

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko.

Agnieszka Piwkowska

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ ~~artystyczne~~ – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

2000 magister biotechnologii, specjalizacja biotechnologia leków, Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej, promotor Prof. Edward Borowski

2005 doktor nauk medycznych w zakresie biologii medycznej, Wydział Lekarski Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, promotor Prof. Edward Borowski
Tytuł rozprawy doktorskiej: „Modulatory białek ABC i antymetabolity w badaniach nad opanowaniem problemu oporności wielolekowej komórek nowotworowych”

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ ~~artystycznych~~.

2000 – 2005 studia doktoranckie w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej

od 2006 adiunkt w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego,

Rola kinazy białkowej G i reaktywnych form tlenu w regulacji funkcji podocytów w warunkach fizjologicznych i wybranych stanach patofizjologicznych.

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1) High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes.

Piwkowska A, Rogacka D, Audzeyenka I, Jankowski M, Angielski S.

J Cell Biochem. 2011, 112(6):1661-72.

IF = 2.868; KBN/MNiSW = 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, wykonaniu obliczeń, rycin, analizie statystycznej wyników, napisaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

2) Hydrogen peroxide induces dimerization of protein kinase G type I α subunits and increases albumin permeability in cultured rat podocytes.

Piwkowska A, Rogacka D, Jankowski M, Kocbuch K, Angielski S.

J Cell Physiol. 2012, 227(3):1004-16.

IF = 4.218; KBN/MNiSW = 35

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, wykonaniu obliczeń, rycin, analizy statystycznej wyników, napisaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

- 3) Insulin increases glomerular filtration barrier permeability through dimerization of protein kinase G type I α subunits.

Piwkowska A, Rogacka D, Kasztan M, Angielski S, Jankowski M.

Biochim Biophys Acta. 2013, 1832(6):791-804.

IF₂₀₁₂ = 4.910; KBN/MNiSW = 40

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, wykonaniu obliczeń, rycin, analizy statystycznej wyników, napisaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

- 4) High glucose increases glomerular filtration barrier permeability by activating protein kinase G type I α subunits in a Nox4-dependent manner.

Piwkowska A, Rogacka D, Audzeyenka I, Angielski S, Jankowski M.

Exp Cell Res. 2014, 320(1):144-52.

IF₂₀₁₂ = 3.557; KBN/MNiSW = 30

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, wykonaniu obliczeń, rycin, analizy statystycznej wyników, napisaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

- 5) Insulin stimulates glucose transport via protein kinase G type I alpha-dependent pathway in podocytes.

Piwkowska A, Rogacka D, Angielski S, Jankowski M.

Biochem Biophys Res Commun. 2014, 446(1):328-34.

IF₂₀₁₂ = 2.406; KBN/MNiSW = 20

Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i wykonaniu doświadczeń, wykonaniu obliczeń, rycin, analizy statystycznej wyników, napisaniu tekstu publikacji. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

Sumaryczny IF w/w prac: **IF = 17.959; KBN/MNiSW = 155**

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Zagadnieniem badawczym rozprawy habilitacyjnej jest rola kinazy białkowej G typu I alfa (PKGI α) i reaktywnych form tlenu w regulacji przepuszczalność bariery filtracyjnej kłębuszków i izolowanych podocytów. Wyjaśnienie tych zależności przyczyni się do lepszego zrozumienia mechanizmu regulacji bariery filtracyjnej kłębuszków oraz zjawisk towarzyszących glomerulopatii cukrzycowej.

Wprowadzenie

Podstawową jednostką morfologiczną i funkcjonalną nerek jest nefron. W jego strukturze wyróżnia się kłębuszek nerkowy oraz cewki bliższej i dalszej. W kłębuszku pod wpływem ciśnienia hydrostatycznego zachodzi przesączanie osocza przez filtr kłębuszkowy. Proces ten zwany jest filtracją kłębuszkową. Bariere filtracyjną tworzą komórki śródbłónka naczyń włosowatych kłębuszka, błona podstawna (GBM) oraz warstwa komórek nabłonkowych – podocytów. Bariera filtracyjna funkcjonuje na zasadzie sita molekularnego, ograniczającego przepływ makromolekuł z osocza do moczu w zależności od ich wielkości i ładunku (*Angielski i Jankowski, 2004*).

Komórki podocytarne są wysoko wyspecjalizowanymi, najbardziej zróżnicowanymi komórkami kłębuszka nerkowego. Anatomiczne usytuowanie podocytów okalających kapilary kłębuszków nerkowych sprawia, że są one permanentnie eksponowane na wysokie, pulsacyjne zmiany ciśnienia wewnątrzkapilarnego będącego siłą napędową procesu filtracji kłębuszkowej. Dojrzałe podocyty nie mają zdolności proliferacyjnych, należą zatem do populacji komórek postmitotycznych, co oznacza, że ich śmierć lub utrata w stanach chorobowych może być dla nerki nieodwracalna w skutkach. Struktura podocytów charakteryzuje się bardzo dobrze rozbudowanym cytoszkieletem i wyróżnia się w ich obrębie trzy strukturalne i funkcjonalne segmenty: ciało komórki, wypustki główne i wypustki stopowate (*Pavenstadt i wsp., 2003*).

Wykazano, że głównym elementem cytoszkieletu podocytów są mikrofilamenty, w których skład wchodzi gęsta sieć F-aktyny i miozyny II oraz białka wiążące się z aktyną jak np. α -aktynina-4, synaptopodyna i kapanina. Wypustki stopowate podocytów również posiadają dobrze rozwinięty aparat kurczliwy zbudowany m.in. z F-aktyny, miozyny i α -aktyniny-4

(Saleem i wsp., 2008). Cytoszkielek odgrywa kluczową rolę nie tylko w utrzymaniu mechanicznej stabilności, ale również w przenoszeniu sygnału generowanego przez mechaniczne siły. Szkielet komórkowy zmienia się w szczególności pod wpływem działania naczynioaktywnych substancji, wpływając w ten sposób na przepuszczalność bariery filtracyjnej (Endlich i wsp., 2001; Sharma i wsp., 1992).

