

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

**Źródła finansowania badań:**

Praca finansowana była z projektów badawczych Narodowego Centrum Nauki nr 2012/05/N/NZ5/00808 oraz DEC-2014/12/T/NZ5/00273 (mgr Ireny Audzeyenka) oraz ze środków IMDiK PAN (dr hab. Maciej Jankowski).

**Uzyskane wyniki w części zostały opublikowane:**

Audzeyenka I, Rogacka D, Piwkowska A, Rychlowski M, Bierla JB, Czarnowska E, Angielski S, Jankowski M. *Reactive oxygen species are involved in insulin-dependent regulation of autophagy in primary rat podocytes*. Int J Biochem Cell Biol 2016; 75: 23-33.

Składam serdecznie podziękowania

Mojemu Promotorowi

**Profesorowi Maciejowi Jankowskiemu**

za poświęcony dla mnie czas, zaangażowanie i pomoc przy realizacji niniejszej pracy.

Cenne wskazówki Pana Profesora i jego życzliwość stworzyły wspaniałą atmosferę pracy dzięki której mogłam sprostać postawionym wyzwaniom badawczym.

Szczególne podziękowania kieruję do

**Profesora Stefana Angielskiego**

za wsparcie merytoryczne i duchowe, a także za wiarę w moje możliwości i ciągłe motywowanie mnie do dalszego rozwoju naukowego.

Za współpracę i pomoc w realizacji doświadczeń oraz owocne dyskusje dziękuję również moim koleżankom, w szczególności *dr hab. Agnieszce Piwkowskiej i dr Dorocie Rogackiej.*

Dziękuję mojemu **Mężowi** za jego cierpliwość i bezgraniczną wiarę we mnie, oraz mojemu **Bratu**, który zawsze był obok i mnie wspierał.

*Niniejszą pracę dedykuję  
moim wspaniałym rodzicom,  
**Mamie i Tacie***

## Wykaz używanych skrótów

2-DG – [1,2-<sup>3</sup>H]-deoksy-D-glukoza

AGEs – końcowe produkty glikacji (ang. *advanced glycation end products*)

Akt/PKB – kinaza białkowa B (ang. *protein kinase B*)

AMP – adenozy-no-5'-monofosforan

AMPK – kinaza aktywowana 5'AMP (ang. *5'AMP-activated protein kinase*)

ANP – przedsionkowy peptyd natriuretyczny (ang. *atrial natriuretic peptide*)

Atg – geny związane z autofagią (ang. *autophagy-related genes*)

ATP – adenozy-no-5'-trifosforan

BCIP – fosforan 5-bromo-4-chloro-3-indoksyłowy

Bcl-2 - rodzina białek pro i antyapoptotycznych oraz białko antyapoptotyczne (ang. *B-cell leukemia-2*)

BSA – albumina wołowa (ang. *bovine serum albumin*)

CD2AP – białko związane z CD2 (ang. *cluster of differentiation associated protein 2*),

CDK – kinaza zależna od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinases*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole

DTT – ditiotreitól

EMT – przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. *epithelial-mesenchymal transition*)

Erk – kinaza regulowana zewnątrzkomórkowo (ang. *extracellular signal-regulated kinase*)

FBS – surowica płodowa bydłęca (ang. *foetal bovine serum*)

FITC – 5-izotiocyanian fluoresceiny

FSGS – ogniskowe segmentowe szkliwienie kłębuszków ni wsp.owych (ang. *focal segmental glomerulosclerosis*)

GBM – błona podstawna kłębuszków (ang. *glomerular basement membrane*)

GFB – bariera filtracyjna kłębuszków (ang. *glomerular filtration barrier*)

GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*)

GLUT – białko transportujące glukozę

GβL - białko podobne do podjednostki β białka G (ang. *G protein β-subunit like protein*)

HG – środowisko o wysokim stężeniu D-glukozy (30 mM)

IR – receptor insulinowy

IRS – substrat receptora insulinowego

JNK – kinaza C-Jun N-końcowa (ang. *c-Jun N-terminal Kinase*)

LAMP - białko związane z błoną lizosomu (ang. *lysosomal-associated membrane protein*)

LC3 – białko związane z mikrotubulami (ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*)

LDH – dehydrogenaza mleczanowa

LG – środowisko o 11 mM stężeniu D-glukozy i 19 mM L-glukozy

MAGI – błonowa kinaza guanylanowa o odwróconej orientacji (ang. *membrane-associated guanylate kinase with inverted orientation*)

MAPK – kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*)

m.c. – masa ciała

MCP – białko chemotaktyczne dla monocytów (ang. *monocyte chemoattractant protein*)

mTOR – ssące białko docelowe dla rapamycyny (ang. *mammalian target of rapamycin*)

MTT – bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylotetrazolu

NBT – błękit nitrotetrazolowy

NC – nefropatia cukrzycowa

p150 – kinaza serynowa o masie cząsteczkowej 150kDa

PBS – bufor fosforanowy (ang. *phosphate buffered saline*)

PCNA – jądrowy antygen komórek proliferujących (ang. *proliferating cell nuclear antigen*)

PE – fosfatydyloetanoloamina (ang. *phosphatidylethanolamine*)

PI3K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu

PPAR – receptory aktywowane proliferatorami peroksysomów (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*)

PRAS40 - białko wchodzące w skład kompleksu mTORC1 (ang. *proline-rich PKB/Akt substrate 40-kDa*)

Raptor - białko regulatorowe związane z mTOR (ang. *regulatory associated protein of mTOR*)

RFP – białko czerwonej fluorescencji (ang. *red fluorescent protein*)

ROS – reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

Rubicon - białko oddziałujące z Beclin 1 (ang. *RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin1-interacting protein*)

SEM – błąd standardowy średniej

SG – środowisko o standardowym stężeniu D-glukozy (11 mM)

STZ – streptozotocyna

TBE – bufor Tris-boran-EDTA

TBS – bufor solny Tris (ang. *Tris Buffered Saline*)

TEM – transmisyjna mikroskopia elektronowa

TEMED – N,N,N',N'-tetrametyloetylenoamina

TGF- $\beta$  – transformujący czynnik wzrostu beta (ang. *transforming growth factor beta*)

TRPC – kationo-selektywny kanał jonowy (ang. *transient receptor potential cation channel*)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónki naczyniowej (ang. *vascular endothelial growth factor*)

## Spis treści

<b>1. Streszczenie</b> .....	11
Abstract .....	14
<b>2. Wstęp</b> .....	17
2.1 Nefron jako podstawowa jednostka strukturalno-funkcjonalna nerek .....	17
2.2 Struktura i funkcja bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego .....	17
2.2.1 Warstwa podocytarna bariery filtracyjnej .....	20
2.3 Nefropatia i podocytopatia cukrzycowa .....	22
2.4 Proces autofagii w podocytach .....	25
2.4.1 Regulacja aktywności autofagii.....	29
2.4.1.1 Regulacja autofagii przez insulinę.....	31
<b>3. Cel pracy</b> .....	33
<b>4. Materiały i metody</b> .....	34
4.1 Zwierzęta doświadczalne .....	34
4.2 Izolacja kłębuszków nerkowych .....	34
4.3 Hodowla pierwotna podocytów szczurzych .....	35
4.4 Ocena jakościowa hodowanych podocytów .....	36
4.4.1 Ocena mikroskopowa .....	36
4.4.1.1 Żywotność komórek.....	36
4.4.1.2 Ultrastruktura komórek .....	36
4.4.2 Ocena metaboliczna .....	38
4.4.3 Ocena immunofluorescencyjna .....	38
4.5 Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA .....	39
4.5.1 Izolacja i oczyszczanie komórkowego RNA.....	39
4.5.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji.....	39
4.5.3 PCR w czasie rzeczywistym.....	40
4.6 Immunodetekcja białek.....	41
4.6.1 Western blot .....	41
4.6.1.1 Przygotowanie lizatów komórkowych.....	41
4.6.1.2 Żele poliakrylamidowe .....	41
4.6.1.3 Elektroforeza i elektrotransfer .....	41
4.6.2 Immunofluorescencja .....	42



4.7 Pomiar aktywności PI3K klasy III .....	44
4.7.1 Immunoprecypitacja PI3K klasy III.....	44
4.7.2 Oznaczanie aktywności PI3K klasy III.....	45
4.8 Transfekcja podocytów .....	47
4.8.1 Transfekcja komórek przy użyciu wyciszającego RNA (siRNA) .....	47
4.8.2 Transfekcja podocytów z użyciem plazmidowego DNA .....	47
4.8.2.1 Przygotowanie plazmidowego DNA.....	47
4.8.2.2 Nukleofekcja.....	48
4.9 Transmisyjna mikroskopia elektronowa .....	49
4.10 Ocena żywotności podocytów w układach badawczych.....	50
4.10.1 Test MTT (test redukcji soli tetrazolowej) .....	50
4.10.2 Barwienie aneksyną V .....	50
4.11 Analiza przepuszczalności warstwy podocytów .....	51
4.12 Pomiar aktywności dokomórkowego transportu	
2-deoksy-[1,2-3H]-D-glukozy .....	52
4.13 Oznaczanie stężenia białka.....	53
4.13.1 Metoda Lowry'ego.....	53
4.13.2 Metoda Bradforda .....	53
4.14 Analiza statystyczna .....	53
4.15 Bufory, odczynniki, materiały.....	53
4.15.1 Bufory .....	53
4.15.2 Odczynniki.....	54
4.15.3 Materiały .....	55
<b>5. Wyniki.....</b>	<b>56</b>
5.1 Cytomorfologiczne wykładniki autofagii w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej.....	56
5.2 Ocena modyfikacji aktywności autofagii przez insulinę w podocytach .....	59
5.2.1 Ilość białka LC3 w kłębuszkach nerkowych szczurów Zucker.....	59
5.2.2 Wpływ insuliny na poziom markerów autofagalnych w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej.....	60
5.2.3 Wpływ insuliny na tworzenie struktur autofagalnych w żywych podocytach.....	70
5.3 Udział reaktywnych form tlenu w regulacji autofagii przez insulinę.....	72

5.3.1 Wpływ apocyniny na stymulowany insuliną poziom białek autofagalnych .....	72
5.3.2 Wpływ insuliny na ilość białek autofagalnych po wyciszeniu NOX4 (siRNA NOX4) .....	74
5.4 Wpływ insuliny na żywotność podocytów .....	81
5.4.1 Wpływ insuliny na żywotność podocytów po transfekcji siRNA Atg5.....	81
5.4.2 Wpływ insuliny na liczbę podocytów ulegających apoptozie po transfekcji siRNA Atg5.....	82
5.5 Udział autofagii w regulacji funkcji podocytów stymulowanych insuliną.....	84
5.5.1 Wpływ insuliny na przepuszczalność dla albuminy warstwy podocytów po transfekcji siRNA Atg5.....	84
5.5.2 Wpływ insuliny na aktywność dokomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2- <sup>3</sup> H]-D-glukozy w podocytach po transfekcji siRNA Atg5 .....	85
5.6 Aktywność autofagii w podocytach hodowanych w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy .....	86
5.7 Udział autofagii w regulacji żywotności i apoptozy podocytów w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy .....	90
5.7.1 Żywotność podocytów w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy po transfekcji siRNA Atg5 .....	90
5.7.2 Wpływ wysokiego stężenia D-glukozy w środowisku hodowlanym na liczbę podocytów apoptotycznych po transfekcji siRNA Atg5 .....	92
5.8. Przepuszczalność dla albuminy warstwy podocytów hodowanych w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy po transfekcji siRNA Atg5 .....	93
5.9 Wpływ insuliny na aktywność dokomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2- <sup>3</sup> H]-D-glukozy w podocytach hodowanych w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy po transfekcji siRNA Atg5 .....	94
<b>6. Dyskusja .....</b>	<b>96</b>
<b>7. Wnioski.....</b>	<b>110</b>
<b>8. Piśmiennictwo .....</b>	<b>111</b>

## 1. 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-<sup>3</sup>H]-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 nadtlakiem wodoru (100 µM, 30 min), stanowiącym egzogenne źródło ROS. Wykazano także, że insulina zwiększa poziom fosforylacji mTOR (Ser<sup>2448</sup>) oraz AMPK (Thr<sup>172</sup>), 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 znamienych 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.

## ABSTRACT

Diabetic nephropathy (DN) is one of the chronic complications of diabetes which remains the leading cause of renal failure requiring renal replacement therapy. Structural and functional impairment of podocytes, which constitute the inner layer of the renal glomerular filtration barrier, plays an important role in the development of DN. Podocytes are insulin sensitive cells with a very limited capacity for cell division, and therefore their loss may be initially balanced by hypertrophy of the remaining glomerular podocytes. Their deficiency however cannot be compensated by proliferation or recruitment and differentiation of other glomerular cells into podocytes.

Autophagy plays a key role in podocyte viability and function. It serves as an adaptive mechanism aimed to remove improperly folded proteins and non-functional intracellular organelles, which might be produced during increased protein synthesis observed in cellular hypertrophy.

The aim of the study was to investigate the mechanisms leading to podocyte damage in diabetes and to evaluate the involvement of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy using primary culture of rat podocytes. Due to the fact that hyperglycemia appears in the early stages of type 2 diabetes as the result of developing cell insulin resistance, which in turn leads to a compensatory increase in plasma insulin levels, in the present study we investigated the effect and mechanism of action exhibited by high insulin (300 nM, 60 min, 3 and 5 days) and D-glucose (30 mM, for 5 days) concentrations regarding the expression of autophagy markers at the mRNA and protein level, viability and apoptosis of podocytes and their permeability to albumin and intracellular 2-deoxy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glucose (2-DG) transport. The effect of insulin was evaluated in 11 mM D-glucose culture medium.

Numerous autophagy structures (autophagosomes and autophagolysosomes) have been observed in TEM in podocytes cultured without exogenous insulin. Next, it has been shown that insulin increases the expression of the autophagy markers LC3-I, LC3-II, Atg5 (protein and mRNA) and the amount of Atg5-Atg12 complexes. Changes in the expression of these markers were transient and were observed after short (60 minutes) and long term (3 days) incubation of podocytes with insulin. Increased expression of LC3-II protein was also observed in glomeruli isolated from obese Zucker rats, characterized by hyperinsulinemia.

In order to investigate the insulin effect *in vitro* on autophagy activity in living cells we performed nucleofection of podocytes using plasmid DNA encoding the LC3 gene and genes for the green and red fluorescence proteins (GFP and RFP, respectively), which enabled tracing the intracellular localization of LC3 in the course of time. Insulin caused a transient increase in the accumulation of LC3 in autophagolysosomes; the maximum effect, i.e. 2.2-fold increase, was observed after 2 days of podocyte exposure to insulin. Due to the fact that in podocytes insulin stimulates the production of reactive oxygen species (ROS), which are potent autophagy activators, we examined the effect of inhibiting the activity and expression (apocynin – 100  $\mu$ M, 2h; NOX4 siRNA) of the NAD(P)H oxidase, the main endogenous source of ROS in podocytes, on the activity of autophagy by analyzing changes in the expression of LC3, Atg5 and Atg5-Atg12 complexes. Apocynin abrogated the stimulatory effect of insulin on the expression of LC3 and Atg5-Atg12 complexes, and NOX4 siRNA transfection inhibited the stimulatory effect of insulin on the expression of LC3 (protein and mRNA), Atg5 (mRNA) and the amount of Atg5-Atg12 complexes. The involvement of NOX4 in the insulin effect on LC3 and Atg5 expression was confirmed by confocal immunofluorescence microscopy; insulin induced accumulation of intracellular LC3 and Atg5 puncta, whereas this effect was not observed in podocytes after transfection with NOX4 siRNA. No effect of NOX4 siRNA on the intracellular localization of LC3 and Atg5 was seen after podocyte stimulation with hydrogen peroxide (100  $\mu$ M, 30 minutes), an exogenous source of ROS. Next, it has been shown that insulin increases the phosphorylation of mTOR (Ser<sup>2448</sup>) and AMPK (Thr<sup>172</sup>), enzymes involved in the regulation of autophagy at the stage of initiation and elongation of autophagosome membranes. However, no significant effect of insulin was observed on the expression of ULK1, beclin 1, JNK1 and class III PI3K at the protein level, or on the enzymatic activity of class III PI3K.

Further experiments have revealed altered expression of autophagy markers (on the protein level) in podocytes cultured 5 days in high glucose concentration (30 mM D-glucose; HG). We observed reduced expression of LC3-II and increased expression of ULK1, although in contrast to LC3-II, changes in ULK1 expression were also present in the medium containing 11 mM D-glucose and 19 mM L-glucose (LG) (osmotic control). There were no significant changes in beclin 1, class III PI3K and Atg5-Atg12 expression, or in the enzymatic activity of class III PI3K in podocytes cultured in HG and LG.

We have further investigated the effect of insulin and HG on podocyte viability and apoptosis, as well as the involvement of autophagy in these processes using podocytes transfected with Atg5 siRNA. Insulin (300 mM, 60 minutes, 3 and 5 days) did not affect podocyte viability and apoptosis, while Atg5 down-regulation resulted in an approximately 13% increase in podocyte apoptosis upon insulin stimulation (60 minutes). HG medium significantly decreased podocyte survival, and this effect was enhanced after silencing Atg5 expression. Additionally, the number of apoptotic podocytes was elevated in HG. There was no impact of the LG environment on podocyte viability and apoptosis.

It has been shown that insulin (60 minutes, 3 and 5 days) increases the permeability of podocytes to albumin, and the effect of short-term incubation of podocytes with insulin (60 minutes) was abrogated after Atg5 siRNA transfection. The increased permeability of podocytes to albumin, observed after prolonged incubation with insulin (3 and 5 days), was not influenced by Atg5 siRNA transfection. The increased permeability of podocytes to albumin was shown also in HG and LG media and this effect was unchanged after Atg5 silencing. Moreover, we have investigated the potential link between autophagy and podocyte sensitivity to insulin. It has been shown that short-term (60 minutes) incubation of podocytes in the presence of insulin increases the activity of 2-DG uptake and this effect was abolished after podocyte transfection with Atg5 siRNA. Additionally, prolonged incubation of podocytes in HG, but not in LG medium, prevented the stimulatory effect of insulin on the activity of intracellular 2-DG transport. HG effect on the activity of 2-DG uptake was observed also in podocytes after transfection with Atg5 siRNA.

The obtained results indicate that both high extracellular concentrations of insulin and glucose affect autophagy activity in podocytes, which can alter podocyte permeability to albumin and might contribute to the development of insulin resistance in podocytes.



## 2. Wstęp

### 2.1 Nefron jako podstawowa jednostka strukturalno-funkcjonalna nerek

U ludzi, każda z dwóch nerek zbudowana jest z około 1 miliona nefronów, w skład których wchodzi kłębuszek nerkowy oraz cewki – bliższa, pętla nefronu oraz dalsza. Kłębuszki nerkowe utworzone są z sieci naczyń włosowatych powstałych w wyniku rozgałęzienia tętniczki doprowadzającej krew do kłębuszka, otoczone są torebką Bowmana i znajdują się w części zewnętrznej nerek, tak zwanej korze nerek. Pomiędzy naczyniami kapilarnymi kłębuszka nerkowego znajdują się komórki mezangialne, które wraz z macierzą pozakomórkową tworzą mezangium.

Nadrzędną funkcją nerek jest utrzymywanie stałości składu środowiska wewnętrznego organizmu, między innymi, poprzez filtrowanie osocza i ciągle dostosowywanie ilości wydalanych z moczem związków fizjologicznie aktywnych do ich wewnątrzustrojowego zapotrzebowania. Przez nerki przepływa około 600 ml/min osocza, z którego w kłębuszkach nerkowych powstaje dziennie ok. 180 l ultrafiltratu, tak zwanego moczu pierwotnego, który jest następnie zagęszczany w cewkach nerkowych do moczu ostatecznego. W procesie filtracji osocza przesączeniu ulega także od kilku do kilkunastu gramów białek (o masie cząsteczkowej <70 kDa). Białka te ulegają prawie całkowitej reabsorpcji głównie w cewce bliższej i u zdrowego człowieka ilość ich w moczu ostatecznym nie przekracza 30 mg na dobę, z czego większość stanowi albumina. Zwiększenie wydalania albuminy z moczem (albuminuria) wskazuje na zaburzenia funkcji, przede wszystkim, kłębuszków nerkowych i jest czynnikiem prognostycznym progresji przewlekłych chorób nerek oraz wystąpienia powikłań sercowo-naczyniowych. Albumina, znajdująca się w płynie cewkowym, pogłębia już istniejące uszkodzenia nerek poprzez stymulację sekrecji czynników prozapalnych, np. MCP-1 (ang. *monocyte chemoattractant protein-1*), oraz produkcji kolagenu i transformującego czynnika wzrostu beta (TGF- $\beta$ , ang. *transforming growth factor*), co skutkuje nagromadzeniem macierzy zewnątrzkomórkowej i włóknieniem kłębuszków [1].

### 2.2 Struktura i funkcja bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego

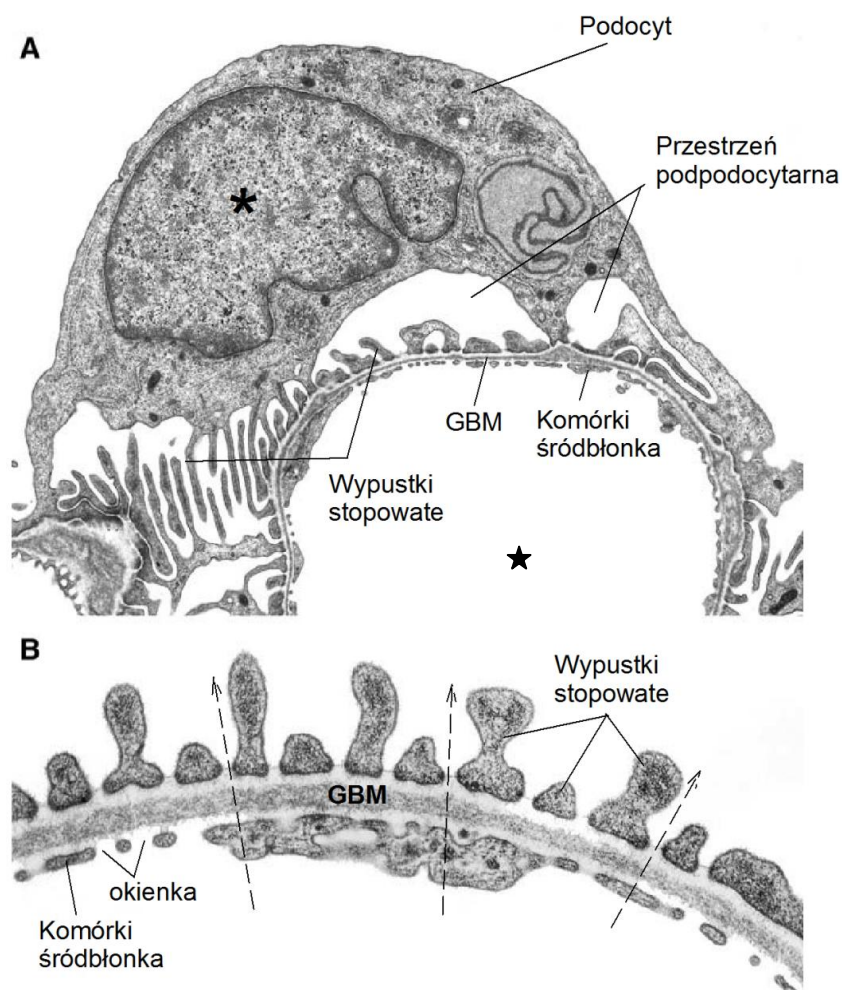
Filtracja osocza zachodzi przez wielowarstwowy filtr kłębuszkowy (GFB, ang. *glomerular filtration barrier*), który funkcjonuje na zasadzie sita molekularnego

ograniczającego przepływ makromolekuł z osocza do moczu pierwotnego w zależności od ich wielkości (masy cząsteczkowej i średnicy) oraz ładunku elektrycznego. Tempo przesączania osocza, zwanego filtracją kłębuszkową, jest determinowane przez efektywne ciśnienie filtracyjne panujące w naczyniach kapilarnych kłębuszka nerkowego oraz wielkość i „szczelność” powierzchni GFB. Prawidłowa funkcja filtracyjna nerek zależy od integracji funkcjonalnej wszystkich elementów tworzących GFB. Choroby związane z uszkodzeniem GFB objawiają się przede wszystkim zwiększoną ilością wydalanej albuminy z moczem, czemu mogą towarzyszyć zmiany w tempie filtracji kłębuszkowej.

