

Załącznik nr 2 do Wniosku  
o wszczęcie postępowania habilitacyjnego

**Dorota Rogacka**

**Autoreferat**

**Zespół Kliniczno-Badawczy  
Molekularnej i Komórkowej Nefrologii,  
Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. Mirosława Mossakowskiego  
Polskiej Akademii Nauk**

Gdańsk 2017

**1. Imię i Nazwisko:** Dorota Rogacka

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

1999 magister biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, promotor Prof. Jolanta Tarasiuk

2005 doktor nauk biologicznych, Wydział Biologii, Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego, promotor Prof. Jolanta Tarasiuk.

Tytuł rozprawy doktorskiej: „Przywracanie aktywności pirarubicyny w stosunku do komórek nowotworowych o oporności wielolekowej”

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

1999 – 2004 studia doktoranckie w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej

2007 asystent w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN

2007-2010 adiunkt w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

od 2011 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,**

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

Zgodnie z treścią w/w ustawy, osiągnięciem naukowym, dołączonym do wniosku o wszczęcie postępowania habilitacyjnego, jest cykl pięciu prac powiązanych tematycznie, objętych wspólnym tytułem:

**„Potencjalne mechanizmy indukcji insulinooporności komórek podocytnych  
kłębuszka nerkowego”**

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

- 1) **Rogacka D**, Piwkowska A, Jankowski M, Kocbuch K, Dominiczak MH, Stepieński JK, Angielski S. Expression of GFAT1 and OGT in podocytes: transport of glucosamine and the implications for glucose uptake into these cells. *Journal of Cellular Physiology* 2010; 225:577-84.

**IF = 3,986; KBN/MNiSW = 32**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i kierowaniu projektem badawczym, zaplanowaniu i wykonaniu większości doświadczeń, wykonaniu obliczeń i analizy statystycznej wyników, interpretacji wyników, przygotowaniu większości rycin, napisaniu manuskryptu a następnie dyskusji z recenzentami i edycji ostatecznej wersji manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 85%.*

- 2) Piwkowska A, **Rogacka D**, Jankowski M, Dominiczak MH, Stepieński JK, Angielski S. Metformin induces suppression of NAD(P)H oxidase activity in podocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2010; 393:268-73.

**IF = 2,595; KBN/MNiSW = 27**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu części doświadczeń i analizy statystycznej wyników, interpretacji wyników i współudziale w napisaniu manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 15%.*

- 3) 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; 428:167-72.

**IF = 2,406; KBN/MNiSW = 25**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, wykonaniu części doświadczeń i analizy statystycznej wyników, interpretacji wyników, współudziale w napisaniu manuskryptu i udziale w weryfikacji manuskryptu po recenzjach. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 25%.*

- 4) **Rogacka D**, Piwkowska A, Audzeyenka I, Angielski S, Jankowski M. Involvement of the AMPK-PTEN pathway in insulin resistance induced by high glucose in cultured rat podocytes. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* 2014; 51:120-30.

**IF = 4,046; KBN/MNiSW = 35**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i kierowaniu projektem badawczym, zaplanowaniu i wykonaniu większości doświadczeń, wykonaniu obliczeń i analizy statystycznej wyników, interpretacji wyników, przygotowaniu większości rycin, napisaniu manuskryptu a następnie dyskusji z recenzentami i edycji ostatecznej wersji manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 85%.*

- 5) **Rogacka D**, Piwkowska A, Audzeyenka I, Angielski S, Jankowski M. SIRT1-AMPK crosstalk is involved in high glucose-dependent impairment of insulin responsiveness in primary rat podocytes. *Experimental Cell Research* 2016; 349:328-38.

**IF = 3,546; KBN/MNiSW = 30**

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na: sformułowaniu hipotezy badawczej, zaplanowaniu i kierowaniu projektem badawczym, zaplanowaniu i wykonaniu większości doświadczeń, wykonaniu obliczeń i analizy statystycznej wyników, interpretacji wyników, przygotowaniu większości rycin, napisaniu manuskryptu a następnie dyskusji z recenzentami i edycji ostatecznej wersji manuskryptu. Mój indywidualny udział w autorstwie pracy szacuję na 85%.*

Prace te zostały opublikowane w latach 2010-2016, po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych, w recenzowanych czasopismach znajdujących się w bazie Journal Citation Reports (JCR).

Sumaryczny IF w/w prac wynosi **16,579**; (KBN/MNiSW: **149** punktów).

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

Insulina pełni kluczową rolę w utrzymaniu integralności kłębuszkowej bariery filtracyjnej. W komórkach podocytarnych kłębuszka nerkowego z zaburzoną sygnalizacją insulinową rozwijają się cechy charakterystyczne dla zmian obserwowanych w nefropatii cukrzycowej. Wyjaśnienie mechanizmów indukcji insulinooporności podocytów może mieć kluczowe znaczenie dla zrozumienia zaburzeń struktury i funkcji tych komórek oraz całych kłębuszków nerkowych, a w konsekwencji nerek w cukrzycy.

**Wprowadzenie**

Nefropatia cukrzycowa jest jedną z głównych przyczyn niewydolności nerek (Xue *i wsp.*, 2017). Do skrajnej postaci niewydolności dochodzi u około 40% pacjentów chorych na cukrzycę typu 1 i u około 30% pacjentów chorych na cukrzycę typu 2. Wiąże się to z koniecznością dializoterapii lub przeszczepu nerek (Sharma *i wsp.*, 2017). Nasza wiedza o przyczynach i mechanizmach tej postaci nefropatii jest wciąż bardzo ograniczona. Pierwszym objawem rozwoju glomerulopatii cukrzycowej są zaburzenia filtracji kłębuszkowej i mikroalbuminuria. Na początku lat osiemdziesiątych wykazano istnienie zależności pomiędzy wielkością dawki insuliny i ilością glukozy przemieszczanej z krwi do tkanek, a nasileniem albuminurii (Mogensen *i wsp.*, 1980).

Wiele badań klinicznych i eksperymentalnych wskazuje na istnienie ścisłego związku pomiędzy występowaniem glomerulopatii cukrzycowej a uszkodzeniem struktury i zaburzeniami funkcji komórek podocytarnych kłębuszka nerkowego (Quaggin, 2007). Kłębuszek nerkowy jest wysoce zróżnicowanym organellum wchodzącym w skład nefronu, podstawowej jednostki funkcjonalnej i strukturalnej nerek. Tworzy go kulista wiązka kapilar otoczona torebką Bowmana (średnica kłębuszka u człowieka wynosi 100-280  $\mu\text{m}$ ). Od strony swojego światła naczynia włosowate pokryte są komórkami śródbłonna okienkowego, natomiast od strony światła torebki Bowmana warstwą wyspecjalizowanych komórek nabłonkowych – podocytów (Samuel *i wsp.*, 2007). W prawidłowych warunkach przenikaniu białek do moczu zapobiega selektywne działanie bariery filtracyjnej, utworzonej przez komórki śródbłonna naczyń włosowatych, błonę podstawną (GBM, *ang. glomerular basement membrane*) oraz warstwę podocytów. Podocyty zbudowane są z trzech morfologicznie i funkcjonalnie różnych segmentów: ciała komórki, wyrostków głównych i wyrostków stopowatych (Pavenstadt *i wsp.*, 2003). Wyrostki główne wyrastają z ciała komórki, a następnie rozgałęziają się w wyrostki stopowate bogate w aktynę, będącą

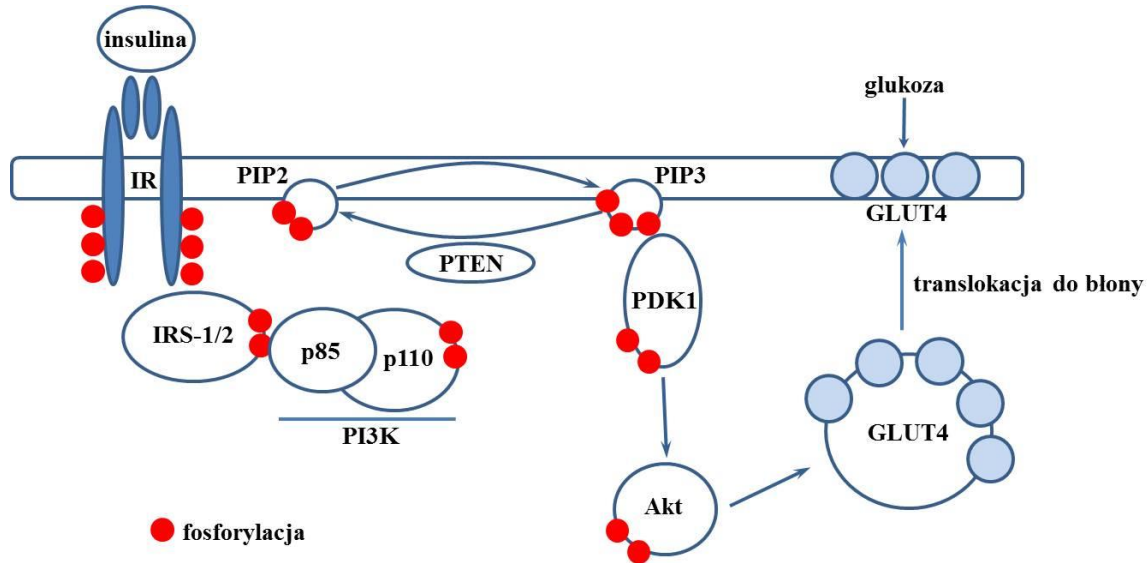
podstawą wysoce zorganizowanego szkieletu komórkowego. Sąsiadujące ze sobą wyrostki, zakotwiczone za pośrednictwem integrzyn  $\alpha\beta 1$  oraz dystroglikanów w błonie podstawnej, są przedzielone szczelinami filtracyjnymi szerokości 20–30 nm, których brzegi łączy błona szczelinowa (SD, *ang. slit diaphragm*), przepuszczalna dla wody i małych molekuł, nie przepuszczająca większych białek, w tym albuminy, stanowiąca najważniejszy element bariery filtracyjnej (Lennon *i wsp.*, 2014). Zlepianiu się leżących obok siebie wyrostków stopowatych zapobiega ujemnie naładowany „płaszcz” proteoglikanów, głównie podokaliksyny – białka bogatego w kwas sialowy. W błonach szczelinowych występuje wiele białek, m.in. P-kadheryna (Reiser *i wsp.*, 2000), nefryna (Ruotsalainen *i wsp.*, 1999), podocyna (Schwarz *i wsp.*, 2001) i białko Neph1 (Barletta *i wsp.*, 2003), dodatkowo zidentyfikowano również kilka białek tworzących połączenia ścisłe (TJ, *ang. tight junctions*) takie jak okludyna i białko ZO-1 (Fukasawa *i wsp.*, 2009). Głównym białkiem strukturalnym błony szczelinowej jest nefryna, umocowana w tratwęce plazmatycznej wypustek. Jej fragment pozakomórkowy tworzy sieć homo- i heterofilowych połączeń, natomiast fragmenty przezbłonowe łańcucha nefryny przechodząc do wnętrza ciała wyrostków stopowatych ściśle kontaktują się z rozbudowanym szkieletem komórkowym podocytów, tworząc system receptorowy, którym podocyt odbiera bodźce generowane przez siły hydrostatyczne wymuszające proces filtracji kłębuszkowej. Te same siły prowadzą do ekspansji światła kapilary kłębuszkowej, a podocyty przeciwstawiają się im zintegrowanym systemem błon szczelinowych i cytoszkieletu. Obecność nefryny w podocycie jest również niezbędna do stymulacji transportu glukozy przez insulinę (Coward *i wsp.*, 2007). W przeciwieństwie do pozostałych komórek kłębuszka podocyty, podobnie jak neurocyty, nie są zdolne do proliferacji i odnawiania swojej populacji, stanowią więc najbardziej wrażliwy na uszkodzenia element kłębuszka. Zmiany patologiczne w nerkach pacjentów chorych na cukrzycę dotyczą zanikania wypustek podocytów oraz zmniejszenia liczby tych komórek, co prowadzi do utraty szczelności filtra kłębuszkowego dla białek (Lin *i Susztak*, 2016). Do uszkodzenia podocytów może dochodzić pod wpływem różnych czynników, jak wysokie stężenie glukozy, stres oksydacyjny, czy stres mechaniczny wywołany pulsacyjnymi zmianami ciśnienia wewnątrzkapilarnego. Ilość podocytów w moczu koreluje ze stopniem rozwoju zaburzeń filtracji kłębuszkowej i funkcji nerek (Wolf *i wsp.*, 2005).