Droga przepływu filtratu kłębuszkowego jest ściśle określona i przebiega przez okienka śródbłonka, błonę podstawną oraz błony szczelinowe zamykające szczeliny pomiędzy wypustkami stopowatymi podocytów. Sąsiadujące ze sobą wypustki stopowate są przedzielone szczelinami filtracyjnymi szerokości 20–30 nm, których brzegi połączone są błoną, tzw. błoną szczelinową (SD, *slit membrane*), która jest najważniejszym elementem bariery filtracyjnej. Błona szczelinowa przypomina międzykomórkowe połączenia przylegające o bardzo rozbudowanej strukturze białkowej (Pavenstadt i wsp., 2003). Kompleks białkowy SD jest zakotwiczony w obszarze tratw lipidowych błony komórkowej w podstawno-bocznej części wyrostków stopowatych (Kubiak i Niemir, 2006). Białka błony szczelinowej sąsiadnych wypustek oddziałują ze sobą homo- lub heterologicznie i na zasadzie modelu zamka błyskawicznego tworzą strukturę SD, która stanowi platformę sygnalizacyjną podocytów, regulującą ich funkcje i morfologię (Faul i wsp., 2007). W skład struktury błon wchodzi szereg białek tworzących funkcjonalny kompleks. Głównym białkiem szczeliny filtracyjnej jest nefryna – glikoproteina należąca do nadrodziny immunoglobulin. Nefryna posiada część przezbłonową, wewnątrz- i zewnątrzkomórkową. Fragment zewnątrzkomórkowy buduje sieć homo- i heterologicznych połączeń tworzących rusztowanie błony szczelinowej, natomiast funkcją fragmentu wewnątrzkomórkowego jest przekazywanie sygnału z błon szczelinowych do wnętrza podocytów poprzez interakcje z takimi białkami jak CD2AP (CD2-associated protein), podocyna, Nck2, MAGI-1 i MAGI-2 (membrane-associated guanylatekinase inverted) i in. (Kubiak i Niemir, 2006). Innym ważnym białkiem kompleksu SD jest podocyna. Jest to białko integralne o strukturze spinki do włosów, decydujące o stabilności kompleksu błony szczelinowej oraz, będąc w bezpośrednim kontakcie z nefryną i NEPH1-3, ułatwiające przekazywanie sygnału do wnętrza komórki i aktywację kinaz wewnątrzkomórkowych, np. ZO-1 (Faul i wsp., 2007).

W komórkach podocytarnych stwierdzono ekspresję wielu receptorów i przekaźników II-rzędu dla naczynioaktywnych związków, co sugeruje, że nie są to komórki statyczne, lecz mogą odpowiadać na różnorodne bodźce fizjologiczne. Wykryto między innymi receptory dla angiotensyny II, prostaglandyny E₂, przedsionkowego czynnika natriuretycznego (ANP), które oddziałują poprzez jony wapnia, fosfolipazę C/1,4,5-trifosforan inozytolu, cAMP, oraz

szlak sygnałowy związany z cGMP. Występowanie wszystkich tych składników wskazuje, że podocyty zaopatrzone są w solidną komórkową maszynę pozwalającą na szybką ich odpowiedź na zewnętrzne bodźce (*Morton i wsp., 2004*).

Substancje zwiększające ilość cGMP, takie jak ANP czy SNP (donor NO), powodują przegrupowanie F-aktyny, która widoczna jest w postaci długich włókien liniowych w miejscu przyczepienia komórki do podłoża. Ekspozycja izolowanych kłębuszków nerkowych na SNP lub stabilny analog cGMP, powoduje zwiększenie przepuszczalności dla albuminy. Po stymulacji komórek podocytarnych angiotensyną II lub toksyną cholery (indukcja syntezy cAMP) następuje zgromadzenie się aktyny w gwieździste struktury wewnątrzkomórkowe. Być może redystrybucja F-aktyny w obecności wzrastającego stężenia cAMP lub cGMP może być konsekwencją regularnych skurczów i relaksacji podocytów (*Sharma i wsp., 1992*). Również w podocytach poddanych stresowi mechanicznemu stwierdzono, że następuje reorganizacja F-aktyny, która prowadzi aż do trzykrotnego zmniejszenia wielkości ciała podocyta. Wykazano ponadto, że w stresie mechanicznym kluczową rolę w reorganizacji F-aktyny odgrywają jony wapnia (wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego) i kinaza Rho (*Endlich i wsp., 2001*). Oznacza to, że kurczliwość komórek podocytarnych może i powinna być regulowana przez czynniki naczynioruchowe, w tym te, które prowadzą do ich relaksacji poprzez wytwarzanie cyklicznego GMP (cGMP) i aktywowaną przez ten nukleotyd kinazę białkową G typu I (PKG I).

Kinaza białkowa G

Białkowe kinazy G należą do rodziny kinaz serynowo-treoninowych. W organizmach ssaków są one kodowane przez dwa geny, *prkg1* i *prkg2*, kodujące odpowiednio kinazę G typu I oraz kinazę G typu II. PKGI jest enzymem cytoplazmatycznym i występuje w postaci homodimeru, podczas gdy PKGII jest związanym z błoną komórkową monomerem. PKGI jest znana przede wszystkim ze względu na regulację aparatu kurczliwego mięśni gładkich, natomiast PKGII jest zaangażowana m.in. w regulację wydalania jonów (Na^+ , Cl^-) (*Smolenski i wsp., 1998*), w procesy różnicowania tkanki chrzęstnej (*Yuasa i wsp., 2010*), a także w procesy neuroprzebiegu (*Hofmann i wsp., 2006*).

PKGI posiada dwie izoformy, α i β powstające wskutek alternatywnego składania mRNA i różniące się N-końcowymi fragmentami o długości ok. 100 reszt aminokwasowych (*Butt i wsp., 1993*). Różnice w N-terminalnym końcu izoform α i β wpływają przede wszystkim na powinowactwo do cGMP, specyficzność względem substratu białkowego, a także lokalizację

wewnątrzkomórkową (*Francis i wsp., 2010*). Wyróżnia się dwie domeny funkcjonalne w monomerze PKGI: domena regulatorowa (bliżej N-końca) i domena katalityczna (bliżej C-końca). Domena regulatorowa zawiera kilka subdomen, pełniących odrębne funkcje biologiczne. Subdomena dimeryzacyjna jest odpowiedzialna za utworzenie motywu zamka leucynowego pomiędzy monomerami i tym samym aktywację enzymu, natomiast subdomena lokalizacyjna determinuje jego rozmieszczenie w komórce (*Francis i wsp., 2010*).

Domena regulatorowa PKGI zawiera także subdomenę wiążącą cGMP z dwoma tandemowymi miejscami wiązania cGMP o różnym powinowactwie. Wiązanie pierwszej cząsteczki cGMP do miejsca o większym powinowactwie powoduje zmiany allosteryczne enzymu i umożliwia wiązanie drugiej cząsteczki cGMP. Do pełnej aktywacji PKGI niezbędne jest wiązanie dwóch cząsteczek cGMP. Aktywacja PKGI przez wiązanie się dwóch cGMP wymusza zmiany struktury trzeciorzędowej enzymu dzięki czemu następuje odsłonięcie domeny katalitycznej dla potencjalnych substratów. Efektem końcowym jest zwiększenie się szybkości maksymalnej katalizowanej reakcji (*Hofmann i wsp., 2006*).

Ostatnio wykazano, że nadtlenek wodoru jest kolejnym ważnym czynnikiem aktywującym PKGI α na skutek jej dimeryzacji. Dimeryzacja PKGI α zachodzi dzięki utworzeniu mostków dwusiarczkowych pomiędzy resztami cysteinowymi w pozycji 42 monomerów. Zwiększa się w ten sposób ilość PKGI α w formie aktywnego homodimeru, który charakteryzuje się 7-krotnym zwiększeniem powinowactwa do jej substratów (*Burgoyne i wsp., 2007*). Brak cystein w domenie N-końcowej PKGI β wskazuje na inny mechanizm dimeryzacji (*Butt i wsp., 1993*).

