

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej
im. prof. Mirosława Mossakowskiego
Polskiej Akademii Nauk



Insulinozależna modyfikacja aktywności autofagii
i jej udział w regulacji funkcji warstwy podocytarnej
bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych

mgr Irena Audzeyenka

Praca doktorska została wykonana w
Zespole Kliniczno - Badawczym Molekularnej i Komórkowej Nefrologii

Promotor: dr hab. n. med. Maciej Jankowski, prof. nadzw.

Gdańsk, 2016

Streszczenie

Nefropatia cukrzycowa (NC) jest przewlekłym powikłaniem cukrzycy będącym najczęstszą przyczyną niewydolności nerek wymagającej terapii nerkozastępczej. Ważną rolę w rozwoju NC przypisuje się zaburzeniom strukturalno-funkcjonalnym podocytów, które tworzą wewnętrzną warstwę bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych. Podocyty są komórkami insulinowrażliwymi o bardzo ograniczonej zdolności do podziałów komórkowych, dlatego też ich utrata może być początkowo równoważona przez hipertrofię pozostałych w kłębuszku nerkowym podocytów, natomiast nie może być kompensowana przez proliferację podocytów czy też rekrutację i różnicowanie komórek w kierunku podocytów. Kluczową rolę dla żywotności i funkcji podocytów odgrywa proces autofagii, który stanowi mechanizm adaptacyjny służący do usuwania nieprawidłowo sfałdowanych białek i niefunkcjonalnych organelli wewnątrzkomórkowych, jakie mogą powstawać między innymi podczas nadmiernej syntezy białek towarzyszącej hipertrofii komórek.

Celem pracy było zbadanie mechanizmów prowadzących do uszkodzenia podocytów w cukrzycy i określenie stopnia zaangażowania autofagii w patogenezę nefropatii cukrzycowej z wykorzystaniem modelu podocytów szczurzych hodowli pierwotnej. Biorąc pod uwagę fakt, iż na wczesnym etapie rozwoju cukrzycy typu 2 hiperglikemia jest wynikiem rozwijającej się insulinooporności komórek, która z kolei prowadzi do kompensacyjnego wzrostu stężenia insuliny w osoczu, w niniejszej pracy badano wpływ i mechanizm działania wysokich stężeń insuliny (300 nM, 60 minut, 3 i 5 dni) oraz D-glukozy (30 mM, 5 dni) na ilość markerów autofagalnych na poziomie mRNA i białka, żywotność i apoptozę podocytów oraz ich przepuszczalność dla albuminy i transport 2-deoksy-[1,2-³H]-D-glukozy (2-DG) do komórek. Efekt działania insuliny badano w środowisku 11 mM D-glukozy.

Przy użyciu techniki transmisyjnej mikroskopii elektronowej, w nieekspozowanych na egzogenną insulinę podocytach stwierdzono obecność licznych struktur autofagalnych – autofagosomów i autofagolizosomów. Następnie wykazano, że insulina zwiększa poziom markerów autofagalnych LC3-I, LC3-II, Atg5 (białko i mRNA) oraz ilość kompleksów Atg5-Atg12. Zmiany ilości badanych markerów miały charakter przejściowy i były obserwowane po krótkotrwałej (60 minut) i długotrwałej (3 dni) inkubacji podocytów z insuliną. Stwierdzono również zwiększoną ilość białka LC3-II w kłębuszkach nerkowych izolowanych od otyłych szczurów Zucker cechujących się hiperinsulinemią.

W celu zbadania wpływu *in vitro* insuliny na aktywność autofagii w żywych podocytach przeprowadzono nukleofekcję podocytów z użyciem plazmidu kodującego gen