Głównym substratem fizjologicznym podocytów jest glukoza. W komórkach tych stwierdzono obecność białek transportujących z rodziny GLUT (GLUT1-4 oraz GLUT8) (Lewko *i wsp.*, 2005; Schiffer *i wsp.*, 2005; Wasik *i wsp.*, 2014), które przemieszczają glukozę na drodze dyfuzji ułatwionej zgodnie z gradientem jej stężeń, oraz sodozależnego

kotransporteru SGLT1, który transportuje glukozę wbrew gradientowi jej stężeń (Lewko *i wsp.*, 2005; Lewko *i Stepinski*, 2009). W podocytach zidentyfikowano również białko GLUT5 będące nośnikiem fruktozy GLUT5 (Wang *i wsp.*, 2015). Większość białek GLUT2 i GLUT4 zlokalizowano w wewnątrzkomórkowych przedziałach podocytów, co sugeruje, że komórki te posiadają wysoki potencjał, aby znacząco zwiększyć ilość cząsteczek transporterów glukozy na swojej powierzchni i adaptować poziom dokomórkowego transportu glukozy do warunków, w których się znajdują. Szacuje się, że 80% transportu glukozy do podocytów odbywa się na drodze dyfuzji ułatwionej poprzez nośniki glukozy, natomiast pozostałe 20% glukozy jest transportowane przez białko SGLT1 (Lewko *i wsp.*, 2005). W ostatnich latach wykazano, że podocyty są komórkami wrażliwymi na działanie insuliny (Coward *i wsp.*, 2005; Lewko *i wsp.*, 2005). Insulina w sposób bezpośredni oddziałuje na te komórki, uruchamiając w nich różne ścieżki sygnałowe i prowadząc m.in. do dynamicznych zmian w cytoszkieletcie aktywnym. Wykazano, że insulina pełni kluczową rolę w utrzymaniu integralności kłębuszkowej bariery filtracyjnej, a nieprawidłowości w transdukcji sygnału tego hormonu prowadzą do rozwoju cech charakterystycznych dla zmian obserwowanych w nefropatii cukrzycowej (Welsh *i wsp.*, 2010).

Insulina zwiększa dokomórkowy transport i metabolizm glukozy (Pessin *i Saltiel*, 2000). Schemat 1. przedstawia drogę sygnałowania uruchomioną w komórce po związaniu insuliny do jej receptora (IR). Receptor insulinowy (IR) jest heterotetramerycznym białkiem złożonym z dwóch podjednostek  $\alpha$  oraz dwóch podjednostek  $\beta$ , które są połączone wiązaniem dwusiarczkowym w kompleks  $\alpha_1\alpha_2-\beta_1\beta_2$ . Insulina wiąże się ze zlokalizowaną pozakomórkowo podjednostką  $\alpha$  receptora i przekazuje sygnały przez błonę komórkową, prowadząc do aktywacji kinazy tyrozynowej znajdującej się w obrębie C-końcowej domeny podjednostki  $\beta$ . Wskutek związania insuliny z IR dochodzi do wielu jego wewnątrzcząsteczkowych transfosforylacji. Autofosforylacja reszt tyrozynowych IR indukuje aktywność katalityczną kinazy tyrozynowej receptora, co prowadzi do rekrutacji białek IRS (*ang. insulin receptor substrate*): IRS-1 i IRS-2 oraz aktywacji 3-kinazy fosfatidyloinozytolu (PI3K), która generuje powstawanie w błonie cytoplazmatycznej 3,4,5-trójfosforanu fosfatidyloinozytolu (PIP<sub>3</sub>) aktywując za jego pośrednictwem kinazę PDK1, która z kolei fosforyluje kinazę Akt. Kinaza Akt odgrywa kluczową rolę we włączaniu transporterów glukozy GLUT4 na drogę sygnałowania insuliny, poprzez translokację tych transporterów ze zlokalizowanych w cytosolu błonowych pęcherzyków na powierzchnię komórki docelowej, w celu ułatwienia dokomórkowego transportu glukozy (Deshmukh, 2016). Negatywnym

regulatorem aktywności szlaku sygnałowania insulinowego jest fosfataza białkowo-lipidowa PTEN, która specyficznie defosforyluje PIP<sub>3</sub> do 3,4-dwufosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP<sub>2</sub>) działając przeciwnie wobec ścieżki PI3K/Akt (Vanhaesebroeck *i wsp.*, 2012).



**Schemat 1. Sygnałowanie insuliny.** Związanie się insuliny do jej receptora prowadzi do translokacji GLUT4 do błony cytoplazmatycznej w celu ułatwienia dokomórkowego transportu glukozy.

Jednym z kluczowych czynników sprawczych w patogenezie cukrzycy typu 2, która charakteryzuje się przewlekłą hiperglikemią, jest insulinooporność, której towarzyszy wzrost aktywności kilku szlaków metabolicznych, m.in. szlaku biosyntezy heksozamin i polioliolowego, aktywacja kinazy białkowej C (PKC), transformującego czynnika wzrostu  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), układu renina-angiotensyna-aldosteron (RAAS), zwiększona produkcja zaawansowanych produktów glikacji (AGEs, ang. *advanced glycation end products*), nadprodukcja reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*), a także aktywacja odpowiedzi białek nieufałdowanych (UPR, ang. *unfolded protein response*), mającej na celu złagodzenie stresu retikulum endoplazmatycznego (Samuel *i Shulman*, 2012). Wykazano, że stres oksydacyjny indukowany w komórkach wskutek utrzymującej się w cukrzycy hiperglikemii może wynikać ze wzrostu aktywności enzymów zaangażowanych w generowanie ROS, co może zaburzać równowagę oksydoredukcyjną w komórce (Rains *i Jain*, 2011). Indukcja insulinooporności w cukrzycy może również wynikać z zaburzeń na poziomie ścieżek związanych z metabolizmem glukozy, pełniących w komórce funkcję czujników stanu energetycznego komórki, regulowanych napływem substancji odżywczych, takich jak ścieżka regulowana przez AMP-zależną kinazę białkową (AMPK) (Towler *i Hardie*, 2007), czy białkową deacetylazę SIRT1 (Sun *i wsp.*, 2007), które odpowiadają za



właściwą odpowiedź metaboliczną komórki na zmieniające się stężenie składników odżywczych, w tym również na warunki stresowe (ich niedobór lub nadmiar).

Nasze badania wykazały, że wskutek długotrwałej ekspozycji komórek podocytnych kłębuszka nerkowego na wysokie stężenie glukozy (HG) w komórkach tych dochodzi do indukcji insulinooporności, przejawiającej się zniesieniem stymulującego efektu insuliny na dokomórkowy transport glukozy (*Publikacja 4. z cyklu prac*) oraz powoduje wzrost przepuszczalności dla albuminy przez warstwę filtracyjną wytworzoną przez te komórki (Piwkowska *i wsp.*, 2014). Podjęliśmy badania mające na celu wyjaśnienie potencjalnych mechanizmów indukcji insulinooporności w podocytach hodowanych w środowisku HG, co może mieć istotne znaczenie dla zrozumienia zaburzeń struktury i funkcji tych komórek w cukrzycy. Nasza hipoteza badawcza zakładała, że nadmiar glukozy może prowadzić do zaburzeń aktywności szlaków regulowanych dokomórkowym napływem substancji odżywczych i zaangażowanych w regulację homeostazy glukozy, a w konsekwencji do uniewrażliwienia podocytów na działanie insuliny. Wykazaliśmy, że insulinooporności podocytów towarzyszy zmniejszenie stopnia fosforylacji AMPK będącej miarą aktywności tego enzymu (*Publikacja 4. z cyklu prac*) oraz redukcja ilości białka i aktywności enzymatycznej deacetylazy SIRT1 (*Publikacja 5. z cyklu prac*). Wykazaliśmy również, że do indukcji insulinooporności w podocytach może dochodzić wskutek potencjalnego wzrostu przepływu substratów przez szlak biosyntezy heksozamin (*Publikacja 1. z cyklu prac*).