W pierwszym etapie badań została zbadana ekspresja kinazy G typu I α na poziomie mRNA i białka w podocytach. Sekwencje starterów dla genu PKGI α zostały dobrane w oparciu o dane w literaturze (*Steiner i wsp., 2009*). Jako pierwsi stwierdziliśmy obecność kinazy białkowej G typu I α (PKGI α) w hodowli pierwotnej komórek podocytarnych (**Publikacja 2.**).

Rola reaktywnych form tlenu w regulacji aktywności kinazy białkowej G typu I alfa w komórkach podocytarnych

Przez wiele lat rodniki były postrzegane jako nieuchronny, zbyteczny i szkodliwy produkt metabolizmu tlenowego organizmu. Biorąc pod uwagę właściwości niszczące reaktywnych form tlenu (ROS) zakładano, że im szybciej zostaną one zneutralizowane przez system antyoksydacyjny, tym lepiej dla komórki. Obecnie jednak wiadomo, że ROS jest niezbędnym mediatorem wielu procesów cytofizjologicznych takich jak proliferacja, różnicowanie czy

migracja. Właściwości te zostały uwidocznione w odniesieniu do nadtlenu wodoru (H_2O_2), który w ostatnich latach uważany jest za ważną cząsteczkę sygnałową w komórkach. Powstaje on z rodnika nadtlenowego ($O_2^{\bullet-}$) w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenową. Nadtlenek wodoru jest związkiem o dużo większej stabilności i, w odróżnieniu od $O_2^{\bullet-}$, jako cząsteczka elektrycznie obojętna, może łatwiej dyfundować przez błony cytoplazmatyczne. Te właściwości H_2O_2 wskazują na duże znaczenie stanu oksydoredukcyjnego komórki w regulacji procesów metabolicznych, zarówno w warunkach fizjologicznych jak i patologicznych (*Rhee i wsp., 2006*).

W cukrzycy dochodzi do rozregulowania wielu szlaków metabolicznych, między innymi do wzrostu aktywności enzymów zaangażowanych w generowanie ROS oraz do hiperfiltracji i hipertrofii komórek kłębuszka nerkowego. Towarzyszy temu wzrost produkcji ilości reaktywnych form tlenu, których głównym źródłem jest oksydaza NAD(P)H. Komórki podocytarne posiadają kilka izoform oksydazy NAD(P)H (NOX1, gp91phox, NOX4) (*Greiber i wsp., 1998; Kim i wsp., 2006; Susztak i wsp., 2006*). Nasze badania wskazują na zależność pomiędzy hiperglikemią a aktywnością oksydazy NAD(P)H. Okazało się, że już po krótkim czasie inkubacji podocytów (2 godziny) w obecności wysokich stężeń glukozy, wzrasta aktywność tego enzymu, przy czym jest ona dużo wyższa w homogenacie otrzymanym z podocytów w porównaniu z całymi kłębuszkami nerkowymi (*Piwkowska i wsp., 2009*). Podocyty mogą być więc komórkami zdolnymi generować znaczne ilości ROS i jednocześnie bardzo czułymi na zmiany jego stężenia. Pozwala to przyjąć, że związane ze stresem oksydacyjnym, zmiany w metabolizmie podocytów mogą prowadzić do zaburzeń w strukturze i funkcjonowaniu filtru kłębuszkowego. Stąd też ważnym zagadnieniem było określenie, w jaki sposób zwiększająca się ilość ROS będzie wpływała na aktywność kinazy białkowej G i jej szlak przekazywania sygnału.

W pierwszym etapie badań zaplanowano określenie całkowitej ilości reaktywnych form tlenu i scharakteryzowanie oksydazy NAD(P)H w podocytach. Stwierdziliśmy, że inkubacja podocytów z wysokim stężeniem glukozy (HG, 30 mM) prowadzi do wzrostu całkowitej ilości ROS już po 2h inkubacji (krótki czas) w porównaniu do komórek kontrolnych (5,6 mM glukoza), a maksymalny wzrost ilości ROS występował po piątym dniu inkubacji (**Publikacja I.**). Zastosowanie różnych inhibitorów enzymów produkujących ROS (apocynina, N-acetylocysteina, rotenon) wskazuje, że oksydaza NAD(P)H jest ważnym źródłem reaktywnych form tlenu w tych komórkach (*Piwkowska i wsp., 2010*).

Kolejnym krokiem było zbadanie aktywności oksydazy NAD(P)H w komórkach podocytarnych. Stwierdziliśmy, że krótkotrwała inkubacja z 30 mM glukozą powoduje wzrost

aktywności tego enzymu już o 117%, a dłuższy czas ekspozycji prowadzi do dalszego wzrostu aktywności oksydazy NAD(P)H. Ponadto metodami RT-PCR i immunodetekcji, wykazaliśmy obecność czterech podjednostek błonowych NOX1, NOX2, NOX4, p22^{phox} oraz podjednostek cytoplazmatycznych p47^{phox} i p67^{phox} oksydazy NAD(P)H. Metodą Western blot stwierdziliśmy również, że długotrwała inkubacja podocytów w środowisku z wysokim stężeniem glukozy powoduje statystycznie znamienne wzrost (Δ 30%) jedynie podjednostki NOX4 (**Publikacja 1.**).

W celu zbadania roli podjednostki NOX4 w indukowaną przez wysokie stężenia glukozy produkcję ROS zastosowaliśmy wyciszający RNA (siRNA). Stwierdziliśmy znaczące obniżenie ilości białka NOX4 w podocytach po transfekcji siRNA NOX4 i obniżenie aktywności oksydazy NAD(P)H w obecności wysokich stężeń glukozy. Wydaje się zatem, że wzrost generacji ROS w obecności wysokich stężeń glukozy jest związana z nadekspresją podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H (**Publikacja 1.**).

Ponieważ aktywność oksydazy NAD(P)H oraz całkowita ilość wewnątrzkomórkowych i zewnątrzkomórkowych reaktywnych form tlenu wzrasta wraz z czasem inkubacji komórek podocytarnych w wysokim stężeniu glukozy, zbadaliśmy w tych warunkach aktywność katalazy (CAT) i peroksydazy glutationowej (GPx) (enzymów o właściwościach antyoksydacyjnych) oraz dysmutazy ponadtlenu (SOD), rozkładającej rodnik ponadtlenu do nadtlenu wodoru. Stwierdziliśmy, że podjednostka NOX4 oksydazy NAD(P)H odgrywa kluczową rolę w regulacji aktywności SOD, GPx i CAT w komórkach podocytarnych eksponowanych na wysokie stężenia glukozy. Sugeruje to, że zwiększona ilość białka NOX4 i związana z tym zwiększona aktywność tego enzymu może powodować zaburzenie równowagi antyoksydacyjnej, czego końcowym efektem jest wzrost ilości reaktywnych form tlenu w komórkach podocytarnych, zarówno wewnątrz-, jak i zewnątrzkomórkowych (**Publikacja 1.**).

