji docelowej dla miR-429 w obrębie mRNA *VEGFA* nie ma wpływu na zależne od miR-429 zmiany ilości tego genu. Modulacja ilości mRNA *VEGFA* przez miR-429 nie wynikała z bezpośredniego wiązania tego miRNA i była konsekwencją jego wpływu na poziom HIF-1.

Potencjalne sekwencje docelowe dla miR-429 zlokalizowaliśmy w obrębie kilkuset mRNA. Aby dokonać dalszej szerszej oceny znaczenia biologicznego tego miRNA, przeprowadziliśmy całogenomową analizę zmian ekspresji spowodowanych inhibicją miR-429 w ludzkich komórkach endotelium. Te badania potwierdziły wpływ miR-429 na poziom zarówno *HIF1A*, jak i 16 innych genów ważnych dla komórkowej odpowiedzi na hipoksję (*HMOX1*, *ADAMTS1*, *PMA-IP1*, *PTHLH*, *CITED2*, *BMP2*, *SIRT1*, *ZEB1*, *BM11*, *ESM1*, *ROCK2*, *EP300*, *ZEB2*, *SPRY2*, *HOXA5*, *UBE2D1*).

Podsumowując, nasze badania wykazały, że podczas niedotlenienia początkowej akumulacji głównego czynnika odpowiedzi adaptacyjnej na hipoksję HIF-1 towarzyszy indukcja miR-429, który redukuje ekspresję tego czynnika. Zidentyfikowaliśmy więc w ludzkim endotelium pętlę negatywnego sprzężenia zwrotnego między HIF-1 a miR-429 (rycina 5).



Rycina 5. Schemat pętli negatywnego sprzężenia zwrotnego HIF-1/miR-429 podczas komórkowej odpowiedzi na hipoksję.

Figure 5. Model of negative feedback loop between HIF1A and miR-429.

Adaptacja endotelium do długotrwałej hipoksji wymaga ograniczenia szerokiej odpowiedzi komórkowej mediowanej przez HIF-1 do wybranych aspektów, które są kontrolowane za pośrednictwem HIF-2. Brak tlenu uniemożliwia jednak eliminację HIF-1 z komórek za pośrednictwem mechanizmów potranslacyjnych (degradacji zależnej od PHD i inaktywacji przez FIH). miR-429 indukowany w odpowiedzi na akumulację HIF-1 umożliwia więc hamowanie aktywności transkrypcyjnej tego czynnika podczas długotrwałego niedotlenienia. Wykazaliśmy również, że miR-429 nie ma wpływu na poziom HIF-2. miR-429 umożliwia więc przekazanie kontroli nad odpowiedzią na hipoksję od czynnika HIF-1 do czynnika HIF-2 i tym samym adaptację komórek endotelium do długotrwałych warunków niedotlenienia. Podobne znaczenie w adaptacji komórek do długotrwałej hipoksji ma miR-155 [96].

3.2. Zdefiniowanie opartego na specyficznej indukcji miR-346 mechanizmu kontroli peptydów do ER podczas UPR

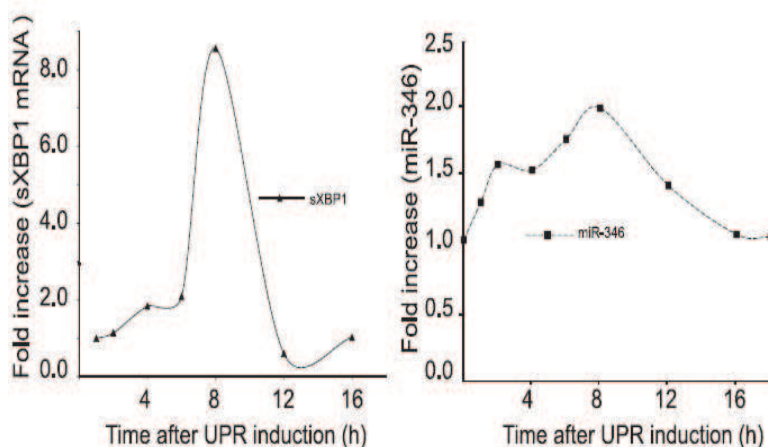
The unfolded protein response (UPR)-activated transcription factor X-box-binding protein 1 (XBP1) induces microRNA-346 expression that targets the human antigen peptide transporter 1 (TAP1) mRNA and governs immune regulatory genes; 2011; Journal of Biological Chemistry 286 (48), 41862-41870.

W 2011 roku zidentyfikowano u myszy pierwsze miRNA zaangażowane w przebieg UPR – miR-708 [119]. Postawiliśmy więc hipotezę, że miRNA mogą brać udział w tym szlaku u człowieka. Nasz model roboczy zakładał, że aktywacja UPR zmieni ilość wybranych miRNA w celu potranskrypcyjnej adaptacji komórek do stresu ER. Aby zweryfikować tę hipotezę, w ludzkich komórkach nowotworowego nabłonka płuc (Calu-3), po 12-godzinnej aktywacji UPR, określiliśmy całogenomowe zmiany poziomu miRNA. Aktywność UPR była indukowana chemicznie, za pośrednictwem dwóch odmiennych mechanizmów zaburzenia homeostazy ER: blokowaliśmy proteasomalną degradację białek lub glikozylację białek w ER. Miało to na celu eliminację zmian związanych z przyczyną stresu ER i w konsekwencji identyfikację miRNA uniwersalnych dla UPR. Do badań wybrano nabłonek płucny, gdyż stanowi on pierwszą linię obrony przed patogenami i niekorzystnymi czynnikami środowiskowymi, co czyni go szczególnie narażonym na stres ER i w konsekwencji aktywacji odpowiedzi na niezwinięte białka.

