

**Function and regulation of pericentromeric satellite RNAs  
and their role in therapy resistance**

**Inaugural-Dissertation**

to obtain the academic degree  
*Doctor rerum naturalium*

*(Dr. rer. nat.)*

submitted to the Faculty of Mathematics and Natural Sciences  
University of Cologne

by

**Julian Kanne**

from Bonn



**2020**

## Zusammenfassung

Die technischen Fortschritte im Bereich der Hochdurchsatzsequenzierung und der assoziierten bioinformatischen Auswertungsprozesse haben der biologisch-medizinischen Forschung über die vergangenen zwei Jahrzehnte einen massiven Schub gegeben. Dieser Fortschritt führte nicht nur zu einer weitreichenden Charakterisierung von proteinkodierenden Genen, sondern auch zu tieferen Einblicken in genomische, nicht proteinkodierenden Regionen. Es zeigte sich, dass diese als Heterochromatin organisierten genomischen Regionen nicht, wie ursprünglich angenommen, transkriptionell inaktiv sind, sondern in verschiedenen physiologischen Situationen, wie in Entwicklungsprozessen oder bei Stressreaktionen, abgelesen werden. Eine fehlerhafte Regulation kann auch hier zur Entstehung von Krankheiten, wie zum Beispiel Krebs führen.

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht eine spezifische nicht-kodierende RNA, die Satelliten RNA III (SatIII), welche ausgehend von pericentromerischen Satelliten-Repeats abgelesen wird. SatIII RNA ist an stress-abhängigen Spleißprozessen sowie an der Aufrechterhaltung genomischer Stabilität beteiligt, wobei die molekulare, epigenetische Regulation weitestgehend unbekannt ist. Anhand eines epigenetischen Wirkstoffscreens sowie funktioneller Experimente sollte ein Verständnis der epigenetischen Regulationsmechanismen und der daraus resultierenden fehlerhaften Mechanismen im Kontext neoplastischer Erkrankungen untersucht werden.

Im Speziellen konnte ich zeigen, dass SatIII in Resistenzmechanismen gegen den Topoisomerase IIA (TOP2A) Inhibitor Etoposid bei Lungenkrebs involviert ist. Hierbei rekrutiert eine als Reaktion auf Stressreaktionen erhöhte SatIII RNA TOP2A zu spezifischen genomischen Loci, den nukleären Stresskörperchen. Dies führt dazu, dass TOP2A einerseits vor der Interaktion mit Etoposid geschützt wird und andererseits von anderen genomischen Bereichen abgezogen wird. Daraus folgt, dass in diesen Bereichen insgesamt weniger DNA-Doppelstrangbrüche erfolgen, was sich in einer reduzierten apoptotischen Aktivität niederschlägt. Hinzu kommt, dass die SatIII RNA, abhängig von ihrem Expressionsniveau, die Replikation und die Progression des Zellzyklus beeinflusst.

Vorhergehende Experimente hatten gezeigt, dass das Bromodomänenprotein BRD4 die Expression von SatIII steuert. Entsprechend konnte ich zeigen, dass eine Kombinationstherapie aus Etoposid und BRD4-Inhibitoren die Sensitivität gegenüber Etoposid wiederherstellt und die TOP2A Rekrutierung zu spezifischen Foci beeinflusst wird.

Um weitere Möglichkeiten einer Kombinationstherapie zu finden sowie um die epigenetische Regulation an dem SatIII Locus besser zu verstehen, führte ich einen Wirkstoff-Screen zur Expression von SatIII und der Rekrutierung zu nukleären Stresskörperchen durch.

Hierbei konnte ich diverse weitere SatIII Regulatoren identifizieren, wie z.B. Histon-Deacetylasen (HDACs) und Aurora Kinasen.

Zusammenfassend konnte ein Einfluss der nichtkodierenden SatIII RNA auf die Etoposid-Sensitivität identifiziert und dies mechanistisch auf eine modifizierten TOP2A Rekrutierung zurückgeführt werden. Weiterführende Arbeiten mit einer großen Anzahl an epigenetisch wirkenden Substanzen ermöglichte es mir epigenetische Netzwerke aufzudecken, die in die transkriptionelle Regulierung sowie zelluläre Lokalisation von SatIII involviert sind. Diese können potenziell für die Entwicklung von geeigneten Kombinationstherapien zur Überwindung einer Etoposid-Therapie und damit für eine bessere Behandlung von Tumorpatienten genutzt werden.

## Summary

The technological progress made in high-throughput sequencing and bioinformatic processing technologies have fundamentally boosted biological and medical research over the past two decades. These advancements have not only allowed the characterization of protein-coding genes, but have also promoted deeper analysis of non-protein-coding (NPC) regions of the genome which resulted in the finding that heterochromatic genomic regions are not generally transcriptionally silent but play diverse roles in development and disease.

Among them, non-coding RNA transcribed from pericentromeric satellite repeats (SatIII) is involved in stress-dependent splicing processes and maintenance of genome stability. However, the epigenetic regulation of these repeats and its exact functions remain largely unclear.

The aim of this work was to gain a better understanding of the epigenetic regulation mechanisms involved in SatIII expression and shed light into further functional roles of SatIII in neoplastic diseases. Within this work, I showed that SatIII RNA is involved in chemoresistance mechanisms against the topoisomerase IIa (TOP2A) inhibitor etoposide in lung cancer. Furthermore, I demonstrated that the epigenetic modification of the *SatIII* DNA locus and the resulting SatIII expression predict chemotherapy resistance. In response to stress, SatIII recruits TOP2A to nuclear stress bodies, which protects TOP2A from complex formation with etoposide and a change in cellular localization of TOP2A. This change in the cellular distribution results in a decreased rate of DNA double strand breaks and a reduced apoptotic activity after treatment. In addition, SatIII expression levels affect replication fidelity and cell cycle progression. Within previous studies we had shown that the bromodomain protein BRD4 regulates SatIII expression. I was able to extend this data and found that a combination of etoposide and BRD4 inhibitors restored etoposide sensitivity and led to a change in the cellular distribution of TOP2A.

To identify additional compounds that might be used in combination therapies I performed a medium-scale epigenetic compound screen. I was able to reveal various regulators of SatIII, including BET proteins, Histone deacetylases (HDACs) and Aurora kinases.

Taken together, this work revealed a novel role for the noncoding SatIII RNA in chemotherapy resistance. Mechanistically, I showed that this was due to a change in the cellular distribution of TOP2A. Further work with epigenetic compounds uncovered epigenetic regulatory mechanisms of SatIII RNA expression and cellular localization. These compounds might provide valuable combination therapies to overcome etoposide therapy resistance and thus might potentially be useful for an improved treatment of cancer patients.