LC3 oraz geny białek znacznikowych tj. zielonej i czerwonej fluorescencji (GFP i RFP), których ekspresja pozwala na śledzenie wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia LC3. Insulina powodowała przejściowy wzrost akumulacji LC3 w autofagolizosomach; maksymalny efekt tj. 2,2-krotny wzrost, obserwowano po 2 dniach ekspozycji podocytów na insulinę. Ze względu na fakt, iż w podocytach insulina stymuluje produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) – aktywatorów autofagii, zbadano efekt zahamowania aktywności oraz ilości białka (apocynina – 100µM, 2h; siRNA NOX4) oksydazy NAD(P)H, głównego endogennego źródła ROS w podocytach, na aktywność autofagii ocenianą w oparciu o zmiany poziomu LC3, Atg5 oraz ilość kompleksów Atg5-Atg12. Apocynina znosiła stymulujący wpływ insuliny na poziom LC3 i ilość kompleksów Atg5-Atg12, a z kolei transfekcja podocytów z użyciem siRNA NOX4 powodowała zahamowanie stymulującego działania insuliny na poziom LC3 (białko i mRNA), Atg5 (mRNA) oraz ilość kompleksów Atg5-Atg12. Otrzymane wyniki dotyczące zaangażowania podjednostki NOX4 w działanie insuliny na poziom LC3 i Atg5 w podocytach zostały potwierdzone metodą konfokalnej mikroskopii immunofluorescencyjnej; insulina powodowała gromadzenie się LC3 i Atg5 w skupiskach wewnątrzkomórkowych, natomiast tego efektu nie obserwowano w podocytach po transfekcji siRNA NOX4. Nie stwierdzono wpływu siRNA NOX4 na zmiany w wewnątrzkomórkowym profilu rozmieszczenia LC3 i Atg5 po stymulacji komórek nadtlenkiem wodoru (100 µM, 30 min), stanowiącym egzogenne źródło ROS. Wykazano także, że insulina zwiększa poziom fosforylacji mTOR (Ser²⁴⁴⁸) oraz AMPK (Thr¹⁷²), enzymów uczestniczących w regulacji autofagii na etapie inicjacji i elongacji błon autofagosomalnych. Natomiast nie stwierdzono znamionnego wpływu insuliny na ilość białek ULK1, bekliny 1, JNK1, PI3K klasy III oraz na aktywność enzymatyczną PI3K klasy III.

W toku kolejnych przeprowadzonych doświadczeń wykazano, że 5-dniowa hodowla podocytów w środowisku o 30 mM stężeniu D-glukozy (HG) wpływa na ilość markerów autofagalnych na poziomie białka. Stwierdzono zmniejszoną ilość LC3-II oraz zwiększoną ilość ULK1, przy czym w przeciwieństwie do LC3-II, zmiany w ilości ULK1 stwierdzono również w środowisku o stężeniu 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG) – kontrola osmotyczna. Nie stwierdzono znamionnych różnic w poziomie białka bekliny 1 oraz PI3K klasy III, ilości kompleksów Atg5-Atg12 oraz w aktywności enzymatycznej PI3K klasy III w środowiskach HG i LG.

Zbadano także wpływ insuliny i środowiska HG na żywotność podocytów i liczbę podocytów ulegających apoptozie, jak również zaangażowanie autofagii w te procesy wykorzystując podocyty po transfekcji siRNA Atg5. Insulina (300 nM, 60 minut, 3 i 5 dni)

nie wpływała zamiennie na żywotność podocytów oraz liczbę podocytów ulegających apoptozie. Natomiast wyciszenie ekspresji Atg5 powodowało zwiększenie o około 13% liczby podocytów ulegających apoptozie pod wpływem insuliny (60 minut). W środowisku hodowlanym HG zmniejszyła się znamienne żywotność podocytów, a efekt ten był nasilony po wyciszeniu ekspresji Atg5. Również liczba podocytów ulegających apoptozie była wyższa w środowisku HG. Nie stwierdzono wpływu środowiska LG na żywotność i liczbę podocytów ulegających apoptozie.

W kolejnych badaniach wykazano, że insulina (60 minut, 3 i 5 dni) zwiększa przepuszczalność warstwy podocytarnej dla albuminy, a efekt krótkotrwałej inkubacji podocytów z insuliną (60 minut) jest zniesiony po transfekcji siRNA Atg5. Zwiększona przepuszczalność podocytów dla albuminy występująca po długotrwałej inkubacji z insuliną (3. i 5. dzień) nie ulegała zmianom pod wpływem siRNA Atg5. Inkubacja podocytów w środowisku HG i LG również powodowała zwiększenie przepuszczalności podocytów dla albuminy, aczkolwiek efekt ten nie ulegał zmianie po wyciszeniu ekspresji Atg5. Zbadano także potencjalny związek pomiędzy autofagią i wrażliwością podocytów na działanie insuliny, gdzie wykazano, że krótkotrwała (60 minut) inkubacja podocytów z insuliną zwiększa aktywność dokomórkowego transportu 2-DG, a efekt ten jest zniesiony w podocytach po transfekcji siRNA Atg5. Ponadto, długotrwała inkubacja podocytów w środowisku HG, lecz nie w środowisku LG, zapobiegała stymulującemu działaniu insuliny na aktywność dokomórkowego transportu 2-DG. Efekt środowiska HG na aktywność dokomórkowego transportu utrzymywał się w podocytach po transfekcji siRNA Atg5.

Uzyskane wyniki wskazują, iż zarówno wysokie pozakomórkowe stężenie insuliny, jak i glukozy wpływają na aktywność autofagii w podocytach, która może modyfikować przepuszczalność podocytów dla albuminy i przyczyniać się do rozwoju insulinooporności podocytów.