Zaobserwowaliśmy, że niezależnie od czynnika stresu odpowiednio poziom tylko 2 miRNA (miR: -346; -885-3p) wzrósł, podczas gdy 7 innych spadł (miR: -1244; -222*; -302d*; -601; -23a*; 625*).

miRNA obniżają ilość białek, co jest również jednym z zadań UPR, więc związana z tym szlakiem indukcja miRNA mogłaby prowadzić do redukcji ilości białek w ER. Dlatego też skoncentrowaliśmy się na miR-346, znacznie mocniej indukowanym przez UPR niż miR-885-3p. Co więcej – ilość miR-346 podczas UPR rosła w różnych ludzkich liniach komórkowych (zarówno nowotworowych, jak i pierwotnych) niezależnie od czynnika stresu ER.

Sekwencja dla miR-346 lokalizuje się w obrębie intronu 2 ludzkiego genu *GRID1* (gen kodujący podjednostkę Δ -1 receptora glutaminowego) na chromosomie 10. Wykazaliśmy jednak, że związanej z UPR akumulacji tego miRNA nie towarzyszyła indukcja ekspresji *GRID1*. Sugerowało to, że za ekspresję tego miRNA podczas UPR odpowiada specyficzny dla niego mechanizm transkrypcyjny. Za pomocą narzędzi bioinformatycznych zlokalizowaliśmy w otoczenia sekwencji miR-346 miejsce wiązania dla jednego z głównych czynników transkrypcyjnych UPR – sXBP1. Postawiliśmy więc hipotezę roboczą, że indukcja miR-346 podczas UPR jest spowodowana aktywnością transkrypcyjną sXBP1. Tę tezę dodatkowo wspierała korelacja między przebiegiem ekspresji sXBP1 a miR-346 podczas UPR (rycina 6). Czas, w którym obserwowano najwyższy poziom miR-346, odpowiadał maksymalnej akumulacji mRNA sXBP1.



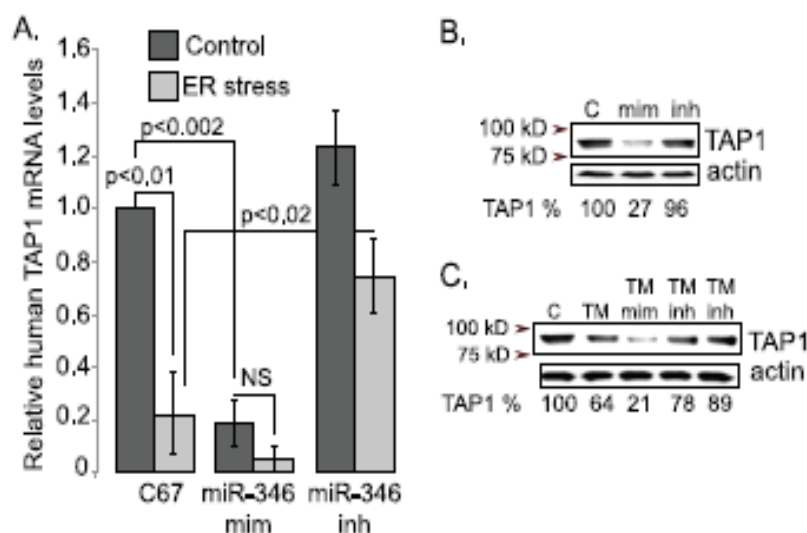
Rycina 6. Związane z UPR zmiany w ilości mRNA sXBP1 oraz miR-346 w komórkach Calu-3. Szczegółowy opis metodyki i analizy statystycznej zawarto w omawianej pracy.
Figure 6. UPR induces dynamic changes in mRNA levels of sXBP1 and miR-346 in Calu 3 cells.

Również nadekspresja aktywnego transkrypcyjnie sXBP1 przy nieaktywnym szlaku UPR prowadziła do indukcji badanego miRNA.

Hipotezę ostatecznie potwierdziliśmy za pomocą mysich linii komórkowych: pozbawionej genu *Xbp1* oraz typu dzikiego (z aktywnym genem *Xbp1*). Akumulację miR-346 podczas UPR obserwowaliśmy jedynie w komórkach z aktywnym genem *Xbp1*.

Kolejnym etapem omawianych badań było ustalenie biologicznego znaczenia związanej z UPR akumulacji miR-346. Zarejestrowaliśmy całogenomowy profil zmian poziomu mRNA podczas UPR i określiliśmy geny ulegające represji. Następnie wykorzystując narzędzia bioinformatyczne, analizowaliśmy ich sekwencje 3'UTR na obecność miejsc wiązania dla miR-346. Opisanie analizy umożliwiły nam identyfikację transkryptu ludzkiego genu *TAP1* (*ER antigen peptide transporter 1*, gen *TAP1*) jako mRNA regulowanego przez miR-346.

Wykazaliśmy, że zmiany w ilości miR-346 negatywnie korelują z ekspresją genu *TAP1* zarówno na poziomie mRNA, jak i białka. W ludzkich nabłonkowych komórkach nowotworu szyjki macicy (HeLa) podniesienie poziomu miR-346 (analog) prowadziło do spadku ilości mRNA i białka *TAP1*. Zablockowanie aktywności miR-346 (inhibitor) prowadziło do akumulacji mRNA i białka *TAP1* (rycina 7). Wykazaliśmy też, że zablockowanie aktywności miR-346 podczas UPR zapobiega represji genu *TAP1*.



Rycina 7. Wpływ miR-346 na ilość mRNA (A) i białka TAP1 (B i C) w komórkach HeLa. Zarówno stres ER (TM, komórki traktowane tunikamycyną w stężeniu końcowym 5 $\mu\text{g/ml}$, przez 12 godzin), jak i analog miR-346 (miR-346 mim) prowadziły do represji TAP1. Inhibicja miR-346 (miR-346 inh) znosiła wpływ stresu ER na poziom TAP1. W charakterze kontroli użyto komórek HeLa transfekowanych cel-miR-67 (C67 oraz C), który nie wykazuje homologii do ssaczych mRNA. Szczegółowy opis metodyki i analizy statystycznej zawarto w omawianej pracy.