Kolejnym czynnikiem odpowiedzialnym za wzrost ilości reaktywnych form tlenu w komórkach jest insulina (*Kim i wsp., 2012; Mahadev i wsp., 2004; Wu i Williams; 2012*). Ostatnio wykazano, że insulina powoduje dynamiczne zmiany w strukturze szkieletu aktynowego w podocytach i, że jest to ważny czynnik dla zachowania integralności bariery filtracyjnej kłębuszków. Reorganizacja aktyny powoduje zmiany w strukturze podocyta, a stymulacja receptora insulinowego przez insulinę powoduje cofanie się wypustek stopowatych co skutkuje zwiększoną przepuszczalność bariery filtracyjnej. Ponadto u myszy z usuniętym genem kodującym receptor insulinowy w podocytach obserwuje się zanik wypustek stopowatych (*Welsh i wsp., 2010*).

Ponieważ, jak wykazaliśmy, NAD(P)H oksydaza jest głównym źródłem rodników ponadtlenowych w podocytach, zbadaliśmy wpływ insuliny oraz w obecności inhibitorów NAD(P)H oksydazy (apocynina, inhibitor pan-NOX VAS2870) na aktywność oksydazy NAD(P)H w pierwotnej hodowli podocytów szczurzych i izolowanych kłębuszkach. Stwierdziliśmy, że insulina zwiększa aktywność tego enzymu o 44%. Natomiast preinkubacja podocytów z apocyniną lub VAS2870 zmniejsza aktywność tego enzymu i zapobiega stymulowanej przez insulinę NAD(P)H-zależnej generacji rodników nadtlenowych. Podobne zależności obserwujemy w izolowanych kłębuszkach nerkowych. Wykazaliśmy ponadto, że wyciszenie ekspresji genu NOX2 lub NOX4 podjednostki NAD(P)H oksydazy częściowo hamuje stymulujące działanie insuliny na ten enzym (**Publikacja 3.**). Zatem, podobnie jak w przypadku komórek eksponowanych na wysokie stężenie glukozy, to między innymi podjednostka NOX4 jest odpowiedzialna za stymulujące działanie insuliny na NADPH-zależną generację $O_2^{\cdot-}$.

Również w innych komórkach wykazano, że insulina stymuluje produkcję $O_2^{\cdot-}$ poprzez stymulację oksydazy NAD(P)H (Kim i wsp., 2012; Mahadev i wsp., 2004; Wu i Williams; 2012). Ponadto stwierdzono, że insulina stymuluje produkcję nadtlenu wodoru w mysich podocytach (Kim i wsp., 2012). Wszystkie te wyniki wskazują na nowy mechanizm regulatorowy działania insuliny. Aktywacja oksydazy NAD(P)H i związany z tym wzrost rodników nadtlenowych i nadtlenu wodoru biorą udział w regulacji ścieżki sygnałowania zależnej od insuliny (Goldstein et al., 2005; Piwkowska i wsp., 2012).

Zatem ważnym celem badań było określenie, w jaki sposób zwiększająca się ilość ROS, a w szczególności rosnąca aktywność oksydazy NAD(P)H i ilość podjednostki NOX4, będzie wpływała na aktywność kinazy białkowej G i jej szlak przekazywania sygnału.

W pierwszym etapie badań wykazaliśmy, że nadtlenek wodoru jest odpowiedzialny za dimeryzację PKGI α w podocytach. Metodą immunodetekcji (Western blot) w warunkach nieredukcyjnych stwierdziliśmy, że ilość dimeru PKGI α (150 kDa) zwiększa się o 25% w obecności 100 μ M H_2O_2 i o 58% w obecności 200 μ M H_2O_2 . Zmianom tym towarzyszyło zmniejszenie się ilości monomeru PKGI α (75 kDa). Również ilość formy dimeru PKGI α rośnie wraz z czasem inkubacji podocytów z H_2O_2 (100 μ M) i osiąga maksymalną ilość w trzeciej min. inkubacji. Dodanie związku o właściwościach redukcyjnych (DL-ditiotreitol, 10 mM) powoduje zmianę dimeru PKGI α w formę monomeru (**Publikacja 2.**). Otrzymane wyniki potwierdzają, że PKGI α jest cząsteczką wrażliwą na stan oksydoredukcyjny komórki oraz to, że nadtlenek wodoru jest ważnym czynnikiem regulującym aktywność PKGI α .

Wykazaliśmy również, że w podocytach hodowanych w środowisku z wysokim stężeniem glukozy, podobnie jak po inkubacji z H_2O_2 , dochodzi do aktywacji PKGI α . Ilość dimeru w HG wzrasta o 40%. Natomiast wyciszenie ekspresji genu NOX4 znosi ten efekt (**Publikacja 4**). Podobne zależności obserwujemy w przypadku insuliny. Ilość dimeru w obecności tego hormonu wzrasta o 124%, a wyciszenie ekspresji genu NOX4 również znosi ten efekt (**Publikacja 3**).

Na podstawie analizy immunofluorescyjnej kinazy G typu I α w komórkach hodowanych w warunkach normalnego i wysokiego stężenia glukozy, stwierdziliśmy, że w obecności wysokiego stężenia glukozy intensywność fluorescencji dla kinazy PKGI α zwiększa się w obszarach przybłonowych. Podobny obraz obserwowaliśmy dla tego białka w obecności nadtlenu wodoru i insuliny (**Publikacja 2., 3., 4.**).

Na podstawie otrzymanych danych można wnioskować, że w komórkach podocytarnych insulina i glukoza są odpowiedzialne za oksydacyjną aktywację PKGI α poprzez aktywację podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H.

Kolejnym etapem badań było określenie zależności pomiędzy kinazą G a ścieżkę sygnalowania zależną od insuliny (**Publikacja 5**). Komórki podocytarne są komórkami wrażliwymi na działanie insuliny, a glukoza jest przypuszczalnie głównym substratem fizjologicznym tych komórek (*Coward i wsp., 2005*). Oddziaływanie insuliny rozpoczyna się od związania jej z błonowym receptorem insulinowym (IR), co wywołuje jego wewnątrzcząsteczkową transformację, prowadzącą do autofosforylacji i aktywacji kinazy tyrozynowej. Autofosforylacja receptora powoduje przyłączenie się do niego białek IRS1/2 oraz ich fosforylację (*Myers i wsp., 1992*). Są one miejscem wiązania i aktywacji wielu sygnalowych i adaptorowych białek spośród których znajduje się podjednostka p85 fosfatydyloinozytolo-3-kinazy (PI3K), która generuje powstawanie w błonie 3,4,5-trójfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₃) a ten z kolei aktywuje kinazę PKB/Akt. Końcowym efektem kaskady sygnału uruchomionego przez insulinę jest translokacja białek GLUT4 do błony komórkowej, które są odpowiedzialne za transport dokomórkowy glukozy (*Le Marchand-Brustel i wsp., 1999*). Inna ważna ścieżka sygnalowania zaangażowana w aktywację transportu glukozy związana jest ze wzrostem stężenia tlenu azotu i cGMP (*Bergandi i wsp., 2003; Ergen i wsp., 1997*). Stwierdzono, że w komórkach mięśni gładkich za stymulujące działanie insuliny i cGMP na transport dokomórkowy glukozy odpowiedzialna jest kinaza białkowa G (*Bergandi i wsp., 2003*). W naszych badaniach wykazaliśmy, że insulina zwiększa dokomórkowy transport glukozy na skutek aktywacji izoformy PKGI α . Stwierdziliśmy, że aktywator PKG, podobnie jak insulina, zwiększa

dokomórkowy transport glukozy w komórkach podocytarnych. Zastosowanie inhibitora PKG lub siRNA dla PKGI α znosi stymulujący efekt glukozy na transport dokomórkowy glukozy, hamuje translokację transportera GLUT4 do błony oraz znosi stymulujące działanie insuliny na białka szlaku sygnałowania insuliny (IR, kinaza Akt). Wyniki te wskazują na istotną rolę kinazy białkowej PKGI α w regulacji dokomórkowego transportu glukozy (**Publikacja 5.**).

