

Rola neutrofilowych proteaz serynowych w regulacji funkcji komórki podocytarnej w warunkach fizjologicznych i w cukrzycy.

Nefropatia cukrzycowa jest jednym z najczęściej występujących i najpoważniejszych powikłań cukrzycowej choroby nerek. Niestety nasza wiedza o przyczynach i mechanizmach tej postaci nefropatii jest wciąż bardzo niewielka. 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. Obecnie wiadomo już, że błona szczelinowa nie jest statycznym molekularnym sitem. Stanowi ona wysoce dynamiczny kompleks białkowy. Do najważniejszych z nich zaliczane są nefryna i podocyna. W cukrzycy wszystkie te procesy są zaburzone, a strukturalne uszkodzenia podocytów, błony podstawnej i błony szczelinowej są pierwszymi morfologicznymi wykładnikami rozwijającej się albuminurii. Dodatkowo w hiperglikemii obserwuje się zwiększony stan zapalny tkanki nerkowej, powodujący dodatkowe zwężenie wypustek stopowatych tworzących błonę szczelinową podocyta. Hiperglikemia i stan zapalny tkanki nerkowej powodują także zainicjowanie śmierci komórek podocytarnych, które nie ulegają odnowieniu. Do dzisiaj nie zostały poznane mechanizmy zaburzeń funkcji i metabolizmu komórek podocyta towarzyszące rozwijającej się albuminurii. Wiemy natomiast, że jedną z przyczyn rozwijającej się nefropatii cukrzycowej jest rozregulowanie aktywności enzymów proteolitycznych. Enzymy te oprócz głównej funkcji, jaką jest trawienie białka, odpowiadają m.in. za podział komórek, krzepnięcie krwi czy prawidłowe działanie układu odpornościowego. Ostatnio wykazaliśmy, że w hiperglikemii zwiększona aktywność katepsyny C (CatC) prowadzi do uszkodzenia struktury komórki podocytarnej i w konsekwencji do zwiększonej przepuszczalności albuminy przez kłębuszkową barierę filtracyjną. Katepsyna C jest to dipeptydylowa egzoptydaza odpowiedzialna m.in. za aktywację białek poprzez odcinanie domen propeptydowych. Najbardziej znaną funkcją CatC jest aktywacja neutrofilowych proteaz serynowych (NSP). Nadmierna aktywność tych enzymów prowadzi do rozwoju różnego rodzaju chorób o podłożu zapalnym i immunologicznym. Podocyty wykazują również cechy komórek odpornościowych, które pozwalają im szybko reagować i chronić się przed zewnątrzkomórkowymi patogenami i brakiem równowagi metabolicznej. Ostatnio odkryto w podocytach istnienie pyroptozy, która jest rodzajem śmierci komórek, wcześniej obserwowanej tylko w komórkach odpornościowych. Nasze wstępne badania wykazały obecność serynowych proteaz również w podocytach. Postawiliśmy zatem hipotezę, że fizjologiczna równowaga między serynowymi proteinazami i anty-proteinazami jest niezbędna do utrzymania prawidłowej funkcji i struktury bariery filtracyjnej tworzonej przez podocyty i, że zakłócenie tej równowagi w cukrzycy, prowadzi do aktywacji immunologicznej komórki podocytarnej oraz stanu zapalnego. Głównym celem tego projektu będzie zatem określenie roli neutrofilnych proteaz serynowych w rozwoju patologicznych zmian w obrębie kłębuszkowej bariery filtracyjnej obserwowanych w cukrzycy oraz ich wpływ na funkcję komórki podocytarnej.

Projekt badawczy będzie podzielony na dwie części: *in vivo* i *in vitro*. W badaniach *in vivo* użyjemy modelu szczurów rasy ZSDS oraz myszy z wyciszonym genem katepsyny C (CTPC<sup>-/-</sup>). Model ZSDS wykazuje progresję cukrzycy typu 2 podobną do choroby u ludzi - stan przedcukrzycowy (w wieku 8-16 tygodni), jawną cukrzycę (> 16 tygodni), powikłania cukrzycowe (24 tygodnie). W doświadczeniach *in vitro* użyjemy podocytów wyizolowanych ze szczurów rasy Wistar jak i linii immortalizowanych (mysiej i ludzkiej). Przeprowadzone w ramach projektu badania funkcjonalne, biochemiczne i molekularne będą miały na celu określenie roli serynowych proteaz w regulacji funkcji i struktury komórki podocytarnej oraz poznanie nowego mechanizmu odpowiedzi immunologicznej, w który zaangażowane są te komórki. Ponadto, ważną częścią projektu będzie opracowanie nowych związków umożliwiających monitorowanie aktywności proteolitycznej w szerokim zakresie materiałów biologicznych (lizaty komórkowe, supernatanty, próbki moczu). Podsumowując, interdyscyplinarny charakter tego projektu, z jednej strony umożliwi lepsze poznanie zaburzeń funkcjonalnych bariery kłębuszkowej występujących w cukrzycy, a z drugiej pozwoli stworzyć podstawę chemiczną do stworzenia w przyszłości nowych narzędzi diagnostycznych do wczesnego wykrywania nefropatii cukrzycowej.