Figure 7. miR-346 affects both mRNA (A) and protein levels of TAP1 in HeLa cells. TAP1 expression is reduced during ER stress, as well as up on treatment with miR-346 analog (miR-346 mim). miR-346 inhibition (miR-346 inh) restored TAP1 expression during ER stress. cel-miR-67 (C67 or C) that has no homology to mammalian mRNA was used as a control.

Białko TAP1 jest odpowiedzialne za przebieg dojrzewania głównych kompleksów zgodności tkankowej klasy I (MHC I, *major histocompatibility complex*) [120]. Zadaniem TAP1 jest przeniesienie zdegradowanych peptydów cytozolowych do ER, gdzie są przyłączane do kompleksów MHC I. Dojrzałe w ER kompleksy MHC I są następnie poprzez aparat Golgiego transportowane na powierzchnię komórki, a tam prezentują antygeny [120]. Podczas stresu ER represja genu TAP1 uniemożliwia więc import peptydów do ER i dojrzewanie kompleksów MHC I. Może to prowadzić w konsekwencji do ograniczenia prezentacji antygenów związanych z MHC I. Podczas UPR XBP1 za pośrednictwem miR-346 ogranicza napływ peptydów do ER w celu przywrócenia homeostazy tego organelum. Efektem ubocznym opisanego mechanizmu mogą być zaburzenia w prezentacji antygenów i peptydów wirusowych [121-123].

3.3. miRNA jako kluczowa składowa mechanizmu odpowiedzi na niezwinięte białka

Regulation of the unfolded protein response by microRNAs; 2013; Cellular & Molecular Biology Letters 18 (4), 555-578.

W tej pracy podsumowaliśmy obecny stan wiedzy na temat roli miRNA w regulacji UPR. Jednocześnie zaproponowaliśmy, że podczas odpowiedzi na niezwinięte białka miRNA pełnią nie tylko funkcje proapoptyczne lub adaptacyjne, lecz także mogą mieć znaczenie dla wyboru między adaptacją a apoptozą. Postulowana w tej pracy **hipoteza zakłada więc, że podczas UPR miRNA pełnią funkcje czynników:**

- **adaptacyjnych** – hamowanie ekspresji określonych miRNA umożliwia akumulację czynników transkrypcyjnych i białek odpowiedzialnych za zwiększenie rozmiaru ER, nasilenie procesów zwijania białek oraz przeciwdziałanie apoptozie; indukcja innych miRNA ma za zadanie zmniejszenie ilości białek w ER oraz obniżenie poziomu czynników proapoptycznych; zmiany profilu ekspresji miRNA mogą być częściowo spowodowane przez specyficzne dla stresu ER czynniki transkrypcyjne (m.in. ATF4, ATF6 oraz XBP1);
- **proapoptycznych** – profil ekspresji miRNA zostaje szybko zmieniony, aby obniżyć poziom białek anty-apoptycznych i umożliwić akumulację czynników indukujących apoptozę, takich jak białko CHOP;
- **decyzyjnych dla przejścia od adaptacji do apoptozy (dynamicznych)** – i tym samym kluczowych dla kontroli tego szlaku, ponieważ dynamiczna zmiana poziomu określonych miRNA, które regulują zarówno czynniki adaptacyjne, jak i apoptotyczne.

Dotychczasowe badania stacjonarne (ograniczone do wybranych, często pojedynczych, okresów trwania UPR) nie pozwalają jednak na identyfikację miRNA decydujących o losie komórki (decyzyjnych dla przejścia od adaptacji do apoptozy), gdyż pomijają kontekst dynamicznego przebiegu UPR.

Ponadto, wykorzystując dostępne narzędzia bioinformatyczne, zaproponowaliśmy nieopisane dotychczas miRNA, mogące mieć wpływ na ten szlak komórkowy.

4. PIŚMIENICTWO

1. Feinbaum R, Ambros V (1999) The timing of lin-4 RNA accumulation controls the timing of postembryonic developmental events in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol* 210: 87-95.
2. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 75: 843-854.
3. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 858-862.
4. Lee RC, Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862-864.
5. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853-858.
6. Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42: D68-73.
7. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, et al. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9: 277-279.
8. Wang J, Haubrock M, Cao KM, Hua X, Zhang CY, et al. (2011) Regulatory coordination of clustered microRNAs based on microRNA-transcription factor regulatory network. *BMC Syst Biol* 5: 199.
9. Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297.
10. Bracht J, Hunter S, Eachus R, Weeks P, Pasquinelli AE (2004) Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA* 10: 1586-1594.
11. Auyeung VC, Ulitsky I, McGeary SE, Bartel DP (2013) Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* 152: 844-858.
12. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425: 415-419.
13. Yeom KH, Lee Y, Han J, Suh MR, Kim VN (2006) Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* 34: 4622-4629.
14. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17: 3011-3016.
15. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
16. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, et al. (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106: 23-34.
17. Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11: 228-234.

18. Yang JS, Phillips MD, Betel D, Mu P, Ventura A, et al. (2011) Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA* species. *RNA* 17: 312-326.
19. Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Bartel B (2006) MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol* 57: 19-53.
20. Kaeuferle T, Bartel S, Dehmel S, Krauss-Etschmann S (2014) MicroRNA methodology: advances in miRNA technologies. *Methods Mol Biol* 1169: 121-130.
21. Sontheimer EJ (2005) Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 127-138.
22. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, et al. (2002) miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 16: 720-728.
23. Schwarz DS, Zamore PD (2002) Why do miRNAs live in the miRNP? *Genes Dev* 16: 1025-1031.
24. Easow G, Teleman AA, Cohen SM (2007) Isolation of microRNA targets by miRNP immunopurification. *RNA* 13: 1198-1204.
25. Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269.
26. Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engle P, Lim LP, et al. (2007) MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 27: 91-105.
27. Sen GL, Blau HM (2005) Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol* 7: 633-636.
28. Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S (2007) Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev* 21: 1857-1862.
29. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA (2006) Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 21: 533-542.
30. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP (2010) Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 466: 835-840.
31. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233.
32. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 9: 102-114.
33. Huntzinger E, Izaurralde E (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 12: 99-110.
34. Mazumder B, Seshadri V, Fox PL (2003) Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci* 28: 91-98.
35. Collier J, Parker R (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* 122: 875-886.
36. Hu W, Collier J (2012) What comes first: translational repression or mRNA degradation? The deepening mystery of microRNA function. *Cell Res* 22: 1322-1324.
37. Wang XJ, Reyes JL, Chua NH, Gaasterland T (2004) Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol* 5: R65.