Rola PKGI α w regulacji aparatu kurczliwego komórek podocytarnych

Najlepiej poznaną funkcją PKGI jest stymulacja rozkurczu mięśni gładkich poprzez obniżanie wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia. PKGI reguluje $[Ca^{2+}]_i$ w wyniku zmiany aktywności białek takich jak: kanał potasowy aktywowany jonami wapnia o dużym przewodnictwie (BK_{Ca}) oraz IRAG, RGS-2, fosfolipaza-C β 3, TRPC-6. Fosforylacja i aktywacja kanału BK_{Ca} powoduje jego otwarcie i przejście jonów K⁺ do płynu zewnątrzkomórkowego, prowadząc do hiperpolaryzacji błony komórkowej i obniżenia napływu jonów Ca²⁺ przez kanały wapniowe typu L (*Francis i wsp., 2010*).

Oprócz regulacji białek bezpośrednio zaangażowanych w modulację wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia, PKGI wpływa na rozkurcz mięśni gładkich poprzez oddziaływanie z białkami aparatu kurczliwego komórek. Proces skurczu jest regulowany przez kinazę MLCK i odbywa się przez fosforylację seryny w pozycji 19 regulatorowego łańcucha lekkiego miozyny (MLC). Działanie antagonistyczne posiada fosfataza lekkich łańcuchów miozyny, MLCP. MLCP stanowi bezpośredni substrat dla PKGI α . Enzym ten jest zbudowany z trzech podjednostek: podjednostki regulatorowej MYPT1, wiążącej miozynę, podjednostki katalitycznej o aktywności fosfatazy serynowo-treoninowej typu I oraz małej podjednostki M20 o nieznannej funkcji. Wykazano, że N-terminalny fragment PKGI α specyficznie oddziałuje z C-końcem MYPT1 i te interakcje determinują przemieszczanie się kinazy G do aparatu kurczliwego komórek mięśni gładkich (*Surks i wsp., 1999*). Fosforylacja MYPT1 przez PKGI α na Ser695 powoduje aktywację tej fosfatazy (*Nakamura i wsp., 2007*).

W związku z powyższym postanowiliśmy sprawdzić wpływ nadtlenu wodoru na stopień fosforylacji powyższych białek. Stosując swoiste przeciwciała wykazaliśmy, że H₂O₂ powoduje wzrost stopnia fosforylacji MYPT1 od 26% w 3. min. do 64% w 30. min. inkubacji, a jednocześnie zmniejsza stopień fosforylacji MLC maksymalnie o 60% w 10. min. inkubacji.

Kolejnym krokiem było zbadanie wpływu aktywacji PKGI α na aparat kurczliwy podocytów. Stwierdziliśmy, że aktywator PKGI (8-Br-cGMP) powoduje podobny efekt co nadtlenek wodoru. Zwiększa on fosforylację MYPT1 i defosforylację MLC. Ponadto w obecności inhibitora PKGI (Rp-8-Br-cGMPS) następuje zahamowanie działania relaksacyjnego nadtlenku wodoru na aparat kurczliwy, mianowicie nie obserwowaliśmy zmian w fosforylacji MYPT1 i lekkich łańcuchów miozyny. Potwierdza to naszą hipotezę, że PKGI α może być ważnym czynnikiem regulującym aparat kurczliwy w podocytach (**Publikacja 2.**). Sprawdziliśmy również wpływ nadtlenku wodoru na komórkowe rozmieszczenie PKGI α oraz na główne białka aparatu kurczliwego. Stwierdziliśmy, że w obecności nadtlenku wodoru zwiększa się ilość PKGI α w obszarze przybłonowym. Następuje również reorganizacja cytoszkieletu aktynowego. W obecności nadtlenku wodoru nie obserwuje się charakterystycznych dla aktyny filamentów (włókien naprężeniowych). Również zmienia się rozmieszczenie fosfatazy MYPT1. W podocycie rozmieszczona jest w postaci filamentów podobnych do aktyny, których również nie obserwujemy w obecności nadtlenku wodoru. Ponadto obserwujemy podobne komórkowe rozmieszczenie PKGI α i jej substratu po inkubacji z nadtlenkiem wodoru (**Publikacja 2.**).

Zaobserwowaliśmy również znaczny wzrost ilości białka MLC w podocytach inkubowanych w obecności wysokiego stężenia glukozy, przy równoczesnym istotnym spadku stopnia fosforylacji MLC w tym środowisku. Powyższe wyniki sugerują, że warunki wysokiego stężenia glukozy mogą promować rozkurcz aparatu kurczliwego podocytów (*Piwkowska i wsp., 2013*).

Następnie zbadaliśmy, czy insulina może również wpływać, poprzez aktywację PKGI α , na stopień fosforylacji miozyny, a tym samym regulować aparat kurczliwy komórek podocytarnych. W celu zbadania tej hipotezy komórki były inkubowane z insuliną w obecności lub bez inhibitora PKG. Inkubacja komórek podocytarnych z insuliną zwiększa ilość ufosforylowanej fosfatazy MYPT1 i zmniejsza ilość ufosforylowanej miozyny. Efekt ten jest zniesiony w komórkach preinkubowanych z inhibitorem PKGI (Rp-8-cGMPS) (**Publikacja 3.**). Powyższe eksperymenty wskazują, że insulina poprzez wzrost produkcji reaktywnych form tlenu bierze również udział, poprzez aktywację PKGI α , w regulacji aparatu kurczliwego komórek podocytarnych.

Z powyższych badań wynika, że w podocytach hodowanych w środowisku z wysokim stężeniem glukozy lub insuliny, gdzie obserwujemy gwałtowny wzrost ilości ROS, następuje spadek fosforylacji lekkich łańcuchów miozyny, co wydaje się być istotne dla zrozumienia funkcjonowania tych komórek w warunkach stresowych. Obniżenie fosforylacji MLC

wskazuje na rozkurcz aparatu kurczliwego, co może być przyczyną zanikania wypustek stopowatych i powiększenia szczelin filtracyjnych, a w konsekwencji utraty prawidłowej funkcji podocytów, skutkującej zwiększeniem przepuszczalności bariery filtracyjnej. Dlatego, bardzo ważnym etapem badań jest określenie roli PKGI α w regulacji przepuszczalności bariery filtracyjnej.