Pierwszą warstwę GFB tworzą komórki śródbłonka naczyń włosowatych kłębuszka nerkowego (Ryc. 1). Śródbłonek ten charakteryzuje się obecnością tzw. „okienek” o wielkości 60-80 nm, pokrywających do 20-50% całkowitej powierzchni naczynia kapilarnego i tworzących miejsca o zwiększonej przewodności hydraulicznej [2]. W 2% naczyń kapilarnych okienka pokryte są błoną okienkową. Komórki śródbłonka pokrywa warstwa ujemnie naładowanego glikokaliksu, w skład którego wchodzi przede wszystkim proteoglikany z przyłączonymi kowalencyjnie glikozaminoglikanami (GAG), głównie siarczanem heparanu i chondroityny oraz kwasem sialowym, a ponadto glikoproteiny oraz glikolipidy [3]. Liczne i specyficzne miejsca wiązania białek osocza do składników glikokaliksu sprawiają, że glikokaliks stanowi rodzaj rusztowania molekularnego dla organizacji przestrzennej białek, oraz odgrywa rolę w przekazywaniu sygnału z płynu pozakomórkowego do wnętrza komórek śródbłonka. Glikokaliks zapobiega nadmiernemu przechodzeniu białek osocza do moczu pierwotnego oraz aktywacji lokalnej reakcji zapalnej i agregacji komórek krwi [3]. Uszkodzenie glikokaliksu poprzez trawienie enzymatyczne jego składników, jak i „wypłukanie” zadsorbowanych komponentów białkowych prowadzi do zwiększonej przepuszczalności GFB dla albuminy [4]. Adriamycyna, która zaburza syntezę proteoglikanów oraz GAG, prowadzi do zmniejszenia grubości warstwy glikokaliksu i zwiększonego wydalania białka z moczem [5]. Zmiany w składzie i strukturze glikokaliksu zaobserwowano u zwierząt doświadczalnych oraz u chorych z uszkodzeniem nerek w przebiegu cukrzycy z towarzyszącym białkomoczem [6-8].

Kolejną warstwą bariery filtracyjnej jest błona podstawna kłębuszków nerkowych (GBM, ang. *glomerular basement membrane*) (Ryc. 1). Jest ona zbudowana głównie z kolagenu typu IV (łańcuchy  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$ ), lamininy (LM-521;  $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ ), nidogenu, proteoglikanów (agryna, perlekan) oraz glikoprotein (fibronektyna) [9]. Sieć polimerów

białkowych GBM jest wysoce zorganizowana przestrzennie: kolagen  $\alpha3\alpha4\alpha5$  i nidogen zlokalizowane są w części środkowej, agryna i LM-521 występują w części zewnętrznej GFB bliżej warstwy podocytarnej, natomiast kolagen  $\alpha1\alpha1\alpha2$  zlokalizowany jest przy warstwie komórek śródbłonka [10]. Właściwa organizacja przestrzenna składników GBM jest kluczowa dla prawidłowej funkcji filtra kłębuszkowego, a jej zaburzeniom towarzyszy zwiększone wydalenie albuminy z moczem [11, 12]. Mutacje w genach kodujących składniki GBM stwierdzono u chorych z zespołem Piersona (*LAMB2* kodujący łańcuch  $\beta2$  lamininy) oraz Alporta (*COL4A3*, *COL4A4* i *COL4A5* kodujące kolagen typu IV) [11].

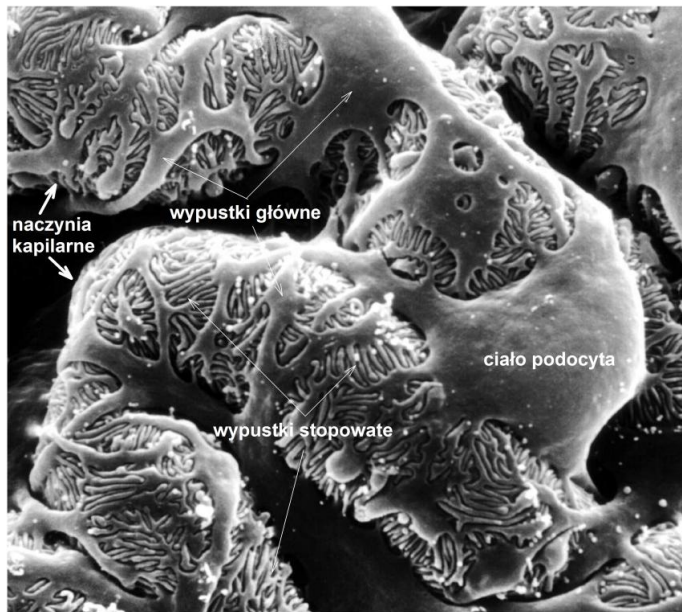


**Ryc. 1.** Struktura bariery filtracyjnej kłębuszka nerkowego. (A) Symbolem (★) zaznaczono światło kapilary wewnątrz-kłębuszkowej, symbolem (\*) wskazano jądro komórkowe podocyta, GBM – błona podstawna kłębuszków nerkowych. (B) Przerywanymi strzałkami zaznaczono kierunek przechodzenia filtratu przez barierę filtracyjną. (Zmodyfikowano z: Pavenstädt i wsp., 2003 [21]).

Trzecim, najbardziej wrażliwym na uszkodzenia, elementem GFB są podocyty, które wspólnie z komórkami śródbłonna uczestniczą w formowaniu GBM. Podocyty są zakotwiczone w błonie podstawnej za pośrednictwem wypustek stopowatych, a ich ciała unoszą się nad GBM tworząc przestrzeń podpodocytarną obejmującą ok. 50-65% powierzchni filtracyjnej (Ryc. 1). Regulacja wielkości tej przestrzeni i panującego w niej ciśnienia hydrostatycznego ma znaczenie w regulacji tempa przepływu filtratu przez GFB [13, 14]. Podocyty wykazują szereg podobieństw z innymi typami komórek – pericytami (np. położenie na powierzchni naczyń włosowatych, kurczliwość) [15, 16], neuronami (np. morfologia, analogiczne połączenia międzykomórkowe) [16, 17] i miocytami (np. budowa cytoszkieletu) [18]. W warunkach fizjologicznych podocyty cechują się ograniczoną zdolnością do podziałów komórkowych, wynikającą z wysokiej ekspresji inhibitorów kinaz zależnych od cyklin oraz niskim poziomem białek powodujących postęp cyklu komórkowego, takich jak PCNA (ang. *proliferating cell nuclear antigen*), Ki-67, cykliny A i B [19]. Ponadto, podocyty podobnie jak miocyty, posiadają rozbudowany aparat kurczliwy, zbudowany z włókien aktyny i miozyny, który jest wrażliwy na działanie substancji naczynioaktywnych, takich jak angiotensyna II, tlenek azotu, czy przedsionkowy czynnik natriuretyczny (ANP) [20].

### **2.2.1 Warstwa podocytarna bariery filtracyjnej**

W podocytach wyróżnia się trzy odrębne morfologicznie i funkcjonalnie struktury: duże ciało komórki, odchodzące od niego cytoplazmatyczne wypustki główne oraz wypustki stopowate, które są z kolei odgałęzieniami wypustek głównych [21]. Cytoszkielet ciała komórki i wypustek głównych składa się głównie z mikrotubul zbudowanych z  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubuliny oraz z filamentów pośrednich zbudowanych z wimentyny i desminy [21]. Ponadto, wypustki podocytarne w odróżnieniu od ciała komórki posiadają aparat kurczliwy, na który oprócz aktyny składają się miozyna II,  $\alpha$ -aktynina, talina i winkulina [22]. Wypustki jednego podocyta oplatają sąsiednie naczynia kapilarne (Ryc. 2), a pomiędzy sąsiadującymi ze sobą wypustkami stopowatymi, ułożonymi równolegle do siebie na wzór zamka błyskawicznego, rozpięta jest cienka błona, tzw. błona szczelinowa, która utrzymuje w odpowiedniej odległości od siebie wypustki stopowate oraz stanowi istotny element filtru kłębuszkowego.



**Ryc. 2.** Przestrzenna lokalizacja podocytów w kłębuszku nerkowym. (Zmodyfikowano z: Pavenstädt i wsp., 2003 [21]).

Wypustki podocytów posiadają trzy charakterystyczne obszary strukturalno-funkcjonalne: część szczytową zwróconą do światła torebki Bowmana, boczną i podstawną przylegającą do GBM. W części szczytowej zlokalizowane są m.in. białka anionowe, takie jak podokaliksyna, podoplanina, podoendyna, które nadają powierzchni błony komórkowej podocyta ładunek ujemny, dzięki czemu utrzymywana jest odpowiednia odległość pomiędzy wypustkami. Natomiast obecność podokaliksyny w moczu jest uważana za wczesny marker uszkodzenia kłębuszków nerkowych, bowiem jej pojawianie się w moczu u chorych z cukrzycą wyprzedza wystąpienie albuminurii [23, 24]. W obszarze tratw lipidowych części podstawno-bocznej wypustek podocytarnych zakotwiczone są białka należące do błony szczelinowej. Głównym białkiem jest nefryna – przezbłonowa glikoproteina należąca do nadrodziny immunoglobulin. Fragment zewnątrzkomórkowy nefryny buduje sieć homo- i heterologicznych połączeń tworzących rusztowanie błony szczelinowej, natomiast funkcją fragmentu wewnątrzkomórkowego jest przekazywanie sygnału z przestrzeni pozakomórkowej do wnętrza podocytów. Nefryna w komórce wchodzi w interakcje, między innymi, z białkami adaptorowymi, np. CD2AP (ang. *cluster of differentiation associated protein 2*), które z kolei oddziałują z białkami efektorowymi cytoszkieletu aktynowego np. z kortaktyną [16]. Innymi charakterystycznymi białkami błony szczelinowej są podocyna i NEPH1-3, które również wchodzi w bezpośrednie interakcje z nefryną i uczestniczą w stabilizacji kompleksów błony szczelinowej,

a także w transdukcji sygnału do cytoszkieletu aktynowego w odpowiedzi na działanie czynników pozakomórkowych [25, 26]. W błonie szczelinowej, w kompleksach z nefryną i podocyną, znajdują się również kanały wapniowe TRPC6, które uczestniczą w regulacji dynamiki cytoszkieletu oraz apoptozy podocytów [16, 27].

Podocyty są jedynymi insulinozależnymi komórkami GFB [28]. Posiadają komponenty ścieżek sygnalizacyjnych dla insuliny, w tym receptory insulinowe (IR-A i IR-B) i substraty receptorów insulinowych (IRS-1, IRS-2). Po stymulacji podocytów insuliną następuje przemieszczanie transporterów glukozy (GLUT1 i GLUT4) z cytoplazmy do błony komórkowej i aktywacja dokomórkowego transportu glukozy [28, 29]. Ważną rolę w prawidłowej odpowiedzi podocytów na działanie insuliny odgrywają białka błony szczelinowej, np. nefryna [30]. U chorych z wrodzonym zespołem nerczycowym typu fińskiego stwierdzono występowanie mutacji w genie dla nefryny, powodujących zmiany jakościowe i ilościowe w białku, prowadzące do zaburzeń w fuzji pęcherzyków cytoplazmatycznych zawierających GLUT1 i GLUT4 z błoną komórkową, a w konsekwencji do insulinooporności podocytów [30]. Glukoza wydaje się być głównym substratem fizjologicznym podocytów, niemniej jednak długotrwałe ich narażenie na działanie wysokiego stężenia glukozy (np. w cukrzycy) może skutkować zaburzeniem prawidłowej funkcji podocytów, określanej mianem podocytopatii cukrzycowej, w głównej mierze odpowiedzialnej za obraz kliniczno-laboratoryjny nefropatii cukrzycowej.

### **2.3 Nefropatia i podocytopatia cukrzycowa**

Nefropatia cukrzycowa (NC) jest przewlekłym powikłaniem cukrzycy występującym u ok. 30% chorych i stanowi najczęstszą przyczynę przewlekłej choroby nerek wymagającej w fazie schyłkowej prowadzenia terapii nerkozastępczej – hemodializ/dializ otrzewnowych oraz przeszczepu nerki. Ze względu na ograniczone możliwości farmakoterapii nefropatii cukrzycowej, obecnie postępowanie terapeutyczne jest ukierunkowane przede wszystkim na zapobieganie powstawaniu albuminurii i spowolnienie progresji zmian patologicznych w nerkach poprzez ścisłą kontrolę glikemii i wielkości ciśnienia tętniczego krwi. W leczeniu NC podocyty są potencjalnym punktem farmakoterapii. Nadto, stosowane są inhibitory oraz antagoniści układu renina-angiotensyna II-aldosteron, jak również agoniści receptora PPAR- $\gamma$  (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma*) [31-33].

Kluczową rolę w diagnostyce laboratoryjnej NC odgrywa wczesne, tj. przed ujawnieniem się albuminurii, wykrycie zmian patologicznych mających odzwierciedlenie w zaburzeniach struktury GFB. Wydaje się, że obecność markerów podocytarnych w moczu może być istotnym parametrem diagnostycznym i prognostycznym rozwoju NC. W moczu chorych z nefropatią cukrzycową ilość białek podocytarnych i/lub mRNA dla nefryny, podocyny i podokaliksyny jest znacznie większa, niż u osób zdrowych [23, 24, 34, 35]. Wiele stanów patologicznych związanych z dysfunkcją nerek charakteryzuje się zmianami w morfologii oraz w liczebności/gęstości podocytów [36, 37]. Zmniejszenie liczby podocytów wiąże się z odsłonięciem fragmentów powierzchni błony podstawnej kłębuszków nerkowych. Naczynia włosowate przy utracie komponenty przeciwdziałającej ciśnieniu hydrostatycznemu poszerzają się i wybrzuszą w kierunku komórek ściennych torebki Bowmana, aż do przylgnięcia do ściany torebki. W miejscach tych dochodzi do aktywacji lokalnej reakcji zapalnej, której powikłaniem są zrosty i szklwienie pętli włosniczek [38].

NC charakteryzuje się zwiększonym wydalaniem albuminy z moczem, prowadzącym do następczego uszkodzenia kłębuszków i cewek nerkowych. Rozwój NC jest wynikiem zarówno predyspozycji genetycznych, jak i przewlekłego działania niekorzystnych czynników środowiskowych [39]. Na wczesnych etapach rozwoju NC w kłębuszkach nerkowych dochodzi do hiperfiltracji kłębuszkowej oraz stresu hemodynamicznego, wywieranego przez zwiększony przepływ krwi. W warunkach tych podocyty podlegają działaniu zwiększonych sił mechanicznych, tj. naprężeniu związanemu z wewnątrz-kłębuszkowym ciśnieniem hydrostatycznym, rozciąganiu w wyniku pulsacyjnych zmian ciśnienia hydrostatycznego w kłębuszku nerkowym oraz siłom ścinania wywieranym przez ultrafiltrat przemieszczający się przez błonę szczelinową [40]. Podocyty przeciwstawiają się stresowi mechanicznemu i zwiększonemu ciśnieniu wewnątrz-kłębuszkowemu przede wszystkim dzięki dynamicznemu i elastycznemu cytoszkieletowi. Zmiany naprężenia cytoszkieletu pozwalają zminimalizować negatywny wpływ powyższych sił działających na podocyty i utrzymać ich prawidłową cytoarchitekturę [16]. Zaburzenia hemodynamiki kłębuszkowej będące wynikiem zwiększonej aktywności związków biologicznie aktywnych, między innymi, prostanoidów, ANP, insuliny, angiotensyny II, tlenku azotu, prowadzą do lokalnego wzrostu produkcji cytokin i czynników wzrostu, między innymi, transformującego czynnika wzrostu beta i czynnika wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF) [40, 41]. Związki te przyczyniają się do powstawania patologicznych zmian

strukturalnych w kłębuszkach nerkowych – włóknienia kłębuszków, pogrubienia GBM oraz hipertrofii komórek mezangialnych i podocytów [41]. Zwiększone stężenie glukozy – patognomiczny parametr laboratoryjny cukrzycy – powoduje nadmierną aktywację wewnątrzkomórkowych szlaków metabolicznych, takich jak szlak polioloowy i heksozaminowy, przyczyniając się do zachwiania równowagi oksydacyjno-redukcyjnej wiodącej do powstania stresu tlenowego. Hiperglikemia prowadzi również do tworzenia tzw. zaawansowanych produktów glikacji (ang. AGEs – *advanced glycation end products*) o właściwościach proapoptotycznych, które także sprzyjają nagromadzeniu się macierzy zewnątrzkomórkowej w kłębuszkach nerkowych [42].

Na wczesnych etapach rozwoju cukrzycy następuje uszkodzenie podocytarnych wypustek cytoplazmatycznych, a także zmniejszenie liczby podocytów w kłębuszkach nerkowych [36, 43]. Uszkodzenie wypustek stopowatych polega na ich zlewaniu się, spłaszczaniu, a także na utracie specyficznych połączeń pomiędzy sąsiadującymi wypustkami, powodując tworzenie szerokich szczelin, czego konsekwencją jest zwiększona przepuszczalność filtra kłębuszkowego dla albuminy [44]. Reakcja podocytów na działanie niekorzystnych czynników zewnętrznych zależy od natężenia i czasu trwania patologicznego bodźca. Do wczesnych reakcji obronnych mających na celu adaptację do panujących warunków środowiskowych zalicza się hipertrofię i autofagię.

W przebiegu NC hipertrofia podocytów jest kompensacyjną odpowiedzią na zwiększenie objętości kłębuszków nerkowych [45, 46]. Początkowe stadia hipertrofii podocytów przebiegają bez towarzyszących zaburzeń funkcji podocytów, wyrażających się zmianami w przepuszczalności filtra kłębuszkowego dla albuminy i tempie filtracji kłębuszkowej. Jednak przy przedłużającym się czasie działania lub nasilonym działaniu szkodliwych czynników w podocytach zostają uruchomione mechanizmy odróżnicowania i przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT, ang. *epithelial-mesenchymal transition*). Molekularnym wykładnikiem tych mechanizmów jest zmniejszona ilość białek podocytarnych (np. WT1, nefryny, podocyny) przy jednoczesnej zwiększonej ilości białek mezenchymalnych (np. desminy, MMP-7, Fsp-1, fibronektyny) [47]. Powyższe zmiany w maszynerii molekularnej podocytów prowadzą do zwiększonej przepuszczalności podocytów dla albuminy oraz wpływają dodatkowo na włóknienie kłębuszków nerkowych.

W konsekwencji nieodwracalnego uszkodzenia podocytów dochodzi do aktywacji apoptozy oraz do odrywania się ich od GBM. Odrywanie się podocytów jest wynikiem



zmniejszonej interakcji pomiędzy podocytami a GBM zachodzącej za pośrednictwem białek przez błonowych podocytów (integryny i dystroglikanów) z białkami GBM, np. agryną [16, 48]. W środowisku o wysokim stężeniu glukozy następuje zmniejszenie ilości integryny  $\alpha 3\beta 1$  w podocytach oraz zahamowanie syntezy agryny [40], co skutkuje rearanżacją cytoszkieletu aktywnego podocytów i osłabieniem ich zdolności do zakotwiczenia w GBM.

Zaawansowane zaburzenia w biologii podocytów prowadzą do uruchomienia wewnątrzkomórkowych ścieżek apoptotycznych i śmierci komórek. Jednym z ważniejszych czynników proapoptotycznych jest TGF- $\beta$ , którego nadekspresję stwierdzono w podocytach ekspozowanych na wysokie stężenie glukozy [49, 50]. Wykazano, że aktywacja tej cytokiny prowadzi do apoptozy podocytów na drodze aktywacji proapoptotycznej kaspazy-3 oraz białka Smad7, hamującego antyapoptotyczny szlak NF- $\kappa$ B/p65 [49]. Ponadto, TGF- $\beta$ 1 wpływa stymulująco na aktywność podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H za pośrednictwem ścieżki ERK1/2 i mTOR [51].

Nadmierna produkcja ROS w podocytach jest cechą charakterystyczną dla NC i zaliczana jest do jednego z głównych mechanizmów powodujących aktywację apoptozy podocytów [52]. Wysokie stężenie glukozy powoduje wzrost produkcji ROS, między innymi, na drodze aktywacji cytochromu P450 oraz oksydazy NAD(P)H, jak również wskutek działania zaawansowanych końcowych produktów glikacji (AGEs) i aktywacji układu renina-angiotensyna II-aldosteron [53, 54].

W podocytach znajdujących się w niekorzystnych warunkach nasileniu ulegają wewnątrzkomórkowe procesy służące zachowaniu homeostazy wewnątrzkomórkowej, a do takich procesów należy autofagia.

## **2.4 Proces autofagii w podocytach**

Autofagia jest wewnątrzkomórkowym procesem katabolicznym, służącym do degradacji białek o długim okresie półtrwania ( $>24$ h), a także do trawienia agregatów nieprawidłowo sfałdowanych białek i niefunkcjonalnych organelli. Choć autofagia jest uważana za podstawowy mechanizm obronny komórek, to długotrwały stres i towarzysząca jemu nadmierna aktywacja autofagii mogą prowadzić do autofagowej śmierci komórek opisywanej jako typ II programowanej śmierci komórki [55, 56]. Zwiększoną aktywność autofagii stwierdzono np. w podocytach u chorych

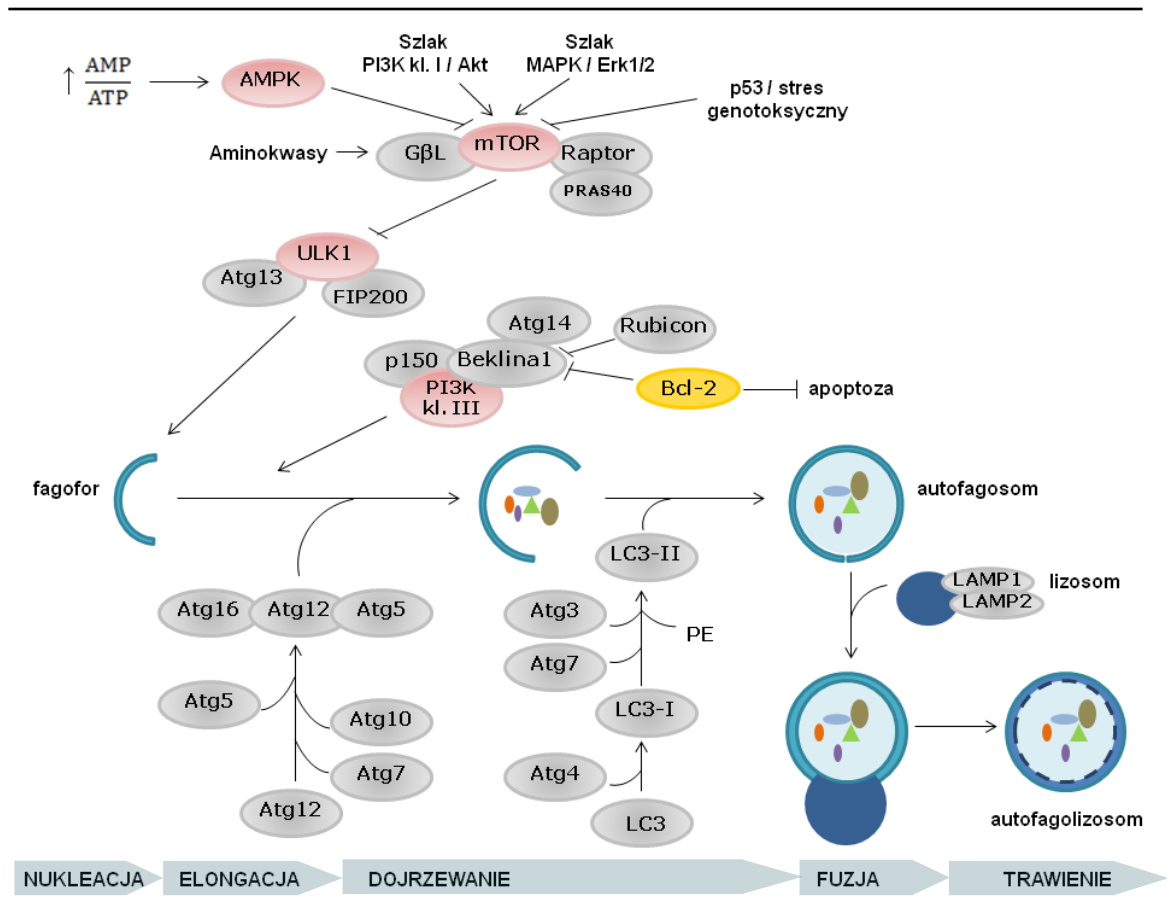
z kłębuszkowym zapaleniem nerek typu zmian minimalnych, lecz wraz z progresją choroby w kierunku ogniskowego segmentowego szkliwienia kłębuszków (FSGS – ang. *focal segmental glomerulosclerosis*), aktywność autofagii ulegała zmniejszeniu [57].