38. Selbach M, Schwanhaussner B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, et al. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455: 58-63.
39. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 19: 92-105.
40. Baek D, Villen J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, et al. (2008) The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 455: 64-71.
41. Kloosterman WP, Plasterk RH (2006) The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell* 11: 441-450.
42. Ji Q, Karnak D, Hao P, Wang R, Xu L (2010) No small matter: microRNAs - key regulators of cancer stem cells. *Int J Clin Exp Med* 3: 84-87.
43. Gangaraju VK, Lin H (2009) MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 116-125.
44. Bushati N, Cohen SM (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 175-205.
45. Davis BN, Hata A (2009) Regulation of MicroRNA Biogenesis: A miRiad of mechanisms. *Cell Commun Signal* 7: 18.
46. Babenko O, Golubov A, Ilnytsky Y, Kovalchuk I, Metz GA (2012) Genomic and epigenomic responses to chronic stress involve miRNA-mediated programming. *PLoS One* 7: e29441.
47. Babar IA, Slack FJ, Weidhaas JB (2008) miRNA modulation of the cellular stress response. *Future Oncol* 4: 289-298.
48. Weissman C (1990) The metabolic response to stress: an overview and update. *Anesthesiology* 73: 308-327.
49. Altman BJ, Rathmell JC (2012) Metabolic stress in autophagy and cell death pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4: a008763.
50. Cimini S, Rizzardini M, Biella G, Cantoni L (2014) Hypoxia causes autophagic stress and derangement of metabolic adaptation in a cell model of amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurochem* 129: 413-425.
51. Singh H, Farouk M, Bose BB, Singh P (2013) Novel genes underlying beta cell survival in metabolic stress. *Bioinformatics* 9: 37-41.
52. Liu R, Li Z, Bai S, Zhang H, Tang M, et al. (2009) Mechanism of cancer cell adaptation to metabolic stress: proteomics identification of a novel thyroid hormone-mediated gastric carcinogenic signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* 8: 70-85.
53. Welch WJ, Kang HS, Beckmann RP, Mizzen LA (1991) Response of mammalian cells to metabolic stress; changes in cell physiology and structure/function of stress proteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 31-55.
54. Taggart MJ, Wray S (1998) Hypoxia and smooth muscle function: key regulatory events during metabolic stress. *J Physiol* 509 (Pt 2): 315-325.
55. van der Harg JM, Nolle A, Zwart R, Boerema AS, van Haastert ES, et al. (2014) The unfolded protein response mediates reversible tau phosphorylation induced by metabolic stress. *Cell Death Dis* 5: e1393.
56. Fougeray S, Bouvier N, Beaune P, Legendre C, Anglicheau D, et al. (2011) Metabolic stress promotes renal tubular inflammation by triggering the unfolded protein response. *Cell Death Dis* 2: e143.
57. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L (2012) *Biochemistry*. New York: W.H. Freeman. xxxii, 1054, 1043, 1041, 1048 p. p.

58. Samuel J, Franklin C (2008) Hypoxemia and Hypoxia. In: Myers J, Millikan K, Saclarides T, editors. *Common Surgical Diseases*: Springer New York. pp. 391-394.
59. Schmedtje JF, Jr., Ji YS (1998) Hypoxia and molecular cardiovascular medicine. *Trends Cardiovasc Med* 8: 24-33.
60. Malhotra R, Tyson DW, Rosevear HM, Brosius FC, 3rd (2008) Hypoxia-inducible factor-1alpha is a critical mediator of hypoxia induced apoptosis in cardiac H9c2 and kidney epithelial HK-2 cells. *BMC Cardiovasc Disord* 8: 9.
61. Yanyan C, Guoxian Q, Yang G, Leting W (2008) Mechanism of hypoxia-induced factor 1alpha expression in endothelial cells of the human umbilical vein and its induction of apoptosis. *Mol Biol Rep* 35: 285-290.
62. Krick S, Eul BG, Hanze J, Savai R, Grimminger F, et al. (2005) Role of hypoxia-inducible factor-1alpha in hypoxia-induced apoptosis of primary alveolar epithelial type II cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 395-403.
63. Chae HJ, Kim SC, Han KS, Chae SW, An NH, et al. (2001) Hypoxia induces apoptosis by caspase activation accompanying cytochrome C release from mitochondria in MC3T3E1 osteoblasts. p38 MAPK is related in hypoxia-induced apoptosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 23: 133-152.
64. Semenza GL (2014) Hypoxia-inducible factor 1 and cardiovascular disease. *Annu Rev Physiol* 76: 39-56.
65. Graff S, Barach A, Bickerman HA, Beck GJ, Eisenberg M, et al. (1960) Hypoxia in cancer. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 16: 651-655.
66. Balamurugan K (2015) HIF-1 at the crossroads of hypoxia, inflammation, and cancer. *Int J Cancer*.
67. Maxwell PH (2005) Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* 90: 791-797.
68. Dunwoodie SL (2009) The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell* 17: 755-773.
69. Semenza GL (2015) Targeting Hypoxia-Inducible Factor 1 to Stimulate Tissue Vascularization. *J Investig Med*.
70. Yang C, Jiang L, Zhang H, Shimoda LA, DeBerardinis RJ, et al. (2014) Analysis of hypoxia-induced metabolic reprogramming. *Methods Enzymol* 542: 425-455.
71. Semenza GL (2012) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* 148: 399-408.
72. Maxwell PH (2005) Hypoxia-inducible factor as a physiological regulator. *Exp Physiol* 90: 791-797.
73. Dengler VL, Galbraith MD, Espinosa JM (2014) Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 49: 1-15.
74. Semenza GL (2014) Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol* 9: 47-71.
75. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, et al. (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271: 32529-32537.
76. Ortiz-Barahona A, Villar D, Pescador N, Amigo J, del Peso L (2010) Genome-wide identification of hypoxia-inducible factor binding sites and target genes by a

probabilistic model integrating transcription-profiling data and in silico binding site prediction. *Nucleic Acids Res* 38: 2332-2345.

