

mgr Tomasz Kulesza

**ROLA TRANSPORTERÓW FOSFORANOWYCH W ROZWOJU  
KŁĘBUSZKOWEJ KALCYFIKACJI ORAZ W INDUKCJI  
INSULINOOPORNOŚCI PODOCYTÓW**

**The role of phosphate transporters in the development of glomerular calcification  
and in the induction of insulin resistance in podocytes**

Rozprawa na stopień naukowy doktora  
w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne

**Promotor** dr hab. inż. Agnieszka Piwkowska, prof. IMDiK PAN



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk

Warszawa, 2023

## ***Rola transporterów fosforanowych w rozwoju kłębuszkowej kalcyfikacji oraz w indukcji insulinooporności podocytów***

Podocyty to wyspecjalizowane komórki nabłonka trzewnego, które wraz z śródbłonkiem naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego oraz błoną podstawną tworzą unikalną strukturę jaką jest kłębuszkowa bariera filtracyjna (GFB). W morfologii podocyta wyróżnić można wypustki stopowate, które zazębiając się ze sobą tworzą szczeliny filtracyjne (SD) – wysoce dynamiczne, a co za tym idzie najbardziej wrażliwe na uszkodzenia elementy GFB. To właśnie SD zapobiegają przedostawaniu się makromolekuł (m. in. białek) z osocza krwi do ultrafiltratu w torebce Bowmana. Podocyty wykazują również wrażliwość na działanie insuliny, przy czym zmiany w homeostazie tego hormonu wpływają na fizjologię omawianych komórek. Cukrzyca i jej powikłanie, jakim jest cukrzycowa choroba nerek (DKD), to przykłady najczęstszych zaburzeń prowadzących do uszkodzenia podocytów. Przewlekła hiperinsulinemia i hiperglikemia, obecne w przebiegu DKD powodują insulinooporność podocytów, a w rezultacie postępującą dezintegrację GFB, i albuminurię. Uszkodzenie GFB jest często niezauważane w początkowych stadiach choroby ze względu na skąpoobjawową manifestację.

Kolejnym szkodliwym powikłaniem choroby cukrzycowej jest kalcyfikacja tkanek miękkich. Z powodu rozregulowanej gospodarki hormonalnej oraz nieprawidłowej funkcji nerek dochodzi do retencji w organizmie jonów fosforanowych (Pi). Długotrwała hiperfosfatemia sprzyja deponowaniu złogów fosforanu wapnia w organach, w których w warunkach fizjologicznych ten proces nie zachodzi. Do tej pory naukowcy najlepiej opisali patomechanizm kalcyfikacji naczyń krwionośnych (VC). Badacze ustalili istotny udział w tym zjawisku sodozależnych transporterów fosforanowych (NaPi 2c, Pit 1, Pit 2), których funkcją jest dokomórkowy transport Pi, oraz transportera XPR1 odpowiedzialnego za transport Pi do przestrzeni pozakomórkowej. W homeostazie fosforanowej bierze również udział nukleotydowa pirofosfataza/fosfodiesteraza 1 (NPP1), która poprzez hydrolizę nukleotydów generuje pirofosforan – najsilniejszy inhibitor kalcyfikacji. Zarówno NPP1, jak i Pit 1 są także czynnikami regulującymi wewnątrzkomórkową sygnalizację insulinową.

Celem badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej było określenie wpływu środowiska cukrzycowego na homeostazę fosforanową w podocytach. W szczególności skupiono się na określeniu udziału białek transportujących fosforan w rozwoju kłębuszkowej kalcyfikacji, a także w rozwoju insulinooporności podocytów.

W pierwszej części badań ustalono, iż warunki wysokiego stężenia glukozy (HG) prowadzą do zmian w ilości i komórkowej lokalizacji analizowanych transporterów

fosforanowych. W błonie komórkowej podocytów zmniejszyła się ilość sodozależnych transporterów Pi, natomiast zwiększyła się translokacja XPR1 do błony plazmatycznej. Dodatkowo, stwierdzono mniejszą błonową ekspozycję NPP1, co skutkowało mniej wydajną produkcją PPI w przestrzeni zewnątrzkomórkowej (PZK). Powyższe obserwacje sugerują, iż w warunkach HG może dochodzić do nasilenia procesów kalcyfikacyjnych z powodu retencji jonów Pi w PZK oraz osłabienia działania naturalnych inhibitorów mineralizacji.