Proces autofagii polega na wyodrębnieniu i otoczeniu przez błonę plazmatyczną fragmentu cytoplazmy zawierającej materiał komórkowy przeznaczony do degradacji, utworzeniu wakuoli autofagalnej i ostatecznie trawieniu jej zawartości przy udziale enzymów lizosomalnych. W procesie autofagii wyróżnia się kilka następujących po sobie etapów, określanych jako: nukleacja, elongacja, dojrzewanie, fuzja i trawienie (Ryc. 3). W poszczególnych etapach uczestniczą konserwatywne ewolucyjnie białka należące do produktów genów z rodziny Atg (ang. *autophagy-related*). Na etapie nukleacji dochodzi do formowania podwójnej błony fosfolipidowej autofagosomu ograniczającej fragment cytoplazmy przeznaczony do degradacji. Nukleacja jest inicjowana przez kompleks białkowy ULK1, do którego należą kinaza serynowo-treoninowa ULK1 (ang. *Unc-51 like kinase*), Atg13, Atg101 oraz FIP200 (ang. *focal adhesion kinase-family-interacting protein of 200 kDa*). Aktywność ULK1 jest regulowana przez kinazę białkową aktywowaną 5'AMP (AMPK) i kinazę mTOR (ang. *mammalian target of rapamycin*) [58]. Uważa się, że mTOR i AMPK pełnią funkcje nadrzędnych regulatorów autofagii, przy czym mTOR odpowiada za hamowanie, a AMPK za aktywację tego procesu. W miejscu nukleacji autofagosomu obserwuje się gromadzenie białek z rodziny Atg, np. białka transportowego Atg9, które dostarcza składniki lipidowe z innych źródeł komórkowych, między innymi, z siateczki endoplazmatycznej oraz aparatu Golgiego.

Na etapie elongacji, czyli wydłużania podwójnej błony autofagalnej, kluczową rolę odgrywa kompleks kinazy 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) klasy III wraz z białkami: bekliną 1, Atg15, Atg14 oraz UVRAG (ang. *ultraviolet radiation resistance-associated gene*). PI3K klasy III jest odpowiedzialna za syntezę fosfatydyloinozytolo-3-fosforanu (PI(3)P) uczestniczącego w tworzeniu błon autofagosomu [59].

Procesy dojrzewania autofagosomu i zamknięcia sferycznej struktury pęcherzyka wymagają udziału dwóch systemów koniugacyjnych: systemu opartego o reakcje ubikwitynopodobne prowadzące do utworzenia kompleksu białkowego Atg12-Atg5-Atg16 oraz systemu koniugacji LC3 (ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*). Ścieżka przekształceń LC3 określana jest mianem lipidacji LC3, gdyż w wyniku kolejnych reakcji ubikwitynopodobnych z udziałem enzymów Atg7 i Atg3 (odpowiednio, enzymy E1- i E2-podobne) do rozpuszczalnej formy LC3-I

kowalencyjnie przyłączana jest fosfatydyloetanolamina (PE). Powstaje forma druga LC3 (LC3-II) o charakterze lipofilnym, która jest wbudowywana do zewnętrznej i wewnętrznej błony tworzącego się autofagosomu. Po zamknięciu podwójnej błony pęcherzyka następuje jego fuzja z lizosomem, który dostarcza enzymy proteolityczne do trawienia zawartości pęcherzyka, a powstała w wyniku połączenia autofagosomu z lizosomem struktura nazywana jest autofagolizosomem (bądź autolizosomem).



**Ryc. 3.** Uproszczony schemat procesu autofagii w komórkach. Zmodyfikowano z: [www.cellsignal.com](http://www.cellsignal.com). Objasnienia skrótów w tekście.

Zewnątrz błonowa frakcja LC3-I jest odzyskiwana w wyniku hydrolizy wiązania LC3-PE przez proteazę Atg4 (tzw. mechanizm dekonjugacji), natomiast frakcja wewnątrz błonowa jest degradowana razem z zawartością autofagosomu przez enzymy lizosomalne. Ze względu na fakt, iż poziom LC3-II koreluje dodatnio z liczbą autofagosomów w komórce, białko LC3 jest uważane za marker aktywności autofagii, co więcej, dzięki opracowaniu stosunkowo prostych metod detekcji obu form tego białka jest ono wykorzystywane do oceny *in vitro* oraz *in vivo* aktywności autofagii.

Autofagia pełni szczególną rolę w komórkach pozostających w fazie postmitotycznej, a więc i w podocytach, a jej zaburzenia wydają się mieć związek z patogenezą albuminurii. Zmniejszoną aktywność autofagii w podocytach stwierdzono u chorych na cukrzycę z proteinurią, lecz nie u chorych z normoalbuminurią [60]. Doświadczalne zahamowanie autofagii w podocytach u myszy na etapie nefrogenezy (poprzez delecję genu *Atg5*), prowadziło do wystąpienia albuminurii po 2 miesiącach od urodzenia, a po 4 miesiącach dodatkowo obserwowano ogniska szkliwienia kłębuszków nerkowych, zrosty włóścinek wewnątrz-kłębuszkowych z torebką Bowmana oraz zmniejszenie liczby podocytów o 60% [61]. Z kolei delecja genu *Atg5* w podocytach i dieta wysokotłuszczowa prowadzą u myszy do albuminurii, aktywacji apoptozy podocytów i zmniejszenia ich liczby [60]. Wydaje się prawdopodobne, iż zwiększona aktywność apoptozy może być skutkiem nadmiernej i długotrwałej aktywacji autofagii, bowiem zmniejszenie nadmiernej aktywności autofagii w podocytach spowodowanej działaniem angiotensyny II prowadzi także do zmniejszenia liczby komórek apoptotycznych [62].

Autofagia wydaje się pełnić istotną rolę w patogenezie NC [63-65], aczkolwiek opublikowane wyniki dotychczas przeprowadzonych badań nie są jednoznaczne. Wykazano bowiem, że wysokie stężenie glukozy w płynie pozakomórkowym zwiększa poziom markerów autofagalnych oraz liczbę struktur autofagalnych w immortalizowanych podocytach mysich i w podocytach szczurów z cukrzycą indukowaną streptozotocyną [66, 67]. Z drugiej strony, stwierdzono również, że wraz z progresją nefropatii cukrzycowej u myszy z doświadczalnie wywołaną cukrzycą zmniejsza się poziom markerów autofagalnych w podocytach, a wysokie stężenie glukozy hamuje aktywność autofagii w hodowli immortalizowanych mysich podocytów [68]. Stwierdzono również zmniejszenie ilości podocyny i nefryny po zahamowaniu autofagii w podocytach, co także mogło być prawdopodobną przyczyną zwiększonej przepuszczalności podocytów dla albuminy [68]. Można więc domniemywać, iż autofagia stanowi szczególnie ważny mechanizm utrzymywania integralności podocytów oraz ich obrony przed niekorzystnym działaniem czynników pozakomórkowych.

### 2.4.1 Regulacja aktywności autofagii

Indukcja i aktywność autofagii są ściśle zależne od stanu energetycznego komórki, stąd też za nadrzędne wewnątrzkomórkowe regulatory aktywności tego procesu uważane są: kinaza mTOR, aktywowana szczególnie w warunkach nadmiaru substancji odżywczych, oraz AMPK i enzymy o aktywności deacetylaz z rodziny sirtuin (Sirt, ang. *silent information regulators*), które z kolei są aktywowane przy niskim wewnątrzkomórkowym stężeniu, odpowiednio, AMP i NAD<sup>+</sup>, a więc w warunkach o obniżonych zasobach energetycznych komórek.

Kinaza mTOR tworzy w komórkach dwa odrębne kompleksy białkowe: mTORC1 i mTORC2. Pierwszy kompleks jest wrażliwy na działanie rapamycyny i jest stymulowany przez czynniki wzrostu, aminokwasy czy stres komórkowy. W wyniku nadmiernej aktywacji mTORC1 dochodzi do hipertrofii komórek wskutek zwiększonej translacji białek oraz biogenezy lipidów. Kompleks mTORC2 jest aktywowany przez czynniki wzrostowe i odgrywa rolę w przeżywalności komórek oraz organizacji cytoszkieletu. Znaczenie mTOR w rozwoju i progresji chorób nerek badano u myszy z inaktywacją w podocytach genu kodującego inhibitor mTORC1 – TSC1 (model stałej aktywacji mTORC1) [69], a także genów białek Raptor (model inaktywacji mTORC1) i Rictor (model inaktywacji mTORC2) [70]. Uzyskane wyniki badań wskazują, że zarówno nadmierna aktywacja kinazy mTOR, jak i jej hamowanie, prowadzą do hipertrofii i zmniejszenia liczby podocytów oraz szkliwienia kłębuszków nerkowych [71]. Pomimo, iż kinaza mTOR powoduje zmniejszenie aktywności autofagii, między innymi, na drodze fosforylacji i hamowania aktywności kinazy ULK1 [72], wykazano, że inaktywacja genu mTOR w podocytach nie prowadzi do aktywacji autofagii, ale do nagromadzenia się autofagolizosomów i do zahamowania ich dalszych przemian, co w konsekwencji uszkadza podocyty i prowadzi do śmierci komórkowej [73]. W podocytach obserwuje się jednocześnie wysoką aktywność autofagii, jak i zwiększony poziom ekspresji mTOR. Dlatego też, aby szlaki te mogły być równocześnie aktywne w pojedynczym podocycie dochodzi do wydzielenia kompartmentów cytoplazmatycznych – TASC (ang. *TOR-autophagy spatial coupling compartment*), które służą rozdzieleniu początkowych etapów procesu autofagii i szlaku sygnałowania mTOR [74].

Kinaza białkowa aktywowana 5'AMP (AMPK) ulega aktywacji w stanach charakteryzujących się zmniejszonym stosunkiem stężeń  $[ATP]_{\text{wewn.}}/[AMP]_{\text{wewn.}}$  i jej

zadaniem jest aktywacja katabolicznych szlaków metabolicznych. Do aktywacji AMPK wymagana jest również fosforylacja reszty tyrozynowej w pozycji 172 katalizowana przez LKB1 (ang. *liver kinase B1*) lub CaMK $\beta$  (ang. *Ca<sup>2+</sup>/calmoduline kinase kinase*) [75]. AMPK odgrywa rolę w regulacji autofagii hamując aktywność kinazy mTOR poprzez fosforylację i aktywację jej inhibitora TSC1/2 [76]. Ponadto, w warunkach głodzenia komórek AMPK stymuluje autofagię katalizując reakcje fosforylacji ULK1 w miejscach odmiennych, niż ma to miejsce w przypadku mTOR [77]. Po przywróceniu fizjologicznego poziomu substancji odżywczych, AMPK hamuje aktywność ULK1 tworząc z nią kompleks [58]. AMPK jest białkiem łączącym procesy autofagii z rozwojem oporności komórek na insulinę [75]. Wykazano zmniejszoną aktywność AMPK w nerkach zwierząt z cukrzycą, a po zastosowaniu aktywatorów AMPK (AICAR, metformina, adiponektyna) obserwowano zmniejszenie stopnia hipertrofii kłębuszków nerkowych oraz ich uszkodzenia [78].

Białko Sirt1 (deacetylaza histonowa klasy III) stanowi trzeci ważny czynnik regulujący stan energetyczny komórek. Jest ono aktywowane w odpowiedzi na zwiększone wewnątrzkomórkowe stężenie NAD<sup>+</sup>. Wykazano istnienie zależności pomiędzy aktywnościami enzymatycznymi białek Sirt1 i AMPK: stymulacja Sirt1 prowadzi do zwiększenia poziomu fosforylacji AMPK i jej aktywności [79], z kolei AMPK stymulując Sirt1 zwiększa stężenie NAD<sup>+</sup> w warunkach niedoboru substancji odżywczych [80]. Sirt1 pełni rolę w rozwoju ostrej niewydolności nerek, przewlekłej choroby nerek, tocznia rumieniowatego układu oraz z zajęciem nerek, a także nefropatii cukrzycowej [81]. W zwierzęcych modelach doświadczalnych cukrzycy typu 1 i 2 stwierdzono zmniejszoną ilość i aktywność Sirt1 w nerkach, a podanie zwierzętom aktywatora Sirt1 (resweratrol) miało korzystny wpływ na przebieg choroby i spowalniało proces włóknienia nerek [82]. Jednym z ostatnio zaproponowanych mechanizmów prowadzących do nadmiernej syntezy i gromadzenia macierzy zewnątrzkomórkowej i włóknienia kłębuszków nerkowych w nefropatii cukrzycowej jest zwiększanie poziomu acetylacji białka SMAD3 (regulatora czynników transkrypcyjnych odpowiedzialnych m.in. za transkrypcję genu TGF- $\beta$ 1), spowodowane zmniejszeniem aktywności Sirt1 [83]. Wydaje się, że Sirt1 może być powiązany także z procesem autofagii. Deacetylaza Sirt1 w warunkach niedoboru substancji odżywczych aktywuje proces autofagii poprzez deacetylację genów i białek, między innymi, Atg5, Atg7 i LC3 [84]. U myszy z wyciszonym genem Sirt1 w podocytach oraz u myszy z genetycznie uwarunkowaną cukrzycą (myszy *db/db*) pod wpływem adriamycyny

dochodzi do nagromadzenia uszkodzonych mitochondriów na skutek zaburzeń mitofagii [85]. Wiele wyników badań potwierdza korzystny wpływ aktywacji Sirt1 na zwiększenie wrażliwości komórek, np. hepatocytów, komórek mięśni szkieletowych i adipocytów, na działanie insuliny, co uzasadnia rozważanie Sirt1 jako potencjalnego punktu uchwytu dla farmakoterapii cukrzycy [86].

Na aktywność autofagii wpływa także zwiększony poziom reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) [87-91], a utlenianie jest jedną z dróg zmiany aktywności białek autofagalnych: proteazy Atg4, biorącej udział w modyfikacjach posttranslacyjnych LC3 [87, 92], AMPK [93], Bcl-2 [94] oraz kinazy JNK1 (ang. *c-Jun N-terminal Kinase 1*) [95], która hamuje aktywność Bcl-2 poprzez jego fosforylację [96, 97].

#### **2.4.1.1 Regulacja autofagii przez insulinę**

Insulina jest czynnikiem niezbędnym dla prawidłowego funkcjonowania podocytów i nerek [98]. Wykazano, że w podocytach, oprócz znanych efektów działania na metabolizm komórkowy, insulina reguluje dynamikę filtracji kłębuszkowej i utrzymuje integralność filtru kłębuszkowego poprzez bezpośredni wpływ na kurczliwość podocytarnych wypustek cytoplazmatycznych [99]. Zaburzenia w wydzielaniu i działaniu insuliny znajdują swój wyraz w nieprawidłowej funkcji podocytów, na co wskazują wyniki badań przeprowadzonych z wykorzystaniem normoglikemicznych myszy pozbawionych w podocytach genu dla receptora insulinowego. U tych zwierząt, po 5 tygodniach od urodzenia stwierdzono białkomocz towarzyszący nieprawidłowej cytoarchitektonice wypustek podocytarnych, a po 8 tygodniach obserwowano szereg objawów charakterystycznych dla nefropatii cukrzycowej, w tym albuminurię, nadmierną produkcję składników GBM (np. kolagenu typu IV), włóknienie kłębuszków nerkowych, a także zaburzoną strukturę podocytów i ich apoptozę [99].

Wpływ sygnałowania insulinowego na regulację procesu autofagii w podocytach nie był dotychczas zbadany. Istnieją jednak przesłanki aby sądzić, że istnieje związek pomiędzy tymi dwoma szlakami komórkowymi. Jednym z czynników łączących działanie insuliny i regulację autofagii mogą być reaktywne formy tlenu (ROS). Wykazano, że wysokie stężenie insuliny już po 15 minutach powoduje znaczne zwiększenie produkcji ROS w hodowli komórek podocytarnych [100]. Istnieją dowody

doświadczalne wskazujące na istnienie bezpośredniego związku pomiędzy procesem autofagii a przekazywaniem informacji od receptora insulinowego [101-105]. Aktywacja autofagii w tkance tłuszczowej, wątrobie i mięśniach szkieletowych koreluje z obniżoną ekspresją receptora insulinowego [108]. Wykazano, że aktywacja autofagii w komórkach wątrobowych skutkuje obniżeniem stężenia insuliny we krwi [106]. Zaobserwowano również, że zahamowanie autofagii wpływa na metabolizm glukozy w komórkach mięśnia szkieletowego u myszy poddanych wysiłkowi fizycznemu, a efekt ten jest wynikiem zmniejszonej wrażliwości komórek mięśniowych na działanie insuliny [107]. Można więc przypuszczać, że autofagia jest ważnym procesem zaangażowanym w rozwój insulinooporności komórek, w związku z czym badania zależności pomiędzy autofagią i sygnałowaniem insulinowym wydają się być istotne szczególnie w przypadku podocytów, które są jedynymi wrażliwymi na insulinę komórkami bariery filtracyjnej, a zarazem komórkami stanowiącymi najbardziej wrażliwy na uszkodzenia element strukturalny bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych.



### **3. Cel pracy**

Głównym celem pracy było określenie potencjalnej roli autofagii w patomechanizmie uszkodzeń podocytów prowadzących do zaburzeń funkcji bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych w przebiegu cukrzycy.

Cele szczegółowe:

1. Ocena zmian aktywności autofagii w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej pod wpływem insuliny oraz wysokiego stężenia glukozy z uwzględnieniem udziału wolnych rodników tlenowych.
2. Określenie zaangażowania autofagii w działanie insuliny oraz wysokiego stężenia glukozy na żywotność i przepuszczalność dla albuminy podocytów szczurzych hodowli pierwotnej oraz dokomórkowy transportu glukozy i aktywację apoptozy w tych komórkach.

## 4. Materiały i metody

### 4.1 Zwierzęta doświadczalne

Do doświadczeń używano szczurów stada Wistar (m. c. 110-120 g, samice) pochodzących ze zwierzętarni Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. Mirosława Mossakowskiego Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Zwierzęta przed doświadczeniami przebywały w pomieszczeniu bytowym o stałej temperaturze (21°C) i cyklu świetlnym dzień/noc (12/12 godzin) na terenie Zakładu Terapii Monitorowanej i Farmakogenetyki Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Zwierzęta miały stały i swobodny dostęp do paszy bytowej Labofeed B i wody.

Część doświadczeń przeprowadzono z wykorzystaniem szczurów Zucker (Crl:ZUC-Lepr<sup>fa</sup>) o fenotypie otyłym (genetyczny model cukrzycy typu 2 charakteryzujący się hiperinsulinizmem; stężenie insuliny w surowicy krwi >5µg/l) oraz szczupłym (szczury kontrolne, normoinsulinizm; stężenie insuliny w surowicy krwi <3µg/l). Zwierzęta pochodziły z hodowli Charles River, USA (m. c. 250-350 g, samce).

Na przeprowadzenie wszystkich doświadczeń uzyskano zgodę Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (Zezwolenia Nr 4//2012 i Nr 2//2015). Całkowita liczba zwierząt, użyta do doświadczeń, wynosiła: 3 szczury Zucker otyłe i 3 szczury Zucker szczupłe oraz 70 szczurów stada Wistar.

### 4.2 Izolacja kłębuszków nerkowych

Szczury Zucker lub Wistar (każdorazowo dwa) znieczulano podając dootrzewnowo tiopental (150 mg/kg m. c.), po czym w sposób aseptyczny pobierano nerki. Miąższ kory nerek rozdrabniano i przesiewano przez sita o malejącej wielkości oczek: 250 µm, 125 µm i 75 µm (do izolacji kłębuszków pochodzących od szczurów Zucker) lub 160 µm, 106 µm i 53 µm (do izolacji kłębuszków pochodzących od szczurów stada Wistar), a otrzymaną zawiesinę kłębuszków nerkowych wirowano (400 x g, 10 minut) w temperaturze pokojowej. Wyizolowane kłębuszki zawieszano w 50 ml pożywki RPMI 1640 wzbogaconej o bydlęcą surowicę płodową (FBS, 10% v/v), penicylinę (100 U/ml) i streptomycynę (100 µg/ml). W kolejnym etapie przenoszono po 10 ml zawiesiny kłębuszków do pięciu płaskodennych butelek hodowlanych, opłaszczonych kolagenem typu I, o powierzchni hodowlanej 75 cm<sup>2</sup>, po czym

w butelkach uzupełniano objętość pożywki do 20 ml, a zaraz potem butelki umieszczano w inkubatorze w temperaturze 37°C i atmosferze o zawartości 5% CO<sub>2</sub>.

### 4.3 Hodowla pierwotna podocytów szczurzych

Do hodowli pierwotnej podocytów używano kłębuszków izolowanych od szczurów stada Wistar. Hodowlę prowadzono w oparciu o standardową procedurę opracowaną w Instytucie Anatomii i Biologii Komórki Uniwersytetu w Heidelbergu, Niemcy [109].