77. Srinivas V, Zhang LP, Zhu XH, Caro J (1999) Characterization of an oxygen/redox-dependent degradation domain of hypoxia-inducible factor alpha (HIF-alpha) proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 260: 557-561.

78. Swanson HI, Chan WK, Bradfield CA (1995) DNA binding specificities and pairing rules of the Ah receptor, ARNT, and SIM proteins. *J Biol Chem* 270: 26292-26302.

79. Lee KY, Gesta S, Boucher J, Wang XL, Kahn CR (2011) The differential role of Hif1beta/Arnt and the hypoxic response in adipose function, fibrosis, and inflammation. *Cell Metab* 14: 491-503.

80. Zhang X, Wang M, Tan G, Wang Q, Zhao H, et al. (2010) Molecular selection and functional divergence of HIF-alpha proteins in vertebrates. *Genetica* 138: 1241-1250.

81. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, et al. (2004) Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. *J Biol Chem* 279: 38458-38465.

82. Huang J, Zhao Q, Mooney SM, Lee FS (2002) Sequence determinants in hypoxia-inducible factor-1alpha for hydroxylation by the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3. *J Biol Chem* 277: 39792-39800.

83. Liang K, Ding XQ, Lin C, Kang YJ (2015) Hypoxia-inducible factor-1alpha dependent nuclear entry of factor inhibiting HIF-1. *Exp Biol Med* (Maywood).

84. Kiriakidis S, Henze AT, Kruszynska-Ziaja I, Skobridis K, Theodorou V, et al. (2015) Factor-inhibiting HIF-1 (FIH-1) is required for human vascular endothelial cell survival. *FASEB J*.

85. Wiesener MS, Turley H, Allen WE, Willam C, Eckardt KU, et al. (1998) Induction of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia: characterization and comparison with hypoxia-inducible factor-1alpha. *Blood* 92: 2260-2268.

86. Li QF, Wang XR, Yang YW, Lin H (2000) Hypoxia upregulates hypoxia inducible factor (HIF)-3[alpha] expression in lung epithelial cells: characterization and comparison with HIF-1[alpha]. *Cell Res* 16: 548-558.

87. Pugh CW, Ratcliffe PJ (2003) Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nat Med* 9: 677-684.

88. Bordji K, Grandval A, Cuhna-Alves L, Lechapt-Zalcman E, Bernaudin M (2014) Hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha), but not HIF-1alpha, is essential for hypoxic induction of class III beta-tubulin expression in human glioblastoma cells. *FEBS J* 281: 5220-5236.

89. Yang SL, Wu C, Xiong ZF, Fang X (2015) Progress on hypoxia-inducible factor-3: Its structure, gene regulation and biological function (Review). *Mol Med Rep* 12: 2411-2416.

90. Nallamshetty S, Chan SY, Loscalzo J (2013) Hypoxia: a master regulator of microRNA biogenesis and activity. *Free Radic Biol Med* 64: 20-30.

91. Madaneci P, Kapoor N, Bebok Z, Ochocka R, Collawn JF, et al. (2013) Regulation of angiogenesis by hypoxia: the role of microRNA. *Cell Mol Biol Lett* 18: 47-57.

92. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, et al. (2007) A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol* 27: 1859-1867.
93. Greco S, Gaetano C, Martelli F (2014) HypoxamiR regulation and function in ischemic cardiovascular diseases. *Antioxid Redox Signal* 21: 1202-1219.
94. Bartoszewska S, Kochan K, Piotrowski A, Kamysz W, Ochocka RJ, et al. (2015) The hypoxia-inducible miR-429 regulates hypoxia-inducible factor-1alpha expression in human endothelial cells through a negative feedback loop. *FASEB J* 29: 1467-1479.
95. Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, et al. (2009) Hypoxia-inducible mir-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Mol Cell* 35: 856-867.
96. Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, Fitzpatrick SF, Cheong A, et al. (2011) MicroRNA-155 promotes resolution of hypoxia-inducible factor 1alpha activity during prolonged hypoxia. *Mol Cell Biol* 31: 4087-4096.
97. Hotamisligil GS (2010) Endoplasmic Reticulum Stress and the Inflammatory Basis of Metabolic Disease. *Cell* 140: 900-917.
98. Rasheva VI, Domingos PM (2009) Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Apoptosis* 14: 996-1007.
99. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-529.
100. Vannuvel K, Renard P, Raes M, Arnould T (2013) Functional and morphological impact of ER stress on mitochondria. *J Cell Physiol* 228: 1802-1818.
101. Senft D, Ronai ZA (2015) UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci* 40: 141-148.
102. Ron D, Walter P (2007) Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 519-529.
103. Schroder M, Kaufman RJ (2005) ER stress and the unfolded protein response. *Mutat Res* 569: 29-63.
104. Hetz C (2013) The biological meaning of the UPR. *Nat Rev Mol Cell Biol* 14: 404.
105. Carrara M, Prischi F, Ali MM (2013) UPR Signal Activation by Luminal Sensor Domains. *Int J Mol Sci* 14: 6454-6466.
106. Merksamer PI, Papa FR (2010) The UPR and cell fate at a glance. *J Cell Sci* 123: 1003-1006.
107. Rutkowski DT, Arnold SM, Miller CN, Wu J, Li J, et al. (2006) Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol* 4: e374.
108. Rutkowski DT, Kaufman RJ (2004) A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 14: 20-28.
109. Bartoszewska S, Kochan K, Madanecki P, Piotrowski A, Ochocka R, et al. (2013) Regulation of the unfolded protein response by microRNAs. *Cell Mol Biol Lett* 18: 555-578.
110. Byrd AE, Brewer JW (2013) Micro(RNA)managing endoplasmic reticulum stress. *IUBMB Life* 65: 373-381.
111. Maurel M, Chevet E (2013) Endoplasmic reticulum stress signaling: the microRNA connection. *Am J Physiol Cell Physiol* 304: C1117-1126.