Następnie zbadano rolę białek Pit 1 i NPP1 w sygnalizacji insulinowej w podocycie. Po raz pierwszy wykazano, iż w podocytach z wyindukowaną insulinoopornością dochodzi do formowania się kompleksów enzymu NPP1 zarówno z transporterem Pit 1 oraz z receptorem insulinowym (IR). Ponadto stwierdzono, że wyciszenie genu *SLC20A1* kodującego białko Pit 1 prowadzi do utraty wrażliwości komórek podocytarnych na insulinę. Objawiało się to zahamowaniem dkomórkowego transportu glukozy oraz internalizacją IR i insulinozależnego transportera glukozy typu 4 (GLUT 4). Wskazuje to na fakt, iż białko Pit 1, oprócz roli transportera Pi, jest kluczowym czynnikiem warunkującym wrażliwość podocytów na insulinę.

Powyższe ustalenia pozwalają na lepsze zrozumienie mechanizmu uszkodzenia komórek podocytarnych w przebiegu choroby cukrzycowej i mogą przyczynić się do rozwoju wydajniejszych narzędzi diagnostycznych i terapeutycznych. Nowo poznane mechanizmy nie tylko wzbogacają wiedzę dotyczącą fizjologii komórki podocytarnej, lecz w dalszej perspektywie mogą istotnie poprawić komfort życia osób cierpiących z powodu cukrzycy i jej powikłań.

*The role of phosphate transporters in the development of glomerular calcification and in the induction of insulin resistance in podocytes*

Podocytes are specialized cells of the visceral epithelium, which, together with the glomerular capillary endothelium and the basement membrane, form a unique structure – the glomerular filtration barrier (GFB). In the morphology of the podocyte, foot processes can be distinguished, which, by interlocking with each other, form slit diaphragms (SD) – highly dynamic, and thus the most sensitive to damage, elements of the GFB. It is SD that prevents macromolecules (including proteins) from entering the ultrafiltrate in the Bowman's capsule. Podocytes are also insulin sensitive cells, and alterations in the homeostasis of this hormone affect their physiology. Diabetes and its complication, diabetic kidney disease (DKD), are examples of the most common disorders leading to podocyte injury. Chronic hyperinsulinemia and hyperglycemia present in the course of DKD cause insulin resistance of podocytes and, as a result, progressive disintegration of GFB, which leads to albuminuria. GFB damage is often overlooked in the initial stages of the disease due to its oligosymptomatic manifestation.

Soft tissues calcification is another deleterious complication of diabetes. Due to dysregulated hormonal balance and abnormal kidney function, phosphate ions (Pi) are retained in the body. Long-lasting hyperphosphatemia favors the deposition of calcium phosphate salts in organs where this process does not occur under physiological conditions. So far, scientists have most accurately described the pathomechanism of vascular calcification (VC). From these studies it is known that mechanism of VC involves the significant participation of sodium-dependent phosphate transporters (NaPi 2c, Pit 1, Pit 2), whose function is the transport of Pi into the cell, and the XPR1 is transporter responsible for the export of Pi from the cell. Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1 (NPP1) also participates in maintaining phosphate homeostasis, mainly by generation of pyrophosphate (PPi) – the strongest inhibitor of calcification – as a result of hydrolysis of nucleotides. Both NPP1 and Pit 1 are also regulators of intracellular insulin signaling.

The aim of the research within this doctoral dissertation was to determine the influence of the diabetic environment on phosphate homeostasis in podocytes. In particular, the role of Pi transport system in the development of glomerular calcification and the formation of insulin resistance of podocytes was investigated.

In the first part of the study, it was established that high glucose (HG) concentration leads to changes in the amount and cellular location of the analyzed phosphate transporters. In the cell

membrane of the podocyte, the amount of sodium-dependent Pi transporters decreased, while the translocation of XPR1 to the plasma membrane elevated. In addition, membrane exposure of NPP1 was also reduced, resulting in attenuated production of P<sub>PPi</sub> in the extracellular space (ES). The above-mentioned observations suggest that under HG conditions, the calcification processes are intensified due to the retention of Pi ions in ES and the reduction of the efficiency of natural mineralization inhibitors.

Next, the role of Pit 1 and NPP1 proteins in insulin signaling in the podocyte was determined. It was discovered for the first time that complexes of the NPP1 enzyme with both the Pit 1 transporter and the insulin receptor (IR) are formed in insulin resistant podocytes. In addition, silencing of the *SLC20A1* gene encoding the Pit 1 protein led to the insensitivity of podocytes to insulin, which was manifested by inhibition of glucose uptake and internalization of IR and insulin-dependent glucose transporter type 4 (GLUT 4). This indicates that Pit 1 protein, besides its role as the Pi transporter, is a key factor determining the sensitivity of podocytes to insulin.

The above-mentioned findings allow for a better understanding of the mechanism of podocyte damage in the course of diabetes and may contribute to the development of more efficient diagnostic and therapeutic tools. The newly discovered mechanisms not only enrich the knowledge on the physiology of the podocyte, but in the long run may significantly improve the quality of life of people suffering from diabetes and its complications.