Rola kinazy białkowej G w regulacji przepuszczalności bariery filtracyjnej.

Ważnym etapem badań były badania funkcjonalne, sprawdzenie, czy aktywacja ścieżki sygnałowania zależnej od PKGI α wpływa na przepuszczalność bariery filtracyjnej.

W pierwszym etapie badań określiliśmy wpływ nadtlenu wodoru na przepuszczalność błony filtracyjnej utworzonej przez podocyty. W tym celu zbadaliśmy przepuszczalność albuminy znakowanej fluorescencyjnie (FITC-albumina) przez warstwę podocytów utworzoną na miękkiej nylonowej błonie, pokrytej kolagenem typu IV. Wykazaliśmy, że w obecności nadtlenu wodoru zwiększa się przepuszczalność bariery filtracyjnej (**Publikacja 2.**). Jako kontrolę pozytywną zastosowaliśmy puromycynę, która zwiększa przepuszczalność albumin w immortalizowanej linii mysich podocytów (*Hunt i wsp., 2005*).

Następnie zbadaliśmy wpływ aktywacji PKGI α na przepuszczalność albuminy. W tym celu użyliśmy nadtlenek wodoru, który zwiększa 5-krotnie przepuszczalność warstwy podocytów dla albuminy. Efekt ten jest znoszony w obecności inhibitora PKGI (Rp-8-cGMPS). Powyższe wyniki sugerują, że H₂O₂ zwiększa przepuszczalność bariery filtracyjnej utworzonej przez podocyty poprzez aktywację PKGI α (**Publikacja 2.**).

Kolejnym etapem badań było określenie, czy wzrost ROS w HG poprzez aktywację PKGI α może wpływać na przepuszczalność bariery filtracyjnej utworzonej z podocytów. Stwierdziliśmy, że w obecności wysokiej glukozy przepuszczalność dla albuminy zwiększa się już po pierwszym dniu inkubacji o 44,5% i wzrasta o 66,4% po pięciu dniach inkubacji. W obecności inhibitora oksydazy NAD(P)H (apocynina) lub kinazy G (Rp-8-Br-cGMP) obserwuje się istotne zmniejszenie przepuszczalności dla albuminy w obecności wysokich stężeń glukozy. Również zastosowanie wyciszenia ekspresji genów dla NOX4 i PKGI α potwierdziło powyższe zależności (**Publikacja 4.**).

Powyższe wyniki wskazują, że kinaza białkowa G typu I α , aktywowana przez reaktywne formy tlenu, jest ważnym czynnikiem regulującym aparat kurczliwy oraz przepuszczalność bariery filtracyjnej dla albuminy utworzonej przez podocyty. Długotrwała inkubacja

podocytów w środowisku z wysokim stężeniem glukozy, poprzez aktywację podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H, prowadzi do zwiększenia ilości ROS, które z kolei, poprzez aktywację kinazy białkowej G prowadzą do zwiększonej przepuszczalności błony filtracyjnej dla albuminy, którą tworzą te komórki.

Następnym etapem badań było określenie, czy wzrost reaktywnych form tlenu w obecności insuliny, poprzez aktywację podjednostki NOX4, może również wpływać na przepuszczalność bariery filtracyjnej utworzonej z podocytów. Stwierdziliśmy, że w obecności insuliny przepuszczalność dla albuminy zwiększa się o 79 %. Natomiast po wyciszeniu ekspresji genu dla NOX4 nie obserwuje się zwiększonej przepuszczalności po stymulacji komórek insuliną. Zatem to stymulacja podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H przez insulinę jest również odpowiedzialna za zwiększoną przepuszczalność bariery filtracyjnej utworzonej przez podocyty (**Publikacja 3.**).

Równoległe do badań nad przepuszczalnością albuminy przez warstwę podocytów zbadaliśmy wpływ reaktywnych form tlenu na przepuszczalność albuminy (P_{alb}) w izolowanych kłębuszkach nerkowych. Również, na tym modelu badawczym insulina zwiększała przepuszczalność dla albuminy. Efekt ten był zniesiony w obecności inhibitora NAD(P)H oksydazy (apocynina lub VAS2870). Podobny efekt obserwowaliśmy w kłębuszkach izolowanych od szczurów z genetycznie uwarunkowaną hiperinsulinemią oraz opornością na insulinę (szczury rasy Zucker). W kłębuszkach tych zaobserwowaliśmy zwiększoną ilość białka NOX4 i PKG1 α (**Publikacja 3.**). Inni autorzy wykazali, że model ten charakteryzuje się zwiększoną aktywnością oksydazy NAD(P)H (*Whaley-Connell i wsp., 2008*). Otrzymane wyniki potwierdzają zatem rolę reaktywnych formy tlenu w regulacji przepuszczalności bariery filtracyjnej.

Powyższe wyniki sugerują, że nadtlenek wodoru poprzez oksydacyjną aktywację kinazy białkowej G powoduje aktywację fosfatazy lekkich łańcuchów miozyny. Ta z kolei poprzez defosforylację lekkich łańcuchów miozyny jest odpowiedzialna za rozkurcz komórki podocytarnej, czego efektem końcowym jest zwiększona przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej dla albuminy. Ponadto, kluczową rolę w tym procesie odgrywa aktywacja podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H. Mechanizm ten może mieć kluczowe znaczenie w zwiększonej przepuszczalności filtru kłębuszkowego w stanach patologicznych przebiegających ze zwiększoną akumulacją wolnych rodników.

Literatura:

- Angielski, S., Jankowski, M., Anatomia i fizjologia nerek. W: Nefrologia. 2004, Lublin: Czelej.
- B.J. Goldstein, K. Mahadev, X. Wu, Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets, *Diabetes* 54 (2005) 311-321.
- Bergandi, L., Silvagno, F., Russo, I., Riganti, C., Anfossi, G., Aldieri, E., Ghigo, D., Trovati, M., Bosia, A., Insulin stimulates glucose transport via nitric oxide/cyclic GMP pathway in human vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2003. 23: p. 2215-2221.
- Burgoyne, J. R., Madhani, M., Cuello, F., Charles, R. L., Brennan, J. P., Schröder, E., Browning, D. D., Eaton, P., Cysteine Redox Sensor in PKGI α Enables Oxidant-Induced Activation. *Science*, 2007. 317: p. 1393-1397.
- Butt, E., Geiger, J., Jarchau, T., Lohmann, S. M., Walter, U., The cGMP-Dependent Protein Kinase - Gene, Protein, and Function. *Neurochemical Research*, 1993. 18(1): p. 27-42.
- Coward, R.J., Welsh, G.I., Yang, J., Tasman, C., Lennon, R., Koziell, A., Satchell, S., Holman, G.D., Kerjaschki, D., Tavaré, J.M., Mathieson, P.W., Saleem, M.A., The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action. *Diabetes*, 2005. 54: p. 3095-3102.
- Endlich, N., Kress, K. R., Reiser, J., Uttenweiler, D., Kriz, W., Mundel, P., Endlich, K., Podocytes Respond to Mechanical Stress In Vitro. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2001. 12: p. 413-422.
- Etgen, G.J. Jr, Fryburg, D.A., Gibbs, E.M., Nitric oxide stimulates skeletal muscle glucose transport through a calcium/contraction- and phosphatidylinositol-3-kinase-independent pathway. *Diabetes*, 1997. 46: p. 1915-1919.
- Faul, C., Asanuma, K., Yanagida-Asanuma, E., Kim, K., Mundel, P., Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *TRENDS in Cell Biology*, 2007. 17(9): p. 428-437.
- Francis, S. H., Busch, J. L., Corbin, J. D., cGMP-Dependent Protein Kinases and cGMP Phosphodiesterases in Nitric Oxide and cGMP Action. *Pharmacological Reviews*, 2010. 62(3): p. 525-563
- Greibe, S., Münzel, T., Kästner, S., Müller, B., Schollmeyer, P., Pavenstädt, H., NAD(P)H oxidase activity in cultured human podocytes: effects of adenosine triphosphate. *Kidney International*, 1998. 53: p. 654-663.
- Hofmann, F., Feil, R., Kleppisch, T., Schlossmann, J., Function of cGMP-Dependent Protein Kinases as Revealed by Gene Deletion. *Physiological Reviews*, 2006. 86: p. 1-2.
- Hunt, J.L., Pollak, M.R., Denker, B.M., Cultured podocytes establish a size-selective barrier regulated by specific signaling pathways and demonstrate synchronized barrier assembly in a calcium switch model of junction formation. *Journal of American Society Nephrology* 2005. 16: p. 1593-1602.
- Kim, E.Y., Anderson, M., Dryer, S.E., Insulin increases surface expression of TRPC6 channels in podocytes: Role of NADPH oxidases and reactive oxygen species. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2012. 302: p. F298-F307.

Kim, N.H., Rincon-Choles, H., Bhandari, B., Choudhury, G.G., Abboud, H.E., Gorin, Y., Redox dependence of glomerular epithelial cell hypertrophy in response to glucose. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2006. 290: p. F741-F751.

Kubiak, A., Niemir, Z. I., Znaczenie podocytów w prawidłowym funkcjonowaniu kłębuszka nerkowego oraz w patogenezie kłębuszkowych zapaleń nerek. Część I. Charakterystyka fenotypowa i czynność podocytów w okresie ich różnicowania się i dojrzałości. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 2006. 60: p. 248-258.

Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.F., Cormont, M., Ricort, J.M., Grémeaux, T., Grillo, S., From insulin receptor signalling to Glut 4 translocation abnormalities in obesity and insulin resistance. *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 1999. 19: p. 217-228.

Mahadev, K., Motoshima, H., Wu, X., Ruddy, J.M., Arnold, R.S., Cheng, G., Lambeth, J.D., Goldstein, B.J., The NAD(P)H oxidase homolog Nox4 modulates insulin-stimulated generation of H₂O₂ and plays an integral role in insulin signal transduction. 2004. *Molecular and Cellular Biology*, 24: p. 1844-1854.

Morton, M.J., Hutchinson, K., Mathieson, P.W., Witherden, I.R., Saleem, M.A., Hunter, M., Human podocytes possess a stretch-sensitive, Ca²⁺-activated K⁺ channel: potential implications for the control of glomerular filtration. *Journal of American Society of Nephrology*, 2004. 15: p. 2981-2987.

Myers, M.G. Jr, Backer, J.M., Sun, X.J., Shoelson, S., Hu, P., Schlessinger, J., Yoakim, M., Schaffhausen, B., White, M.F., IRS-1 activates phosphatidylinositol 3'-kinase by associating with src homology 2 domains of p85. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1992: 89: p. 10350-10354.

Nakamura, K., Koga, Y., Sakai, H., Homma, K., Ikebe, M., cGMP-Dependent Relaxation of Smooth Muscle Is Coupled With the Change in the Phosphorylation of Myosin Phosphatase. *Circulation Research*, 2007. 101: p. 712-722.

Pavenstädt, H., Kriz, W., Kretzler, M., Cell Biology of the Glomerular Podocyte. *Physiological Reviews*, 2003. 83: p. 253-307.

Piwkowska, A., Rogacka, D., Angielski, S., Jankowski, M. Hydrogen peroxide induces activation of insulin signaling pathway via AMP-dependent kinase in podocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2012, 428(1): p. 167-172.

Piwkowska, A., Rogacka, D., Audzeyenka, I., Kasztan, M., Angielski, S., Jankowski, M.; High glucose increases glomerular filtration barrier permeability through activation of protein kinase G type I alpha subunits. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2013. 28: p. 377-377.

Piwkowska, A., Rogacka, D., Jankowski, M., Angielski, S., Generation of reactive oxygen species by glomeruli and glomerular epithelial cells: influence of hyperglycemia and metformin. *Acta Biochimica Polonica*, 2009. 54(Suppl. 3): p. 203-203.

Piwkowska, A., Rogacka, D., Jankowski, M., Dominiczak, M.H., Stepieński, J.K., Angielski, S., Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010. 393(2): p. 268-273.

Rhee, S.G., Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science*, 2006. 312: p. 1882-1883.

Saleem, M. A., Zavadil, J., Bailly, M., McGee, K., Witherden, I. R., Pavenstadt, H., Hsu, H., Sanday, J., Satchell, S. C., Lennon, R., Ni, L., Bottinger, E. P., Mundel, P., Mathieson, P. W., The molecular

and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 2008. 295: p. F959-F970.

Sharma, R., Lovell, H. B., Wiegmann, T. B., Savin, V. J., Vasoactive Substances Induce Cytoskeletal Changes in Cultured Rat Glomerular Epithelial Cells. *Journal of the American Society of Nephrology*, 1992. 3: p. 1131-1138.

Smolenski, A., Burkhardt, A. M., Eigenthaler, M., Butt, E., Gambaryan, S., Lohmann, S. M., Walter, U., Functional analysis of cGMP-dependent protein kinases I and II as mediators of NO/cGMP effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1998. 358: p. 134-139.

Steiner, J.A., Carneiro, A.M., Wright, J., Matthies, H.J., Prasad, H.C., Nicki, C.K., Dostmann, W.R., Buchanan, C.C., Corbin, J.D., Francis, S.H., Blakely, R.D., cGMP-dependent protein kinase I α associates with the antidepressant-sensitive serotonin transporter and dictates rapid modulation of serotonin uptake. *Molecular Brain*, 2009. 2: p.26.

Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M., Mendelsohn, M. E., Regulation of Myosin Phosphatase by a Specific Interaction with cGMP-Dependent Protein Kinase I α . *Science*, 1999. 286.

Susztak, K., Raff, A.C., Schiffer, M., Böttinger, E.P., Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy. *Diabetes*, 2006. 55: p. 225-233.

Welsh, G.I., Hale, L.J., Eremina, V., Jeansson, M., Maezawa, Y., Lennon, R., Pons, D.A., Owen, R.J., Satchell, S.C., Miles, M.J., Caunt, C.J., McArdle, C.A., Pavenstädt, H., Tavaré, J.M., Herzenberg, A.M., Kahn, C.R., Mathieson, P.W., Quaggin, S.E., Saleem, M.A., Coward, R.J., Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cellular Metabolism*, 2010. 12: p. 329-340.

