

Streszczenie:

Angiogeneza jest wieloetapowym procesem prowadzącym do utworzenia nowych naczyń krwionośnych. W warunkach fizjologicznych proces ten rozpoczyna się już w okresie płodowym ulegając stopniowemu ograniczeniu po narodzinach. Znacząca aktywacja angiogenezy obserwowana jest przede wszystkim w chorobach nowotworowych skutkujących powstaniem guzów litych. Umożliwia ona wzrost guza, dzięki rozwojowi jego systemu ukrwienia. O ile w przypadku terapii chorób nowotworowych pożądane jest hamowanie procesu angiogenezy, to w leczeniu chorób sercowo-naczyniowych, przebiegających z niedokrwieniem skutkującym niedotlenieniem tkanek, bardziej odpowiednie są działania dążące do wzrostu aktywności tego procesu. Najnowsze badania sugerują możliwość wykorzystania w tym celu cytokin proangiogennych. Opracowanie skutecznych terapii przeciw- i proangiogennych wymaga szczegółowej wiedzy na poziomie molekularnych mechanizmów regulujących ekspresję poszczególnych cząsteczek, biorących udział w procesie tworzenia nowych naczyń krwionośnych.

Niezmiernie istotne w procesie angiogenezy są dojrzałe komórki śródbłonka (ang. *Endothelial Cells* – EC), jak również progenitorowe komórki śródbłonka (ang. *Endothelial Progenitor Cells* – EPC). Komórki progenitorowe śródbłonka, należą do grupy multipotencjalnych komórek macierzystych. Powstają one w wyniku różnicowania się wcześniejszego progenitora zwanego hemangioblastem. Komórki te w odpowiedzi na sygnały pochodzące z niedokrwionych i niedotlenionych tkanek różnicują się do dojrzałych komórek śródbłonka. Ponadto komórki progenitorowe wykazują właściwości parakryne, wydzielając do otoczenia cytokiny proangiogenne, które dodatkowo stymulują proces angiogenezy.² Wzrost stężenia cytokin i czynników wzrostowych pobudza dojrzałe komórki śródbłonka do proliferacji i migracji, co stanowi pierwszy, konieczny etap w tworzeniu się struktur nowego naczynia.

Z uwagi na złożony charakter procesu angiogenezy, istotne jest poznanie wszelkich zależności pomiędzy czynnikami pro- i antyangiogennymi oraz mechanizmów jego regulacji. Za główny induktor angiogenezy uważa się cząsteczkę czynnika wzrostu śródbłonka naczyniowego (ang. *Vascular Endothelial Growth Factor* – VEGF). Czynniki te w wyniku niedotlenienia spowodowanego niewystarczającą perfuzją jest wydzielany do otaczających tkanek przez komórki mięśniowe (miocyty) budujące naczynia krwionośne. W efekcie stymulacji komórek śródbłonka przez cząsteczkę VEGFA uruchomiona zostaje kaskada

procesów oparta głównie na szlakach sygnałowych Dll4 i Notch. Ostatecznym etapem procesu angiogenezy jest wytworzenie nowego naczynia, które zwiększa stopień perfuzji otaczających tkanek.⁴ Obok VEGF w procesie tworzenia nowych naczyń krwionośnych istotną rolę pełni szereg innych cytokin proangiogennych m.in. białka z rodziny czynnika wzrostu fibroblastów – FGF, angiopoetyna 1 i 2, płytkopochodny czynnik wzrostu – PDGF (BB-homodimer), a także czynnik wzrostu hepatocytów – HGF.

Czynnik wzrostu hepatocytów (HGF) jest uważany za jedną z kluczowych cytokin proangiogennych, stymulujących komórki śródbłonna do proliferacji i migracji. Głównym czynnikiem aktywującym prekursorową formę HGF jest proteaza serynowa HGFA. Badania wskazują, że czynnik indukowany hipoksją HIF-1 α stymuluje ekspresję HGFA w komórkach raka trzustki PK8.⁶ Z drugiej strony dane literaturowe pokazują, że HGFA jest syntetyzowany przez komórki m.in. fibroblastów, śródbłonna i makrofagów.

