

Mechanistic Role of miR-71 in Stress Adaptation, Proteostasis and Longevity

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln



vorgelegt von

Andriana Ntogka

geboren am 21.05.1993 in Kalamata, GR

angenommen im Jahr 2025

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) are essential post-transcriptional regulators involved in stress adaptation, proteostasis, and aging. While the mechanisms of miRNA targeting are well characterized, their regulation under proteotoxic stress remains poorly understood. In this thesis, I investigated how stress-induced changes in miR-71 stability and target engagement influence organismal survival in the model nematode *Caenorhabditis elegans*.

Using a newly developed dual fluorescent reporter, I showed that chronic heat stress alters miR-71 targeting activity and miRNA strand dynamics. Specifically, the mature strand miR-71-5p exhibits a more than fourfold increase in half-life, while the passenger strand miR-71-3p is destabilized, leading to a shift in strand ratios under stress. Despite increased duplex loading into ALG-1 during stress, miRISC-associated miR-71-5p levels remain unchanged, suggesting that stabilization is driven by heat-induced mRNA target engagement. Proteomic analysis identified 77 heat-induced targets of miR-71-5p, many of which are muscle-enriched transcripts. Functional analyses revealed that miR-71-5p stabilization promotes stress survival by reducing motility and enhancing proteostasis. In contrast, *mir-71(n4115)* mutants exhibit elevated motility, increased protein aggregation, stress sensitivity, and muscle reorganization. Downregulation of individual heat-induced miR-71 targets, such as troponin T (*tnt-2*), suppressed key mutant phenotypes, while muscle-specific re-expression of miR-71 fully rescued both motility and survival defects. Moreover, intestine-specific expression of miR-71 rescued heat stress resistance and proteostasis, while re-expression in AFD or AWC thermosensory neurons rescued the shortened lifespan phenotype. These results define a heat stress-induced rewiring of miRNA–target interactions and establish miR-71 as a dynamic regulator of systemic proteostasis and longevity.

Collectively, this work provides mechanistic insight into how miRNA stability and targeting specificity adapt under chronic stress. It highlights miR-71 as both a sensor and effector of environmental stress, offering a framework for understanding small RNA-mediated regulation of resilience and aging, with potential implications for stress adaptation pathways linked to cancer and aging.

Zusammenfassung

MicroRNAs (miRNAs) sind essenzielle posttranskriptionelle Regulatoren, die an Stressanpassung, Proteostase und Alterung beteiligt sind. Während die Mechanismen des miRNA-Targeting gut charakterisiert sind, ist ihre Regulierung unter proteotoxischem Stress noch wenig verstanden. In dieser Arbeit untersuchte ich, wie stressinduzierte Veränderungen der Stabilität von miR-71 und dessen Bindung an Ziel-mRNAs das Überleben des Modellorganismus *Caenorhabditis elegans* beeinflussen.

Mithilfe eines neu entwickelten dualen Fluoreszenzreporters konnte ich zeigen, dass chronischer Hitzestress die miR-71-Targeting-Aktivität und die miRNA-Strangdynamik verändert. Insbesondere weist der reife Strang miR-71-5p eine mehr als vierfache Verlängerung der Halbwertszeit auf, während der Passagierstrang miR-71-3p destabilisiert wird, was zu einer Verschiebung der Strangverhältnisse unter Stress führt. Trotz erhöhter Duplex-Beladung in ALG-1 unter Stress bleiben die miRISC-assoziierten miR-71-5p-Spiegel unverändert, was darauf hindeutet, dass die Stabilisierung durch hitzeinduzierte Ziel-mRNA-Bindung erfolgt. Die Proteomanalyse identifizierte 77 hitzeinduzierte Zielmoleküle von miR-71-5p, von denen viele muskelassoziierte Transkripte sind. Funktionelle Analysen ergaben, dass die miR-71-5p-Stabilisierung das Überleben bei Stress fördert, indem sie die Motilität reduziert und die Proteostase verbessert. Im Gegensatz dazu weisen *mir-71(n4115)*-Mutanten eine erhöhte Motilität, erhöhte Proteinaggregation, Stressempfindlichkeit und Muskelreorganisation auf. Die Herunterregulierung einzelner hitzeinduzierter miR-71-Zielmoleküle, wie Troponin T (*tnt-2*), unterdrückte zentrale Phänotypen der Mutanten, während die muskelspezifische Reexpression von miR-71 sowohl Motilitäts- als auch Überlebensdefekte vollständig rettete. Darüber hinaus stellte die darmspezifische Expression von miR-71 die Resistenz gegen Hitzestress und die Proteostase wieder her, während die Reexpression in den thermosensorischen AFD- oder AWC-Neuronen den Phänotyp der verkürzten Lebensspanne wiederherstellte. Diese Ergebnisse definieren eine durch Hitzestress induzierte Neuverdrahtung von miRNA-Ziel-Interaktionen und etablieren miR-71 als einen dynamischen Regulator der systemischen Proteostase und Langlebigkeit.

Insgesamt liefert diese Arbeit mechanistische Erkenntnisse darüber, wie sich die miRNA-Stabilität und die Targeting-Spezifität unter chronischem Stress anpassen. Sie hebt miR-71 sowohl als Sensor als auch als Effektor von Umweltstress hervor und

bietet einen Rahmen für das Verständnis der durch kleine RNA vermittelten Regulierung von Stressresilienz und Alterung, mit potenziellen Auswirkungen auf Stressadaptation im Zusammenhang mit Krebs und Alterung.