### **AMP-zależna kinaza białkowa**

Powszechnie występująca w komórkach ssaków serynowo-treoninowa kinaza białkowa AMPK, pełni rolę głównego czujnika stanu energetycznego komórki, który wzmaga dokomórkowy napływ glukozy i aktywuje ścieżki metaboliczne mające na celu „oszczędzanie” energii. AMPK ulega aktywacji gdy w komórce wzrasta stosunek AMP/ATP. Enzym ten składa się z trzech podjednostek: katalitycznej podjednostki  $\alpha$  i podjednostek regulatorowych  $\beta$  i  $\gamma$ , występujących w kilku izoformach (Carling, 2004). Jedna z izoform podjednostki katalitycznej enzymu – AMPK $\alpha$ 1 jest szeroko rozpowszechniona w tkankach, podczas gdy druga izoforma – AMPK $\alpha$ 2 występuje głównie w komórkach mięśni szkieletowych, serca i wątroby. Obecność obu podjednostek AMPK $\alpha$  wykazaliśmy również w podocytach (*Publikacja 4. z cyklu prac*). AMPK $\beta$  występuje w dwóch izoformach ( $\beta$ 1 i  $\beta$ 2), przy czym forma  $\beta$ 2 zlokalizowana jest przede wszystkim w mięśniach szkieletowych. W bezpośrednie interakcje wchodzi podjednostki  $\alpha$  i  $\beta$  oraz  $\beta$  i  $\gamma$ , podczas gdy nie

stwierdzono takich oddziaływań pomiędzy podjednostką  $\alpha$  i  $\gamma$ . Wydaje się zatem, że podjednostka  $\beta$  służy jako rusztowanie pomiędzy podjednostkami  $\alpha$  i  $\gamma$ . W komórkach ssaków podjednostka  $\gamma$  jest niezbędna dla aktywności katalitycznej enzymu. Zidentyfikowano trzy izoformy podjednostki  $\gamma$ : wszystkie charakteryzują się wysokim stopniem homologii sekwencji aminokwasowej. AMPK jest aktywowana wskutek fosforylacji podjednostki  $\alpha$  na Thr<sup>172</sup>, gdy w komórce wzrasta stosunek AMP do ATP. Proces ten jest regulowany przez nadrzędną wobec AMPK kinazę serynowo-treoninową LKB1 (Woods *i wsp.*, 2003). Aktywność AMPK jest regulowana również przez inne nadrzędne kinazy, jak kinaza  $\beta$  kinazy białkowej zależnej od wapnia i kalmoduliny (CaMKK $\beta$ ) oraz kinaza aktywowana transformującym czynnikiem wzrostu  $\beta$  (TAK1) (Viollet *i Andreelli*, 2011).

Wykazano, że zastosowanie aktywatora AMPK jakim jest 5-aminoimidazolo-4-karboksyamido-1 $\beta$ -D-rybofuranosyd (AICAR) redukuje zaburzenia metaboliczne i obniża ciśnienie krwi u szczurów charakteryzujących się insulinoopornością, co sugeruje ważną rolę AMPK w regulacji wrażliwości na insulinę (Iglesias *i wsp.*, 2002). W adipocytach AMPK wpływa na transport glukozy poprzez zwiększanie translokacji GLUT4 do błony komórkowej. W obecności AICAR transport glukozy do tych komórek jest porównywalny do transportu obserwowanego po stymulacji insuliną (Yamaguchi *i wsp.*, 2005). Aktywacja AMPK za pomocą AICAR zwiększa również wrażliwość komórek mięśniowych na insulinę (Fryer *i wsp.*, 2002). Farmakologiczna aktywacja AMPK może więc stwarzać potencjalne możliwości terapii cukrzycy, co potwierdzono w badaniach, w których zastosowano myszy ze znokautowanym genem AMPK (AMPK  $\alpha 1^{-/-}$  i  $\alpha 2^{-/-}$ ), u których stwierdzono insulinooporność (Viollet *i wsp.*, 2003). Innym znanym aktywatorem AMPK jest metformina (MTF), dimetylowa pochodna biguanidu powszechnie stosowana w leczeniu cukrzycy typu 2. Metformina stymuluje zależny od insuliny transport glukozy do tkanek obwodowych, jak mięśnie szkieletowe i tkanka tłuszczowa (Zou *i wsp.*, 2004).

### **Rola reaktywnych form tlenu w regulacji aktywności AMPK w komórkach podocytarnych**

Jednym z głównych czynników mających swój udział w powikłaniach cukrzycowych jest stres oksydacyjny (Forbes *i wsp.*, 2008). Wskutek utrzymującej się w cukrzycy hiperglikemii wzrasta aktywność enzymów zaangażowanych w generowanie ROS. Sugeruje się, że nadprodukcja ROS jest jednym z czynników inicjujących i podtrzymujących rozwój nefropatii cukrzycowej. Głównym wewnątrzkomórkowym źródłem ROS jest wielopodjednostkowy kompleks oksydazy NAD(P)H, który katalizuje powstawanie rodnika

nadtlenowego ( $O_2^{\bullet}$ ) poprzez jednoelektronową redukcję tlenu z udziałem NADPH lub NADH jako donora elektronów. Powstający  $O_2^{\bullet}$  ulega reakcji dysmutacji do  $H_2O_2$  i tlenu cząsteczkowego. W skład oksydazy NAD(P)H wchodzi dwie błonowe podjednostki: p22<sup>phox</sup> i gp91<sup>phox</sup> (Nox2) oraz tworzące kompleks białka cytozolowe p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> i p40<sup>phox</sup>. Zidentyfikowano 6 homologów oksydazy NAD(P)H (Nox1, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 i Duox2), które różnią się budową podjednostki gp91<sup>phox</sup> (Nox2) oraz składem pozostałych podjednostek. W nerkach stwierdzono występowanie podjednostek Nox1, Nox2 i Nox4, z dużą przewagą ilościową Nox4, która odgrywa istotną rolę w sygnałowaniu insuliny (Goldstein *i wsp.*, 2005).

Wyniki naszych badań, w których zastosowane zostały inhibitory różnych enzymów zaangażowanych w produkcję ROS (rotenon, apocynina, *N*-acetylocysteina) potwierdziły, że również w podocytach głównym źródłem ROS jest oksydaza NAD(P)H (**Publikacja 2. z cyklu prac**). Wykazaliśmy, że już po krótkotrwałej ekspozycji podocytów na wysokie stężenia glukozy aktywność oksydazy NAD(P)H wzrasta o 117%, a produkcja ROS o 27%. Maksymalny wzrost ilości ROS obserwowano po piątym dniu inkubacji (długotrwała ekspozycja) (Piwkowska *i wsp.*, 2011). Krótkotrwała ekspozycja na HG nie powoduje zmian w aktywności AMPK mimo wzrostu aktywności oksydazy NAD(P)H i ilości ROS (**Publikacja 2. z cyklu prac**), natomiast po długotrwałej ekspozycji podocytów na HG aktywność AMPK maleje o 25% z towarzyszącym zniesieniem stymulującego efektu insuliny na dokomórkowy transport glukozy (**Publikacja 4. z cyklu prac**). Otrzymane wyniki sugerują, że po krótkotrwałej ekspozycji na środowisko HG w podocytach obserwowane są pierwsze przejawy stresu oksydacyjnego, natomiast dopiero nasilenie tych przejawów wskutek długotrwałej hiperglikemii w konsekwencji mogą prowadzić do zmian w aktywności AMPK zaangażowanej w regulację wrażliwości podocytów na działanie insuliny. Aby zbadać zależność pomiędzy aktywnością AMPK a aktywnością oksydazy NAD(P)H zastosowaliśmy metforminę. Wykazaliśmy, że MTF działa antyoksydacyjnie zmniejszając produkcję ROS wskutek obniżenia aktywności oksydazy NAD(P)H. Preinkubacja z MTF prowadzi do zmniejszenia aktywności tego enzymu o 36% w warunkach kontrolnych, oraz o 86% w komórkach hodowanych w warunkach hiperglikemicznych (**Publikacja 2. z cyklu prac**). Aktywność AMPK pod wpływem MTF wzrasta o 70% w komórkach kontrolnych, podczas gdy w komórkach inkubowanych przez dwie godziny w środowisku HG zaobserwowano 15% wzrost stopnia fosforylacji tego enzymu. Otrzymane wyniki wykazują zatem, że aktywności AMPK i oksydazy NAD(P)H w podocytach są ze sobą powiązane, a antyoksydacyjny efekt metforminy wynika przede wszystkim ze zdolności tego związku do aktywacji AMPK.

Hamującego efektu MTF na aktywność oksydazy NAD(P)H nie stwierdzono w komórkach inkubowanych w obecności inhibitora AMPK (związku C, CC) (**Publikacja 2. z cyklu prac**).

Reaktywne formy tlenu nie są jedynie zbędnym i szkodliwym produktem ubocznym metabolizmu tlenowego w komórce, jak były postrzegane przez wiele lat. Są one aktywatorami wielu procesów komórkowych oraz pełnią rolę przekaźników w obrębie różnych ścieżek sygnałowania komórkowego. Również aktywność AMPK może być regulowana przez ROS (Emerling *i wsp.*, 2009). Wpływ reaktywnych form tlenu na aktywność AMPK w podocytach zbadaliśmy inkubując komórki w obecności H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Publikacja 3. z cyklu prac**). W warunkach fizjologicznych nadtlenek wodoru jest ważną cząsteczką sygnałową w komórkach. Powstaje z rodnika nadtlenowego w reakcji katalizowanej przez dysmutazę ponadtlenową, jest jednak cząsteczką dużo bardziej stabilną i jako elektrycznie obojętna może łatwiej dyfundować przez błonę cytoplazmatyczną (Rhee, 2006). Wykazaliśmy, że H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bierze udział w regulacji ścieżki sygnałowania insulinowego w podocytach w sposób zależny od AMPK (**Publikacja 3. z cyklu prac**). Stopień fosforylacji AMPK zwiększa się wraz ze wzrostem czasu inkubacji podocytów z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (do dziesiątej minuty). Po 3 minutach inkubacji aktywność AMPK wzrosła o 78%, po 5 minutach o 107% i po 10 minutach o 244%. Do indukowanej H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aktywacji AMPK nie dochodzi w obecności CC. Wykazaliśmy, że H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zwiększa stopień fosforylacji receptora insulinowego (IR) o 276%, oraz wzmacnia aktywujący efekt insuliny (wzrost fosforylacji IR o 113%) powodując wzrost fosforylacji receptora o dodatkowe 314%. Inhibitor AMPK zmniejsza stymulujący wpływ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na fosforylację IR oraz zapobiega aktywacji IR przez insulinę, co sugeruje, że efekt nadtlenu wodoru na ścieżkę zależną od insuliny jest zależny od AMPK. AMPK reguluje transport glukozy w wielu typach komórek, jak komórki mięśniowe (Fryer *i wsp.*, 2002), adipocyty (Yamaguchi *i wsp.*, 2005) oraz neurony (Patel *i wsp.*, 2011). Nasze badania pokazały, że również w podocytach enzym ten odgrywa kluczową rolę w regulacji wychwytu glukozy (**Publikacje 3., 4. i 5. z cyklu prac**). Pod wpływem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dokomórkowy transport glukozy wzrasta o 47%, a efekt ten nie występuje w obecności inhibitora AMPK (**Publikacja 3. z cyklu prac**). W badaniach, w których zastosowana została MTF (**Publikacja 4. z cyklu prac**) oraz inny znany aktywator AMPK – resweratrol (RSV) (**Publikacja 5. z cyklu prac**) również wykazaliśmy AMPK-zależny wzrost transportu glukozy do podocytów.

