

ROZPRAWA DOKTORSKA

BIAŁKO WWOX

JAKO WIELOFUNKCYJNY MODULATOR TRANSKRYPCJI

W PATOGENEZIE CUKRZYCY CIĄŻOWEJ

mgr inż. Izabela Baryła

Promotor: prof. dr hab. n. med. Andrzej K. Bednarek

Promotor pomocniczy: dr hab. n. med. Elżbieta Płuciennik

Zakład Kancerogenezy Molekularnej
Katedra Medycyny Molekularnej i Biotechnologii
Oddział Nauk Biomedycznych
Wydział Lekarski



Łódź 2022

Streszczenie w języku polskim

Białko WWOX jako wielofunkcyjny modulator transkrypcji w patogenezie cukrzycy ciężowej

Białko kodowane przez gen *WWOX* jest kluczowym regulatorem wielu procesów komórkowych. Udowodniono jego udział w szlakach sygnałowych regulujących m.in. proliferację komórek, apoptozę, metabolizm oraz rozwój ośrodkowego układu nerwowego. Za rolę modulatora wielu procesów komórkowych, w tym metabolicznych, odpowiedzialna jest głównie pierwsza domena WW białka *WWOX* wiążąca partnerskie czynniki transkrypcyjne, regulując ich aktywność. Jednym z nich jest czynnik odpowiedzi na hipoksję HIF-1 α . Białko *WWOX* zostało opisane jako jeden z czynników regulujących funkcjonowanie czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α w nowotworach. Obniżona ekspresja *WWOX* w raku piersi łączy się z ograniczeniem sekwestracji czynnika HIF-1 α , czego konsekwencją jest nasilenie glikolizy beztlenowej tzw. efekt Warburga.

W związku z tymi obserwacjami dotyczącymi udziału *WWOX* w regulacji efektu Warburga oraz doniesieniami wskazującymi na odgrywanie inicjującej roli w zaburzeniach metabolicznych czynnika HIF-1 α i efektu Warburga uzasadnione było podjęcie tematu określenia profilu ekspresji *WWOX* u pacjentek z cukrzycą ciężową. Występowanie warunków hipoksji i podwyższonej aktywności czynnika HIF-1 α jest zjawiskiem obserwowanym w pierwszym trymestrze prawidłowo rozwijającej się ciąży. W późniejszych etapach ciąży następuje wzrost poziomu tlenu w łożysku, co zostaje zaburzone m.in. w przypadku cukrzycy ciężowej. Tezą pracy było założenie, że zaburzona ekspresja *WWOX* w czasie ciąży nie rekompensuje podwyższonej ekspresji *HIF1A*, co może prowadzić do wystąpienia cukrzycy ciężowej.

Celem niniejszej rozprawy była ocena profilu ekspresji genów *WWOX* oraz *HIF1A* i wybranych genów zaangażowanych w podstawowy metabolizm glukozy w grupie pacjentek z cukrzycą ciężową, a także analiza korelacji pomiędzy ekspresją badanych genów a parametrami klinicznymi i wynikami badań biochemicznych pacjentek. Ponadto, podjęto próbę poznania wpływu genu *WWOX* na ekspresję i aktywność enzymatyczną wybranych białek zaangażowanych w metabolizm glukozy, w zależności od stężenia glukozy i tlenu w warunkach *in vitro*, na modelu linii komórkowej ludzkich fibroblastów z wyciszeniem genu *WWOX*. Jednocześnie, przeprowadzono przegląd literatury dotyczącej wyników badań wskazujących na udział

W WOX w kontroli metabolizmu w dużo szerszym zakresie, obejmującym obok metabolizmu glukozy, również metabolizm steroidów i kości.

Przeprowadzona analiza ekspresji wykazała istotne zróżnicowanie pomiędzy kobietami ze zdiagnozowaną cukrzycą ciążową (GDM) a grupą kontrolną kobiet ciężarnych z prawidłową tolerancją glukozy (NGT), wskazując na obniżoną ekspresję W WOX , podwyższoną ekspresję *HIF1A* i obniżony stosunek W WOX /*HIF1A* oraz podwyższoną ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w transport glukozy i glikolizę w grupie badanej. Ponadto, stosunek W WOX /*HIF1A* negatywnie korelował z ekspresją większości z badanych genów u pacjentek GDM. W modelu komórkowym, potwierdzono, że W WOX reguluje HIF-1 α w prawidłowych komórkach ludzkich. Zaobserwowano, że knockout genu W WOX spowodował wzrost ekspresji badanych genów docelowych czynnika transkrypcyjnego HIF-1 α w warunkach podstawowych. Dodatkowo, w warunkach hiperglikemii zaobserwowano obniżenie insulino-zależnego wychwyty glukozy oraz nasilenie glikolizy prowadzące do zwiększonej produkcji mleczanu. Przy hiperglikemii sprzężonej z hipoksją, wykazano wzrost aktywności HIF-1 α , wzrost ekspresji części jego genów docelowych oraz spadek całkowitego wychwyty glukozy, bez zmian w insulino-zależnym wychwycie, przy jednoczesnym wzroście stężenia mleczanu, w porównaniu do komórek kontrolnych.