Whaley-Connell, A., DeMarco, V.G., Lastra, G., Manrique, C., Nistala, R., Cooper, S.A., Westerly, B., Hayden, M.R., Wiedmeyer, C., Wei, Y., Sowers, J.R., Insulin resistance, oxidative stress, and podocyte injury: role of rosuvastatin modulation of filtration barrier injury. *American Journal of Nephrology*, 2008. 28: p. 67-75.

Wu, X., Williams, K.J., NOX4 Pathway as a Source of Selective Insulin Resistance and Responsiveness. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2012. 32: p. 1236-1245.

Yuasa, K., Uehara, S., Nagahama, M., Tsuji, A., Transcriptional Regulation of cGMP-Dependent Protein Kinase II (cGK-II) in Chondrocytes. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2010. 74(1): p. 44-49.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Po ukończeniu kierunku biotechnologii na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej, w 2000 r rozpoczęłam studia doktoranckie w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem pana Profesora Edwarda Borowskiego. Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły jednego z istotnych problemów w klinicznej onkologii, jakim jest oporności wielolekowa nowotworów. Uzyskane wyniki badań były przedmiotem rozprawy doktorskiej pod tytułem „Modulatory białek ABC i antymetabolity w badaniach nad

opaniowaniem problemu oporności wielolekowej komórek nowotworowych”, którą obroniłam na Wydziale Lekarskim Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego w 2005 r. Wykazałam, że modyfikatory aktywności białek transportowych dla ksenobiotyków są związkami kompetycyjnymi w stosunku do stosowanych w klinice cytostatyków. Wyniki tych badań są przedmiotem międzynarodowego zgłoszenia patentowego (zał. 7). Ponadto, wyniki badań zostały umieszczone w siedmiu publikacjach w czasopismach o zasięgu międzynarodowym (zał. 5) znajdujących się na liście filadelfijskiej (w tym artykułu przeglądowego) i ośmiu doniesieniach kongresowych (zał. 7).

W trakcie studium doktoranckiego uczestniczyłam w szkoleniach, w wyniku których otrzymałam certyfikaty. Były to: V Międzynarodowa Konferencja Cytometrii w Ryniu, Gliwice Science Encounters, Molecular Biology in Cancer Research, “I Szkoły Cytometrii Przepływowej Becton Dickinson” Jadwisin. Brałam również udział w organizacji konferencji „8th International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy”, która odbyła się w Gdańsku. W trakcie trwania studium doktoranckiego byłam wykonawcą w trzech grantach KBN w tym grantu promotorskiego (zał. 7). Ponadto firma L’oreal przy wsparciu Polskiego Komitetu ds. UNESCO doceniając mój dorobek naukowy, przyznały mi stypendium w ramach konkursu „Kobiety Nauki 2003”.

W 2006 roku rozpoczęłam pracę w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN w Gdańsku. Główny nurt badań, prowadzonych w zespole dotyczy molekularnych podstaw zaburzeń funkcji komórek kłębuszka nerkowego w stanach patologicznych i czynników regulujących funkcję kłębuszka nerkowego. Tutaj rozpoczęłam badania dotyczące poznania roli kinazy białkowej G typu I alfa w regulacji kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Inne ważniejsze kierunki prowadzonych przeze mnie badań naukowych dotyczyły roli układu purynergicznego w regulacji filtracji kłębuszkowej oraz mechanizmu insulinooporności podocytów z uwzględnieniem przemian heksozamin, kinazy białkowej aktywowanej przez AMP oraz reaktywnych form tlenu.

Prowadzone w naszym zespole badania dotyczą jednego z najpoważniejszych powikłań cukrzycy, a mianowicie nefropatii cukrzycowej. Wyniki badań z ostatnich lat wskazują, że kluczową rolę w patomechanizmie glomerulopatii cukrzycowej odgrywa uszkodzenie struktury i zaburzenia funkcji komórek podocytarnych kłębuszka nerkowego. Komórki te odpowiadają za mechaniczne wzmocnienie bariery filtracyjnej kłębuszków, za syntezę i rozbudowę błony podstawnej oraz za syntezę błony szczelinowej i regulację filtracji kłębuszkowej. U diabetyków wszystkie te procesy są zaburzone, a strukturalne uszkodzenia

podocytów, błony podstawnej i błony szczelinowej są pierwszymi wykładnikami morfologicznymi rozwijającej się glomerulopatii. U podłoża przyczyn zaburzeń związanych z rozwojem nefropatii cukrzycowej znajdują się czynniki takie jak hiperglikemia oraz insulinooporność komórkowa. Jednym z proponowanych mechanizmów insulinooporności jest zwiększony przepływ napływającej do komórki glukozy przez szlak biosyntezy heksozamin (HBP), który odpowiada za powstawanie i przemiany glukozaminy (GlcN) w komórce. Stwierdziliśmy, że do mechanizmów desensytyzacji na działanie insuliny należą: wzrost poziomu białek modyfikowanych na drodze *O*-glikozylacji, spadku aktywności kinazy białkowej zależnej od AMP, obniżenie aktywności białek szlaku sygnałowania insulinowego: receptora insulinowego oraz kinazy PKB/Akt oraz wzrost poziomu fosfataz: PTP1B oraz PTEN (poz. 1., 12 wykaz publikacji, zał. 5).

Hiperglikemia charakteryzuje się również wzrostem generacji reaktywnych form tlenu. Wykazaliśmy, że metformina (lek przeciwcukrzycowy) w komórkach podocytarnych jest odpowiedzialna za zmniejszenie produkcji reaktywnych form tlenu, poprzez zahamowanie aktywności NAD(P)H oksydazy (poz. 13. wykaz publikacji, zał. 5). Stwierdziliśmy ponadto, że za mechanizm ten odpowiedzialny jest wzrost zewnątrzkomórkowego stężenia ATP (poz. 4. wykaz publikacji, zał. 5). Wykazaliśmy również, że kinaza białkowa AMP jest regulowana przez szlak sygnałowania zależny od receptorów purynowych oraz, że aktywacja kinazy AMPK jest odpowiedzialna za zmniejszoną produkcję reaktywnych form tlenu (poz. 9., 13 wykaz publikacji, zał. 5).

W trakcie pracy w Instytucie przyznano mi na prowadzone badania cztery granty w których jestem kierownikiem. W czterech kolejnych projektach jestem głównym wykonawcą (zał. 7). Efektem mojej pracy naukowej w IMDiK jest 14 publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej o łącznym IF = 40.831 (zał. 5) oraz 24 doniesień zjazdowych prezentowanych na krajowych (11) i międzynarodowych (13) zjazdach i sympozjach naukowych (zał. 7).

* w przypadku, gdy osiągnięciem tym jest praca/ prace wspólne, należy przedstawić oświadczenia wszystkich jej współautorów, określające indywidualny wkład każdego z nich w jej powstanie

Piwlowska