### **AMPK-zależna regulacja aktywności szlaku sygnałowania insulinowego w podocytach hodowanych w obecności wysokiego stężenia glukozy**

Długotrwała ekspozycja podocytów na wysokie stężenia glukozy powoduje spadek aktywności AMPK o 25%, której towarzyszy zniesienie stymulującego efektu insuliny na dokomórkowy transport glukozy do podocytów (*Publikacja 4. z cyklu prac*). Powstało pytanie w którym miejscu szlaku sygnałowania insuliny dochodzi do zaburzeń wskutek ekspozycji podocytów na wysokie stężenia glukozy. Zbadaliśmy stopień fosforylacji receptora insulinowego oraz kinazy Akt w komórkach kontrolnych oraz inkubowanych w obecności insuliny. Stwierdziliśmy, że wysokie stężenie glukozy powoduje obniżenie fosforylacji IR i Akt w podocytach, odpowiednio o 34 i 14%. W komórkach kontrolnych insulina powoduje wzrost fosforylacji IR o 104%, a kinazy Akt o 32%. Mimo obniżenia fosforylacji IR w komórkach inkubowanych w środowisku HG, efekt insuliny na fosforylację IR nie jest zniesiony (zaobserwowano wzrost o 140%), podczas gdy zależny od insuliny wzrost fosforylacji Akt po ekspozycji na wysokie stężenie glukozy jest zahamowany. Otrzymane wyniki sugerują zatem, że do zmian na szlaku sygnałowania insulinowego w podocytach eksponowanych na środowisko HG dochodzi w miejscu zlokalizowanym dystalnie wobec receptora insulinowego (*Publikacja 4. z cyklu prac*). Aby zbadać, czy w regulacji aktywności szlaku insulinowego w podocytach eksponowanych na wysokie stężenia glukozy zaangażowana jest AMPK, zbadaliśmy stopień fosforylacji tego enzymu w obecności insuliny i wykazaliśmy, że w komórkach kontrolnych insulina powoduje wzrost aktywności AMPK o 47%, natomiast po długotrwałej ekspozycji na HG efekt ten jest zniesiony. Istotnym celem badań było więc określenie, czy AMPK może wpływać na aktywność ścieżki PI3K/Akt w podocytach. Zbadaliśmy ilość białka fosfatazy PTEN i wykazaliśmy, że pod wpływem wysokiego stężenia glukozy poziom białka PTEN w podocytach jest większy o 45%, co może prowadzić do osłabienia aktywności ścieżki PI3K/Akt, a w konsekwencji do zaburzenia transdukcji sygnału insuliny. Po zastosowaniu modulatorów AMPK stwierdzono, że po aktywacji AMPK metforminą (wzrost fosforylacji AMPK o 35% w normo- i o 88% w hiperglikemii) ilość białka PTEN maleje o 31% w komórkach kontrolnych i o 64% w komórkach hodowanych w środowisku HG. W obecności inhibitora AMPK ilość białka PTEN w komórkach kontrolnych rośnie o 26%, nie stwierdzono natomiast dodatkowego wzrostu poziomu białka PTEN w komórkach eksponowanych na HG w obecności CC. W podocytach wykazaliśmy obecność mRNA i białek podjednostek AMPK $\alpha$ 1 i AMPK $\alpha$ 2. Po wyciszeniu ekspresji genów kodujących

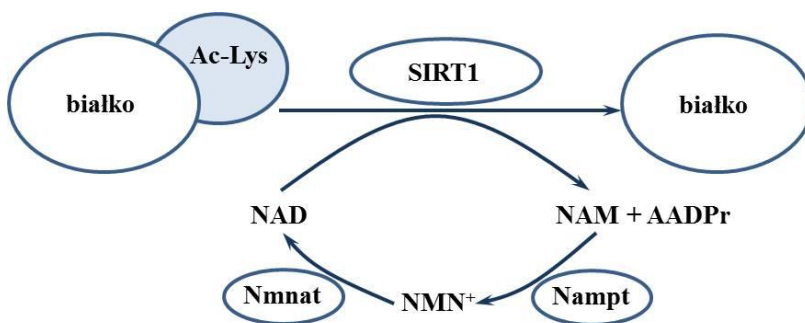
białka tych podjednostek za pomocą odpowiednich wyciszających RNA (siRNA) potwierdziliśmy, że zmiana ilości białka PTEN w podocytach jest zależna od AMPK. Po transfekcji ilość białka podjednostki AMPK $\alpha$ 1 jest mniejsza o 50% a podjednostki AMPK $\alpha$ 2 o 45%. W podocytach transfekowanych siRNA AMPK $\alpha$ 1 ilość białka PTEN zwiększa się o 26%, a siRNA AMPK $\alpha$ 2 o 25%, podczas gdy transfekcja komórek kontrolnym siRNA nie ma wpływu na poziom PTEN (*Publikacja 4. z cyklu prac*).

W podocytach hodowanych w warunkach normoglikemicznych insulinozależny transport glukozy wzrasta o 50% (*Publikacje 4. i 5. z cyklu prac*). Wykazaliśmy, że efekt insuliny na dokomórkowy transport glukozy zależy od ścieżki AMPK-PTEN (*Publikacja 4. z cyklu prac*). W utrzymaniu stymulującego działania insuliny na dokomórkowy transport glukozy zaangażowane są obie izoformy katalitycznej podjednostki AMPK: AMPK $\alpha$ 1 i AMPK $\alpha$ 2, co wykazaliśmy wyciszając ekspresję ich genów. Wyciszenie ekspresji genu już jednej z podjednostek znosi efekt insuliny na dokomórkowy transport glukozy, podczas gdy w komórkach transfekowanych kontrolnym siRNA, transport glukozy pod wpływem insuliny wzrasta o 50%. Wykazaliśmy również, że po wyciszeniu ekspresji genu *PTEN* podocyty eksponowane na wysokie stężenia glukozy zachowują wrażliwość na działanie insuliny. Ilość białka PTEN wskutek transfekcji była zmniejszona o 45% w komórkach hodowanych w normoglikemii i o 49% w komórkach hodowanych w środowisku HG. W podocytach transfekowanych kontrolnym siRNA a następnie inkubowanych w obecności HG insulina nie stymuluje transportu glukozy, natomiast w komórkach z wyciszoną ekspresją genu *PTEN* wzrost transportu glukozy pod wpływem insuliny wynosi 37% (*Publikacja 4. z cyklu prac*). Otrzymane wyniki wykazują, że ścieżka AMPK-PTEN zaangażowana jest w regulację szlaku sygnałowania insulinowego i wrażliwości podocytów na działanie insuliny, a zaburzenia tego oddziaływania mogą przyczyniać się do indukcji insulinooporności tych komórek.

Wrażliwość na insulinę w wielu typach komórek, jak adipocyty, hepatocyty czy komórki mięśniowe, jest regulowana również aktywnością enzymu deacetylazy SIRT1, która odpowiada za właściwą odpowiedź metaboliczną komórki na zmieniające się stężenie składników odżywczych. Stwierdzono, że w cukrzycy dochodzi do obniżenia poziomu białka SIRT1 (de Kreutzenberg *i wsp.*, 2010). Nasze kolejne badania miały na celu określenie, czy indukcja insulinooporności podocytów w hiperglikemii może być związana ze zmianami w ilości/aktywności deacetylazy SIRT1.

## Acetylacja białek komórkowych i sirtuiny

Aktywność wielu białek (histonowych i niehistonowych) regulowana jest poprzez odwracalną modyfikację potranslacyjną, polegającą na przyłączeniu grupy acetylowej do reszty aminowej lizyny. Reakcja acetylacji katalizowana jest przez enzymy zwane acetylotransferazami. Jak dotąd zidentyfikowano ponad 2000 modyfikowanych w ten sposób białek, w większości cytoplazmatycznych. Niemal wszystkie enzymy metaboliczne zaangażowane w glikolizę, glukoneogenezę, cykl kwasów trójkarboksylowych, utlenianie kwasów tłuszczowych, cykl mocznikowy, metabolizm azotu i glikogenu są modyfikowane na drodze acetylacji, co sugeruje, że proces ten jest ważnym koordynatorem metabolizmu komórkowego (Zhao *i wsp.*, 2010). Usunięcie grupy acetylowej z reszty lizyny katalizowane jest przez konserwowane ewolucyjnie deacetylazy. Trzecia klasa deacetylaz, zwana sirtuinami (SIRT) obejmuje siedem zidentyfikowanych dotąd sirtuin (SIRT1-7), z których najlepiej poznana i najintensywniej badana jest SIRT1. SIRT1 zlokalizowana jest głównie w jądrze komórkowym i cytoplazmie. SIRT2 jest białkiem głównie cytoplazmatycznym, SIRT3-5 występują w mitochondriach, natomiast SIRT6 i SIRT7 w jądrze komórkowym (Yu *i Auwerx*, 2010). Kluczowym kofaktorem reakcji deacetylacji jest NAD a w jej wyniku powstaje cząsteczka nikotynamidu (NAM) oraz cząsteczka 2'-O-acetylo-ADP-rybozy (AADPr). Nieodzowność NAD w przebiegu reakcji deacetylacji sugeruje, że związek ten może służyć jako komórkowy czujnik w sytuacji stresu metabolicznego, gdy jego poziom ulega obniżeniu. W tym kontekście regulacja biosyntezy NAD nabiera nowego znaczenia. W komórkach ssaków występuje dwuetapowy cykl odzyskiwania NAD. Pierwszy etap stanowi reakcja katalizowana przez fosforybozylotransferazę nikotynamidu (Nampt), w której z cząsteczki NAM i 5'-fosforybozylo-1-pirofosforanu (5'-PRPP) powstaje mononukleotyd nikotynamidu (NMN). W następnym etapie adenilylotransferaza NMN (Nmnat) przenosi grupę adeninową z ATP na NMN odtwarzając NAD (Yang *i Sauve*, 2006).



