

mgr Patrycja Rachubik

Rola kinazy białkowej PKGI $\alpha$  i kanału jonowego TRPC6 w regulacji funkcji podocytów  
w warunkach fizjologicznych i wybranych stanach patofizjologicznych

The Role of Protein Kinase G Type I $\alpha$  and TRPC6 Channel in Regulating Podocyte Function  
in Physiological Conditions and Selected Pathophysiological States

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

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



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Naukową  
Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej  
im. M. Mossakowskiego PAN

Warszawa, 2021

*Rola kinazy białkowej PKGI $\alpha$  i kanału jonowego TRPC6 w regulacji funkcji podocytów  
w warunkach fizjologicznych i wybranych stanach patofizjologicznych*

Najważniejszym elementem kłębuszkowej bariery filtracyjnej są podocyty – komórki wrażliwe na działanie insuliny, regulujące przepływ filtratu przez szczelinę filtracyjną utworzoną przez przeplatające się wypustki stopowate sąsiednich podocytów. Utrata prawidłowej funkcji tych komórek prowadzi do zmian w przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Zwiększona przepuszczalność bariery filtracyjnej skutkuje rozwojem albuminurii, pierwszego klinicznego objawu cukrzycowej choroby nerek (DKD). Molekularne mechanizmy regulujące funkcjonowanie podocytów i przepuszczalność bariery filtracyjnej w cukrzycy wciąż nie są dokładnie poznane.

Jony wapnia ( $\text{Ca}^{2+}$ ) są ważnymi mediatorami homeostazy komórkowej, a ich napływ do komórki jest regulowany m. in. przez kanał jonowy TRPC6. W podocytach, kanał TRPC6 jest zaangażowany w insulinozależną regulację dynamiki szkieletu aktynowego, a tym samym odgrywa istotną rolę w regulacji przepuszczalności bariery filtracyjnej podczas fizjologicznych wahań filtracji kłębuszkowej.

W insulinozależną regulację przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej zaangażowana jest również kinaza białkowa G typu I $\alpha$  (PKGI $\alpha$ ). Wcześniejsze badania zespołu potwierdzają występowanie zależności pomiędzy aktywacją PKGI $\alpha$ , reorganizacją szkieletu aktynowego, a zwiększoną przepuszczalnością dla albuminy przez warstwę podocytów utworzoną na nylonowej membranie pokrytej kolagenem typu IV.

Rozregulowanie szlaku sygnałowego zależnego od TRPC6 oraz PKGI $\alpha$  wpływa negatywnie na funkcję podocytów, dlatego też istotne jest poznanie szlaków sygnałowych aktywowanych przez te białka. Celem pracy było zbadanie roli PKGI $\alpha$  i TRPC6 w regulacji szlaków sygnałowych kluczowych dla funkcjonowania podocytów zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patofizjologicznych. W cyklu publikacji stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej zaprezentowano dowody potwierdzające występowanie zależności pomiędzy aktywnością TRPC6, PKGI $\alpha$ , a insulinozależną regulacją przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Badania *in vitro* wykazały, że insulina zwiększa przepuszczalność kłębuszkowej bariery filtracyjnej poprzez aktywację szlaku sygnałowego PKGI $\alpha$ /TRPC6. Ponadto insulina indukuje proces reorganizacji aktyny w wyniku TRPC6-zależnego napływu jonów  $\text{Ca}^{2+}$  do komórek podocytarnych hodowanych w warunkach *in vitro*.

TRPC6 odgrywa również kluczową rolę w regulacji insulinozależnego dokomórkowego transportu glukozy w podocytach oraz wpływa na aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK), głównego regulatora metabolizmu glukozy. Co więcej, aktywacja AMPK i TRPC6 jest niezbędna do pobudzenia szlaku sygnałowego zależnego od białka Rac1, którego aktywność wiąże się z kontrolą dynamiki szkieletu aktynowego i z dokomórkowym transportem glukozy.

Warunki patofizjologiczne, takie jak hiperinsulinemia czy hiperglikemia, zaburzają prawidłowe funkcjonowanie podocytów w wyniku aktywacji szlaku sygnałowego PKGI $\alpha$ /VASP. Wysokie stężenia insuliny lub glukozy zwiększają zarówno ilość białka VASP, jak i PKGI $\alpha$ -zależną fosforylację tego białka w pozycji Ser239, inicjują przebudowę szkieletu aktynowego oraz zwiększają przepuszczalność monowarstwy podocytów dla albuminy w sposób zależny od białka VASP.

Powyższe wyniki świadczą o istotnej roli szlaku sygnałowego zależnego od insuliny oraz sygnalizacji wapniowej w regulacji funkcji podocytów oraz kłębuszków nerkowych, co może przekładać się na funkcjonowanie nerek. Zaburzenia sygnalizacji zależnej od insuliny i TRPC6 mogą znacząco zaburzyć stan energetyczny podocytów, upośledzając ich funkcjonowanie, co z kolei może prowadzić do zmian w przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Otrzymane wyniki badań sugerują również, iż jednym z czynników indukujących rozwój DKD jest aktywacja szlaku sygnałowego PKGI $\alpha$ /VASP, mogąca prowadzić do wzrostu przepuszczalności bariery filtracyjnej.