



Gdańsk, 1 czerwca 2021

Prof. dr hab. Teresa Zalewska
Przewodnicząca Komisji
ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich
Rady Naukowej MDK im. M. Mossakowskiego PAN
02-106 Warszawa, ul. A. Pawińskiego 5

Recenzja pracy doktorskiej mgr Patrycji Rachubik pt. „Rola kinazy białkowej PKG α i kanału jonowego TRPC6 w regulacji funkcji podocytów w warunkach fizjologicznych i wybranych stanach patofizjologicznych” przedstawionej mi do oceny w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne.

Praca doktorska mgr Patrycji Rachubik powstała w oparciu publikacje wydrukowane w recenzowanych czasopismach międzynarodowych i zawiera rozdziały: Streszczenie polskojęzyczne i anglojęzyczne, Oryginalność rozprawy, Wstęp, Cel pracy, Metodyka, Omówienie i podsumowanie najważniejszych wyników, Wnioski, Bibliografia, Kopie publikacji wchodzące w skład zbioru, Pisemne oświadczenia autorów prac tworzących zbiór. Opracowanie liczy łącznie 122 strony.

Praca doktorska została przygotowana na podstawie czterech publikacji:

Rogacka D, Audzeyenka I, Rachubik P, Rychłowski M, Kasztan M, Jankowski M, Angielski S, Piwkowska A. 2017. Insulin increases filtration barrier permeability via TRPC6-dependent activation of PKG α signaling pathways. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 1863: 1312-1325; IF5=5,386 (2019)

2. Rachubik P, Szrejder M, Rogacka D, Audzeyenka I, Rychłowski M, Angielski S, Piwkowska A. 2018. The TRPC6-AMPK pathway is involved in insulin-dependent cytoskeleton reorganization and glucose uptake in cultured rat podocytes. *Cell Physiol Biochem*, 51(1): 393-410; IF5=4,354 (2017)

3. Rachubik P, Szrejder M, Audzeyenka I, Rogacka D, Rychłowski M, Angielski S, Piwkowska A. 2020. The PKG α /VASP pathway is involved in insulin- and high glucose-dependent regulation of albumin permeability in cultured rat podocytes. *J Biochem*, 168(6): 575-588; IF5=2,381 (2019)

4. Rachubik P, Piwkowska A. 2019. The role of vasodilator-stimulated phosphoprotein in podocyte functioning. *Cell Biol Int*, 43(10): 1092-1101; Review, IF5=2,223 (2019)



W dwóch publikacjach oryginalnych oraz jednej pracy przeglądowej mgr Rachubik jest pierwszym autorem. W jednej pracy oryginalnej jest trzecim autorem. Wszystkie prace zostały opublikowane w bardzo dobrych recenzowanych czasopismach międzynarodowych. Publikacje te są powiązane ze sobą i spójne tematycznie. Materiał ten znacząco przekracza oczekiwania w odniesieniu do prac doktorskich.

Głównym problemem którego dotyczy praca jest wyjaśnienie mechanizmów zwiększonej przepuszczalności kłębuszków nerkowych dla albumin, co stanowi jeden z najważniejszych problemów klinicznych w nefrologii, szczególnie u pacjentów z cukrzycą. Najważniejszym elementem kłębuszkowej bariery filtracyjnej są podocyty. Utrata prawidłowej funkcji tych komórek prowadzi do zmian w przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej skutkującego rozwojem albuminurii. Jony wapnia (Ca^{2+}) są ważnymi mediatorami homeostazy komórkowej, a ich napływ do komórki jest regulowany m. in. przez obecny w podocytach kanał jonowy TRPC6. W insulinozależną regulację przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej zaangażowana jest również kinaza białkowa G typu α (PKG α). Molekularne mechanizmy regulujące funkcjonowanie podocytów i przepuszczalność bariery filtracyjnej w cukrzycy wciąż nie są dokładnie poznane. Dlatego temat pracy uważam za bardzo ciekawy i ważny zarówno dla badań podstawowych jak i ze względów praktycznych.

Głównym celem pracy było określenie roli szlaku sygnałowego TRPC6/AMPK w insulinozależnej reorganizacji szkieletu aktynowego oraz w dokomórkowym transporcie glukozy w szczurzych podocytach, a także zbadanie udziału kanału jonowego TRPC6 i białka VASP w zależnej od PKG α regulacji przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej w odpowiedzi na wysokie stężenia insuliny i/lub glukozy.

Metodyka badań obejmowała izolację i hodowlę szczurzych podocytów oraz kłębuszków nerkowych, analizy zawartości białek techniką Western Blot, badania lokalizacji białek techniką immunofluorescencyjną, wyciszenie ekspresji genów przez transfekcję siRNA, analizy zawartości mRNA techniką PCR w czasie rzeczywistym, badania komórkowego wychwytu glukozy technikami izotopowymi, badania przepuszczalności kłębuszków nerkowych dla albuminy, a także wiele innych standardowych technik biochemicznych. Wiele z tych procedur jest bardzo wymagających i również zakres stosowanych metod jest bardzo szeroki. Świadczy to o opanowaniu kompleksowego i kompletnego warsztatu badawczego, co stanowi gwarancję dalszego szybkiego rozwoju naukowego i świadczy o możliwości prowadzenia zaawansowanych projektów badawczych.