Do chwili obecnej niewiele wiadomo o potencjalnym znaczeniu czynników epigenetycznych w regulacji szlaku sygnałowego HGF – c-Met. Dane literaturowe wskazują, że miR-181a-5p, miR-26a, miR-144, miR-1, miR-185, miR-130a, miR-449 bezpośrednio wpływają na ekspresję c-Met w warunkach normoksji (21% tlenu).⁸ Dotychczas brakowało natomiast danych na temat aktywności tych cząsteczek w warunkach hipoksji, jak również identyfikacji mikroRNA zaangażowanych bezpośrednio w regulację ekspresji HGF i HGFA.

Celem pracy było określenie wpływu hipoksji na regulację szlaku sygnałowego HGF-c-Met w dojrzałych i progenitorowych komórkach śródbłonna. W badaniach, szczególna uwaga została poświęcona regulacji ekspresji aktywatora HGF (HGFA) oraz identyfikacji cząsteczek mikroRNA, wpływających na przebieg szlaku HGF/c-Met w warunkach hipoksji. Otrzymane wyniki mogą posłużyć do opracowania metod sterowania procesem angiogenezy w warunkach *in-vitro* i oceny ich potencjalnego wykorzystania w terapiach chorób niedokrwienych i przeciwnowotworowych.

Jako model badawczy zostały użyte dojrzałe komórki śródbłonna – ludzkie komórki śródbłonna mikronaczyń skóry HSKMEC (ang. *Human Skin Microvascular Endothelial cells*) oraz ludzkie progenitorowe komórki śródbłonna HEPC-CB.2. Komórki były stymulowane CoCl₂, który w literaturze jest opisywany jako induktor syntezy HIF1 α . Kontrolę procesu każdorazowo stanowiły komórki hodowane w obecności 21% stężenia tlenu. Następnie wykonane zostały badania określające zmiany poziomu mRNA oraz białka dla genów *HGF*, *HGFA*, *c-Met*, *HIF-1 α* oraz *VEGFA* w czasie. Powyższe doświadczenia pozwoliły na scharakteryzowanie zmian poziomu HGF na poziomie mRNA oraz określenie mechanizmu

regulacji ekspresji przez warunki hipoksji oraz przy udziale HGFA. Przeprowadzone doświadczenia pozwoliły ponadto na porównanie mechanizmów regulujących ścieżkę sygnałową HGF – c-Met w komórkach śródbłonna w zależności od stopnia ich zróżnicowania. Informacje te dostarczyły istotnej wiedzy pomocnej w określeniu dominującej roli poszczególnych komórek w procesach tworzenia naczyń krwionośnych.

Druga część pracy, dotyczy badań przesiewowych, mających na celu identyfikację cząsteczek mikroRNA, których ekspresja ulega zmianie w komórkach śródbłonna w warunkach hipoksji chemicznej. Na podstawie zidentyfikowanej w ten sposób grupy mikroRNA oraz przeprowadzonej analizie bioinformatycznej wytypowano cząsteczki o potencjalnym znaczeniu w regulacji ścieżki sygnałowej HGFA – HGF – c-Met.

Abstract:

Angiogenesis is a multi-stage process leading to the creation of new blood vessels. In physiological conditions, this process starts during development of the foetus and gradually diminishes after birth. Significant activation of angiogenesis is mainly observed in neoplastic diseases resulting in the emergence of solid tumours. It enables tumour growth thanks to the development of new blood vessels. While in the case of neoplastic diseases therapy, it is desirable to inhibit the angiogenesis, in the treatment of cardiovascular diseases, more appropriate are actions seeking to increase the activity of this process. The latest data suggest the possibility of using proangiogenic cytokines for this purpose. Developing effective anti- and proangiogenic therapy requires detailed knowledge at the level of molecular mechanisms regulating the expression of individual molecules taking part in the process of creating new blood vessels.