112. Bartoszevska S, Kochan K, Madanecki P, Piotrowski A, Ochocka R, et al. (2013) Regulation of the unfolded protein response by microRNAs. *Cell Mol Biol Lett*.
113. Bartoszewski R, Brewer JW, Rab A, Crossman DK, Bartoszevska S, et al. (2011) The unfolded protein response (UPR)-activated transcription factor X-box-binding protein 1 (XBP1) induces microRNA-346 expression that targets the human antigen peptide transporter 1 (TAP1) mRNA and governs immune regulatory genes. *J Biol Chem* 286: 41862-41870.
114. Byrd AE, Aragon IV, Brewer JW (2012) MicroRNA-30c-2* limits expression of proadaptive factor XBP1 in the unfolded protein response. *J Cell Biol* 196: 689-698.
115. Chan YC, Khanna S, Roy S, Sen CK (2011) miR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells. *J Biol Chem* 286: 2047-2056.
116. Piret JP, Mottet D, Raes M, Michiels C (2002) CoCl₂, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1, and hypoxia reduce apoptotic cell death in hepatoma cell line HepG2. *Ann N Y Acad Sci* 973: 443-447.
117. Guo M, Song LP, Jiang Y, Liu W, Yu Y, et al. (2006) Hypoxia-mimetic agents desferrioxamine and cobalt chloride induce leukemic cell apoptosis through different hypoxia-inducible factor-1 α independent mechanisms. *Apoptosis* 11: 67-77.
118. Forsythe JA, Jiang BH, Iyer NV, Agani F, Leung SW, et al. (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell Biol* 16: 4604-4613.
119. Behrman S, Acosta-Alvear D, Walter P (2011) A CHOP-regulated microRNA controls rhodopsin expression. *J Cell Biol* 192: 919-927.
120. Kang JK, Yoon SJ, Kim NK, Heo DS (2000) The expression of MHC class I, TAP1/2, and LMP2/7 gene in human gastric cancer cell lines. *Int J Oncol* 16: 1159-1163.
121. Granados DP, Tanguay PL, Hardy MP, Caron E, de Verteuil D, et al. (2009) ER stress affects processing of MHC class I-associated peptides. *BMC Immunol* 10: 10.
122. Tardif KD, Siddiqui A (2003) Cell surface expression of major histocompatibility complex class I molecules is reduced in hepatitis C virus subgenomic replicon-expressing cells. *J Virol* 77: 11644-11650.
123. Ulianich L, Terrazzano G, Annunziatella M, Ruggiero G, Beguinot F, et al. (2011) ER stress impairs MHC Class I surface expression and increases susceptibility of thyroid cells to NK-mediated cytotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 1812: 431-438.

5. STRESZCZENIE

Za mikro-RNA uznaje się jednoniciowe, krótkie (o średniej długości 22 nukleotydów), niekodujące RNA, mogące potranskrypcyjnie regulować ekspresję genów. Efektem wiązania miRNA do 3'UTR mRNA jest redukcja ilości białka, co często jest odzwierciedlone w obniżonej ilości danego transkryptu. miRNA obniżając ekspresję białek, translatowanych z już obecnych w komórce transkryptów, stwarzają możliwość szybkiej i specyficznej redukcji ilości tych białek. Sekwencje docelowe dla miRNA zlokalizowano już w większości ssaczych mRNA. Poprzez wpływ na ilość i czas trwania poszczególnych protein te krótkie RNA regulują większość witalnych procesów komórkowych, poczynając od podziałów komórkowych, poprzez różnicowanie i starzenie się komórek, przebieg ich metabolizmu, a kończąc na apoptozie.

Stres metaboliczny można zdefiniować jako zaburzenie równowagi między organizmem a jego otoczeniem, które ma znaczące konsekwencje dla metabolizmu, zarówno na poziomie całego organizmu, jak i jego komórek. Najczęstsze przyczyny stresu metabolicznego to przewlekłe infekcje i chroniczne stany zapalne, nowotwory, zaburzenie gospodarki hormonalnej, ischemia i związany z nią deficyt tlenowy, zranienia, stres pooperacyjny i pourazowy czy też inne patologie wpływające na przebieg procesów metabolicznych. Przywrócenie równowagi metabolicznej na poziomie komórkowym, kluczowe dla przetrwania organizmu, jest realizowane poprzez aktywację mechanizmów komórkowej odpowiedzi na stres. Podstawowym zadaniem tych szlaków przekazywania sygnału jest modyfikacja procesów komórkowych mająca na celu odpowiednio adaptację do niekorzystnych warunków i odtworzenie homeostazy metabolicznej. Jeśli równowaga metaboliczna komórek nie zostanie przywrócona, to te same szlaki sygnałowe zainicjują śmierć komórek. Zależnie od czynnika stresogennego lub kombinacji tych czynników zostają upośledzone wybrane aspekty metabolizmu komórek, co aktywuje specyficzne dla tych zaburzeń szlaki odpowiedzi komórkowej.

Celem pracy był zbadanie roli miRNA w mechanizmach komórkowej odpowiedzi na wybrane czynniki stresu metabolicznego. Prowadzone badania dotyczyły znaczenia mikro-RNA dla komórkowej adaptacji do hipoksji oraz stresu retikulum endoplazmatycznego.

Obniżenie zawartości tlenu w tkankach skutkujące zaburzeniem przebiegu procesów komórkowych określa się terminem hipoksji. Hipoksja aktywuje komórkowe szlaki przekazywania sygnału, których zadaniami są adaptacja metabolizmu komórek do obniżonej podaży tlenu i przywrócenie homeostazy tlenowej. Długotrwała niemożność przywrócenia metabolizmu tlenowego doprowadzi jednak do kierowanej przez te szlaki śmierci komórek.