W badaniach stanowiących podstawę niniejszej rozprawy doktorskiej zaprezentowano dowody potwierdzające występowanie zależności pomiędzy aktywnością TRPC6, PKG1 α , a insulinozależną regulacją przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Główne spostrzeżenia to:

1. Insulina zwiększa przepuszczalność kłębuszkowej bariery filtracyjnej poprzez aktywację szlaku sygnałowego PKG1 α /TRPC6 oraz indukuje proces reorganizacji aktyny w wyniku TRPC6 zależnego napływu jonów Ca²⁺ do podocytów.
2. TRPC6 odgrywa kluczową rolę w regulacji insulinozależnego dokomórkowego transportu glukozy w podocytach oraz wpływa na aktywności kinazy białkowej aktywowanej przez AMP (AMPK).
3. Aktywacja AMPK i TRPC6 jest niezbędna do pobudzenia szlaku sygnałowego zależnego od białka Rac1, którego aktywność wiąże się z kontrolą szkieletu aktynowego i z dokomórkowym transportem glukozy.
4. Warunki patofizjologiczne, takie jak hiperinsulinemia czy hiperglikemia, zaburzają prawidłowe funkcjonowanie podocytów w wyniku aktywacji szlaku sygnałowego PKG1 α /VASP.
5. Wysokie stężenia insuliny lub glukozy zwiększają zarówno ilość białka VASP, jak i PKG1 α -zależną fosforylację tego białka w pozycji Ser239, inicjują przebudowę szkieletu aktynowego oraz zwiększają przepuszczalność monowarstwy podocytów dla albuminy w sposób zależny od białka VASP.

Wyniki tych badań mają znaczenie poznawcze, wykazując istotną rolę szlaku sygnałowego zależnego od insuliny oraz sygnalizacji wapniowej w regulacji funkcji podocytów oraz kłębuszków nerkowych. Badania te wyjaśniają też zjawiska patologiczne łącząc zaburzenia sygnalizacji zależnej od insuliny i TRPC6 ze stanem energetycznym podocytów, zaburzeniami funkcji tych komórek, aktywacją szlaku sygnałowego PKG1 α /VASP i wzrostem przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Wyniki te dają podstawy poszukiwania nowych terapii które mogły by specyficznie blokować te procesy patologiczne.

Praca przygotowana jest niezwykle starannie i napisana w sposób klarowny. Trudno jest wnieść jakiegokolwiek uwagi, szczególnie gdy badania zostały przeprowadzone w tak dobrym ośrodku, a publikacje stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej poddane były recenzji w redakcjach bardzo wymagających czasopism. Można jedynie poprosić o przedstawienie jak uzyskane wyniki mogą ukierunkować poszukiwania nowych terapii w cukrzycy i chorobach nerek. Czy mechanizmy zidentyfikowane w przedstawianych badaniach mogą mieć znaczenie w niecukrzycowych patologiiach nerki przebiegających z albuminuria? Zaletą z punktu



widzenia spójności i porównania różnych wyników jest zastosowanie jednego gatunku i dwóch modeli eksperymentalnych hodowanych podocytów i izolowanych kłębuszków nerkowych szczura. Jest to też jednak też pewne ograniczenie: czy można być pewnym że procesy te tak samo funkcjonują w nerce człowieka? Czy są badania *in vivo* które potwierdzały by wnioski z przedstawionych badań *in vitro*? Taka dyskusja dotycząca szerszego kontekstu i perspektyw prowadzonych badań mogła by nie zostać dobrze przyjęta w poszczególnych publikacjach w czasopismach, jednak na pewno była by ciekawa w pracy doktorskiej.

Praca stanowi bardzo istotny wkład w zrozumienie mechanizmów patologicznych przyczyniających się do dysfunkcji nerki w cukrzycy. Badania te mogą pomóc w opracowaniu nowych terapii. Oceniana praca spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawie doktorskiej.

Wnoszę do Komisji ds. Przewodów i Postępowań Doktorskich Rady Naukowej MDK im. M. Mossakowskiego PAN o dopuszczenie mgr Patrycji Rachubik do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Ponadto, biorąc pod uwagę wysoką wartość naukową wyników uzyskanych z zastosowaniem unikalnych i bardzo wymagających modeli eksperymentalnych, a także publikacje tych wyników w bardzo dobrych czasopismach składam dodatkowy wniosek o wyróżnienie.

Z poważaniem

KIEROWNIK
Katedry i Zakładu Biochemii
Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego
prof. dr hab. Ryszard Tomasz Smoleński