Extremely important in the process of angiogenesis are mature endothelial cells (EC) as well as endothelial progenitor cells (EPC). Endothelial progenitor cells belong to a group of multipotent stem cells. They arise as a result of differentiation of earlier progenitor called Hemangioblast. These cells in response to signals from ischemic and hypoxied tissues differentiate to mature endothelial cells. In addition, progenitor cells show paracrine properties, emitting the pro-angiogenic cytokines to the microenvironment, which additionally stimulate the angiogenic process. Increase in the concentration of cytokines and growth factors stimulate mature endothelial cells to proliferate and migrate, which are the first, steps in the formation of new vessel structures.

Due to the complex nature of the angiogenesis, it is important to understand all relationships between pro- and anti-angiogenic agents and their regulation mechanisms. The main inducer of angiogenesis is a molecule of the vascular endothelial growth factor (VEGF) This protein is secreted to surrounding tissues by hypoxic muscle cells (Myocytes) that built blood vessels. As a result of stimulation of endothelial cells through the VEGF molecule, a cascade of processes is initiated mainly based on DLL4 and Notch signalling pathways. The final stage of the angiogenesis is to produce a new vessel that increases the degree of perfusion of the surrounding tissues. Together with VEGF the process of creating new blood vessels requires a number of other proangiogenic cytokines. Molecules like fibroblast growth factor, angiopoietin 1 and 2, a platelet growth factor - PDGF (BB-Homodimer) as well as a hepatocyte growth factor – HGF are needed.

Hepatocyte growth factor is considered one of the key pro-angiogenic cytokines, stimulating endothelial cells to proliferate and migrate. The main activating factor of the precursor form of HGF is the HGFA serine protease. Studies indicate that the HIF-1 α stimulates HGFA expression in PZ8.6 pancreas cell cells, on the other hand, literature data shows that HGFA is synthesized by various types of cells like fibroblasts, endothelial cells and macrophages.

Little is known about the possible influence of epigenetic factors in the regulation of the HGF - c-Met signalling pathway. Literature data indicates that mirR-181a-5p, mirR-26a, miR-144, mirR-1, mirR-185, mirR-130a and mirR-449 directly affect the expression of c-MET under normal concentration of oxygen (21%). So far, little information was available on the activity of these molecules under hypoxic conditions. Furthermore, only partial information was available on the microRNA molecules targeting HGF and HGFA genes that are known to play an important role in the regulation of the expression.

The aim of the study was to determine the impact of hypoxia on the regulation of the HGF – c-Met signalling pathway in mature and endothelial progenitor cells. A special attention was devoted to the regulation of HGFA expression and identification of microRNAs targeting HGF – c-Met pathway under hypoxia. Obtained results can be utilised to develop methods for controlling the process of angiogenesis in-vitro and assessing their potential use in the therapy of ischemic diseases and cancer.

As a research model, mature endothelial cells HSKMEC (Human Skin Microvascular Endothelial Cells) were used together with human endothelial progenitor cells HEPC-CB.1 and HEPC-CB.2. Cells were stimulated cobalt chloride – CoCl₂, which according to the literature is described as the HIF-1 α synthesis inductor. For the control of the research cells cultured in the presence of 21% oxygen were used. Then tests have been performed in order to define the changes over time in the levels of mRNA and proteins for *HGF*, *HGFA*, *c-Met*, *HIF-1 α* and *VEGF* genes. The above-mentioned experiments allowed to characterize changes in HGF mRNA level and determine the mechanism for the expression regulation by hypoxia conditions and with the HGFA participation. The experiments also allowed comparison of mechanisms regulating the HGF – c-Met signalling pathway in endothelial cells depending on the degree of their maturity. The results bring significant knowledge and help to determine the leading role of those cell types in the processes of creating blood vessels.

The second part of the work, applies to microRNA screening, aimed at identifying molecules, which expression changes in endothelial cells under chemical hypoxia conditions.

On the basis of the screening assays and bioinformatic analysis, molecules potentially targeting HGFA – HGF – c-Met signalling pathway have been identified.