

mgr Maria Szrejder

Rola kinazy białkowej AMP w regulacji funkcji kłębuszkowej bariery  
filtracyjnej i cytoszkieletu komórek podocytarnych.

The role of AMP protein kinase in the regulation of glomerular filtration barrier  
function and podocyte actin cytoskeleton.

Rozprawa na stopień naukowy doktora nauk medycznych  
w dyscyplinie biologia medyczna

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



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

Warszawa, rok 2021

## 1.1. Streszczenie

Kluczowym elementem kłębuszkowej bariery filtracyjnej są podocyty, które posiadają w swoich wypustkach stopowatych rozbudowany cytoszkielet aktynowy, mający zdolność regulacji wielkości powierzchni filtracyjnej. Wypustki stopowate sąsiednich podocytów tworzą strukturę błony szczelinowej, a kompleks zakotwiczonych w niej białek ściśle kontroluje dynamikę przebudowy cytoszkieletu aktynowego. AMP-zależna kinaza białkowa jest kluczowym enzymem odpowiedzialnym za utrzymanie energetycznej homeostazy oraz właściwą odpowiedź metaboliczną w zależności od zmieniających się warunków środowiskowych, w tym również na warunki stresowe. Podocyty, pokrywające zewnętrzną powierzchnię włóściczków w kłębuszku, wydają się być komórkami szczególnie wrażliwymi na działanie wysokiego stężenia glukozy czy też stresu mechanicznego, co ma miejsce w przebiegu licznych glomerulopatii m.in. nefropatii cukrzycowej. W stanach patofizjologicznych gwałtownie wzrasta uwalnianie nukleotydów z komórek podocytarnych, jak i z kłębuszków nerkowych, prowadząc do lokalnego wzrostu ich stężenia w przestrzeni zewnątrzkomórkowej. Uwalniane nukleotydy oraz produkty ich zewnątrzkomórkowej degradacji, działając za pośrednictwem receptorów nukleotydowych P2 pełnią funkcje cząstek sygnałowych regulujących skurcz naczyń, tym samym przyczyniając się do modulacji tempa filtracji kłębuszkowej.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu aktywacji kinazy AMP w warunkach hiperglikemii oraz stymulacji receptorów P2 na białka związane z cytoszkieletem aktynowym komórek podocytarnych oraz funkcję kłębuszkowej bariery filtracyjnej.

Doświadczenia przeprowadzono na izolowanych kłębuszkach nerkowych pochodzących od szczurów stada Wistar oraz na szczurzych podocytach hodowli pierwotnej.

W wyniku przeprowadzonych analiz immunoenzymatycznych w podocytach hodowanych w obecności wysokich stężeń glukozy stwierdzono zmniejszenie poziomu fosforylacji

AMPK, który ulegał zwiększeniu pod wpływem stymulacji AMPK przez metforminę. Jednocześnie stwierdzono, że obserwowane zmiany są skorelowane z ilością kanału wapniowego TRPC6, stanowiącego istotny element błony szczelinowej. W środowisku hiperglikemicznym zaobserwowano wzrost ilości białka TRPC6, która była przywracana do wartości kontrolnych w obecności metforminy. Podobną zależność wykazano w przeprowadzonym barwieniu immunofluorescencyjnym, które wykazało zmniejszenie ilości kompleksu złożonego z TRPC6 oraz podjednostki AMPK $\alpha$ 1 w warunkach wysokiego stężenia glukozy oraz zwiększenie ilości tego kompleksu w wyniku działania metforminy. Z przeprowadzonych badań wynika również, że w warunkach wysokiego stężenia glukozy dochodzi do zmniejszenia ilości nefryny, a także zmian w wewnątrzkomórkowej lokalizacji aktyny oraz aktywności białek modulujących cytoszkielet aktynowy. Co więcej, zastosowanie metforminy skutkowało odwróceniem zmian związanych z organizacją włókien aktynowych, dlatego możemy przypuszczać że proces ten jest zależny od AMPK. W przeprowadzonych doświadczeniach na izolowanych kłębuszkach nerkowych i podocytach stwierdziliśmy wzrost przepuszczalności dla albuminy w warunkach hiperglikemii oraz jej znaczny spadek w obecności metforminy, co potwierdza protekcyjne działanie metforminy na kłębuszkową barierę filtracyjną w hiperglikemii.

Przeprowadzone badania wykazały również, że aktywacja receptorów nukleotydowych w komórkach podocytarnych wpływa na równowagę metaboliczną poprzez zwiększenie poziomu fosforylacji AMPK, a także równowagę oksydoredukcyjną poprzez zahamowanie produkcji reaktywnych form tlenu. Spostrzeżono również, że stymulacja purynergiczna wpływa na wielkość syntezy cyklicznych nukleotydów (cAMP i cGMP) regulujących skurcz naczyń krwionośnych. Ponadto, aktywacja receptorów P2, a w szczególności receptora P2Y<sub>4</sub>, prowadzi do przebudowy cytoszkieletu aktynowego, czemu towarzyszą spadek aktywności białka RhoA oraz wzrost przepuszczalności dla albuminy przez warstwę podocytów. Proces

ten wydaje się być sprzężony z działaniem kinazy białkowej A, której hamowanie aktywności zapobiegało zmianom indukowanym przez stymulację purynergiczną.

Na podstawie otrzymanych danych można wnioskować, że AMP-kinaza, jak i zewnątrzkomórkowe nukleotydy za pośrednictwem receptorów P2 regulują funkcję podocytów, a także modyfikują reorganizację cytoszkieletu aktynowego podocytów oraz przepuszczalność kłębuszkowej bariery filtracyjnej. Obserwowane w badanych warunkach zmiany mogą przyczynić się do lepszego poznania mechanizmów regulujących funkcjonowanie kłębuszkowej bariery filtracyjnej w warunkach fizjologicznych oraz patofizjologicznych.