Po 6 dniach hodowli kłębuszków, powierzchnia hodowlana butelek była w 80-90% pokryta podocytami, które opuściły kłębuszki nerkowe i przytwierdziły się do kolagenowanego podłoża. W celu oddzielenia podocytów od kłębuszków, z butelek hodowlanych usuwano pożywkę po czym dwukrotnie przepłukiwano kolagenowe dno butelki ciepłym (37°C) roztworem PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4), następnie dodawano roztwór trypsyny (5 g/l trypsyny świńskiej i 2 g/l EDTA • 4Na w 0,9% NaCl) i umieszczano butelki hodowlane na 5 minut w temperaturze 37°C. Aktywność enzymatyczną trypsyny hamowano poprzez dodanie pożywki RPMI 1640 zawierającej 10% FBS, 100 U/ml penicyliny, 100 µg/ml streptomycyny. Otrzymaną zawiesinę podocytów i kłębuszków nerkowych przesiewano przez sito nylonowe o wielkości oczek 33 µm. Zebrany przesącz, zawierający głównie podocyty, wirowano przez 10 minut (400 x g) w temperaturze pokojowej. Nadsącz usuwano, a osad podocytarny zawieszano w 50 ml pożywki RPMI 1640 (10% FBS, 100 U/ml penicylina, 100 µg/ml streptomycyna) i zliczano podocyty w komorze Fuchs-Rosenthal'a pod mikroskopem świetlnym. W zależności od zaplanowanego doświadczenia, podocyty wysiewano w liczbie:

- 10 tys./cm<sup>2</sup> powierzchni hodowlanej wstawki (pomiar przepuszczalności warstwy podocytów dla albuminy – pkt. 4.11);
- 30 tys./studzienkę płytki 24-dołkowej (nukleofekcja – pkt. 4.8.2.2, test MTT – pkt. 4.10.1, pomiar dokomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozy – pkt. 4.12);
- 60 tys./szkiełko hodowlane o średnicy 22 mm (immunofluorescencja – pkt. 4.6.2, transmisyjna mikroskopia elektronowa – pkt. 4.9).
- 90 tys./płytkę Petriego o średnicy 33 mm (barwienie aneksyną V-FITC – pkt. 4.10.2);

- 700 tys./butelkę hodowlaną o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> (analiza ekspresji genów na poziomie mRNA – pkt. 4.5, transfekcja podocytów przy użyciu siRNA – pkt. 4.8.1);
- 1,3 mln/butelkę hodowlaną o powierzchni 75 cm<sup>2</sup> (Western blot – pkt. 4.6.1, pomiar aktywności PI3K klasy III – pkt. 4.7);

Podocyty hodowano 5-6 dni, po czym pożywkę hodowlaną zmieniano na środowisko odpowiadające poszczególnym układom badawczym. W przypadku inkubacji podocytów z nadtlaniem wodoru (100 μM, 30 min), komórki przed dodaniem związku inkubowano przez 2 godziny w buforze PBS z dodatkiem CaCl<sub>2</sub> (0,9 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,49 mM) oraz 11 mM D-glukozy.

#### **4.4 Ocena jakościowa hodowanych podocytów**

##### **4.4.1 Ocena mikroskopowa**

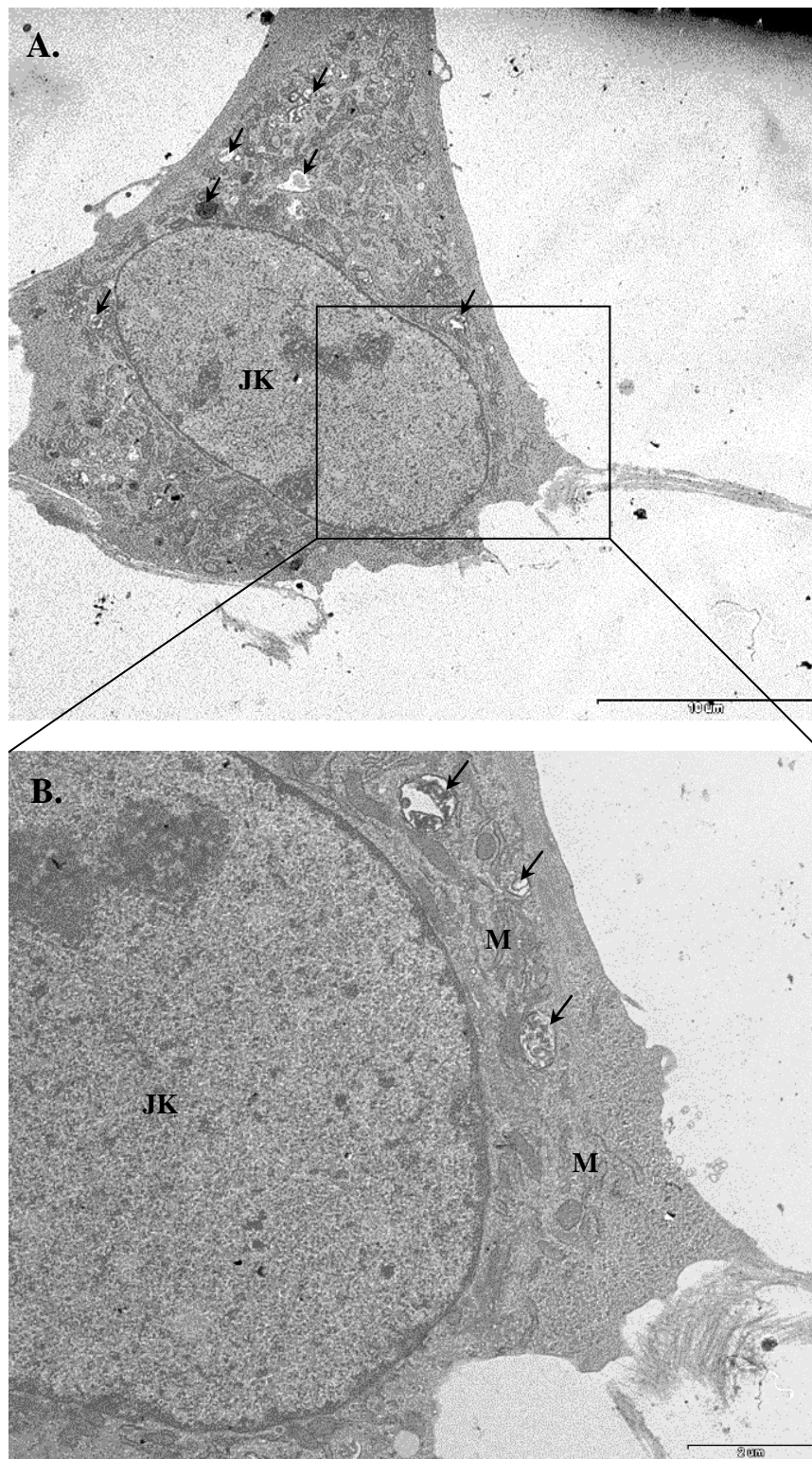
###### **4.4.1.1 Żywotność komórek**

Żywotność podocytów oceniano przy pomocy metody barwienia zawiesiny podocytów błękitem trypanu przed ich wysianiem do butelek hodowlanych. Związek ten wnika do wnętrza komórek o zaburzonej integralności błony komórkowej i barwi je na niebiesko, podczas gdy nieuszkodzone komórki pozostają niezabarwione.

Do 10 μl zawiesiny podocytów dodawano 5 μl 0,5% błękitu trypanu i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie zliczano podocyty w komorze Fuchs-Rosenthal'a pod mikroskopem świetlnym i wyznaczano odsetek komórek zabarwionych na niebiesko. W przeprowadzonych doświadczeniach odsetek podocytów zabarwionych błękitem trypanu wynosił nie więcej niż 5.

###### **4.4.1.2 Ultrastruktura komórek**

Ultrastrukturę podocytów badano przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Preparaty komórkowe przygotowano według procedury opisanej w pkt. 4.9. Reprezentatywne elektronogramy przedstawiono na Ryc. 4. W komórkach widoczne jest charakterystyczne dla podocytów duże, centralnie położone jądro komórkowe, a także liczne mitochondria i pęcherzyki wewnątrzkomórkowe rozmieszczone w obrębie ciała podocyta.



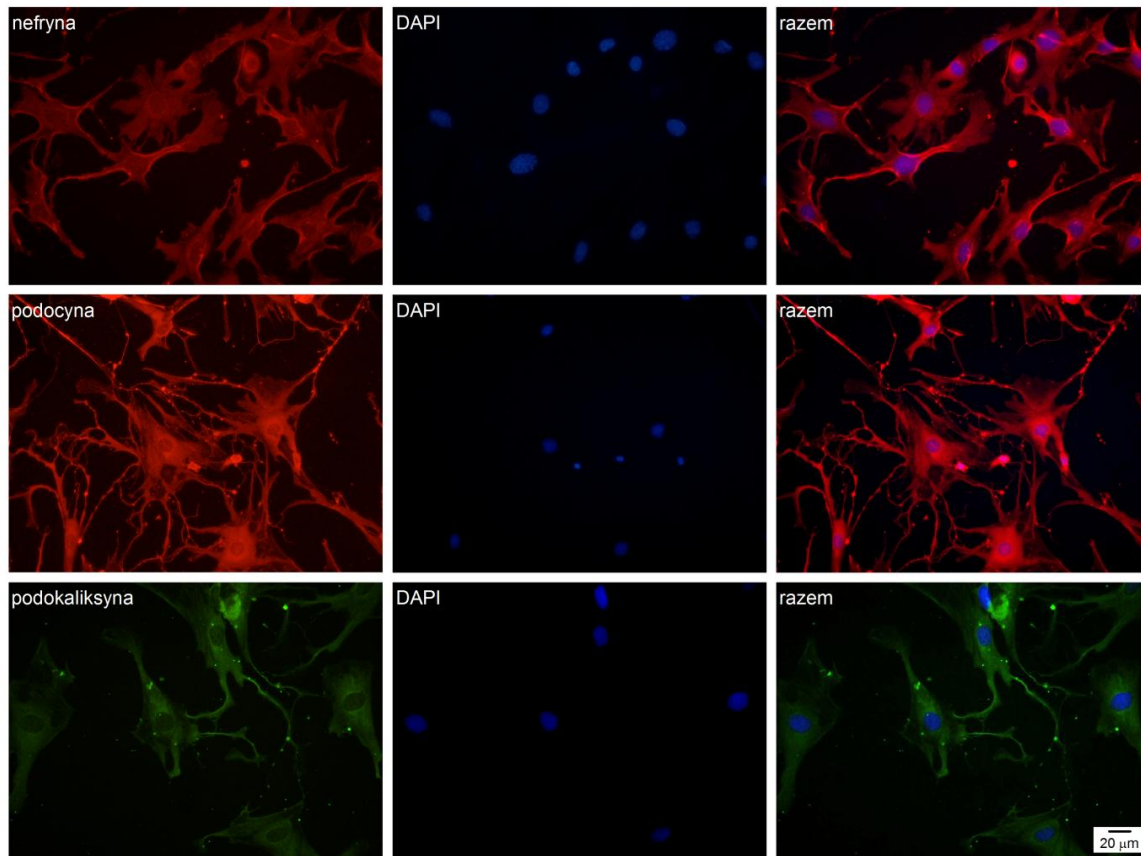
**Ryc. 4.** Elektronogramy transmisyjnej mikroskopii elektronowej podocytów szczurzych hodowli pierwotnej. Skala 10  $\mu\text{m}$  (A) i 2  $\mu\text{m}$  (B). JK – jądro komórkowe, M – mitochondria, pęcherzyki wewnątrzkomórkowe (autofagosomy/autofagolizosomy) zaznaczono strzałkami.

#### 4.4.2 Ocena metaboliczna

Stopień uszkodzenia podocytów oceniano metodą spektrofotometryczną oznaczając aktywność dehydrogenazy mleczanowej (LDH) uwalnianej przez podocyty do środowiska inkubacyjnego w odniesieniu do całkowitej aktywności enzymu w podocytach. W przeprowadzonych doświadczeniach odsetek ten nie przekraczał 10.

#### 4.4.3 Ocena immunofluorescencyjna

Fenotyp podocytów badano metodą immunofluorescencyjną przy użyciu przeciwciał skierowanych przeciwko swoistym białkom podocytów: podocynie, nefrynie i synaptopodynie (Ryc. 5) sprzężonych z fluorochromem, według metody opisanej w pkt. 4.6.2.



**Ryc. 5.** Obraz immunofluorescencyjny podocytów szczurzych hodowli pierwotnej: nefryna (Alexa 546, górny rząd), podocyna (Alexa 546, środkowy rząd) i podokaliksyna (Alexa 488, dolny rząd). Jądra komórkowe (kolor niebieski) uwidoczniono poprzez barwienie z użyciem DAPI.

## **4.5 Analiza ekspresji genów na poziomie mRNA**

### **4.5.1 Izolacja i oczyszczanie komórkowego RNA**

Podocyty płukano zimnym PBS, a następnie poddawano lizie z użyciem roztworu TRI Reagent (Sigma-Aldrich, USA) przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Zlizowane komórki zeskrobywano z powierzchni butelek hodowlanych i przenoszono przy pomocy pipety do probówek typu Eppendorf. RNA ekstrahowano chloroformem (1:2 v/v). Następnie próbki wirowano przez 15 minut ( $20\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ) otrzymując 2 frakcje: dolną – organiczną, zawierającą fenol i fragmenty komórek, oraz górną – wodną, zawierającą RNA. Frakcję górną przenoszono do nowych probówek, a RNA wytrącano izopropanolem (1:1 v/v). Próbki delikatnie mieszano i umieszczano na 30 minut w temperaturze  $-20^{\circ}\text{C}$ , po czym wirowano przez 30 minut ( $20\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Otrzymany osad RNA delikatnie przemywano 96% etanolem i ponownie wirowano (15 minut,  $20\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Po usunięciu etanolu, osad RNA suszono poprzez pozostawienie otwartej probówki pod wyciągiem laminarnym na 30 minut w temperaturze pokojowej, a następnie oczyszczony osad RNA rozpuszczano w  $20\ \mu\text{l}$   $\text{dH}_2\text{O}$ .

Stężenie RNA mierzono metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr typu Nanodrop). Zanieczyszczenie białkami i fenolem otrzymanego roztworu RNA oznaczano mierząc jego absorbancję przy długości fali 260 i 280 nm. Roztwór RNA przyjmowano za czysty gdy wartość ilorazu  $A_{260}/A_{280}$  mieściła się w przedziale 1,8-2,2.

W celu usunięcia ewentualnego zanieczyszczenia pochodzącego od DNA, roztwór RNA oczyszczano za pomocą zestawu AMP-D1 DNase I Amplification Grade. Oczyszczony RNA używano jako matrycę do reakcji odwrotnej transkrypcji. Do pracy z RNA zawsze stosowano wolny od RNAz sprzęt laboratoryjny i odczynniki laboratoryjne.

### **4.5.2 Reakcja odwrotnej transkrypcji**

Do przeprowadzenia 1 reakcji używano 700 ng RNA, 100 U odwrotnej transkryptazy M-MLV, dNTPs – 0,2 mM, DTT – 10 mM, starter  $p(\text{dT})_{15}$  (Roche Diagnostics) – 0,25  $\mu\text{g}$  oraz inhibitor RNAz (EURx) – 8U.

Reakcję przeprowadzano w termocyklerze (Mastercycler, Eppendorf) przez 1 godzinę w temperaturze  $42^{\circ}\text{C}$ . Produkt reakcji (cDNA) używano jako matrycę w polimerazowej reakcji łańcuchowej (PCR).

### 4.5.3 PCR w czasie rzeczywistym

Ilościowy pomiar ekspresji mRNA badanych genów przeprowadzono za pomocą metody PCR w czasie rzeczywistym z wykorzystaniem reakcji hydrolizy podwójnie znakowanej sondy molekularnej typu TaqMan (Roche Diagnostics). Startery zostały zaprojektowane do sekwencji różnych egzonów, dzięki czemu możliwa była weryfikacja właściwego produktu PCR na żelu agarozowym. Sekwencje użytych starterów oraz sond molekularnych zamieszczono w Tabeli 1.

PCR przeprowadzono w aparacie Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) z użyciem 20 ng cDNA, specyficznych starterów (0,4  $\mu$ M) i sondy typu TaqMan (0,2  $\mu$ M), oraz dwukrotnie rozcieńczonej mieszaniny LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics). Kontrolę negatywną stanowiła próbka bez matrycy cDNA.

Warunki temperatury i czasu dla poszczególnych etapów PCR były następujące: preinkubacja (10 min, 95°C), 45 cykli składających się z: denaturacji (10 s, 95°C), przyłączania starterów (30 s, 60°C) i syntezy produktu (1 s, 72°C), oraz końcowe schładzanie próbki reakcyjnej w temperaturze 4°C. Względną ilość produktu PCR obliczano metodą porównawczą  $\Delta\Delta C_t$ , gdzie  $C_t$  (ang. *cycle threshold*) odnosi się do liczby cykli PCR, po których poziom intensywności fluorescencji przekracza wyznaczoną wartość progową. Poziom ekspresji  $\beta$ -aktyny stanowił kontrolę wewnętrzną.

**Tabela 1.** Sekwencje starterów i sond molekularnych użytych do PCR w czasie rzeczywistym.

Nazwa genu	Numer dostępu w GenBank	Sekwencje starterów (5'–3')	Sekwencje sond (5'–3')	Wielkość produktu
<i>atg5</i>	NM_001014250.1	F: CTGTTCGATCTTCTTGCATCA R: TCCTTTTCTGGAAAACCTCTTGAA	Yellow555 <sup>®</sup> -CTCTGCCT-dqd	77 pz
<i>LC3a</i>	NM_199500.1	F: CATGAGCGAGTTGGTCAAGA R: CACCATGCTGTGCTGGTT	Yellow555 <sup>®</sup> -TCCTGCTG-dqd	91 pz
<i>LC3b</i>	NM_022867.2	F: TGAATATGAGCGAACTCATCAAG R: GGTGTGGACACACTCACCAT	Yellow555 <sup>®</sup> -CCAGGAGG-dqd	109 pz
$\beta$ -aktyna	NM_031144.3	F: AGCCCCCTCTGAACCCTA R: GGGGTGTTGAAGGTCTCAA	FAM-CGTGAAAAGATG-dqd	70 pz

Yellow555<sup>®</sup> i FAM (fluoresceina) – fluorescencyjne barwniki reporterowe, dgd – wygaszacz (ang. *dark quencher dye*) (nazwa związku zastrzeżona przez producenta).



Produkty reakcji rozdzielano na 2,5% żelu agarozowym zawierającym bromek etydyny (1 µg/ml). Obrazy rozdziałów elektroforetycznych archiwizowano przy użyciu aparatu GelDoc-It Imaging System (UVP, Cambridge, Wielka Brytania).

## **4.6 Immunodetekcja białek**

### **4.6.1 Western blot**

#### **4.6.1.1 Przygotowanie lizatów komórkowych**

Podocyty płukano zimnym PBS, po czym przeprowadzano lizę komórek z użyciem buforu lizującego (20 mM Tris, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, pH 8.0) z dodatkiem mieszaniny inhibitorów proteaz (Protease Inhibitor Cocktail, Sigma-Aldrich) w rozcieńczeniu 1:40 v/v. Podocyty zbierano z powierzchni hodowlanej przy pomocy plastikowego skrobaka, po czym zawiesinę wirowano przez 20 minut (20 000 x g, 4°C). Osad odrzucano, a w nadsączu oznaczano całkowite stężenie białka metodą Lowry'ego (pkt. 4.13.1). Lizaty rozcieńczano buforem lizującym tak, aby stężenie końcowe białka wynosiło 1 mg/ml, następnie je porcjowano i przechowywano w temperaturze -20°C do czasu przeprowadzenia detekcji białek, nie dłużej jednak, niż 3 miesiące.

#### **4.6.1.2 Żele poliakrylamidowe**

Żele poliakrylamidowe przygotowywano najpóźniej na dzień przed ich użyciem. Procentowość żeli rozdzielających wynosiła: 8% – w przypadku detekcji białek o masie cząsteczkowej >200 kDa, 10% – do detekcji białek o masie cząsteczkowej 40-160 kDa oraz 12% – do detekcji białek o masie cząsteczkowej 16-60 kDa. Procentowość żelu zagęszczającego wynosiła zawsze 4,5%.

#### **4.6.1.3 Elektroforeza i elektrotransfer**

Do lizatów komórkowych dodawano bufor obciążający (6-x stężony: 350 mM Tris/HCl, 10% SDS, 30% glicerol, 9,3% DTT, 0,012% błękit bromofenolowy, pH 6,8), próbki umieszczano na 2 minuty w bloku grzejmym w temperaturze 96°C, a następnie schładzano je na lodzie. Na jedną ścieżkę żelu poliakrylamidowego nakładano 20 µg białka. Elektroforezę prowadzono w buforze elektrodowym (100 mM Tris, 100 mM trycyna, 0,1% SDS, pH 8,3) przy stałym napięciu prądu elektrycznego (95 V). Po zakończeniu elektroforezy, żel rozdzielający umieszczano na 15 minut w buforze

transferowym (25 mM Tris, 192 mM glicyna, 5% metanol, pH 8,3). Do elektrotransferu używano membran PVDV aktywowanych bezpośrednio przed użyciem w 100% metanolu. Transfer pólśuchy prowadzono przez 50 minut przy stałym natężeniu prądu elektrycznego (40 mA) w aparacie TE77x (Hoefler, Inc., USA). Po transferze, membrany utrwalano w 100% metanolu, a następnie umieszczano je w roztworze blokującym (3% odtłuszczone mleko w proszku, 1% Tween 20 w buforze TBS) na ok. 1,5-2 godzin z ciągłym mieszaniem. Po tym czasie membrany płukano trzykrotnie po 5 minut buforem płuczającym (0,02% BSA, 2% Tween 20 w TBS), dodawano roztwór 0,2% BSA, 1% Tween 20 w TBS, zawierający przeciwciała I-rzędowe (rozcieńczenie przeciwciał podano w Tabeli 2) i pozostawiano na noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia, membrany płukano buforem płuczającym (trzykrotnie po 15 minut), dodawano roztwór 0,2% BSA, 1% Tween 20 w TBS zawierający przeciwciała II-rzędowe sprzężone z fosfatazą alkaliczną, po czym membrany inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej (rozcieńczenie przeciwciał II-rzędowych podano w Tabeli 3). W kolejnym etapie, membrany płukano trzykrotnie po 15 minut buforem płuczającym i przeprowadzano reakcję barwną w obecności substratów dla fosfatazy alkalicznej: BCIP – 0,15 mg/ml i NBT – 0,3 mg/ml, rozpuszczonych w buforze o składzie: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub> i pH 9,5. Membrany płukano w wodzie dejonizowanej i archiwizowano przy użyciu aparatu GelDoc-It Imaging System (UVP, Cambridge, Wielka Brytania). Uzyskane obrazy poddawano analizie densytometrycznej przy pomocy programu Quantity One (Bio-Rad, USA).

#### **4.6.2 Immunofluorescencja**

Podocyty hodowano na okrągłych szkiełkach o średnicy 22 mm, pokrytych kolagenem typu I (BD Biosciences, USA). W dniu doświadczenia usuwano pożywkę, a podocyty delikatnie płukano ciepłym buforem PBS (37°C), po czym utrwalano je przez 10 minut w 4% roztworze paraformaldehydu w PBS w temperaturze pokojowej. Paraformaldehyd usuwano płuczając podocyty dwukrotnie ciepłym PBS (37°C). Do perforacji błony komórkowej podocytów używano 0,3% Triton X-100 w PBS, który nakładano na szkiełko na okres 4-5 minut, po czym podocyty płukano PBS, dodawano roztwór blokujący (5% BSA w PBS) i pozostawiano na lodzie na 60 minut. W następnej kolejności, na szkiełko nakładano przeciwciała I-rzędowe rozpuszczone w roztworze blokującym (rozcieńczenie przeciwciał podano w Tabeli 2). Do niespecyficznego barwienia podocytów używano roztwór blokujący bez I-rzędowych przeciwciał. Po 60

minutach podocyty płukano 3-krotnie PBS i dodawano do nich roztwór II-rzędowych przeciwciał (sprzężonych z fluorochromem), rozcieńczonych w roztworze blokującym (rozcieńczenie przeciwciał podano w Tabeli 4). Po upływie 45 minut przeciwciała usuwano, a podocyty płukano buforem PBS. Następnie szkiełka z podocytami przyklejano na szkiełka podstawowe przy użyciu odczynnika Fluoromount Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich, USA). Obrazy immunofluorescencyjne preparatów otrzymane z mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX51 analizowano przy użyciu programu CellSens Dimension (Olympus, Japonia), a otrzymane z fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego Leica SP8X za pomocą programu LAS X (Leica, Niemcy).