**Schemat 2. Deacetylacja białek komórkowych i szlak odzyskiwania NAD.** SIRT1 katalizuje reakcje usunięcia grupy acetylowej z reszty Lys białka z wykorzystaniem NAD jako niezbędnego kofaktora. NAD jest odtwarzany w dwuetapowym cyklu odzyskiwania NAD.

## **Deacetylaza SIRT1**

SIRT1 uczestniczy w regulacji wielu procesów metabolicznych. W wątrobie SIRT1 reguluje glukoneogenezę aktywując czynnik PGC-1 $\alpha$  (Rodgers *i wsp.*, 2005). W komórkach  $\beta$  trzustki jest pozytywnym regulatorem sekrecji insuliny i zabezpiecza te komórki przed stresem oksydacyjnym przez deacetylację białek transkrypcyjnych FOXO (Kitamura *i wsp.*, 2005). Ostatnie badania wskazują na istnienie związku pomiędzy SIRT1 i insulinoopornością. W cukrzycy aktywność SIRT1 jest obniżona, a zastosowanie inhibitorów SIRT1 indukuje insulinooporność komórek wrażliwych na insulinę. Zwiększona ekspresja białka SIRT1 redukuje ilość białka PTP1B – fosfatazy receptora insulinowego, zwiększając wrażliwość mioblastów C2C12 i hepatocytów HepG2 z wywołaną insulinoopornością (Sun *i wsp.*, 2007). Wykazano także, że zmniejszenie aktywności SIRT1 selektywnie hamuje insulinozależną fosforylację białka IRS-2 w komórkach pierwotnej linii hepatocytów, co może sugerować potencjalną funkcję regulatorową SIRT1 w szlaku sygnałowania insuliny (Zhang, 2007). Obniżony poziom białka SIRT1 wykazano w opornych na działanie insuliny komórkach mięśniowych (Frojdo *i wsp.*, 2011) oraz w komórkach  $\beta$  trzustki (Luu *i wsp.*, 2013), ponadto u myszy, w których w sposób specyficzny zahamowano ekspresję genu *SIRT1* w adipocytach, stwierdzono indukcję insulinooporności (Chalkiadaki *i Guarente*, 2012). Wykazano, że do obniżenia poziomu białka SIRT1 może dochodzić wskutek stresu oksydacyjnego powodującego nieodwracalne modyfikacje białka, prowadząc do jego inaktywacji i degradacji (Caito *i wsp.*, 2010). Wykazano odwrotną zależność poziomu białka SIRT1 od poziomu stresu oksydacyjnego u szczurów z wyindukowaną za pomocą streptozotocyny cukrzycą (Iskender *i wsp.*, 2017). Z drugiej strony aktywatory SIRT1 przywracają homeostazę glukozy i wrażliwość na insulinę w tkankach metabolicznych, takich jak wątroba, mięśnie czy tkanka tłuszczowa (Milne *i wsp.*, 2007). Nasze badania wykazały, że w podocytach eksponowanych na warunki hiperglikemiczne zmniejsza się ilość białka i aktywność enzymatyczna deacetylazy SIRT1, co prowadzi do obniżenia stopnia fosforylacji AMPK i w konsekwencji do zniesienia stymulującego działania insuliny na dokomórkowy transport glukozy (**Publikacja 5. z cyklu prac**).

## **Znaczenie ścieżki SIRT1-AMPK w regulacji wrażliwości komórek podocytarnych na insulinę**

Długotrwała ekspozycja podocytów na wysokie stężenia glukozy powoduje zmniejszenie ilości białka SIRT1 o 27% i aktywności deacetylazy o 22% oraz zmienia stan oksydoredukcyjny komórki zmniejszając stosunek NAD/NADH. Aby odpowiedzieć na



pytanie, czy SIRT1 reguluje wrażliwość podocytów na insulinę, zastosowano modulatory aktywności SIRT1: RSV (aktywator) i EX-527 (inhibitor). Inhibitor zmniejsza aktywność enzymu o 15% w podocytach kontrolnych, natomiast nie wykazuje dalszego wpływu hamującego w obecności wysokich stężeń glukozy. EX-527 zmniejsza również poziom białka SIRT1 o 32% w normoglikemii oraz znosi efekt insuliny na dokomórkowy transport glukozy. RSV zwiększa ilość białka SIRT1 o 28% w komórkach kontrolnych i o 43% w komórkach eksponowanych na warunki hiperglikemiczne. W środowisku HG pod wpływem RSV o 37% zwiększa się aktywność enzymatyczna SIRT1. Wzrostowi poziomu białka i aktywacji SIRT1 pod wpływem RSV towarzyszy zwiększenie stopnia fosforylacji AMPK (o 23% w normo- i 70% w hiperglikemii) i obniżenie poziomu fosforylacji kinazy Akt (odpowiednio o 46 i 37%) (**Publikacja 5. z cyklu prac**). Aby określić, czy są to efekty zależne od SIRT1, w podocytach wyciszaliśmy ekspresję genu kodującego białko SIRT1. Ilość białka deacetylazy po transfekcji siRNA SIRT1 jest mniejsza o 40%, a aktywność enzymatyczna o 20% w porównaniu z komórkami transfekowanymi kontrolnym siRNA. Wykazaliśmy, że wyciszenie ekspresji genu *SIRT1* prowadzi do zmniejszenia fosforylacji AMPK o 30%, a także znosi stymulujący efekt insuliny na aktywność AMPK, podczas gdy w podocytach transfekowanych kontrolnym siRNA insulina zwiększa fosforylację AMPK o 30%. Transfekcja siRNA SIRT1 nie ma natomiast wpływu na poziom fosforylacji kinazy Akt ani na zależny od insuliny wzrost fosforylacji Akt. W komórkach transfekowanych kontrolnym siRNA i siRNA SIRT1 insulina zwiększa stopień fosforylacji Akt odpowiednio o 17 i 28% (**Publikacja 5. z cyklu prac**). Pod wpływem RSV ilość białka SIRT1 wzrasta o 24% w komórkach transfekowanych kontrolnym siRNA i o 61% w komórkach transfekowanych siRNA SIRT1, co prowadzi do wzrostu stopnia fosforylacji AMPK. Wyciszenie ekspresji genu *SIRT1* nie zapobiega natomiast spadkowi fosforylacji Akt pod wpływem RSV, co sugeruje, że efekt RSV na Akt może być niezależny od SIRT1 (**Publikacja 5. z cyklu prac**). Obserwowane w hiperglikemii zniesienie efektu insuliny na fosforylację Akt nie zależy więc w sposób bezpośredni od aktywności SIRT1, ale jest to raczej efekt pośredni, wynikający z zależnego od SIRT1 obniżenia aktywności AMPK (**Publikacja 4. z cyklu prac**).

Po wyciszeniu ekspresji genu *SIRT1* w podocytach zbadaliśmy również dokomórkowy transport glukozy w warunkach normoglikemicznych w obecności insuliny. W komórkach transfekowanych kontrolnym siRNA transport glukozy pod wpływem insuliny zwiększa się o 50%, podczas gdy w komórkach transfekowanych siRNA SIRT1 stymulujący efekt tego hormonu jest zniesiony. Otrzymane wyniki wykazują, że zmniejszenie stopnia fosforylacji AMPK w podocytach eksponowanych na wysokie stężenia glukozy prowadzi do indukcji

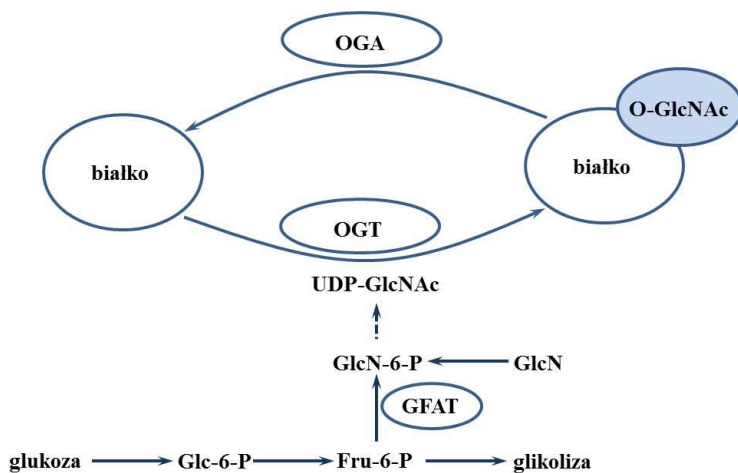
insulinooporności tych komórek w sposób zależny od SIRT1 (**Publikacja 5. z cyklu prac**). AMPK i SIRT1, które odgrywają tak ważną rolę w kontroli stanu odżywienia i utrzymaniu równowagi energetycznej komórki mogą stanowić istotny cel molekularny w leczeniu insulinooporności, a przywrócenie podocytom wrażliwości na insulinę stanowiłoby możliwość skuteczniejszej terapii nefropatii cukrzycowej.