Czynniki stresu metabolicznego, często prowadzą do zakłócenia funkcji retikulum endoplazmatycznego (ER). ER kontroluje więc metabolizm komórek, modulując zależnie od ich potrzeb syntezę białek i lipidów. Jednocześnie lokalizowane w ER szlaki przekazywania sygnału regulują przebieg procesów metabolicznych zarówno na poziomie komórkowym, jak i całego organizmu. Niemożność dostosowania przebiegu procesów zachodzących w ER do potrzeb organizmu lub ich upośledzenie określa się terminem stresu ER. W celu przywrócenia homeostazy ER jest aktywowany adaptacyjny mechanizm odpowiedzi na niezwinięte białka, mechanizm ten również indukuje apoptozę komórek, gdy stan równowagi w ER nie może zostać przywrócony.

Trudno przecenić znaczenie społeczne określenia nowych celów terapii dla schorzeń związanych z upośledzeniem komórkowej odpowiedzi na stres. Mając jednak na uwadze, że komórkowa odpowiedź na stres jest konsekwencją wzajemnej regulacji wielu aspektów metabolizmu komórki i ma konsekwencje dla całego organizmu, konieczne jest określenie kluczowych elementów warunkujących adaptację do warunków stresu. Pojedyncze miRNA może teoretycznie wiązać wiele różnych mRNA, zmieniając w konsekwencji ilość wielu białek i modyfikując wiele aspektów życia komórki. Aby wykorzystać te krótkie niekodujące RNA w terapii schorzeń, należy więc poznać ich mechanizm działania w kontekście właściwych procesów komórkowych. Dotychczasowe badania jednak koncentrują się często jedynie na obserwacji związanych ze schorzeniami zmian w ilości miRNA, bez określenia przyczyn i konsekwencji tych aberracji. Częściki *target protector*, które specyficznie eliminują oddziaływanie miRNA-mRNA, umożliwiają modulację wpływu miRNA na przebieg procesów komórkowych. Potencjalne wykorzystanie cząsteczek *target protector* w terapii ludzkich schorzeń wymaga jednak określenia nie tylko związanych z nimi miRNA, lecz także ich docelowych specyficznym mRNA.

W omawianej pracy **A**, w komórkach pierwotnych ludzkiego śródbłonka zidentyfikowano pętlę negatywnego sprzężenia zwrotnego między HIF-1 a miR-429. Rolą tej, opartej na miR-429, pętli jest przekazanie kontroli nad odpowiedzią na hipoksję od czynnika HIF-1 do czynnika HIF-2 i tym samym adaptację komórek endotelium do długotrwałych warunków niedotlenienia. W omawianej pracy **B**, zbadano oparty o wywołaną przez XBP1 indukcję miR-346, mechanizm kontroli importu peptydów do ER podczas UPR. Wywołany przez XBP1 wzrost ilości miR-346 ogranicza napływ peptydów do ER w celu przywrócenia homeostazy tego organelum. Natomiast, w omawianej pracy **C**, postawiono hipotezę, że podczas UPR miRNA pełnią funkcje czynników adaptacyjnych, proapoptotycznych oraz decyzyjnych dla przejścia od adaptacji do apoptozy. W tejże pracy, wykorzystując dostępne narzędzia bioinformatyczne, zaproponowano nieopisane dotychczas miRNA, mogące mieć wpływ na ten szlak komórkowy.

Zależna od mikro-RNA potranskrypcyjna regulacja dotyczy większości ludzkich

genów ulegających translacji, a wyniki badań omówione w niniejszej rozprawie podkreśliły znaczenie miRNA dla regulacji przebiegu ludzkiej komórkowej odpowiedzi na stres metaboliczny. Oba omawiane miRNA modulują bowiem odpowiednio przebieg odpowiedzi na hipoksję i niezwinięte białka w celu przywrócenia homeostazy komórkowej. Co więcej – regulacja ekspresji badanych przez nas miRNA przez kluczowe czynniki transkrypcyjne oraz opisany przez nas mechanizm negatywnego sprzężenia zwrotnego wskazują, że przebieg szlaków odpowiedzi komórkowej jest konsekwencją istnienia molekularnej sieci wzajemnych oddziaływań integrujących regulację transkrypcyjną i potranskrypcyjną.

Najważniejsze wnioski wynikające z przeprowadzonych badań wchodzących w skład rozprawy:

A. Zidentyfikowano w komórkach pierwotnych ludzkiego śródbłonka pętlę negatywnego sprzężenia zwrotnego między HIF-1 a miR-429. miR-429 indukowany w odpowiedzi na akumulację HIF-1 umożliwia hamowanie aktywności transkrypcyjnej tego czynnika podczas długotrwałego niedotlenienia. miR-429 umożliwia więc przekazanie kontroli nad odpowiedzią na hipoksję od czynnika HIF-1 do czynnika HIF-2 i tym samym adaptację komórek endotelium do długotrwałych warunków niedotlenienia.

B. Wykazano, że czynnik XBP1 odpowiada za indukcję miR-346 podczas UPR. Wywołany przez XBP1 wzrost ilości miR-346 ogranicza napływ peptydów do ER w celu przywrócenia homeostazy tego organelum.

C. Zaproponowano, że podczas UPR miRNA pełnią funkcje czynników adaptacyjnych, proapoptotycznych oraz decyzyjnych dla przejścia od adaptacji do apoptozy. Ponadto, wykorzystując dostępne narzędzia bioinformatyczne, wskazano nieopisane dotychczas miRNA, mogące mieć wpływ na ten szlak komórkowy.

6. ABSTRACT

The discussed works aimed to research microRNAs role in molecular mechanisms of cellular stress responses. Herein, we focused our research on adaptive response to hypoxia, as well as an adaptive arm of unfolded protein response.

In manuscript A, in primary HUVECs we identified miR-429, that destabilized HIF1A message and decreased VEGFA mRNA by inhibiting HIF1A. The results demonstrate that HIF-1 is in a negative regulatory loop with miR-429, that miR-429 attenuates HIF-1 activity by decreasing HIF1A message during the early stages of hypoxia before HIF-2 is activated, and this regulatory network helps explain the HIF-1 transition to HIF-2 during chronic hypoxia in endothelial cells.