Otrzymane wyniki potwierdziły, że W WOX wpływa na metabolizm glukozy poprzez kontrolę aktywności czynnika HIF-1 α w przypadku komórek ludzkich oraz wykazały, że pacjentki GDM charakteryzują się zaburzonym poziomem ekspresji W WOX , co sugeruje jego udział w patogenezie cukrzycy ciążowej. Istotnie podwyższona ekspresja czynnika odpowiedzi na hipoksję oraz genów metabolizmu glukozy charakterystycznych dla występowania efektu Warburga, wskazuje na jego występowanie w badanej grupie pacjentek GDM.

Streszczenie w języku angielskim

WWOX protein as multifunctional transcriptional modulator of gestational diabetes mellitus pathogenesis

The protein encoded by the *WWOX* gene is a key regulator of many cellular processes. It participates in signaling pathways that regulate, among others, cell proliferation, apoptosis, metabolism, and development of the central nervous system. The first WW domain of the *WWOX* protein, which binds partner transcription factors and regulates their activity, is mainly responsible for the role of a modulator of many cellular processes, including metabolic processes. One of them is the hypoxia response factor HIF-1 α . The *WWOX* protein has been described as one of the regulators of the transcription factor HIF-1 α in cancer tumors. Decreased expression of *WWOX* in breast cancer is associated with reduced cytoplasmic sequestration of the HIF-1 α . The consequence is the intensification of anaerobic glycolysis - the Warburg effect.

Due to the observation that *WWOX* takes part in the Warburg effect regulation and reports indicating that the HIF-1 α factor and the Warburg effect play an initiating role in metabolic disorders, it was justified to take up the topic of determining the *WWOX* expression profile in gestational diabetes patients. The occurrence of hypoxic conditions and increased HIF-1 α activity is a phenomenon that occurs in the first trimester of a normally developing pregnancy. In the later stages of pregnancy, the level of oxygen in the placenta increases, which is disturbed, for example in the case of gestational diabetes. The assumption of the study was that disturbed *WWOX* expression during pregnancy does not compensate for increased expression of HIF1A and it may lead to the development of gestational diabetes.

The aim of this dissertation was to assess the expression profile of *WWOX*, *HIF1A*, and selected genes involved in basic glucose metabolism in gestational diabetes patients, as well as an attempt to find a correlation between the expression of the studied genes and clinical and biochemical parameters of the patients. In addition, an attempt was made to understand the effect of *WWOX* on the expression and enzymatic activity of selected proteins involved in glucose metabolism, depending on the glucose and oxygen concentration in the environment using the human fibroblast cell line model with a *WWOX* gene knockout. Additionally, a review of the literature of studies showing the involvement of the *WWOX* gene in the control of metabolism was performed. Apart from glucose metabolism, the *WWOX* also influences on the metabolism of steroids, cholesterol, and bone.

The expression analysis showed significant differentiation between GDM women and controls. A reduction of *WWOX* expression, an increase in *HIF1A* expression and *WWOX/HIF1A* expression ratio, and an increase in the expression of genes encoding proteins involved in glucose transport and glycolysis were observed. Moreover, the *WWOX/HIF1A* ratio negatively correlated with the expression of most of these genes in GDM patients. The cellular model confirmed that *WWOX* regulates HIF-1 α . *WWOX* knockout leads to increased expression of its target genes tested under basal conditions. Additionally, decrease in insulin-dependent glucose uptake and an increase in glycolysis leading to increased lactate production were observed under hyperglycemia. In hypoxia-coupled with hyperglycemia, an increase in HIF-1 α activity and expression of some of its target genes, and a decrease in total glucose uptake without changes in insulin-dependent uptake with a simultaneous increase in lactate concentration compared to control cells, were shown.

The obtained results confirmed that *WWOX* influences glucose metabolism by controlling HIF-1 α activity in human cells and showed that GDM patients are characterized by an altered level of *WWOX* expression, which suggests its participation in the pathogenesis of gestational diabetes. The significantly increased HIF-1 α and the glucose metabolism genes' expression characteristic of the Warburg effect indicates its occurrence in the studied group of GDM patients.