

Abstract

Cellular response to hypoxia is regulated by hypoxia-inducible transcription factors called HIFs. Those transcription factors are heterodimers made of two HIF subunits: constitutively expressed beta subunit (HIF1B) and oxygen-dependent alpha subunits, of which there are three major isoforms: HIF1A encoded by *HIF1A*, HIF2A encoded by the *EPAS1*, and HIF3A encoded by *HIF3A*. HIF1A is responsible for the acute response to hypoxia, whereas HIF2A and HIF3A are responsible for the adaptation to the long-term hypoxia. During oxygen homeostasis, the concentration of the alpha subunits is low, due to their oxygen-dependent degradation. During hypoxia, this degradation process is interrupted, which leads to the accumulation of alpha subunits, their translocation to the nucleus, where they dimerize with HIF1B to form transcriptionally active complexes. Active HIF complexes bind to hypoxia-response elements (HREs) in target-gene promoters to regulate their response to hypoxia.

HIF1 and HIF2 regulate the adaptation of vascular endothelial cells to low oxygen conditions, by activating signalling pathways and genes, which are responsible for endothelial cells migration, growth, differentiation and metabolism. In this dissertation, I characterised two previously described HRE motifs annotated to HIF1 and HIF2, by identifying their instances in the open chromatin regions in promoters of hypoxia-responsive genes, their association with the timepoint of gene activation under hypoxia, and their spatial distribution in the promoters of hypoxia-responsive genes. These results confirmed that the two HRE motifs do have some specificity for HIF1 and HIF2.

We investigated the effects of silencing of either HIF1A or HIF2A in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs) on the expression of 14 pre-selected hypoxia-responsive genes. Among these genes, we identified genes that in HUVECs are regulated by HIF1 (*ANKRD37*, *NARF*, *BNIP3*, *SLC2A1*), by HIF2 (*ADM*, *ANGPTL4*, *C1orf21*, *MAGI1*, *PTGIS*), and by both HIF1 and HIF2 (*EGLN3*, *LUCAT1*, *MIR210HG*, *BNIP3L*), in the time-window when both HIF1 and HIF2 are active. I demonstrated a linear proportionality between the effect of HIF1 on gene activation and the count of HRE motifs annotated to HIF1 in promoter open chromatin regions. I corroborated this result by genome-wide analysis of HRE motif content in normoxic HUVECs open chromatin regions and HIF1A binding in these cells under hypoxia. This allowed us to propose a mechanism, by which higher content of HRE motifs annotated to HIF1 in open chromatin regions increases HIF1 binding, which contributes to increased gene induction due to HIF1 under hypoxia. I also report that for 232 previously identified hypoxia-responsive genes, the genes which have in their

promoter regions ChIP-seq peaks for HIF1A contain more HRE motifs annotated to HIF1A, than genes which do not contain said ChIP-seq peaks in their promoter regions.

I developed an ordinary differential equations (ODE) model of hypoxia signalling and transcriptional activation of hypoxia responsive genes that takes into account not only HIF1 but also HIF2. Within this model, I was able to correctly simulate the effects of a further drop of oxygen level during hypoxia on the HIF switch. These simulation results support experimentally established conclusion that residual PHD activity under hypoxia contributes to the HIF-switch. Furthermore, by simulations in the model I established that, for the simulation results to broadly agree with experiments, there is a need for a large excess of HIF1B over the two HIF alpha subunits. However, our model including both HIFs was not better than model including only HIF1 in predicting mRNA expression of hypoxia responsive genes.

The results described in this dissertation illustrate the relationship between the type and number of HRE motifs in open chromatin regions in the promoters of hypoxia responsive genes and their transcriptional activation by HIF1 and HIF2.

Keywords: modeling, hypoxia, endothelium, HIF1, HIF2

Streszczenie

Komórkowa odpowiedź na niedotlenienie regulowana jest przez czynniki transkrypcyjne indukowane hipoksją. Czynniki te są kompleksami składającymi się z dwóch podjednostek: konstytutywnie eksprymowanej podjednostki beta oraz zależnej od stężenia tlenu podjednostki alfa, która występuje w trzech głównych izoformach: HIF1A, HIF2A oraz HIF3A, kodowanych odpowiednio przez *HIF1A*, *EPAS1* oraz *HIF3A*. HIF1A odpowiada za wczesną odpowiedź na hipoksję, a HIF2A oraz HIF3A odpowiadają za adaptację do długotrwałego niedotlenienia. W warunkach homeostazy tlenowej, stężenie podjednostek alfa jest niskie, gdyż podlegają one degradacji zależnej od tlenu. W niedotlenieniu ten proces zostaje przerwany, co prowadzi do akumulacji podjednostek alfa oraz ich translokacji do jądra komórkowego, gdzie dimeryzują one z podjednostkami beta, tworząc aktywne regulacyjne czynniki transkrypcyjne. Czynne kompleksy wiążą się do specyficznych dla hipoksji elementów regulatorowych (HRE) w promotorach genów indukowanych przez hipoksję i regulują ich transkrypcję.