### **Potencjalna rola szlaku biosyntezy heksozamin w indukcji insulinooporności podocytów**

Jednym z proponowanych mechanizmów insulinooporności jest zwiększona aktywność szlaku biosyntezy heksozamin (HBP, *ang. hexosamine biosynthesis pathway*), który odpowiada za powstawanie i przemiany glukozaminy (GlcN) w komórce (Buse, 2006). HBP stanowi swoisty czujnik stanu odżywienia komórki. HBP rozpoczyna się reakcją katalizowaną przez kluczowy enzym tego szlaku: amidotransferazę glutamino-fruktozo-6-fosforanowa (GFAT), w której z fruktozo-6-fosforanu (F-6-P) i glutaminy powstaje glukozamino-6-fosforan (GlcN-6-P). GFAT odgrywa istotną rolę w regulacji homeostazy glukozy. Wykazano również udział GFAT w mechanizmach toksyczności glukozy przejawiających się uniewrażliwieniem komórek na insulinę (Marshall *i wsp.*, 1991). Ukazało się wiele doniesień o wpływie HBP na aktywność insuliny w regulacji transportu glukozy w różnych typach komórek, między innymi w komórkach mięśni szkieletowych (Kim *i Youn*, 1997), mezangium (Haneda *i wsp.*, 2003) i adipocytach (Robinson *i wsp.*, 1995). W warunkach fizjologicznych HBP konsumuje 2-5% napływającej do komórki glukozy. Kończącym produktem szlaku biosyntezy heksozamin jest urydylo-difosfo-*N*-acetyloglukozamina (UDP-GlcNAc), wykorzystywana jako substrat w reakcji *O*-glikozytacji, czyli przyłączania reszt *N*-acetyloglukozaminy wiązaniem *O*-glikozydowym do reszt serynowych i treoninowych białek komórkowych, katalizowanej przez cytosolową  $\beta$ -*N*-acetyloglukozaminylotransferazę UDP-GlcNAc:polipeptyd (*O*-glikozylotransferazę, OGT). Reakcję usunięcia reszt *N*-acetyloglukozaminy katalizuje  $\beta$ -*N*-acetyloglukozaminidaza (OGA). Dynamiczny i odwracalny proces *O*-glikozytacji stanowi jedną z najczęstszych modyfikacji potranslacyjnych wielu białek zaangażowanych w regulację metabolizmu, w tym m.in. białek szlaku sygnałowania insuliny (np. IR, IRS-1, IRS-2) (D'Alessandris *i wsp.*, 2004). Wykazano, że wzrost ilości białek *O*-glikozyłowanych jest związany z insulinoopornością komórek (Walgren *i wsp.*, 2003). Aktywność białek, które są modyfikowane na drodze *O*-glikozytacji, jest regulowana również na drodze fosforylacji, przy czym obie te modyfikacje wzajemnie się wykluczają generując cykl *O*-glikozyłacja:fosforylacja. Stwierdzono, że OGT posiada wiele wspólnych z AMPK białek docelowych. Oba enzymy

oddziałują na te same procesy w komórce. Aktywność AMPK reguluje selektywność substratową OGT, będąc jednocześnie regulowana przez *O*-glikozylację (Bullen *i wsp.*, 2014).

Narzędziem farmakologicznym i związkiem modelowym stosowanym w badaniach dotyczących HBP jest glukozamina, która włącza się w szlak biosyntezy heksozamin z pominięciem reakcji katalizowanej przez GFAT i „naśladuje” indukowaną wysokim stężeniem glukozy insulinooporność komórek, jednak jest pod tym względem czterdziestokrotnie bardziej aktywna niż sama glukoza (Marshall *i wsp.*, 1991; Marshall *i wsp.*, 2005).



**Schemat 3. Przemiany glukozy na szlaku biosyntezy heksozamin i *O*-glikozylacja białek.** Część transportowanej do komórki glukozy inkorporowana jest w szlak HBP. Końcowy produkt reakcji katalizowanej przez GFAT służy jako substrat w reakcji *O*-glikozylacji białek komórkowych katalizowanej przez OGT. *Fru-6-P*: fruktozo-6-fosforan; *Glc-6-P*: glukozo-6-fosforan; *GlcN*: glukozamina; *GlcN-6-P*: glukozamino-6-fosforan; *UDP-GlcNAc*: urydylo-difosfo-*N*-acetylglukozamina

Nasze badania wykazały po raz pierwszy, że podocyty charakteryzują się wysokim w porównaniu z GFAT poziomem białka OGT. Wysoki poziom białka GFAT wykazaliśmy w korze nerek oraz kłębuszkach nerkowych, podczas gdy w podocytach wykryliśmy jego śladowe ilości (**Publikacja 1. z cyklu prac**). Ilość białka OGT oraz poziom białek *O*-glikozylowanych w podocytach sugeruje natomiast, że modyfikacja białek na drodze *O*-glikozylacji może odgrywać istotną rolę w regulacji metabolizmu tych komórek. Otrzymane wyniki sugerują, że w komórkach tych w procesie *O*-glikozylacji białek wykorzystywana jest GlcN pochodząca w większości najprawdopodobniej ze środowiska pozakomórkowego, a w mniejszym stopniu wygenerowana na szlaku biosyntezy heksozamin. Zbadaliśmy zatem czy podocyty mogą transportować GlcN ze środowiska pozakomórkowego i wykazaliśmy, że wychwyt GlcN do tych komórek odbywa się z prędkością zbliżoną do prędkości wychwyty glukozy, a w transporcie tym uczestniczy w głównej mierze system białek transportu ułatwionego z rodziny GLUT, o które GlcN konkuruje z glukożą. Szybkość transportu GlcN w obecności glukozy maleje wraz ze wzrostem stężenia glukozy. W obecności GlcN maleje również szybkość dokomórkowego transportu glukozy (**Publikacja 1. z cyklu prac**). Metabolizm glukozy na szlaku biosyntezy heksozamin odgrywa kluczową

rolę w regulacji procesu *O*-glikozylacji. Utrzymujący się nadmiar glukozy dopływający do komórki w konsekwencji może prowadzić do zwiększenia ilości białek *O*-glikozylowanych, co w konsekwencji wiąże się z indukcją insulinooporności (McLarty *i wsp.*, 2013). Nasze badania wykazały, że poziom białek zmodyfikowanych na drodze *O*-glikozylacji zwiększa się wraz ze wzrostem stężenia pozakomórkowej GlcN: o 45, 60 i 100% dla odpowiednio 0,25, 0,5 i 2 mM GlcN (**Publikacja 1. z cyklu prac**). Uzyskane wyniki sugerują, że potencjalny wzrost przepływu glukozy przez HBP w podocytach może prowadzić do indukcji insulinooporności tych komórek wskutek podwyższenia poziomu *O*-glikozylowanych białek komórkowych.

Wyniki naszych badań zbliżają nas do zrozumienia mechanizmów biorących udział w rozwoju insulinooporności komórek podocytarnych kłębuszka nerkowego w warunkach towarzyszącej cukrzycy hiperglikemii, oraz dostarczają nowej wiedzy na temat przyczyn rozwoju nefropatii cukrzycowej. Stanowią również punkt wyjścia do dalszych, bardziej szczegółowych badań mających na celu poznanie nowych możliwości zapobiegania uszkodzeniom kłębuszka nerkowego i opracowania skuteczniejszych metod leczenia cukrzycy.

**Piśmiennictwo:**

- Barletta GM *i wsp.*, 2003. Neph1 and Neph1 co-localize at the podocyte foot process intercellular junction and form cis hetero-oligomers. *J Biol Chem* 278(21), 19266-19271.
- Bullen JW *i wsp.*, 2014. Cross-talk between two essential nutrient-sensitive enzymes: O-GlcNAc transferase (OGT) and AMP-activated protein kinase (AMPK). *J Biol Chem* 289(15), 10592-10606.
- Buse MG, 2006. Hexosamines, insulin resistance, and the complications of diabetes: current status. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 290(1), E1-E8.
- Caito S *i wsp.*, 2010. SIRT1 is a redox-sensitive deacetylase that is post-translationally modified by oxidants and carbonyl stress. *FASEB J* 24(9), 3145-3159.
- Carling D, 2004. The AMP-activated protein kinase cascade--a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci* 29(1), 18-24.
- Chalkiadaki A *i Guarente L*, 2012. High-fat diet triggers inflammation-induced cleavage of SIRT1 in adipose tissue to promote metabolic dysfunction. *Cell Metab* 16(2), 180-188.
- Coward RJ *i wsp.*, 2007. Neph1 is critical for the action of insulin on human glomerular podocytes. *Diabetes* 56(4), 1127-1135.
- Coward RJ, *i wsp.*, 2005. The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action. *Diabetes* 54(11), 3095-3102.
- D'Alessandris C *i wsp.*, 2004. Increased O-glycosylation of insulin signaling proteins results in their impaired activation and enhanced susceptibility to apoptosis in pancreatic beta-cells. *FASEB J* 18(9), 959-961.
- de Kreutzenberg SV *i wsp.*, 2010. Downregulation of the longevity-associated protein sirtuin 1 in insulin resistance and metabolic syndrome: potential biochemical mechanisms. *Diabetes* 59(4), 1006-1015.
- Deshmukh AS, 2016. Insulin-stimulated glucose uptake in healthy and insulin-resistant skeletal muscle. *Horm Mol Biol Clin Investig* 26(1), 13-24.
- Emerling BM *i wsp.*, 2009. Hypoxic activation of AMPK is dependent on mitochondrial ROS but independent of an increase in AMP/ATP ratio. *Free Radic Biol Med* 46(10), 1386-1391.
- Forbes JM *i wsp.*, 2008. Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57(6), 1446-1454.
- Frojdo S *i wsp.*, 2011. Phosphoinositide 3-kinase as a novel functional target for the regulation of the insulin signaling pathway by SIRT1. *Mol Cell Endocrinol* 335(2), 166-176.
- Fryer LG *i wsp.*, 2002. Characterization of the role of the AMP-activated protein kinase in the stimulation of glucose transport in skeletal muscle cells. *Biochem J* 363(Pt 1), 167-174.
- Fukasawa H *i wsp.*, 2009. Slit diaphragms contain tight junction proteins. *J Am Soc Nephrol* 20(7), 1491-1503.