**Tabela 2.** Rozcieńczenia przeciwciał I-rzędowych zastosowanych w metodzie Western blot oraz immunofluorescencyjnej

Epitop białkowy	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent
LC3	Królik	1:500	Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA
Beklina1	Królik	1:500	
Aktyna	Mysz	1:3000	
p-JNK	Mysz	1:400	
Podocyna	Królik	1:50	
Synaptopodyna	Koza	1:50	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
ULK1	Królik	1:200	
Atg5	Mysz	1:200	
JNK	Mysz	1:200	
Vps34	Królik	1:200	
p-mTOR	Królik	1:200	
mTOR	Królik	1:650	Cell Signaling, Danvers, USA
AMPK	Królik	1:750	
p-AMPK	Królik	1:750	
Vps34	Królik	1:1000	Echelon, Salt Lake City, USA
NOX4	Królik	1:500	Abcam, Cambridge, Wielka Brytania
Nefryna	Koza	1:50	ProSci, Poway, USA

**Tabela 3.** Rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych stosowanych w metodzie Western blot

Swoistość gatunkowa przeciwciała	Pochodzenie	Rozcieńczenie	Producent
anty-królik	koza	1:5000	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
anty-mysz	koza	1:2000	

**Tabela 4.** Rozcieńczenia przeciwciał II-rzędowych stosowanych w metodzie immunofluorescencyjnej

Fluorochrom	Alexa Fluor 488	Alexa Fluor 546
Pochodzenie / swoistość gatunkowa	królicze anty-mysie	kozie anty-królicze
Rozcieńczenie	1:75 (mikroskopia fluorescencyjna) 1:3000 (fluorescencyjna mikroskopia konfokalna)	1:75 (mikroskopia fluorescencyjna) 1:3000 (fluorescencyjna mikroskopia konfokalna)
Producent	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

#### 4.7 Pomiar aktywności PI3K klasy III

Aktywność kinazy fosfatydylo-3-inozytolu klasy III (PI3K klasy III) oznaczano metodą immunoenzymatyczną po immunoprecypitacji białka z lizatów komórkowych.

##### 4.7.1 Immunoprecypitacja PI3K klasy III

Lizat podocytny (300  $\mu$ l, 300  $\mu$ g białka) oczyszczano z użyciem niespecyficznych przeciwciał klasy G i złoża agarozowego związanego z białkiem A (inkubacja na rotorze przez 1 godzinę w temperaturze 4°C). Po odwirowaniu próbek (5 minut, 1 000 x g, 4°C) i odrzuceniu złoża, do oczyszczonego lizatu dodawano 1  $\mu$ g przeciwciał skierowanych przeciwko PI3K klasy III (Vps34; Echelon Biosciences, USA) i inkubowano z ciągłym mieszaniem wertykalnym przez noc w temperaturze 4°C. Następnego dnia dodawano 60  $\mu$ l złoża agarozowego związanego z białkiem A (Santa Cruz, USA) i kontynuowano inkubację przez 1 godzinę (4°C). Próbki wirowano (3 minuty, 1 000 x g, 4°C), nadsącz odrzucano, a osad przemywano kolejno: 3-krotnie 1% Nonidet P-40 w PBS, 3-krotnie buforem 500 mM LiCl, 100 mM Tris-HCl, pH 7,5,

oraz 2-krotnie buforem TNE (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7,5). Po ostatnim płukaniu i wirowaniu (5 minut, 1 000 x g, 4°C) nadsącz odrzucano, a osad zawierający złożę wraz z kompleksami przeciwciał i białka PI3K klasy III posłużył do oznaczania aktywności kinazy fosfatydylo-3-inozytolu klasy III przy użyciu komercyjnego zestawu immunoenzymatycznego Class III PI3K ELISA Kit (Echelon Biosciences, USA). Obecność białka PI3K klasy III w osadzie po immunoprecypitacji potwierdzono metodą Western blot.

#### **4.7.2 Oznaczanie aktywności PI3K klasy III**

Substratem dla PI3K klasy III jest fosfatydyloinozytol (PI), który pod wpływem PI3K klasy III jest fosforylowany do fosfatydyloinozytolo-3-fosforanu (PI(3)P).

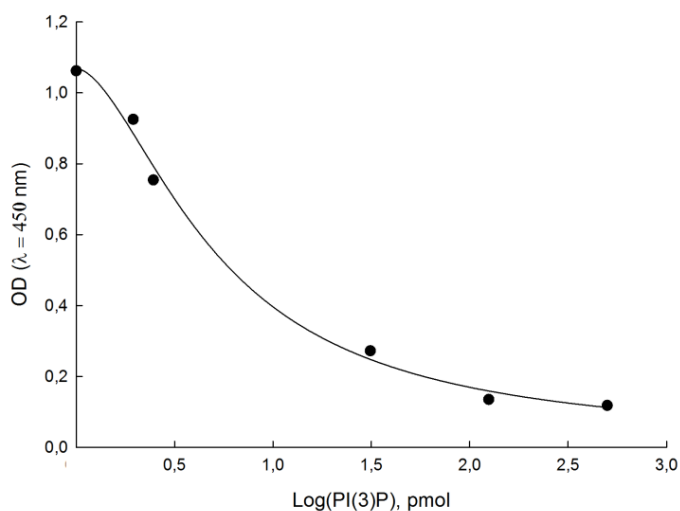
Do 60 µl złoża związanego z PI3K klasy III dodawano 22 µl buforu reakcyjnego (10 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM MnCl<sub>2</sub>, pH 8,0) i 2 µl PI (1 nmol). Reakcję enzymatyczną rozpoczynano dodając 1 µl 1,25 mM ATP (stężenie końcowe 50 µM). Zawiesinę delikatnie mieszano i inkubowano przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, po czym reakcję hamowano dodając 5 µl 100 mM EDTA (pH 8,0). Następnie próbkę reakcyjną rozcieńczano dodając 130 µl H<sub>2</sub>O i wirowano (1000 x g, 5 min, 4°C). Nadsącz (160 µl) przenoszono do nowych probówek typu Eppendorf, do których dodawano po 40 µl komercyjnego buforu do detekcji PI(3)P.

Krzywą standardową sporządzano w oparciu o roztwory PI(3)P o stężeniach: 39,1 nM, 156 nM, 625 nM, 2,5 µM i 10 µM w buforze komercyjnym zawierającym 2,5 mM EDTA. Na 96-dołkową płytkę, uprzednio opłaszczoną PI(3)P, nakładano standardy PI(3)P, próbki (50 µl/studzienkę) oraz 50 µl roztworu z detektorem PI(3)P (zestaw ELISA Echelon Biosciences), którego powinowactwo do PI(3)P jest wyższe w stosunku do PI(3)P znajdującego się w roztworze, niż do związanego z podłożem płytki.

Płytkę inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej z ciągłym mieszaniem (mieszadło horyzontalne, prędkość 300 rpm), po czym usuwano środowisko reakcyjne, a płytkę płukano 3 razy buforem TBS-T (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20, pH 7,6). Następnie do studzienek dodano po 100 µl komercyjnego roztworu zawierającego tzw. wtórny detektor i kontynuowano inkubację przez 30 minut (mieszadło horyzontalne, prędkość 300 rpm, temperatura pokojowa). Po trzykrotnym płukaniu płytki buforem TBS-T, studzienki osuszano, a następnie dodawano do nich 100 µl komercyjnego roztworu wywołującego. Po 10 minutach

reakcję zatrzymano poprzez dodanie 50  $\mu\text{l}$  1N  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Pomiaru absorbancji dokonywano przy długości fali 450 nm.

Krzywą standardową sporządzono jako zależność pomiędzy wielkością absorbancji dla poszczególnych standardów a logarytmem dziesiętnym z ilości PI(3)P w próbce (Ryc. 6 i Tabela 5).



**Ryc. 6.** Zależność pomiędzy  $\log(\text{PI}(3)\text{P})$  a wielkością absorbancji.

**Tabela 5.** Zależność pomiędzy absorbancją a zawartością PI(3)P w próbach standardowych

Standard PI(3)P		OD $\Lambda=450$ nm
PI(3)P pmol/próbę	$\log(\text{PI}(3)\text{P})$ pmol/próbę	
0	0	1,062
1,95	0,290	0,925
7,81	0,392	0,754
31,25	1,495	0,272
125	2,097	0,135
500	2,699	0,118

Do obliczenia wartości PI(3)P w badanych próbach zastosowano czteroparametrowe równanie regresji wyznaczone dla krzywej standardowej przy użyciu programu SigmaPlot (Systat Software, Inc.).

## 4.8 Transfekcja podocytów

### 4.8.1 Transfekcja komórek przy użyciu wyciszającego RNA (siRNA)

Podocyty hodowano w standardowych warunkach (RPMI 1640, 10% FBS, 1% P/S) w butelkach hodowlanych o powierzchni 25 cm<sup>2</sup> opłaszczonych kolagenem typu I. Na dzień przed transfekcją podocyty umieszczano w środowisku bez antybiotyków (RPMI 1640, 10% FBS). Roztwory siRNA NOX4, Atg5 oraz niespecyficznego siRNA (ns siRNA) przygotowywano *ex tempore* w środowisku transfekcyjnym z dodatkiem liposomalnego czynnika transfekcyjnego (Santa Cruz Biotechnology, USA) według wskazówek producenta.

Podocyty płukano ciepłym buforem PBS (37°C), a następnie dodawano 1,6 ml pożywki transfekcyjnej (Santa Cruz Biotechnology, USA), i 0,4 ml uprzednio przygotowanej mieszaniny zawierającej siRNA dla badanych genów lub ns siRNA, i inkubowano przez 7 godzin w temperaturze 37°C i atmosferze o zawartości 5% CO<sub>2</sub>. Stężenie końcowe siRNA NOX4 wynosiło 80 nM, a siRNA Atg5 – 50 nM. Następnie, do środowiska inkubacyjnego dodawano 2 ml pożywki RPMI 1640 wzbogaconej o 20% FBS (20% v/v) oraz 2% penicyliną i streptomycyną i prowadzono inkubację przez 16 godzin, po czym wymieniono środowisko inkubacyjne na standardową pożywkę. Inkubacje podocytów w badanych środowiskach doświadczalnych (z insuliną lub w wysokim stężeniu glukozy) rozpoczynano po 2 dobach od dnia transfekcji.

W celu oceny efektywności transfekcji, po wyciszeniu określonego genu przeprowadzano analizę ilości odpowiedniego białka metodą Western blot.

### 4.8.2 Transfekcja podocytów z użyciem plazmidowego DNA

#### 4.8.2.1 Przygotowanie plazmidowego DNA

Do doświadczeń używano plazmid kodujący konstrukt białkowy RFP-GFP-LC3 (ptfLC3) izolowany z kultur bakterii *E. coli* (szczep DH5 $\alpha$ ) ekspresujących ptfLC3.

Bakterie wprowadzono do płynnej hodowli (pożywka LB: 1% NaCl, 1% bakto-trypton, 0,5% wyciąg drożdżowy z dodatkiem kanamycyny – 50  $\mu$ g/ml) i hodowano przy ciągłym mieszaniu w temperaturze 37°C przez noc. Następnego dnia plazmid izolowano z komórek i oczyszczano na kolumnach jonowymiennych z użyciem zestawu Plasmid Midi AX (A&A Biotechnology, Polska). Stężenie końcowe DNA oraz czystość preparatu analizowano metodą spektrofotometryczną mierząc absorbancję przy długości

fali 260 i 280 nm (spektrofotometr typu Nanodrop), a roztwór DNA przyjmowano za czysty, gdy wartość ilorazu  $A_{260}/A_{280}$  mieściła się w przedziale 1,8-2,2.

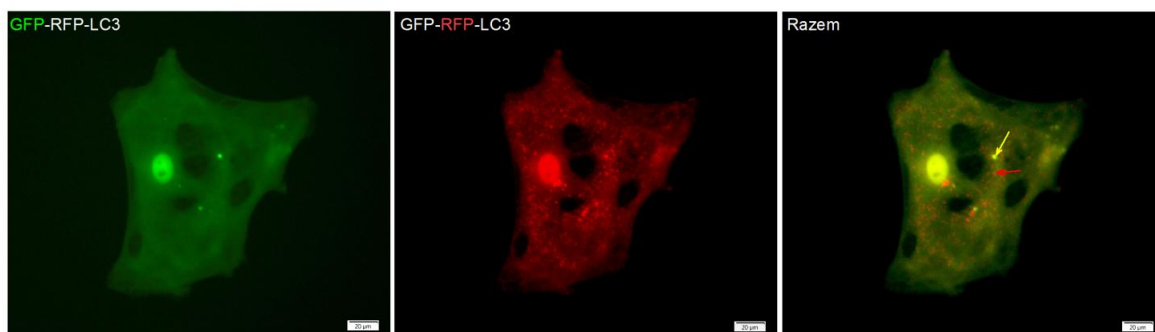
Plazmid sterylizowano przed jego dalszym użyciem w podocytach. Roztwór plazmidu rozcieńczono w 100% izopropanolu z dodatkiem 1,2 M NaCl (10:6 v/v) i pozostawiono na 15 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano (20 000 x g, 20 minut, 4°C). Nadsącz odrzucano, a osad zawieszano w 96% etanolu i przenoszono do sterylnej próbówki i ponownie wirowano (20 000 x g, 30 minut, 4°C). Po usunięciu nadsącz, a osad suszono pod wyciągiem laminarnym, po czym rozpuszczano wyjałowiony plazmid w sterylnej H<sub>2</sub>O i ponownie mierzono jego stężenie i czystość.

#### 4.8.2.2 Nukleofekcja

Podocyty hodowano na płytkach 24-dółkowych opłaszczonych kolagenem typu I (Cellstar, Greiner Bio-One, Austria) do uzyskania ok. 70-80% konfluencji. Nukleofekcję prowadzono z użyciem zestawu Amaxa<sup>TM</sup> AD1 Primary Cell 4D-Nucleofector<sup>TM</sup>-Y Kit (Lonza, Szwajcaria) i DNA plazmidowego (ptfLC3; 16 µg/studzienkę). Optymalizację warunków transfekcji przeprowadzono z użyciem kontrolnego plazmidu (pmaxGFP<sup>TM</sup> Vector, Lonza) przy 11 różnych programach różniących się wielkością napięcia oraz długością trwania impulsów (dokładne parametry nukleofekcji zastrzeżone przez producenta). Optymalne warunki nukleofekcji uzyskano przy wykorzystaniu programu FB-166. Wydajność nukleofekcji wynosiła ok. 10%.

W transfekowanych podocytach stwierdzono obecność białka LC3 z dwoma białkami fluorescencyjnymi, tj. RFP (ang. *red fluorescent protein*; kolor czerwony) i GFP (ang. *green fluorescent protein*; kolor zielony). Sygnał fluorescencyjny pochodzący od białka LC3 zlokalizowanego w cytoplazmie i/lub autofagosomach ma barwę żółtą (jako wynik nakładających się fal o długości odpowiadającej barwie czerwonej i zielonej, RFP i GFP). Po fuzji autofagosomu z lizosomem zanika sygnał pochodzący od GFP (białko to jest wrażliwe na niskie pH), stąd autofagolizosomy mają kolor czerwony (Ryc. 7).





**Ryc. 7.** Obraz fluorescencyjny podocytów szczurzych hodowli pierwotnej po nukleofekcji przy użyciu plazmidu ptfLC3 kodującego białka LC3 oraz GFP i RFP. Żółta strzałka – autofagosom, czerwona strzałka – autofagolizosom.

Podocyty po nukleofekcji inkubowano z insuliną (300 nM, 5 dni) lub w obecności wysokiego stężenia D-glukozy (30 mM, 5 dni). Co 24-godziny wykonywano od 15 do 30 zdjęć obrazów z mikroskopu fluorescencyjnego Olympus IX51 i obliczano całkowitą fluorescencję dla autofagosomów i autofagolizosomów za pomocą programu CellSens Dimension (Olympus, Japonia). Wyniki przedstawiano jako stosunek wielkości sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z autofagolizosomów do autofagosomów.

#### 4.9 Transmisyjna mikroskopia elektronowa

Podocyty hodowano na szkiełkach nakrywkowych opłaszczonych kolagenem typu I (Becton, Dickinson and Company, Wielka Brytania), a następnie utrwalano w 2,5% roztworze aldehydu glutarowego w 0,1 M buforze fosforanowym przez 3 godziny w temperaturze pokojowej, po czym płukano PBS i ponownie utrwalano przez 1 godzinę w roztworze 1% czterotlenku osmu i 1% żelazocyjanku potasu, a następnie odwadniano w etanolu, kolejno w roztworach o wzrastającym stężeniu etanolu od 30% do 90%. Szkiełka z podocytami cięto na mniejsze fragmenty, które zatapiano w żywicy epoksydowej (Epon 812 resin, Fluka, Niemcy) i krojono w ultramikrotomie na skrawki o grubości 40 nm. Do kontrastowania skrawków umieszczonych na siateczce miedzianej używano nasyconego roztworu octanu uranylu i cytrynianu ołowiu (0,4% w/v). Preparaty analizowano przy użyciu transmisyjnego mikroskopu elektronowego (Philips CM100) w Laboratorium Mikroskopii Elektronowej Wydziału Biologii Uniwersytetu Gdańskiego. Zdjęcia wykonano pod powiększeniem 1650x za pomocą programu iTEM (Olympus Soft Imaging Solutions).

## **4.10 Ocena żywotności podocytów w układach badawczych**

### **4.10.1 Test MTT (test redukcji soli tetrazolowej)**

Test żywotności komórek MTT przeprowadzano na podocytach hodowanych na 24-dołkowej płytce opłaszczonej kolagenem typu I. Po inkubacji podocytów z badanymi czynnikami – insulina (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni), D-glukoza (30 mM; 5 dni) – zmieniono pożywkę na świeżą i zawierającą sól tetrazolową (MTT, bromek 3-(4,5-dimetylo-tiazol-2-ilo)-2,5-difenylo-tetrazolu, 0,2 mg/ml), po czym podocyty inkubowano przez 4 godziny w temperaturze 37°C oraz atmosferze o zawartości 5% CO<sub>2</sub>. Następnie usuwano pożywkę z nad komórek, a wytrącone kryształy formazanu rozpuszczano w DMSO. Pomiar absorbancji lizatów podocytów wykonywano przy długości fali 560 nm (właściwa) i 690 nm (referencyjna) przy użyciu aparatu VICTOR<sup>3</sup> Multilabel Counter 1420 (PerkinElmer, USA)

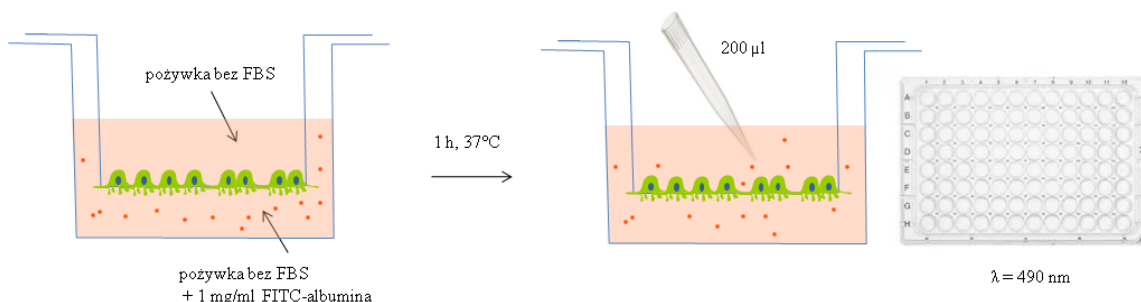
### **4.10.2 Barwienie aneksyną V**

W celu oceny wpływu badanych czynników na liczbę podocytów ulegających apoptozie, komórki hodowano na płytkach Petriego o średnicy 33 mm opłaszczonych kolagenem typu I. Po inkubacji podocytów z badanymi czynnikami – insulina (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni), D-glukoza (30 mM; 5 dni) – komórki płukano ciepłym PBS, a następnie barwiono aneksyną V znakowaną FITC (50 µg/ml, 10 minut, temperatura pokojowa) stosując komercyjny zestaw (Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit, Sigma-Aldrich, USA). Po odpłukaniu niezwiązanej z błonami komórkowymi aneksyny V-FITC, podocyty utrwalano w 4% paraformaldehydzie przez 15 minut i temperaturze pokojowej, po czym jądra komórkowe uwidaczniano z zastosowaniem DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindole; 20 µg/ml, 2 minuty, temperatura pokojowa).

Analizę ilościową komórek przeprowadzono przy użyciu aparatu Olympus Scan<sup>R</sup> screening system (Olympus, Japonia) w Zakładzie Patologii Instytutu „Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka” w Warszawie. Całkowitą liczbę podocytów w preparatach określono na podstawie liczby komórek wybarwionych DAPI. Wykonano po 100 zdjęć dla każdego preparatu pochodzącego z dwóch niezależnych hodowli pierwotnych podocytów. Średnia liczba zliczonych komórek w każdym preparacie wynosiła ok. 2,5 tys.

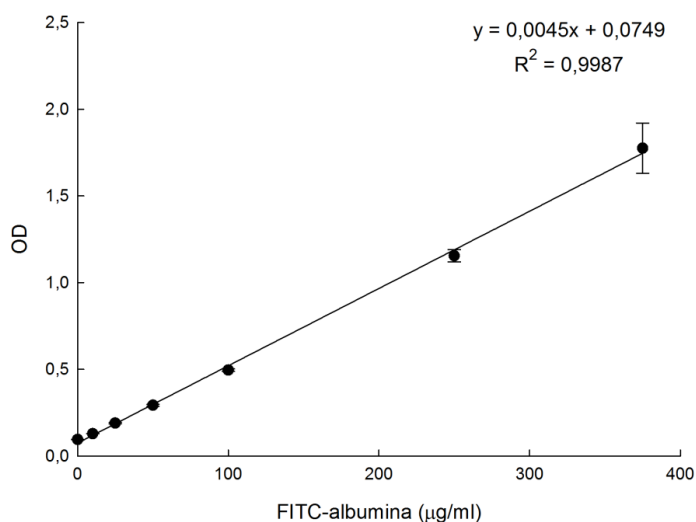
#### 4.11 Analiza przepuszczalności warstwy podocytów

Przepuszczalność podocytów dla albuminy oceniano w oparciu o pomiar wielkości dyfuzji albuminy-FITC przez warstwę podocytów hodowanych we wstawkach umieszczonych w 24-dołkowej płytce, w których powierzchnię hodowlaną stanowiła opłaszczona kolagenem typu IV błona z politereftalanu etylenu o powierzchni  $0,3 \text{ cm}^2$  i wielkości porów  $1 \text{ }\mu\text{m}$  (BD Biosciences, USA). Po 4 dniach hodowli, podocyty transfekowano przy użyciu siRNA według metody opisanej w pkt. 4.8.1 i kontynuowano hodowlę w obecności badanego czynnika – insuliny (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni) lub D-glukozy (30 mM; 5 dni). Następnie wymieniano środowisko hodowlane na pożywkę RPMI 1640 bez FBS. Po 2 godzinach pożywkę we wstawce zastępowano świeżą pożywką RPMI 1640 bez FBS (0,3 ml), a pod wstawką pożywką RPMI 1640 bez FBS ale wzbogaconą o 1 mg/ml albuminy-FITC (1,5 ml) i inkubowano przez 1 godzinę ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ), po czym pobierano 200  $\mu\text{l}$  środowiska nad podocytów i mierzono absorbancję płynu przy długości fali 490 nm (spektrofotometr BioTek ELx808) (Ryc. 8).



**Ryc. 8.** Schemat układu doświadczenia stosowanego do badania przepuszczalności warstwy podocytów szczurzych hodowli pierwotnej dla albuminy znakowanej FITC.