HIF1 i HIF2 regulują adaptację komórek śródbłonna naczyniowego do niedotlenienia, aktywując ścieżki sygnalizacji i geny odpowiadające za migrację komórek śródbłonna, ich wzrost i różnicowanie. W niniejszej rozprawie scharakteryzowałam dwa uprzednio opisywane motywy HRE dla HIF1 i HIF2, identyfikując ich wystąpienia w rejonach otwartej chromatyny w promotorach genów odpowiadających na niedotlenienie, ich związek z momentem aktywacji danego genu w niedotlenieniu, rozkład przestrzenny w promotorach genów docelowych oraz lokalizację względem zbadanych doświadczalnie miejsc wiązania HIF1 oraz HIF2. Nasze wyniki potwierdziły, że oba motywy charakteryzują się pewnym stopniem specyficzności dla HIF1 i HIF2.

Zbadaliśmy wpływ wyciszenia HIF1A lub HIF2A w komórkach ludzkiego śródbłonna żyły pępowinowej na ekspresję 14 wybranych genów odpowiadających na niedotlenienie. Wśród nich zidentyfikowaliśmy geny regulowane w komórkach HUVEC przez HIF1 (*ANKRD37*, *NARF*, *BNIP3*, *SLC2A1*), przez HIF2 (*ADM*, *ANGPTL4*, *C1orf21*, *MAG11*, *PTGIS*) lub przez oba z nich (*EGLN3*, *LUCAT1*, *MIR210HG*, *BNIP3L*), w punkcie czasowym gdy aktywne są zarówno HIF1, jak i HIF2. Zbadałam związek między liczbą motywów HRE w promotorach tych genów, a ich reakcją na wyciszenie każdego z tych czynników transkrypcyjnych. Wykazałam liniową zależność pomiędzy wpływem HIF1 na aktywację genów docelowych, a liczbą motywów HRE dla HIF1 w obszarach otwartej chromatyny w promotorach genów docelowych. Potwierdziłam ten wynik poprzez całogenomową analizę zawartości motywów HRE w obszarach otwartej chromatyny w komórkach HUVEC w normoksji oraz miejscach wiązania HIF1 w tych komórkach w niedotlenieniu. Dzięki temu zaproponowałam mechanizm, w którym większa liczba motywów HRE

dla HIF1 zwiększa szansę na wiązanie HIF1, co przyczynia się do zwiększonej aktywacji genów docelowych dla HIF1. Wykazałam również, że wśród 232 genów zidentyfikowanych wcześniej jako odpowiadające na niedotlenienie, geny posiadające w swoich promotorach miejsce wiązania dla HIF1 zidentyfikowane metodą CHIP-seq zawierają więcej motywów dla HIF1, niż geny nieposiadające w swoich promotorach miejsc wiązania dla HIF1.

Stworzyłam model opisujący regulację odpowiedzi genów docelowych na niedotlenienie oparty o równania różniczkowe zwyczajne, który zawiera zarówno HIF1, jak i HIF2. W tym modelu uzyskałam wyniki symulacji odpowiedzi systemu na dalsze obniżenie stężenia tlenu, które były zgodne z wynikami doświadczenia, z czego wnioskuję, że resztkowa aktywność PHD2 w hipoksji odgrywa istotną rolę w zmianie wiodącego czynnika transkrypcyjnego z HIF1 na HIF2. Co więcej, na podstawie symulacji uzyskałam wnioszek, że dla właściwego działania badanego systemu niezbędny jest nadmiar podjednostki HIF1B. Uwzględnienie w modelu zarówno HIF1 jak i HIF2 nie poprawiło wyników przewidywania ekspresji genów docelowych regulowanych przez niedotlenienie, w porównaniu z modelem uwzględniającym jedynie HIF1.

Słowa kluczowe: modelowanie, hipoksja, śródbłonek, HIF1, HIF2