In manuscript B, in Calu3 cells we identified miR-346 as the most significantly induced miRNA by both classic ER stressors. We demonstrated that the spliced X-box-binding protein-1 is sufficient for ER stress-associated miR-346 induction, revealing a novel role for this unfolded protein response-activated transcription factor. We demonstrate that the human TAP1 mRNA is a direct target of miR-346. Because TAP function is necessary for proper MHC class I-associated antigen presentation, our results provide a novel mechanistic explanation for reduced MHC class I-associated antigen presentation that was observed during ER stress.

In manuscript C, we discuss the potential role of miRNAs as key regulators of this pathway and describe how miRNAs may play an essential role in turning off the UPR after the stress has subsided. Furthermore, using bioinformatics tools, we identified a number of miRNAs that are predicted to decrease the mRNA expression levels for a number of critical components of the UPR.

The results of our work highlights the importance of miRNAs as crucial regulators of cellular stress responses.

The abstracts of discussed manuscripts:

A. *Hypoxia-inducible factors (HIFs) 1 and 2 are dimeric a/b transcription factors that regulate cellular responses to low oxygen. HIF-1 is induced first, whereas HIF-2 is associated with chronic hypoxia. To determine how HIF1A mRNA, the inducible subunit of HIF-1, is regulated during hypoxia, we followed HIF1A mRNA levels in primary HUVECs over 24 hours using quantitative PCR. HIF1A and VEGF A (VEGFA) mRNA, a transcriptional target of HIF-1, increased ~2.5- and 8-fold at 2–4 hours, respectively. To determine how the*

mRNAs were regulated, we identified a microRNA (miRNA), miR-429, that destabilized HIF1A message and decreased VEGFA mRNA by inhibiting HIF1A. Target protector analysis, which interferes with miRNA-mRNA complex formation, confirmed that miR-429 targeted HIF1A message. Desferoxamine treatment, which inhibits the hydroxylases that promote HIF-1 α protein degradation, stabilized HIF-1 activity during normoxic conditions and elevated miR-429 levels, demonstrating that HIF-1 promotes miR-429 expression. RNA-sequencing-based transcriptome analysis indicated that inhibition of miRNA-429 in HUVECs upregulated 209 mRNAs, a number of which regulate angiogenesis. The results demonstrate that HIF-1 is in a negative regulatory loop with miR-429, that miR-429 attenuates HIF-1 activity by decreasing HIF1A message during the early stages of hypoxia before HIF-2 is activated, and this regulatory network helps explain the HIF-1 transition to HIF-2 during chronic hypoxia in endothelial cells.

B. *To identify endoplasmic reticulum (ER) stress-induced microRNAs (miRNA) that govern ER protein influx during the adaptive phase of unfolded protein response, we performed miRNA microarray profiling and analysis in human airway epithelial cells following ER stress induction using proteasome inhibition or tunicamycin treatment. We identified miR-346 as the most significantly induced miRNA by both classic stressors. miR-346 is encoded within an intron of the glutamate receptor ionotropic delta-1 gene (GRID1), but its ER stress-associated expression is independent of GRID1. We demonstrated that the spliced X-box-binding protein-1 (sXBP1) is necessary and sufficient for ER stress-associated miR-346 induction, revealing a novel role for this unfolded protein response-activated transcription factor. In mRNA profiling arrays, we identified 21 mRNAs that were reduced by both ER stress and miR-346. The target genes of miR-346 regulate immune responses and include the major histocompatibility complex (MHC) class I gene products, interferon-induced genes, and the ER antigen peptide transporter 1 (TAP1). Although most of the repressed mRNAs appear to be indirect targets because they lack specific seeding sites for miR-346, we demonstrate that the human TAP1 mRNA is a direct target of miR-346. The human TAP1 mRNA 3'-UTR contains a 6-mer canonical seeding site for miR-346. Importantly, the ER stress-associated reduction in human TAP1 mRNA and protein levels could be reversed with an miR-346 antagomir. Because TAP function is necessary for proper MHC class I-associated antigen presentation, our results provide a novel mechanistic explanation for reduced MHC class I-associated antigen presentation that was observed during ER stress.*

C. *The unfolded protein response (UPR) is an adaptive response to the stress that is caused by an accumulation of misfolded proteins in the lumen of the en-*

Endoplasmic reticulum (ER). It is an important component of cellular homeostasis. During ER stress, the UPR increases the protein-folding capacity of the endoplasmic reticulum to relieve the stress. Failure to recover leads to apoptosis. Specific cellular mechanisms are required for the cellular recovery phase after UPR activation. Using bioinformatics tools, we identified a number of microRNAs that are predicted to decrease the mRNA expression levels for a number of critical components of the UPR. In this review, we discuss the potential role of microRNAs as key regulators of this pathway and describe how microRNAs may play an essential role in turning off the UPR after the stress has subsided.

PODZIĘKOWANIA

Pragnę podziękować wszystkim, bez których niniejsza praca nie mogłaby powstać.

Przede wszystkim mojemu promotorowi profesorowi Leszkowi Kalinowskiemu za opiekę merytoryczną i okazane wsparcie. Szczególnie dziękuję za szereg odbytych dyskusji naukowych, które stanowiły inspirację do stworzenia tej pracy.

Składam również serdeczne podziękować moim opiekunom z Univeristy of Alabama at Birmingham, Profesorowi Collawn oraz profesor Bebok, za możliwość realizacji badań i wiele cennych uwag.

Pragnę podziękować również Profesor Renacie Ochockiej oraz profesorowi Wojciechowi Kamyszowi za okazaną pomoc, panu Tadeuszowi Skowyrze za pomoc w opracowaniu redakcyjnym niniejszej rozprawy, oraz kolegom i koleżankom z pracy za stworzenie wspaniałej atmosfery naukowej.

Gdańsk, 2015 rok

Sylwia Bartoszevska