Ilość albuminy, która przeszła przez warstwę podocytów, obliczano na podstawie krzywej standardowej sporządzonej dla absorbancji roztworów o znanym stężeniu FITC-albuminy: 0, 10, 25, 50, 100, 250 oraz 375  $\mu\text{g/ml}$  (Ryc. 9).



**Ryc. 9.** Zależność pomiędzy stężeniem albuminy-FITC w próbce a jej absorbancją przy długości fali 490 nm.

#### 4.12 Pomiar aktywności dokomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozy

Podocyty hodowane na płytkach 24-dołkowych opłaszczonych kolagenem typu I delikatnie płukano ciepłym buforem PBS (37°C), a następnie inkubowano przez 2 godziny w środowisku hodowlanym zawierającym pożywkę RPMI 1640 bez FBS i bez glukozy (900 µl/dołek) w temperaturze 37°C oraz atmosferze o zawartości 5% CO<sub>2</sub>. Następnie do środowiska hodowlanego dodawano 100 µl/dołek pożywki RPMI 1640 wzbogaconej o 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozę (1 µCi/dołek) oraz insulinę (300 nM) w przypadku badań dotyczących insulinozależnego transportu glukozy. Reakcję prowadzono przez 3 minuty w temperaturze 37°C, po czym płytkę umieszczano na lodzie, z każdego dołka pobierano 400 µl środowiska inkubacyjnego do naczynek scyntylacyjnych zawierających 2 ml płynu scyntylacyjnego (próba zewnątrzkomórkowa), a resztę pożywki usuwano i podocyty przepłukiwano trzykrotnie zimnym PBS. Po osuszeniu płytki, podocyty lizowano przez 1,5 godziny w 0,05 N NaOH (500 µl/dołek) w temperaturze pokojowej przy ciągłym mieszaniu. Lizat komórkowy (400 µl z każdego dołka) przenoszono do naczynek scyntylacyjnych zawierających 2 ml płynu scyntylacyjnego (próba wewnątrzkomórkowa) i mierzono radioaktywność próbek w liczniku płynnej scyntylacji (MicroBeta<sup>2</sup><sup>®</sup>, Perkin Elmer, Waltham, USA). W lizacie podocytarnym oznaczano również stężenie białka metodą Bradforda (pkt. 4.13.2).

## **4.13 Oznaczanie stężenia białka**

### **4.13.1 Metoda Lowry'ego**

Stężenie białka oznaczano w próbkach z 20  $\mu\text{l}$  lizatu dodając 80  $\mu\text{l}$  0,2% roztworu SDS w 0,2 N NaOH oraz 1 ml roztworu 0,01%  $\text{CuSO}_4$ , 0,02% winian Na/K w 2%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  w 0,1 N NaOH. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej dodawano 100  $\mu\text{l}$  odczynnika Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich, USA) rozcieńczonego wodą w stosunku 1:1. Próby intensywnie mieszano i po 20 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono wielkość absorbancji przy długości fali 600 nm. Krzywą wzorcową sporządzano w oparciu o wielkość absorbancji dla standardowych roztworów albuminy surowicy wołowej (BSA) o stężeniach: 0; 0,25; 0,5; 1,25 oraz 2,5 mg/ml.

### **4.13.2 Metoda Bradforda**

Na 96-dółkową płytkę nakładano po 50  $\mu\text{l}$ /dółek badanych próbek oraz 200  $\mu\text{l}$ /dółek odczynnika Bradford (117  $\mu\text{M}$  Commasie Brilliant Blue G-250, 4,75% etanol, 8,5%  $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) i inkubowano płytkę przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Następnie mierzono wielkość absorbancji przy długości fali 630 nm i 490 nm (BioTek ELx808). Stężenie białka w próbkach obliczano na podstawie równania krzywej wzorcowej sporządzanej w oparciu o wielkość absorbancji dla standardowych roztworów BSA o stężeniach: 0; 0,8; 1,6; 2,4; 3,2; 4; 8 oraz 16  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

## **4.14 Analiza statystyczna**

Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  standardowy błąd średniej (SEM). Prawdopodobieństwo identyczności grup wyników oceniano metodą analizy wariancji ANOVA oraz przy użyciu testu Studenta-Newmana-Keulsa. Do obliczeń statystycznych wykorzystano oprogramowanie SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Inc., USA). Za statystycznie znaczącą różnicę uznawaną taką, dla której  $p < 0,05$ .

## **4.15 Bufory, odczynniki, materiały**

### **4.15.1 Bufory**

Bufor fosforanowy (PBS): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4

Bufor lizujący: 20 mM Tris, 140 mM NaCl, 2 mM EDTA, 10% glicerol, 1% Nonidet P-40, pH 8.0

Bufor obciążający (6x): 350 mM Tris/HCl, 10% SDS (w/v), 30% glicerol (v/v), 9,3% DTT (w/v), 0,012% BPB (w/v).

Bufor elektrodowy: 100 mM Tris, 100 mM Tricyna, 0,1% SDS, pH 8,3.

Bufor transferowy: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 5% metanol, pH 8,3.

Bufor blokujący: 3% odtuszczone mleko w proszku w TBS 1x, 1 ml Tween20 na każde 100 ml TBS.

TBS 10x: 1,4 M NaCl, 0,2 M Tris/HCl, 0,1% NaN<sub>3</sub>.

Bufor płuczący: 0,1% BSA, 0,1% Tween 20 w TBS 1x.

Roztwór do inkubacji przeciwciał: 1% BSA, 0,05% Tween 20 w TBS 1x.

Środowisko reakcyjne dla fosfatazy alkalicznej: 100 mM Tris, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 9,5.

Bufor TBE 5x: 438 mM Tris; 445 mM kwas borowy; 10 mM EDTA; pH 8,0.

#### 4.15.2 Odczynniki

##### **MP Biochemicals, Irvine, USA:**

akrylamid, glicerol, N, N'-metylenobisakrylamid

##### **Sigma-Aldrich, St Louis, USA:**

pożywka hodowlana – RPMI 1640, agaroz, BCIP, BPB, bromek etydyny, BSA, D-glukoza, DTT, EDTA, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, L-glicyna, NBT, Tri Reagent, odczynnik Folin-Ciocalteu, RNazeZAP, roztwór penicyliny i streptomycyny, tricyna, Tris, trypsyna, inhibitory proteaz, apocynina, insulina, AMP-D1 DNase I Amplification Grade, SDS, DMSO, MTT, aneksyna V-FITC, albumina-FITC, DAPI

##### **Sandoz, Kundl, Austria:**

tiopental

##### **American Radiolabeled Chemicals, St Louis, USA:**

2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukoza

##### **ThermoScientific, Waltham, USA:**

paraformaldehyd, płodowa surowica bydlęca (FBS), Coomassie Brilliant Blue R-250

##### **Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA:**

L-glukoza, złożo agarozowe związane z białkiem A, czynnik transfekcyjny do siRNA, medium transfekcyjne do siRNA, kontrolne siRNA (scrambled)

**Promega, Madison, Wisconsin, USA**

dNTPs, odwrotna transkryptaza M-MLV

**POCH, Gliwice, Polska:**

chloroform, CuSO<sub>4</sub>, etanol, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, izopropanol, metanol, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, NaCl, NaN<sub>3</sub>, winian sodowo-potasowy.

**Qbiogene, Carlsbad, CA, USA**

TEMED, Tween 20

**Roche Diagnostics Ltd, Bazylea, Szwajcaria**

Nonidet P-40, starter p(dT)<sub>15</sub>, sondy molekularne, LightCycler480 Probes Master

**EURx Sp. z o.o., Gdańsk, Polska**

inhibitor RNAz

**4.15.3 Materiały**

**Wytwórnia Pasz i Koncentratów, Kcynia, Polska**

Pasza bytowa Labofeed B

**Becton Dickinson Labware, Beckton, Wielka Brytania**

Pokryte kolagenem typu I: butelki płaskie do hodowli komórek adherentnych, szkiełka nakrywkowe, płytki hodowlane 12- lub 24-dołkowe, płytki Petriego. Pokryte kolagenem typu IV: inserty do badań przepuszczalności

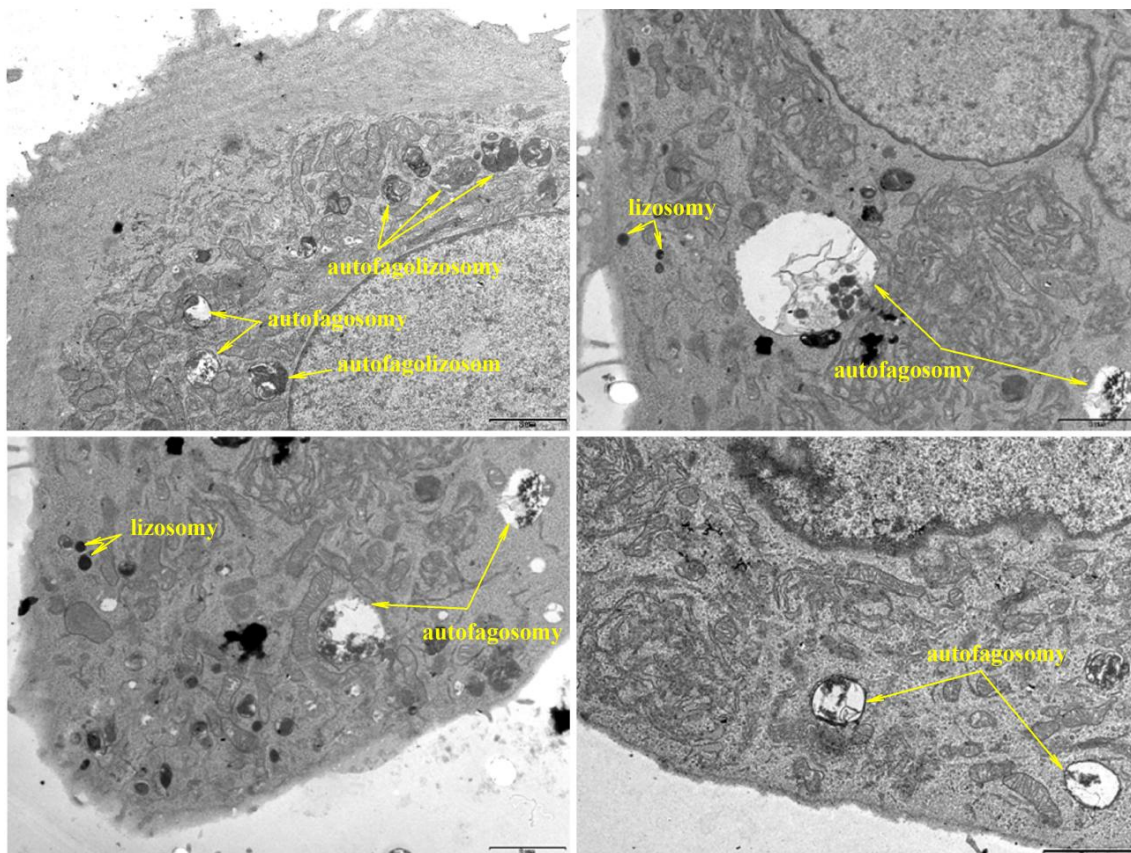
**Addgene, Cambridge, CA, USA**

Plazmid ptfLC3 #21074

## 5. Wyniki

### 5.1 Cytomorfologiczne wykładniki autofagii w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej

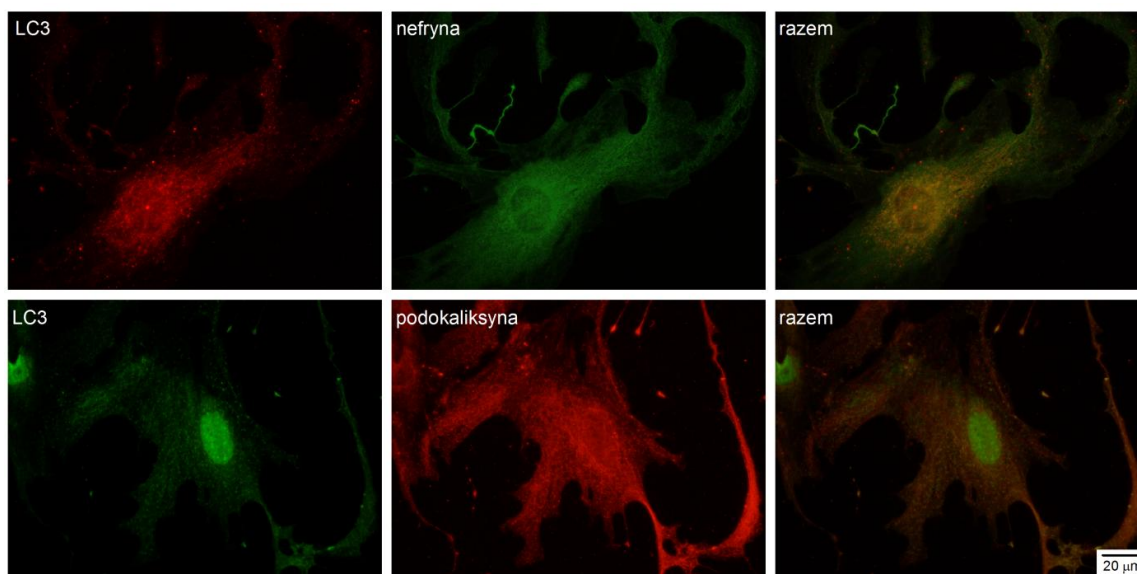
Na podstawie zdjęć uzyskanych z transmisyjnej mikroskopii elektronowej stwierdzono, że podocyty szczurze w hodowli pierwotnej charakteryzują się obecnością licznych wewnątrzkomórkowych struktur autofagalnych: autofagosomów i autofagolizosomów (Ryc. 10). Autofagosomy są pęcherzykami o średnicy od 200 nm do 2  $\mu\text{m}$ , otoczonymi podwójną błoną fosfolipidową i powstającymi podczas początkowych etapów autofagii. Wnętrze autofagosomów wypełnia heterogenny materiał utworzony z rozpuszczalnych składników cytoplazmy, jak również mniejszych organelli wewnątrzkomórkowych lub ich fragmentów i struktur błonowych. Po fuzji autofagosomów z lizosomami powstają autofagolizosomy, które są pęcherzykami o wielkości zbliżonej do autofagosomów, lecz otoczone są pojedynczą błoną fosfolipidową oraz charakteryzują się wyraźnie elektronowo gęstszą zawartością. Zarówno autofagosomy, jak i autofagolizosomy obserwowano w obrębie ciała podocyta (Ryc. 10).



**Ryc. 10.** Zdjęcia pierwotnych podocytów szczurzych z transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) (powiększenie 1650 $\times$ , skala 2  $\mu\text{m}$ ).

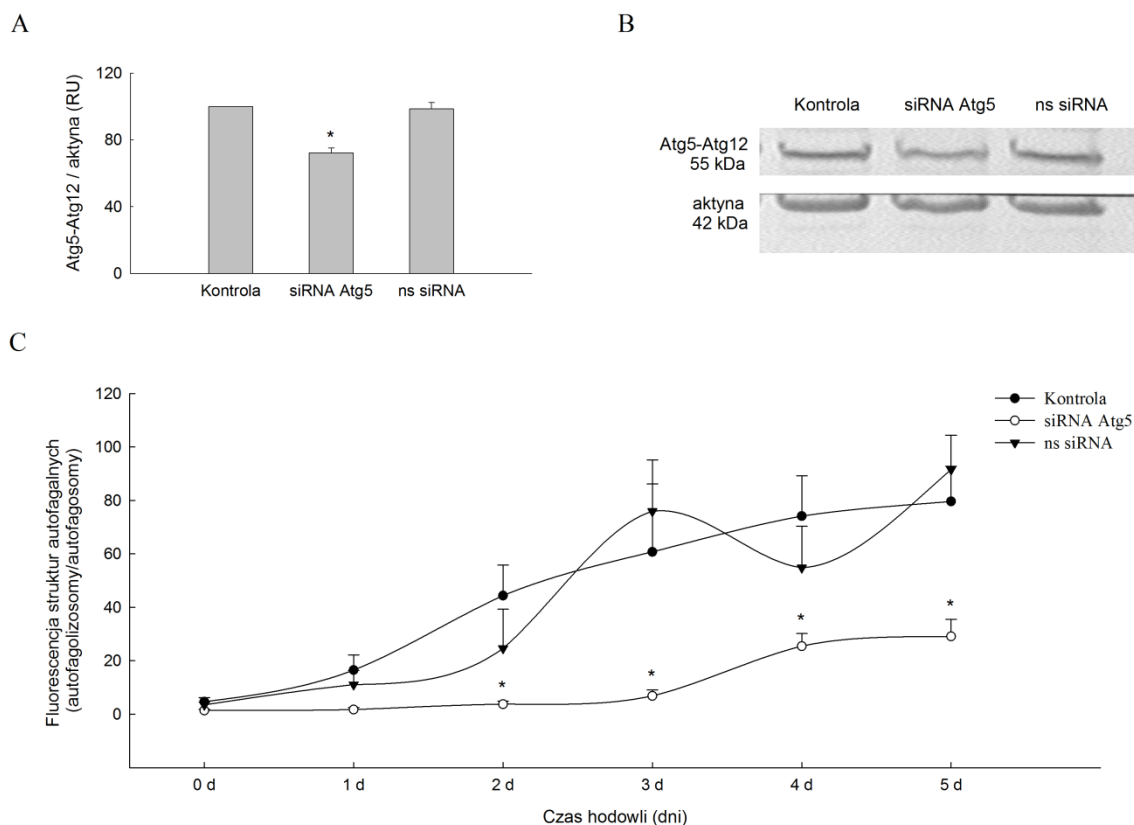


Posługując się metodą barwienia immunofluorescencyjnego stwierdzono w podocytach obecność białka LC3 – głównego markera autofagii. W ciele podocyta, a szczególnie w obszarze okołojądrowym, LC3 współwystępuje z nefryną (Ryc. 11). Natomiast nie stwierdzono współwystępowania LC3 z innym markerem podocytarnym – podokaliksyną (Ryc. 11).



**Ryc. 11.** Zdjęcia podocytów szczurzych hodowli pierwotnej po podwójnym barwieniu immunofluorescencyjnym: LC3 i nefryna (górny rząd) oraz LC3 i podokaliksyna (dolny rząd).

W następnych doświadczeniach zbadano wpływ zmniejszonej ilości białka Atg5, tworzącego kompleksy z białkiem Atg12, na obecność w podocytach pęcherzyków autofagalnych. Stosując transfekcję siRNA Atg5 wyciszono ekspresję mRNA Atg5, w efekcie czego zmniejszeniu o ok. 28% uległa ilość kompleksów Atg5-Atg12 (Ryc. 12A i B). Podocyty po transfekcji siRNA Atg5 charakteryzowały się mniejszą wartością ilorazu sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z autofagolizosomów do sygnału pochodzącego z autofagosomów w porównaniu do podocytów transfekowanych ns siRNA, tj. około 3-krotnie po 24 godzinach od transfekcji siRNA Atg5 (dzień 1), 7-krotnie w 2. dniu i ponad 9-krotnie w 3. dniu doświadczenia ( $p < 0,05$ ) (Ryc. 12C). W 4. i 5. dniu doświadczenia wartość ilorazu analizowanych sygnałów fluorescencyjnych w podocytach po wyciszeniu Atg5 była ok. 3-krotnie niższa w porównaniu do komórek transfekowanych kontrolnym siRNA ( $p < 0,05$ ) (Ryc. 12C).

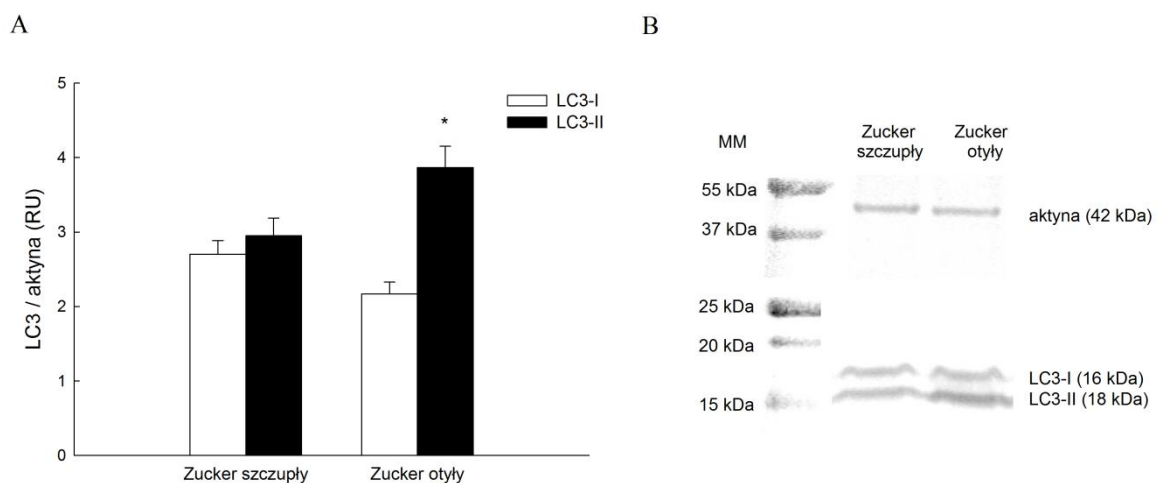


**Ryc. 12.** Efekt wyciszenia ekspresji mRNA Atg5 na ilość kompleksów Atg5-Atg12 oraz profil fluorescencyjny autofagosomów i autofagolizosomów w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Podocyty transfekowano przy użyciu siRNA Atg5 lub kontrolnego siRNA (ns siRNA), a następnie hodowano przez 5 dni w standardowych warunkach (RPMI 1640, 10% FBS). Panel A: ilość kompleksów Atg5-Atg12 w stosunku do aktyny po 5 dniach od transfekcji (\* $p < 0,05$  vs Kontrola,  $n = 3$ ). Panel B: obraz reprezentatywnych immunoblotów. Panel C: zmiany wielkości sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z autofagolizosomów w stosunku do wielkości sygnału pochodzącego z autofagosomów w żywych podocytach w czasie hodowli (0-5 dni,  $n = 8-20$  zdjęć z dwóch niezależnych hodowli podocytów, \* $p < 0,05$  vs Kontrola). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM. Kontrola – podocyty nie transfekowane. RU – jednostki względne.

## 5.2 Ocena modyfikacji aktywności autofagii przez insulinę w podocytach

### 5.2.1 Ilość białka LC3 w kłębuszkach nerkowych szczurów Zucker

Przeprowadzono serię wstępnych doświadczeń mających na celu zbadanie potencjalnego wpływu insuliny *in vivo* na ilość LC3 w kłębuszkach nerkowych. Białko LC3 występuje w dwóch formach: LC3-I (forma cytoplazmatyczna) i LC3-II (forma błonowa, zakotwiczona w błonie autofagosomów). U otyłych szczurów Zucker cechujących się hiperinsulinemią stwierdzono zmniejszoną o ok. 20% ( $p = 0,055$ ) ilość LC3-I, a zarazem zwiększoną o ok. 30% ilość LC3-II ( $p < 0,05$ ) w porównaniu do zwierząt kontrolnych, którymi były szczupłe szczury Zucker z normoinsulinemią (Ryc.13). Uzyskane wyniki sugerują, iż insulina *in vivo* może być jednym z czynników aktywujących autofagię w komórkach kłębuszka nerkowego.