- Goldstein BJ *i wsp.*, 2005. Redox paradox: insulin action is facilitated by insulin-stimulated reactive oxygen species with multiple potential signaling targets. *Diabetes* 54(2), 311-321.
- Haneda M *i wsp.*, 2003. Overview of glucose signaling in mesangial cells in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 14(5), 1374-1382.
- Iglesias MA *i wsp.*, 2002. AICAR administration causes an apparent enhancement of muscle and liver insulin action in insulin-resistant high-fat-fed rats. *Diabetes* 51(10), 2886-2894.
- Iskender H *i wsp.*, 2017. The effect of hesperidin and quercetin on oxidative stress, NF-kappaB and SIRT1 levels in a STZ-induced experimental diabetes model. *Biomed Pharmacother* 90, 500-508.
- Kim JK *i Youn JH*, 1997. Prolonged suppression of glucose metabolism causes insulin resistance in rat skeletal muscle. *Am J Physiol* 272(2 Pt 1), E288-E296.
- Kitamura YI *i wsp.*, 2005. FoxO1 protects against pancreatic beta cell failure through NeuroD and MafA induction. *Cell Metab* 2(3), 153-163.
- Lennon R *i wsp.*, 2014. The importance of podocyte adhesion for a healthy glomerulus. *Front Endocrinol (Lausanne)* 5, 160.
- Lewko B *i wsp.*, 2005. Characterization of glucose uptake by cultured rat podocytes. *Kidney Blood Press Res* 28(1), 1-7.
- Lewko B *i Stepinski J*, 2009. Hyperglycemia and mechanical stress: targeting the renal podocyte. *J Cell Physiol* 221(2), 288-295.
- Lin JS *i Susztak K*, 2016. Podocytes: the Weakest Link in Diabetic Kidney Disease? *Curr Diab Rep* 16(5), 45.
- Luu L *i wsp.*, 2013. The loss of Sirt1 in mouse pancreatic beta cells impairs insulin secretion by disrupting glucose sensing. *Diabetologia* 56(9), 2010-2020.
- Marshall S *i wsp.*, 1991. Discovery of a metabolic pathway mediating glucose-induced desensitization of the glucose transport system. Role of hexosamine biosynthesis in the induction of insulin resistance. *J Biol Chem* 266(8), 4706-4712.
- Marshall S *i wsp.*, 2005. Glucosamine induces rapid desensitization of glucose transport in isolated adipocytes by increasing GlcN-6-P levels. *Biochem Biophys Res Commun* 329(3), 1155-1161.
- McLarty JL *i wsp.*, 2013. Post-translational protein modification by O-linked N-acetylglucosamine: its role in mediating the adverse effects of diabetes on the heart. *Life Sci* 92(11), 621-627.
- Milne JC *i wsp.*, 2007. Small molecule activators of SIRT1 as therapeutics for the treatment of type 2 diabetes. *Nature* 450(7170), 712-716.
- Mogensen CE *i wsp.*, 1980. The acute effect of insulin on heart rate, blood pressure, plasma noradrenaline and urinary albumin excretion. The role of changes in blood glucose. *Diabetologia* 18(6), 453-457.
- Patel MI *i wsp.*, 2011. Potentiation of neuronal insulin signaling and glucose uptake by resveratrol: the involvement of AMPK. *Pharmacol Rep* 63(5), 1162-1168.

- Pavenstadt H *i wsp.*, 2003. Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev* 83(1), 253-307.
- Pessin JE *i Saltiel AR*, 2000. Signaling pathways in insulin action: molecular targets of insulin resistance. *J Clin Invest* 106(2), 165-169.
- Piwkowska A *i wsp.*, 2014. High glucose increases glomerular filtration barrier permeability by activating protein kinase G type Ialpha subunits in a Nox4-dependent manner. *Exp Cell Res* 320(1), 144-152.
- Piwkowska A *i wsp.*, 2011. High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes. *J Cell Biochem* 112(6), 1661-1672.
- Quaggin SE, 2007. Sizing up sialic acid in glomerular disease. *J Clin Invest* 117(6), 1480-1483.
- Rains JL *i Jain SK*, 2011. Oxidative stress, insulin signaling, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 50(5), 567-575.
- Reiser J *i wsp.*, 2000. The glomerular slit diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 11(1), 1-8.
- Rhee SG, 2006. Cell signaling. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a necessary evil for cell signaling. *Science* 312(5782), 1882-1883.
- Robinson KA *i wsp.*, 1995. Effects of diabetes and hyperglycemia on the hexosamine synthesis pathway in rat muscle and liver. *Diabetes* 44(12), 1438-1446.
- Rodgers JT *i wsp.*, 2005. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1alpha and SIRT1. *Nature* 434(7029), 113-118.
- Ruotsalainen V *i wsp.*, 1999. Nephrin is specifically located at the slit diaphragm of glomerular podocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(14), 7962-7967.
- Samuel T *i wsp.*, 2007. Applicability of the glomerular size distribution coefficient in assessing human glomerular volume: the Weibel and Gomez method revisited. *J Anat* 210(5), 578-582.
- Samuel VT *i Shulman GI*, 2012. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. *Cell* 148(5), 852-871.
- Schiffer M *i wsp.*, 2005. Localization of the GLUT8 glucose transporter in murine kidney and regulation in vivo in nondiabetic and diabetic conditions. *Am J Physiol Renal Physiol* 289(1), F186-F193.
- Schwarz K *i wsp.*, 2001. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 108(11), 1621-1629.
- Sharma D *i wsp.*, 2017. Diabetic nephropathy: New insights into established therapeutic paradigms and novel molecular targets. *Diabetes Res Clin Pract* 128, 91-108.
- Sun C *i wsp.*, 2007. SIRT1 improves insulin sensitivity under insulin-resistant conditions by repressing PTP1B. *Cell Metab* 6(4), 307-319.

- Towler MC *i* Hardie DG, 2007. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res* 100(3), 328-341.
- Vanhaesebroeck B *i* *wsp.*, 2012. PI3K signalling: the path to discovery and understanding, *Nat Rev Mol Cell Biol*. England, pp. 195-203.
- Viollet B *i* Andreelli F, 2011. AMP-activated protein kinase and metabolic control. *Handb Exp Pharmacol* (203), 303-330.
- Viollet B *i* *wsp.*, 2003. Physiological role of AMP-activated protein kinase (AMPK): insights from knockout mouse models. *Biochem Soc Trans* 31(Pt 1), 216-219.
- Walgren JL *i* *wsp.*, 2003. High glucose and insulin promote O-GlcNAc modification of proteins, including alpha-tubulin. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284(2), E424-E434.
- Wang W *i* *wsp.*, 2015. Pterostilbene and allopurinol reduce fructose-induced podocyte oxidative stress and inflammation via microRNA-377. *Free Radic Biol Med* 83, 214-226.
- Wasik AA *i* *wsp.*, 2014. Ezrin is down-regulated in diabetic kidney glomeruli and regulates actin reorganization and glucose uptake via GLUT1 in cultured podocytes. *Am J Pathol* 184(6), 1727-1739.
- Welsh GI *i* *wsp.*, 2010. Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function. *Cell Metab* 12(4), 329-340.
- Wolf G *i* *wsp.*, 2005. From the periphery of the glomerular capillary wall toward the center of disease: podocyte injury comes of age in diabetic nephropathy. *Diabetes* 54(6), 1626-1634.
- Woods A *i* *wsp.*, 2003. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* 13(22), 2004-2008.
- Xue R *i* *wsp.*, 2017. Mechanistic Insight and Management of Diabetic Nephropathy: Recent Progress and Future Perspective. *J Diabetes Res* 2017, 1839809.
- Yamaguchi S *i* *wsp.*, 2005. Activators of AMP-activated protein kinase enhance GLUT4 translocation and its glucose transport activity in 3T3-L1 adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289(4), E643-649.
- Yang T *i* Sauve AA, 2006. NAD metabolism and sirtuins: metabolic regulation of protein deacetylation in stress and toxicity. *AAPS J* 8(4), E632-E643.
- Yu J *i* Auwerx J, 2010. Protein deacetylation by SIRT1: an emerging key post-translational modification in metabolic regulation. *Pharmacol Res* 62(1), 35-41.
- Zhang J, 2007. The direct involvement of SirT1 in insulin-induced insulin receptor substrate-2 tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 282(47), 34356-34364.
- Zhao S *i* *wsp.*, 2010. Regulation of cellular metabolism by protein lysine acetylation. *Science* 327(5968), 1000-1004.
- Zou MH *i* *wsp.*, 2004. Activation of the AMP-activated protein kinase by the anti-diabetic drug metformin in vivo. Role of mitochondrial reactive nitrogen species. *J Biol Chem* 279(42), 43940-43951.



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

Po ukończeniu studiów na Międzyuczelnianym Wydziale Biotechnologii Uniwersytetu Gdańskiego i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, w 1999 roku rozpoczęłam studia doktoranckie w Katedrze Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej pod kierunkiem pani Profesor Jolanty Tarasiuk. Prowadzone przeze mnie badania dotyczyły jednego z ważnych problemów w klinicznej onkologii jakim jest oporności wielolekowa nowotworów na stosowane w terapii chemioterapeutyki. Badałam zdolność dwóch nowych grup związków: estrów latentnych benzoperymidyny i antrapirydazownów do hamowania eksportu aktywnego i przywracania wewnątrzkomórkowej akumulacji pirarubicyny w komórkach nowotworowych o oporności wielolekowej z nadekspresją P-glikoproteiny lub białka MRP1. Uzyskane wyniki były przedmiotem rozprawy doktorskiej pod tytułem „Przywracanie aktywności pirarubicyny w stosunku do komórek nowotworowych o oporności wielolekowej”, którą obroniłam na Wydziale Biologii, Oceanografii i Geografii Uniwersytetu Gdańskiego w 2005 roku uzyskując stopień doktora nauk biologicznych. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w trzech publikacjach w czasopiśmie o zasięgu międzynarodowym znajdujących się na liście filadelfijskiej (Załącznik 6., punkt II.A) i czterech doniesieniach kongresowych (Załącznik 6., punkt III). W trakcie studium doktoranckiego brałam udział w organizacji konferencji „8<sup>th</sup> International Symposium on Molecular Aspects of Chemotherapy”, która odbyła się w 2001 roku w Gdańsku. Byłam również wykonawcą promotorskiego grantu KBN (Załącznik 6., punkt II.G).

W 2007 roku rozpoczęłam pracę na stanowisku asystenta w Zespole Kliniczno-Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN w Gdańsku. Główny nurt badań prowadzonych w Zespole dotyczy molekularnych podstaw funkcji komórek kłębuszka nerkowego – podocytów - w stanach fizjologicznych i patologicznych np. cukrzycy, oraz czynników endo-/para-/autokrynych regulujących funkcję kłębuszka nerkowego, ze szczególnym uwzględnieniem przepuszczalności bariery filtracyjnej dla albuminy. Prowadzone badania dotyczą również patogenezy nefropatii cukrzycowej. Tutaj rozpoczęłam badania dotyczące poznania potencjalnych mechanizmów indukcji insulinooporności komórek podocytarnych kłębuszka nerkowego w warunkach wysokiego stężenia glukozy odzwierciedlających warunki cukrzycowe.

