Wydział Farmaceutyczny

GDAŃSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

Adrianna Moszyńska

Rola mikro-RNA w przebiegu odpowiedzi na hipoksję zależnej od czynników indukowanych hipoksją (HIF)

Promotor: prof. dr hab. Rafał Bartoszewski

Praca doktorska wykonana w Katedrze i Zakładzie Biologii i Botaniki Farmaceutycznej

Gdańsk 2020

STRESZCZENIE

Podczas chronicznego niedotlenienia komórek śródbłonka szlaki sygnałowe odpowiedzi adaptacyjnej, które bazują na aktywności transkrypcyjnej czynników indukowanych hipoksją (ang. *hypoxia-inducible factor,* HIF), w odpowiedzi na niską podaż tlenu modulują transkryptom komórek śródbłonka wspierając angiogenezę, erytropoezę, adaptację metaboliczną, jak również ich migrację, wzrost, różnicowanie i przeżywalność. Natomiast cechami mikrośrodowiska nowotworu litego są następujące po sobie fale niedotlenienia i reoksygenacji, co również prowadzi do aktywacji białek HIF, które wspierają ekspresję czynników sprzyjających tworzeniu naczyń krwionośnych, utrudniając tym samym terapię. Mimo, że czynniki HIF będące centralnym regulatorem komórkowej odpowiedzi na hipoksję są kluczowym celem terapeutycznym zarówno dla schorzeń kardiowaskularnych, jak i nowotworowych, to możliwości kontroli ich aktywności w niedotlenionym śródbłonku są dotychczas ograniczone. Rezultaty badań tej rozprawy koncentrowały się więc na mechanizmach determinujących przebieg zależnych od HIF kaskad sygnałowych w ludzkim śródbłonku, ze szczególnym uwzględnieniem znaczenia krótkich niekodujących RNA, mikro-RNA (miRNA), które mogą potranskrypcyjnie modulować aktywność HIF. Na podstawie badań przeprowadzonych w 10-ciu różnych liniach pierwotnych komórek ludzkiego śródbłonka wykazałam, że podczas chronicznej hipoksji uniwersalnym mechanizmem adaptacji komórkowej jest przekazanie sygnału od HIF-1 do HIF-2, co wynika z różnic w stabilności mRNA tych czynników. Określiłam również znaczenie tego mechanizmu dla ekspresji genów zależnych od czynników HIF. Ponadto badałam wpływ cyklicznego niedotlenienia ludzkich komórek śródbłonka na aktywność HIF i całogenomowe profile ekspresji mikro-RNA. Badania te doprowadziły do opisania związanych z hipoksją cykliczną zmian w ekspresji hsa-miR-19a-5p o znaczeniu dla przebiegu angiogenezy. Mimo, że miRNA wyłaniają się jako potencjalny cel terapeutyczny dla ludzkich schorzeń, to jednym z kluczowych ograniczeń na drodze do ich implementacji klinicznej jest zmienność populacyjna, a w szczególności konsekwencje występowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (ang. *single nucleotide polymorphism*, SNP).

Słowa kluczowe: hipoksja, czynnik indukowany hipoksją, ludzkie komórki śródbłonka, mikro-RNA, polimorfizm pojedynczego nukleotydu.

ABSTRACT

In endothelial cells during chronic hypoxia, a cellular adaptive response activates hypoxia-inducible factors (HIFs) that respond to low tissue-oxygen levels and induce the expression of a number of genes that promote angiogenesis, erythropoiesis, energy metabolism, as well as cells' migration, growth, differentiation and survival. On the other hand, within the tumor microenvironment more common are subsequent waves of hypoxia and reoxygenation that also lead to the activation of HIFs, promoting vascularisation and metastasis, and thus making therapy more difficult. Although HIFs being the central regulators of cellular response to hypoxia, are key therapeutic targets for cardiovascular diseases and cancer, the possibilities of controlling their activity in hypoxic endothelium are still limited. Therefore, this thesis focused on mechanisms determining the course of HIF-dependent signaling cascades in the human endothelium with particular emphasis on the importance of short non-coding RNAs, micro-RNAs (miRNAs), that can post-transcriptionaly modulate HIFs activity.
In my work, based on the results obtained from 10 different primary human endothelial cell lines, I demonstrated that during chronic hypoxia the universal mechanism of cell adaptation is the switch from HIF-1 to HIF-2, which results from differences in the mRNA stabilities of these factors. Furthermore, I determined the importance of this mechanism on the expression of HIF-dependent genes. Additionally, I studied the effect of cyclic hypoxia on HIFs activity and whole-genome micro-RNA expression profiles in human endothelial cells. These studies identified the cyclic hypoxia-related changes in the hsa-miR-19a-5p levels and their role in angiogenesis. Although miRNAs emerge as potential therapeutic targets for human diseases, one of the key limitations to their clinical implementation is population variability, particularly the consequences of the presence of single nucleotide polymorphisms (SNPs).

Keywords: hypoxia, hypoxia-inducible factor, human endothelial cells, micro-RNA, single nucleotide polymorphism.