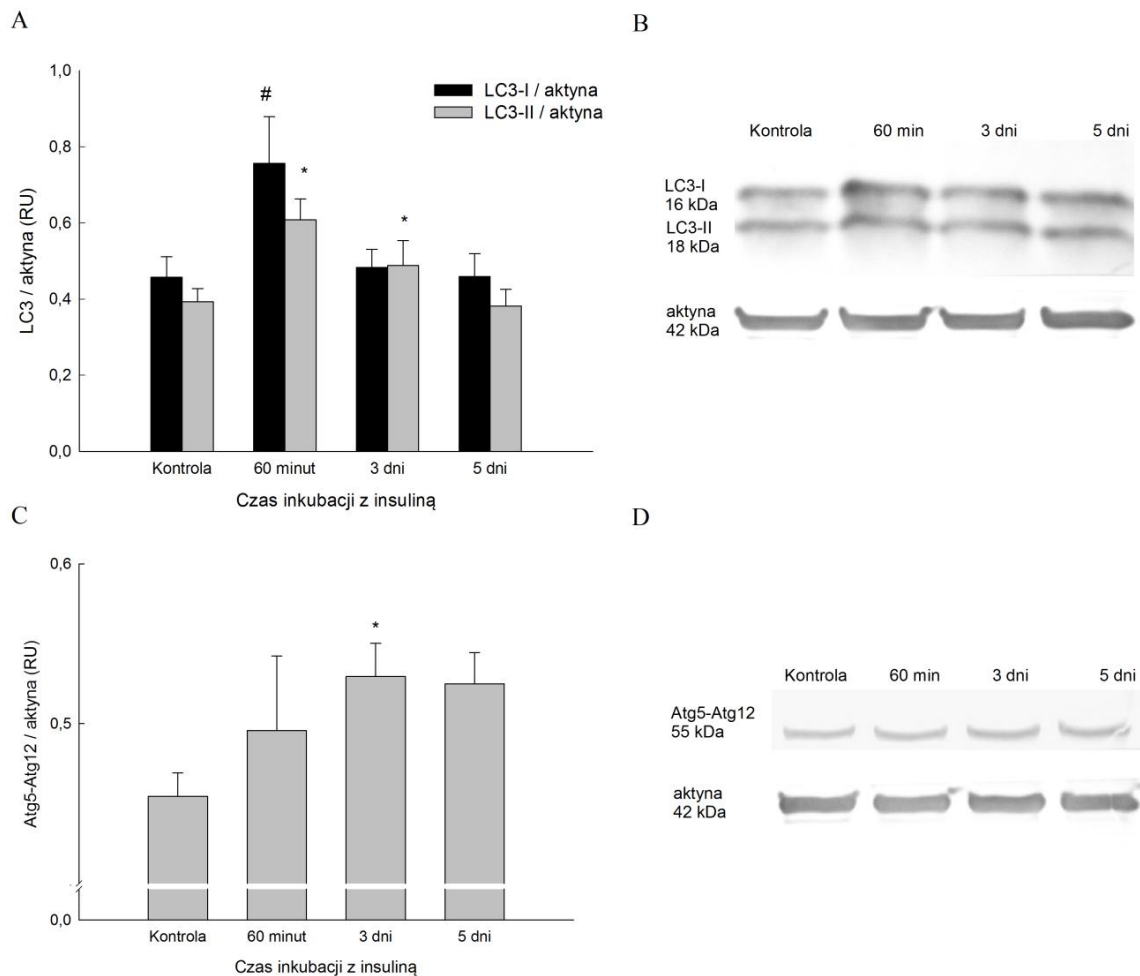


**Ryc. 13.** Poziom białek LC3-I i LC3-II w kłębuszkach nerkowych otyłych i szczupłych szczurów Zucker (\* $p < 0,05$  vs. LC3-II Zucker szczupły,  $n=3$ , panel A). Panel B przedstawia obraz reprezentatywnych immunoblotów (MM – marker masowy). RU – jednostki względne.

### 5.2.2 Wpływ insuliny na poziom markerów autofagalnych w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej

Wykazano, że insulina (300 nM) wpływa na ilość białek LC3-I i LC3-II w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Odnotowano zwiększenie ilości LC3-I o ok. 65% ( $0,46 \pm 0,05$  vs.  $0,76 \pm 0,12$ ,  $p < 0,05$ ), a LC3-II o ok. 54% ( $0,39 \pm 0,03$  vs.  $0,61 \pm 0,06$ ,  $p < 0,05$ ) po 60 minutowej inkubacji podocytów z insuliną (Ryc. 14A i B). Po 3 dniach inkubacji, poziom obu form LC3 zmniejszył się, aczkolwiek w przypadku LC3-II wciąż był większy o ok. 25% od wartości kontrolnych ( $0,39 \pm 0,03$  vs.  $0,49 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ), podczas gdy ilość LC3-I była porównywalna do wartości kontrolnych ( $0,46 \pm 0,05$  vs.  $0,48 \pm 0,05$ ). Po 5 dniach inkubacji, poziomy LC3-I i LC3-II były porównywalne do wartości uzyskanych w warunkach kontrolnych (odpowiednio:  $0,46 \pm 0,05$  vs.  $0,46 \pm 0,06$  i  $0,39 \pm 0,03$  vs.  $0,38 \pm 0,04$ ) (Ryc. 14A i B).

W kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ insuliny na ilość kompleksów białkowych Atg5-Atg12, które wraz z LC3 biorą udział w procesie dojrzewania autofagosomów. Wykazano, że insulina po 3 dniach inkubacji powoduje statystycznie znaczne zwiększenie ilości kompleksów Atg5-Atg12 o ok. 17% ( $0,46 \pm 0,02$  vs.  $0,54 \pm 0,06$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 14C i D). W pozostałych badanych punktach czasowych, tj. 60. minuta i po 5 dniach, obserwowano również przyrost ilości kompleksów (odpowiednio o 10% i 17%), aczkolwiek zmiany te nie były statystycznie znaczne (Ryc. 14C i D).

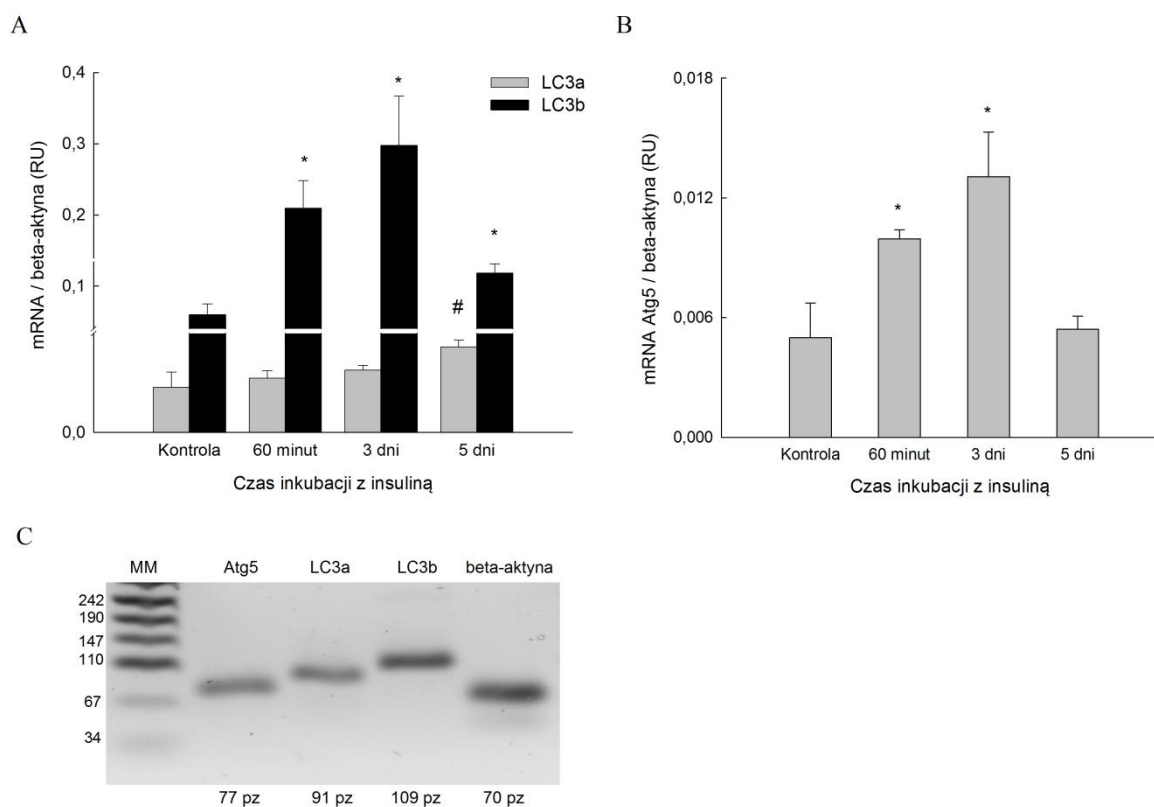


**Ryc. 14.** Wpływ insuliny (300 nM) na poziom białka LC3 i ilość kompleksów Atg5-Atg12 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: stosunek LC3-I oraz LC3-II do aktyny (# $p < 0,05$  vs. LC3-I Kontrola, \* $p < 0,05$  vs. LC3-II Kontrola). Panel B: obraz reprezentatywnych immunoblotów (LC3 i aktyna). Panel C: stosunek Atg5-Atg12 do aktyny (\* $p < 0,05$  vs. Atg5-Atg12 Kontrola). Panel D: obraz reprezentatywnych immunoblotów (Atg5-Atg12 i aktyna). Wyniki ilościowe przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM,  $n = 4-9$ . Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny. RU – jednostki względne.

Ze względu na fakt występowania genu LC3 w trzech wariantach (*LC3a*, *LC3b*, *LC3c*), kodujących LC3A, LC3B oraz LC3C, z których białka LC3A i LC3B są wspólnie rozpoznawane przez przeciwciała używane w prowadzonych badaniach, kolejne doświadczenia wykonano z zastosowaniem metody PCR w czasie rzeczywistym w celu oceny wpływu insuliny na poziom ekspresji mRNA *LC3a* oraz *LC3b*. Stwierdzono, że w podocytach ekspresja mRNA *LC3b* jest ponad 10-krotnie większa, niż mRNA *LC3a* (Ryc. 15A i C). Insulina zwiększała ekspresję mRNA *LC3b*; statystycznie znamienne przyrost mRNA *LC3b* stwierdzono w 60. minucie ( $0,059 \pm 0,015$  vs.  $0,209 \pm 0,039$ ,  $p < 0,05$ ), natomiast efekt był maksymalny po 3 dniach

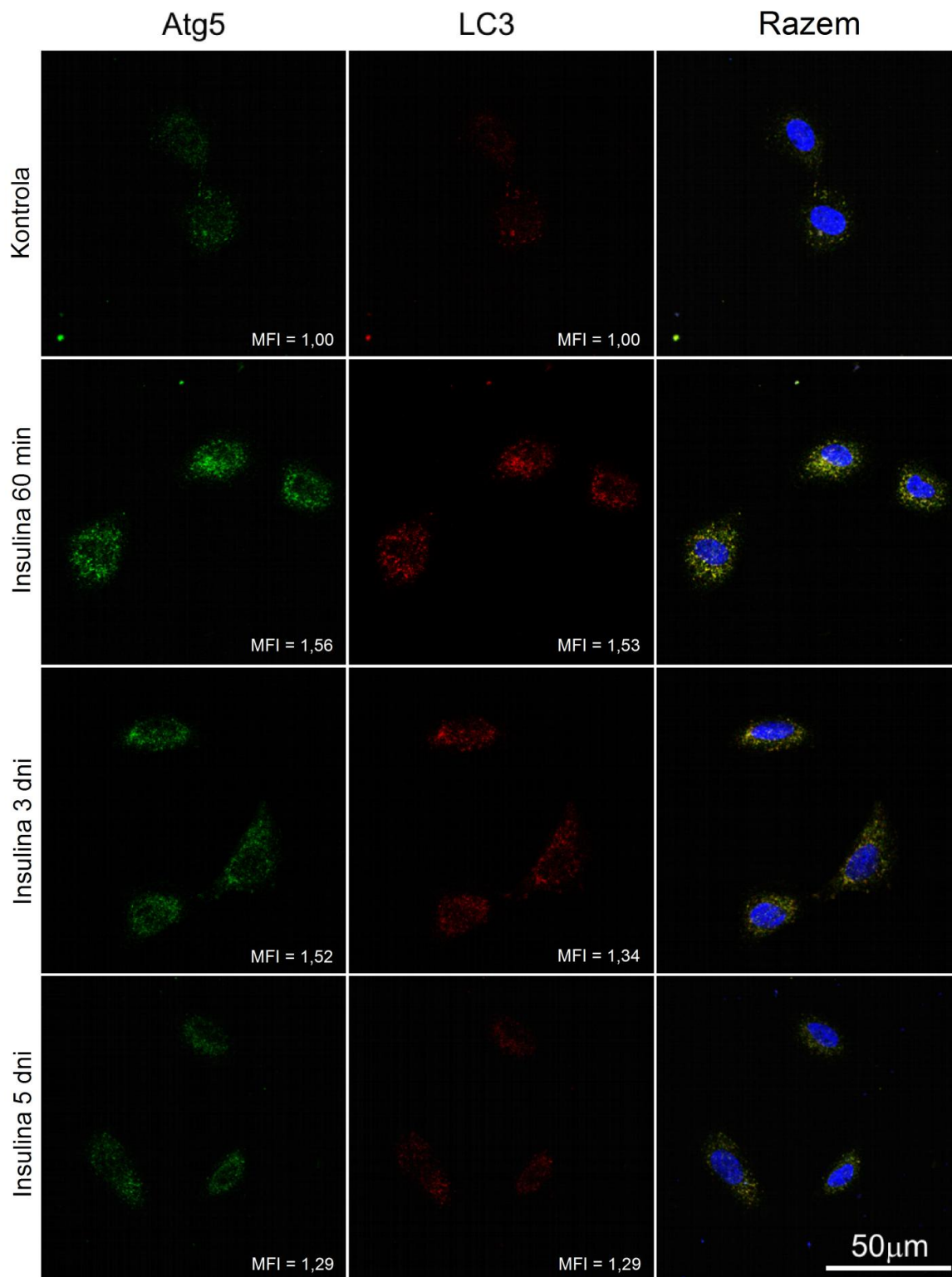
inkubacji – przyrost mRNA *LC3b* był ponad 5-krotny ( $0,059 \pm 0,015$  vs.  $0,297 \pm 0,07$ ,  $p < 0,05$ ). Po 5 dniach inkubacji poziom ekspresji mRNA *LC3b* uległ zmniejszeniu w stosunku do wcześniejszych punktów czasowych, ale nadal był większy od wartości kontrolnych ( $0,059 \pm 0,015$  vs.  $0,118 \pm 0,013$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 15A). Ponadto stwierdzono, że insulina po 5 dniach inkubacji powodowała wzrost o 90% ekspresji mRNA *LC3a* ( $0,009 \pm 0,003$  vs.  $0,017 \pm 0,001$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 15A).

Stymulujący wpływ insuliny zaobserwowano również na poziom ekspresji mRNA *Atg5*, który zwiększył się dwukrotnie po 60 minutach inkubacji z insuliną ( $0,0049 \pm 0,001$  vs.  $0,0099 \pm 0,0004$ ,  $p < 0,05$ ), a po 3 dniach był o ok. 2,5-krotnie większy od wartości kontrolnych ( $0,005 \pm 0,001$  vs.  $0,013 \pm 0,002$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 15B i C). Po 5 dniach poziom ekspresji mRNA *Atg5* uległ zmniejszeniu i nie różnił się od wartości kontrolnych (Ryc. 15B).



**Ryc. 15.** Wpływ insuliny (300 nM) na ekspresję mRNA *LC3a*, *LC3b* i *Atg5* w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: poziom mRNA *LC3a* i *LC3b* w stosunku do mRNA beta-aktyny (# $p < 0,05$  vs. Kontrola *LC3a*, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola *LC3b*). Panel B: poziom mRNA *Atg5* w stosunku do mRNA beta-aktyny (\* $p < 0,05$  vs. Kontrola). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM,  $n = 6-12$ . Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny. Panel C: obraz reprezentatywnego żelu agarozowego po rozdziale elektroforetycznym produktów PCR odpowiadających fragmentom mRNA poszczególnych genów: *Atg5* (77 pz), *LC3a* (91 pz), *LC3b* (109 pz) i beta-aktyny (70 pz). MM – marker masowy, RU – jednostki względne.

W celu potwierdzenia wpływu insuliny na poziom białek LC3 i Atg5, przeprowadzono podwójne barwienie immunofluorescencyjne podocytów hodowanych w obecności insuliny (300 nM) (Ryc. 16). Na zdjęciach podocytów z immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej widoczne są ziarnistości wewnątrzkomórkowe wyraźnie odróżniające się od tła, odpowiadające skupiskom białek LC3 i Atg5, najprawdopodobniej umiejscowionych w strukturach autofagalnych tj. autofagosomach i/lub autofagolizosomach. Po 60 minutach inkubacji podocytów z insuliną zaobserwowano więcej ziarnistości zawierających białko Atg5 (kolor zielony) oraz LC3 (kolor czerwony) w porównaniu do podocytów hodowanych warunkach kontrolnych (bez egzogennej insuliny); wartości średniej intensywności fluorescencji (MFI) zwiększyły się o ponad 50% dla obu białek ( $MFI_{Atg5} = 156\%$ ,  $MFI_{LC3} = 153\%$ ). Efekt działania insuliny po 3 i 5 dniach inkubacji ulegał osłabieniu, jednak wciąż sygnał fluorescencyjny pochodzący od wybarwionych ziarnistości był większy od sygnału fluorescencyjnego uzyskanego w warunkach kontrolnych: wartości MFI dla Atg5 i LC3 wynosiły 129% kontroli (Ryc. 16). Powyższe obserwacje potwierdziły uzyskane uprzednio wyniki półilościowych analiz (mRNA i białko) dotyczących zmian ilości LC3 i Atg5 pod wpływem działania insuliny (Ryc. 14 i 15).

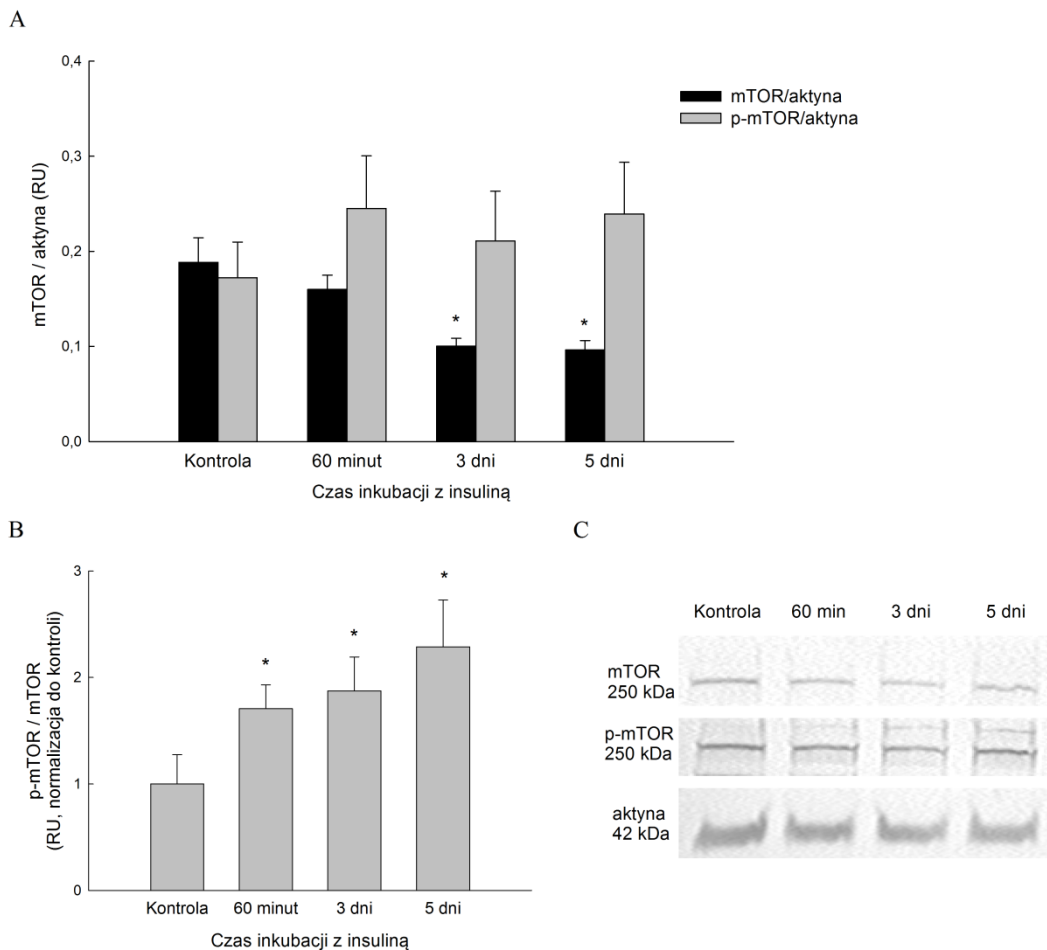


**Ryc. 16.** Wpływ insuliny na ilość i rozmieszczenie białek Atg5 i LC3 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Obrazy z immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia białek Atg5 (kolor zielony) i LC3 (kolor czerwony) w podocytach po inkubacji z insuliną (300 nM; 60 min, 3 i 5 dni). Jądra komórkowe wybarwione DAPI (kolor niebieski). MFI – średnia intensywność fluorescencji (normalizowana do kontroli). Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny.



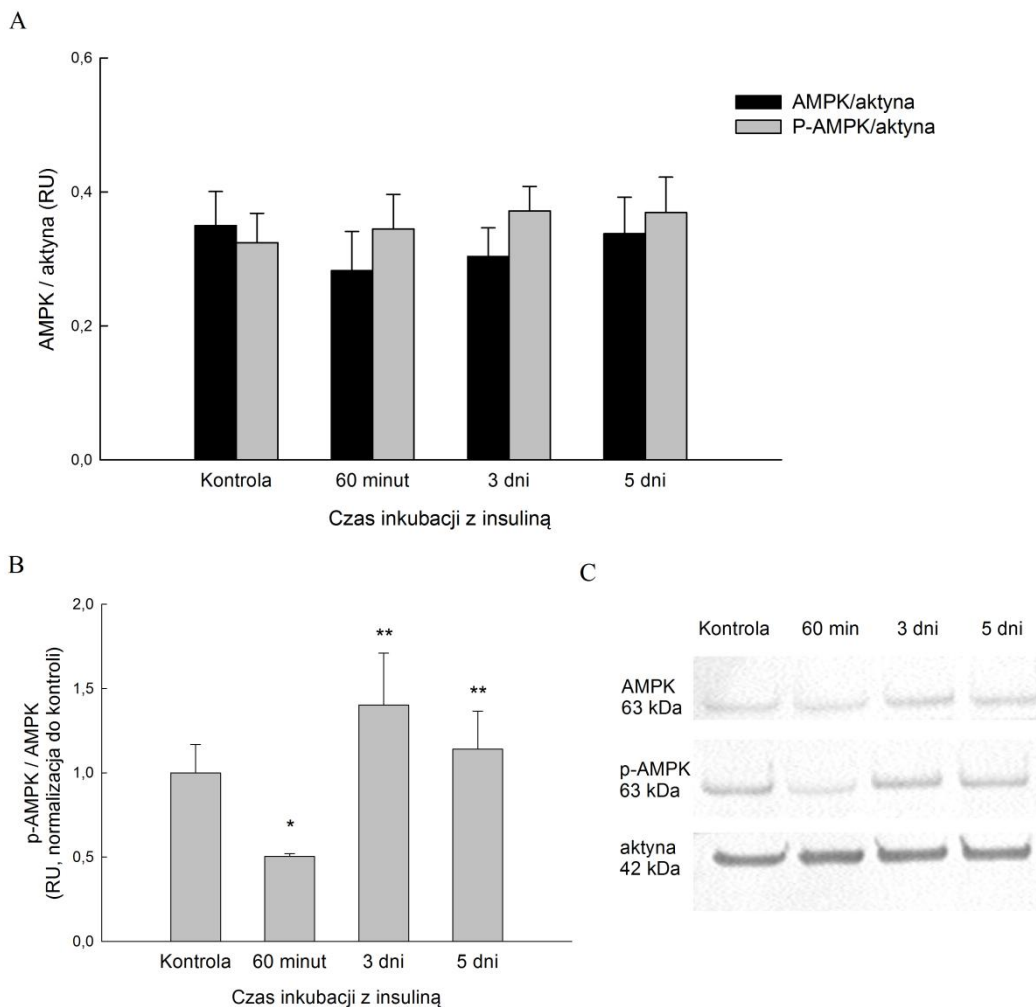
W kolejnych doświadczeniach zbadano efekt działania insuliny na poziom białek zaangażowanych w regulację procesu autofagii na etapie inicjacji i elongacji błon autofagosomalnych.