W latach 2007-2010 realizowałam projekt badawczy POLPOSTDOC III (Załącznik 6., punkt II.G) pracując na stanowisku adiunkta w Zakładzie Immunologii Klinicznej i Transplantologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Od 2011 roku do chwili obecnej jestem pracownikiem Zespołu Kliniczno-Badawczego Molekularnej i Komórkowej Nefrologii IMDiK PAN w Gdańsku i kontynuuję tematykę badań dotyczących insulinooporności podocytów w cukrzycy. Inne ważniejsze kierunki prowadzonych przeze mnie badań naukowych dotyczą roli kinazy białkowej G typu I $\alpha$  w regulacji kłębuszkowej bariery filtracyjnej i aparatu kurczliwego podocytów w warunkach normo- i hiperglikemii oraz regulacji procesu autofagii w podocytach.

Wyniki badań ostatnich lat wskazują na istnienie ścisłego związku pomiędzy występowaniem glomerulopatii cukrzycowej a uszkodzeniem struktury i zaburzeniami funkcji komórek podocytarnych kłębuszka nerkowego. Uszkodzenie podocytów prowadzi do białkomoczu, a ich utrata jest wczesnym i kluczowym objawem rozwoju nefropatii cukrzycowej, która rozwija się u co najmniej 40% pacjentów chorych na cukrzycę. Podocyty odpowiadają za mechaniczne wzmocnienie bariery filtracyjnej kłębuszków, syntezę i rozbudowę błony podstawnej i błony szczelinowej oraz za regulację filtracji kłębuszkowej. W cukrzycy procesy te są zaburzone, a strukturalne uszkodzenia podocytów, błony podstawnej i błony szczelinowej są pierwszymi wykładnikami morfologicznymi rozwijającej się glomerulopatii. W warunkach cukrzycowych osłabione są ścieżki sygnałowe regulowane przez cykliczny GMP (cGMP). Nasze badania wykazały po raz pierwszy, że w hodowli pierwotnej komórek podocytarnych obecna jest zależna od cGMP kinaza białkowa G typu I $\alpha$  (PKGI $\alpha$ ), która w podocytach występuje w kolokalizacji z nefryną, co sugeruje, że białko to jest zlokalizowane w błonach szczelinowych. Wykazaliśmy, że PKGI $\alpha$  jest cząsteczką wrażliwą na stan oksydoredukcyjny komórki a ważnym czynnikiem regulującym aktywność tego enzymu jest nadtlenek wodoru. Nadtlenek wodoru powoduje tworzenie mostków dwusiarczkowych, które łączą dwie podjednostki PKGI $\alpha$  w aktywny homodimer, co prowadzi do reorganizacji cytoszkieletu aktynowego komórki i w konsekwencji do pięciokrotnego wzrostu przepuszczalności warstwy utworzonej przez podocyty dla albuminy. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w pracy:

- Piwkowska A, **Rogacka D**, Jankowski M, Kocbuch K, Angielski S. Hydrogen peroxide induces dimerization of protein kinase G type I $\alpha$  subunits and increases albumin permeability in cultured rat podocytes. *Journal of Cellular Physiology* 2012; 227:1004-16.

Również w podocytach eksponowanych na wysokie stężenia glukozy dochodzi do aktywacji PKGI $\alpha$ , a enzym ten jest zaangażowany w regulację zależnego od insuliny transportu glukozy. Stwierdziliśmy, że aktywatory PKGI $\alpha$  znacząco zwiększają wychwyty glukozy w podocytach, podczas gdy zastosowanie inhibitora PKGI $\alpha$  znosi stymulujący efekt insuliny na dokomórkowy transport glukozy. Podobny efekt uzyskaliśmy po wyciszeniu ekspresji genu kodującego białko PKGI $\alpha$ . Aktywatory PKGI $\alpha$  regulują ścieżkę sygnałowania insulinowego zwiększając stopień fosforylacji receptora insulinowego oraz kinazy Akt, podczas gdy efekt insuliny na fosforylację jej receptora oraz kinazy Akt jest zniesiony w obecności inhibitora PKGI $\alpha$ . Otrzymane wyniki opublikowane zostały w pracy:

- Piwkowska A, **Rogacka D**, Angielski S, Jankowski M. Insulin stimulates glucose transport via protein kinase G type I alpha-dependent pathway in podocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014; 446:328-34.

Wyniki naszych badań pokazują także, że insulina zwiększa przepuszczalność warstwy filtracyjnej podocytów oraz izolowanych kłębuszków nerkowych dla albuminy, stymulując produkcję reaktywnych form tlenu, co prowadzi do zmian w wewnątrzkomórkowej lokalizacji PKGI $\alpha$  i aktywacji tego enzymu. Powyższe wyniki wykazują istnienie zależności pomiędzy generowanym w cukrzycy stresem oksydacyjnym, aktywacją PKGI $\alpha$ , reorganizacją cytoszkieletu aktynowego oraz zmianami w przepuszczalności bariery filtracyjnej podocytów. Otrzymane wyniki zostały opublikowane w pracy:

- Piwkowska A, **Rogacka D**, Kasztan M, Angielski S, Jankowski M. Insulin increases glomerular filtration barrier permeability through dimerization of protein kinase G type I $\alpha$  subunits. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* 2013; 1832:791-804.

Kolejnym krokiem było podjęcie badań mających na celu wyjaśnienie zależnego od insuliny i PKGI $\alpha$  mechanizmu regulacji przepuszczalności warstwy filtracyjnej podocytów dla albuminy. Wykazaliśmy, że w mechanizmie ten zaangażowane są białka regulujące wewnątrzkomórkowy poziom jonów wapnia. Pod wpływem insuliny dochodzi do błonowej mobilizacji wielkich kanałów potasowych aktywowanych jonami wapnia (BK<sub>Ca</sub>). Nasze badania wykazały, że w obecności inhibitora BK<sub>Ca</sub> oraz w komórkach z wyciszoną ekspresją genu kodującego BK<sub>Ca</sub> zniesiony zostaje efekt insuliny na przepuszczalność bariery filtracyjnej podocytów związany z aktywacją PKGI $\alpha$ . Kanały BK<sub>Ca</sub> oddziałują z kanałami wapnia TRPC6 tworząc kompleksy regulujące przezbłonowy przepływ Ca<sup>2+</sup>. Nasze badania wykazały, że zależny od TRPC6 napływ jonów wapnia zwiększa aktywność PKGI $\alpha$ .

w podocytach. Wyciszenie ekspresji genu *TRPC6* w konsekwencji prowadzi do zniesienia związanego z aktywacją PKGI $\alpha$  stymulującego efektu insuliny na przepuszczalność warstwy filtracyjnej podocytów dla albuminy. Wydaje się zatem, że oddziaływania pomiędzy PKGI $\alpha$  a BK<sub>Ca</sub> i TRPC6 mogą stanowić część większego kompleksu regulującego filtrację kłębuszkową w odpowiedzi na insulinę. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracach:

- Piwkowska A, **Rogacka D**, Audzeyenka I, Kasztan M, Angielski S, Jankowski M. Insulin increases glomerular filtration barrier permeability through PKGI $\alpha$ -dependent mobilization of BK<sub>Ca</sub> channels in cultured rat podocytes. *Biochimica et Biophysica Acta – Molecular Basis of Disease* 2015; 1852:1599-609.
- Piwkowska A, **Rogacka D**, Audzeyenka I, Kasztan M, Angielski S, Jankowski M. Intracellular calcium signaling regulates glomerular filtration barrier permeability: the role of the PKGI $\alpha$ -dependent pathway. *FEBS Letters* 2016; 590:1739-1748.
- **Rogacka D**, Audzeyenka I, Rachubik P, Rychłowski M, Kasztan M, Jankowski M, Angielski S, Piwkowska A. Insulin increases filtration barrier permeability via TRPC6-dependent activation of PKGI $\alpha$  signaling pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 2017; 1863:1312-1325.

Autofagia jest procesem polegającym na degradacji składowych komórki w pęcherzykach zwanych autofagosomami. Proces ten umożliwia komórce usunięcie nieprawidłowych lub uszkodzonych organelli komórkowych i białek, z drugiej zaś strony aktywowany jest jako mechanizm obronny umożliwiający komórce przeżycie w warunkach dla niej niekorzystnych. Nasze badania wykazały, że pod wpływem insuliny w podocytach dochodzi do wzrostu ekspresji genów kodujących markery autofagii: *Atg5* i *LC3*, co sugeruje, że hormon ten wpływa na aktywność procesu autofagii na etapie dojrzewania pęcherzyków autofagosomalnych. Wykazaliśmy również, że stymulacja autofagii pod wpływem insuliny zależy od poziomu produkcji reaktywnych form tlenu. Uzyskane wyniki zostały opublikowane w pracy:

- Audzeyenka I, **Rogacka D**, Piwkowska A, Rychłowski M, Bierla JB, Czarnowska E, Angielski S, Jankowski M. Reactive oxygen species are involved in insulin-dependent regulation of autophagy in primary rat podocytes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2016; 75:23-33.

Na prowadzone badania zostało mi przyznanych pięć grantów, w których jestem kierownikiem. W sześciu kolejnych projektach jestem głównym wykonawcą (Załącznik 6., punkt II.G). Mój dotychczasowy dorobek naukowy obejmuje 24 prace oryginalne opublikowane w czasopismach z listy filadelfijskiej o łącznym współczynniku wpływu IF = 77,777 oraz punktacji KBN/MNiSW = 656. Jestem pierwszym autorem w 5 publikacjach i autorem korespondencyjnym w 1 publikacji (Załącznik 6., punkty I.B i II.A).

Biorąc pod uwagę publikacje opublikowane po uzyskaniu stopnia doktora nauk biologicznych jestem autorem i współautorem 21 prac oryginalnych o łącznym współczynniku wpływu IF = 70,647 oraz punktacji KBN/MNiSW = 614. Jestem pierwszym autorem w 4 publikacjach i autorem korespondencyjnym w 1 publikacji (Załącznik 6., punkt II.A). Odejmując cykl publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego, sumaryczny IF = 54,068 (KBN/MNiSW = 465).

Mój dorobek uzupełnia 36 doniesień zjazdowych prezentowanych na krajowych (12) i międzynarodowych (24) zjazdach i sympozjach naukowych (Załącznik 6., punkt III).