Początkowy etap autofagii (inicjacja) jest regulowany przez białka o aktywności kinaz, między innymi, przez kinazy mTOR, AMPK oraz ULK1. Stwierdzono zmniejszenie ilości białka mTOR po 3 i 5 dniach inkubacji podocytów z insuliną, odpowiednio o 47% ( $0,19 \pm 0,03$  vs.  $0,10 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ) i 49% ( $0,19 \pm 0,03$  vs.  $0,096 \pm 0,01$ ,  $p < 0,05$ ). Ilość białka mTOR fosforylowanego w pozycji Ser<sup>2448</sup> (p-mTOR Ser<sup>2448</sup>) wyrażona w stosunku do aktyny była porównywalna do wartości kontrolnych (Ryc. 17A i C), natomiast wyrażona w stosunku do całkowitej ilości białka mTOR była większa o ok. 1,8 razy w 60. minucie i po 3 dniach oraz ponad 2-krotnie po 5 dniach inkubacji z insuliną ( $p < 0,05$ ) (Ryc. 17B).



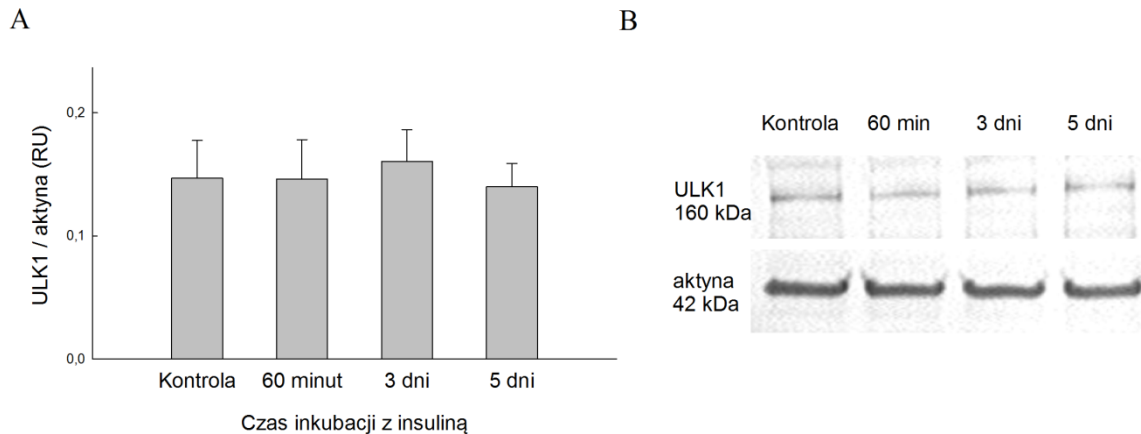
**Ryc. 17.** Wpływ insuliny (300 nM) na ilość mTOR i p-mTOR Ser<sup>2448</sup> w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: stosunek mTOR oraz p-mTOR Ser<sup>2448</sup> do aktyny (\* $p < 0,05$  vs. Kontrola mTOR). Panel B: stosunek p-mTOR Ser<sup>2448</sup> do mTOR (wartości normalizowane do kontroli, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ). Panel C: obraz reprezentatywnych immunoblotów. Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny. RU – jednostki względne.

W przypadku białka AMPK, nie stwierdzono wpływu insuliny na całkowitą ilość AMPK, jak również na ilość AMPK fosforylowanego w pozycji Thr<sup>172</sup> (p-AMPK Thr<sup>172</sup>) w stosunku do aktyny (Ryc. 18A i C). Natomiast efekt insuliny wyrażony jako ilość p-AMPK Thr<sup>172</sup> w odniesieniu do całkowitej ilości AMPK był statystycznie znamienny i miał charakter zmienny w czasie. Zaobserwowano zmniejszenie o ok. 50% ilości p-AMPK Thr<sup>172</sup>/AMPK po 60 minutach inkubacji podocytów z insuliną ( $p < 0,05$ ), natomiast po 3 dniach ilość p-AMPK Thr<sup>172</sup>/AMPK uległa zwiększeniu i stanowiła ok. 140% wartości kontrolnej, aby po 5 dniach inkubacji ulec zmniejszeniu do wartości porównywalnej do wartości kontrolnych (Ryc. 18B).



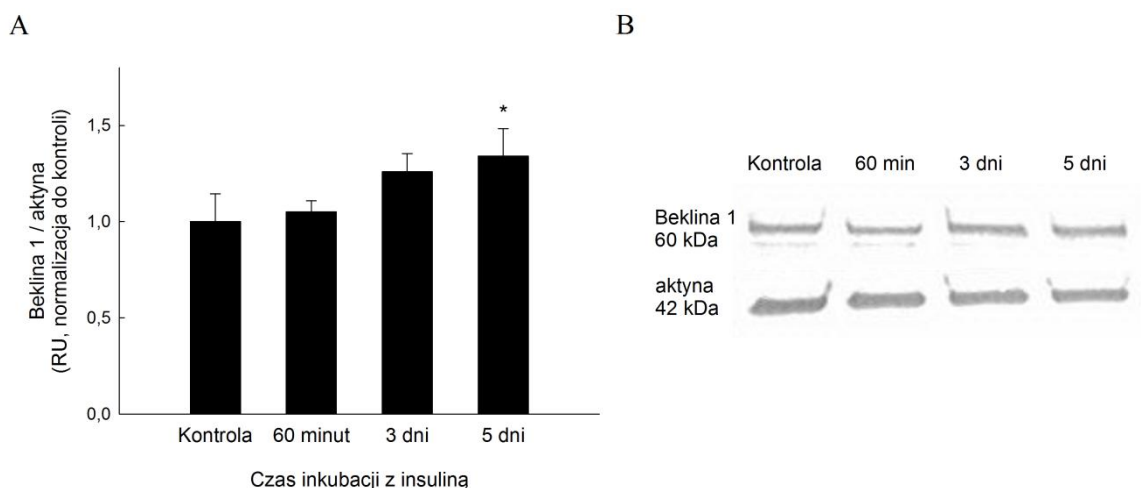
**Ryc. 18.** Wpływ insuliny (300 nM) na ilość AMPK i p-AMPK Thr<sup>172</sup> w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: stosunek AMPK i p-AMPK Thr<sup>172</sup> do aktyny. Panel B: stosunek p-AMPK Thr<sup>172</sup> do AMPK (wartości normalizowane do kontroli, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola, \*\* $p < 0,05$  vs. 60 minut). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM ( $n = 4$ ). Panel C: obraz reprezentatywnych immunoblotów. Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny. RU – jednostki względne.

Nie stwierdzono wpływu insuliny na poziom białka ULK1 (Ryc. 19A i B).

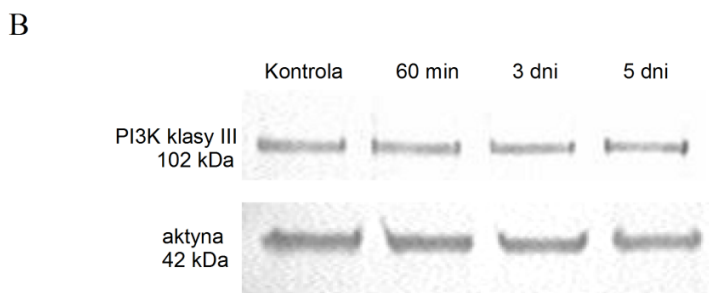
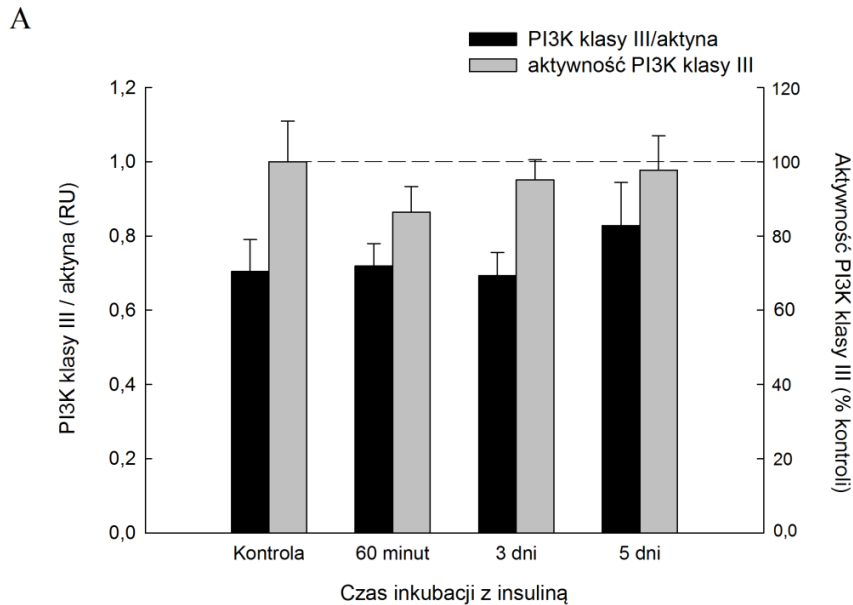


**Ryc. 19.** Wpływ insuliny (300 nM) na ilość ULK1 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: stosunek ULK1 do aktyny. Panel B: obraz reprezentatywnych immunoblotów. Wyniki ilościowe przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM,  $n = 12$ . Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny. RU – jednostki względne.

W proces wydłużania błony autofagosomalnej (etap elongacji) zaangażowane są, między innymi, takie białka, jak beklina 1 oraz kinaza 3-fosfatydyloinozytolu (PI3K) klasy III. Stwierdzono, że insulina zwiększa poziom bekliny 1 w podocytach, której ilość po 3 i 5 dniach inkubacji zwiększyła się odpowiednio o 26% i 34%,  $p < 0,05$  (Ryc. 20A i B). Natomiast nie stwierdzono wpływu insuliny na ilość białka PI3K klasy III (Ryc. 21A i B) oraz na jego aktywność enzymatyczną (Ryc. 21A).



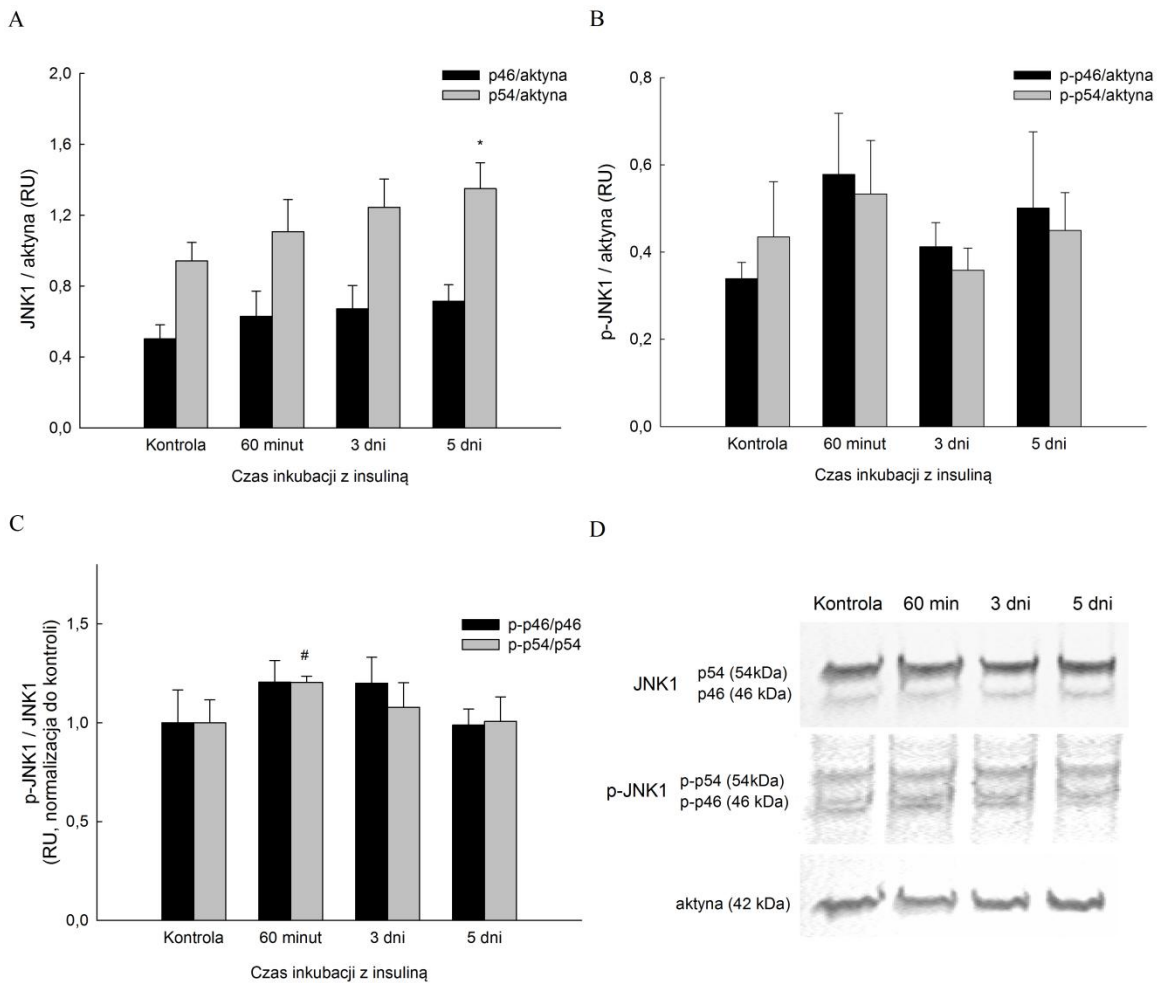
**Ryc. 20.** Wpływ insuliny (300 nM) na poziom bekliny 1 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: stosunek bekliny 1 do aktyny (wartości normalizowane do kontroli, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola). Panel B: obraz reprezentatywnych immunoblotów. Wyniki ilościowe przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM,  $n = 10$ . Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny.



**Ryc. 21.** Wpływ insuliny (300 nM) na ilość białka i aktywność kinazy PI3K klasy III w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: stosunek ilości kinazy PI3K klasy III do aktyny (czarne słupki) oraz aktywność PI3K klasy III (szare słupki, wartości normalizowane do kontroli). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM (n = 7-8). Panel B: obraz reprezentatywnych immunoblotów. Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny. RU – jednostki względne.

W dalszej kolejności zbadano wpływ insuliny na poziom białka JNK1 – pozytywnego regulatora aktywności bekliny 1. Stwierdzono obecność dwóch izoform białkowych JNK1 – p46 i p54, które powstają w wyniku alternatywnego składania mRNA JNK1. Zaobserwowano zwiększoną o 43% ( $0,94 \pm 0,1$  vs.  $1,35 \pm 0,15$ ,  $p < 0,05$ ) ilość izoformy p54 JNK1 po 5 dniach inkubacji podocytów w obecności insuliny (Ryc. 22A i D). Poziom izoformy p46 JNK1 zwiększał się wraz z czasem inkubacji podocytów z insuliną (o 26% – 60 min, 34% – 3 dni i 42% – 5 dni w odniesieniu do wartości kontrolnych), jednak wzrost ten nie był statystycznie znamienny (Ryc. 22A), podobnie jak ilość fosforylowanych izoform p46 i p54 JNK1 (Thr<sup>183</sup> i Tyr<sup>185</sup>) wyrażona w stosunku do ilości aktyny (Ryc. 22B i D). Stwierdzono natomiast znamienny wpływ

insuliny na ilość fosforylowanej izoformy p54 JNK1 wyrażonej w odniesieniu do całkowitej ilości p54 JNK1 po 60 minutach inkubacji podocytów z insuliną (wzrost o 20%,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 22C).



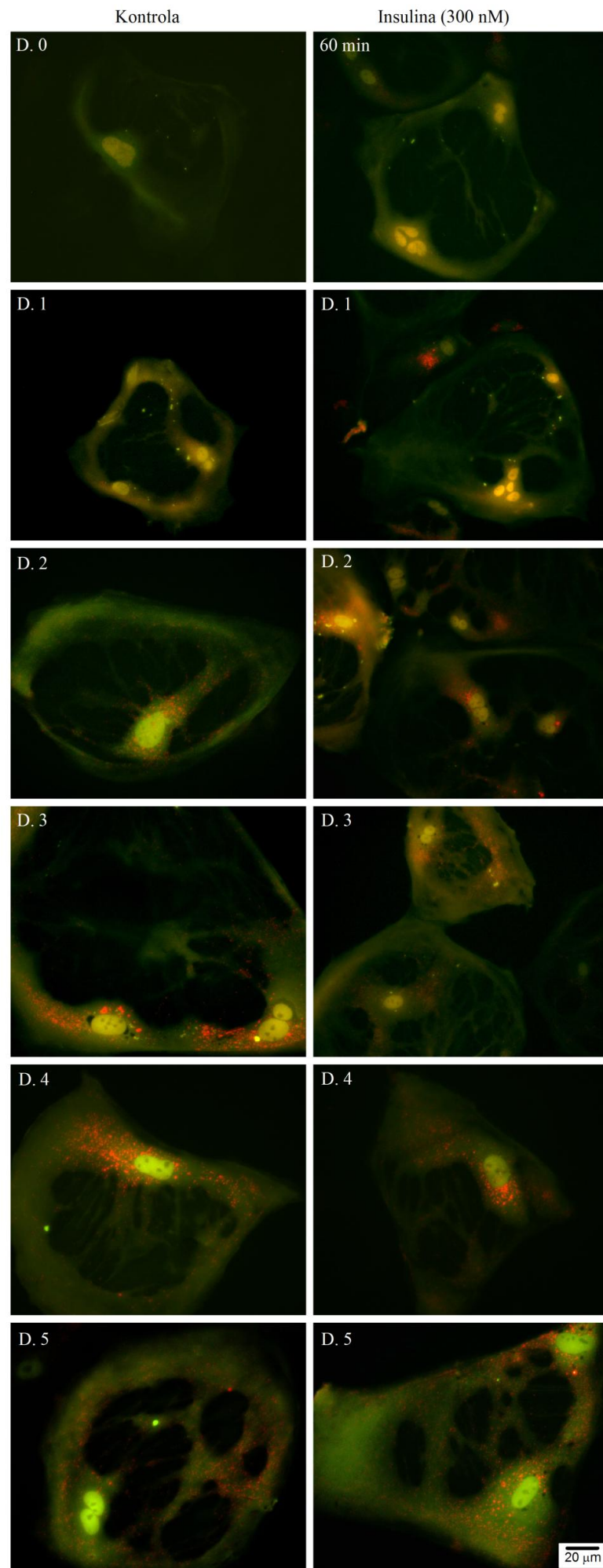
**Ryc. 22.** Wpływ insuliny (300 nM) na ilość izoform p46 i p54 JNK1 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: stosunek ilości p46 i p54 JNK1 do aktyny (\* $p < 0,05$  vs. Kontrola p54 JNK1). Panel B: stosunek ilości p-p46 i p-p54 JNK1 (p-Thr<sup>183</sup> i p-Tyr<sup>185</sup>) do aktyny. Panel C: stosunek p-JNK1 do JNK1 (wartości normalizowane do kontroli, # $p < 0,05$  vs. Kontrola p-p54/p54 JNK1). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM,  $n = 6-7$ . Panel D: obraz reprezentatywnych immunoblotów. Kontrola – podocyty hodowane 5 dni bez egzogennej insuliny. RU – jednostki względne.

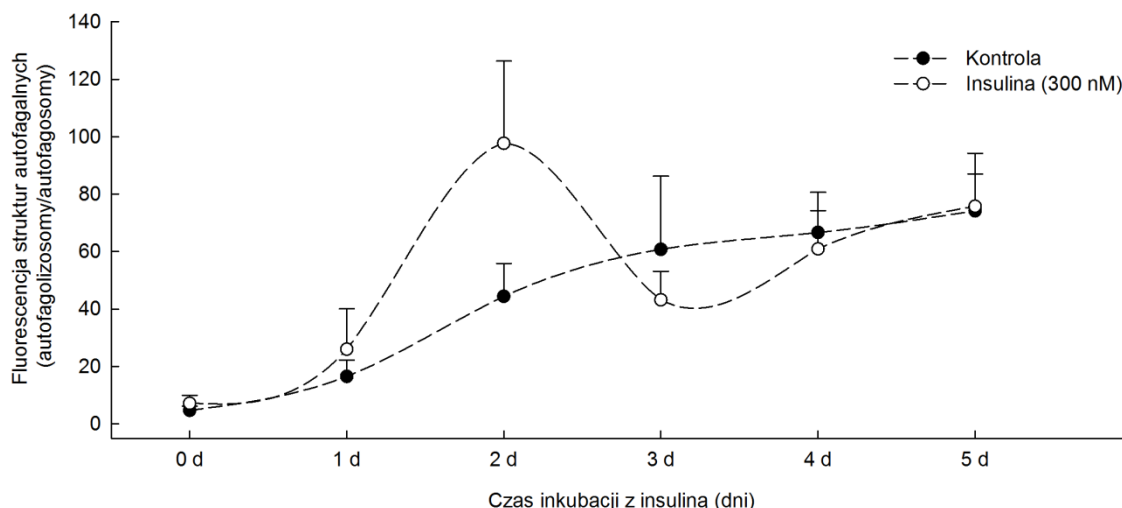
### 5.2.3 Wpływ insuliny na tworzenie struktur autofagalnych w żywych podocytach

Przeprowadzono nukleofekcję podocytów przy użyciu plazmidu kodującego gen LC3 oraz dwa geny znacznikowe dla białek zielonej i czerwonej fluorescencji (GFP i RFP). Wydajność nukleofekcji nie przekraczała 10%. Podocyty eksprymujące egzogenne białko charakteryzowały się zmianami morfologicznymi polegającymi na „zlewaniu” się ze sobą komórek, tworzeniu dużych obszarów pokrytych cytoplazmą lub gęstą siecią wypustek cytoplazmatycznych (Ryc. 23A). W takich grupach podocytów obserwowano zazwyczaj od dwóch do pięciu jąder komórkowych.

W trakcie inkubacji podocytów w obecności 300 nM insuliny codziennie przez 5 dni wykonywano zdjęcia w mikroskopii fluorescencyjnej dla długości widma fali świetlnej odpowiadającej kolorowi zielonemu i czerwonemu. Zaobserwowano, że zarówno w podocytach hodowanych w obecności insuliny, jak i hodowanych w warunkach kontrolnych (bez egzogennej insuliny), wielkość sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z autofagolizosomów (kolor czerwony) w stosunku do wielkości sygnału pochodzącego z autofagosomów (kolor żółty) zwiększała się wraz z czasem hodowli, jednakże w komórkach stymulowanych insuliną wartość stosunku analizowanych sygnałów fluorescencyjnych była znacznie wyższa w początkowych punktach czasowych doświadczenia i była maksymalna po dwóch dniach inkubacji, przewyższając wartość kontrolną o ok. 2,2-krotnie (Ryc. 23B). Od trzeciego dnia inkubacji obserwowano zmniejszenie wartości badanych stosunków sygnałów fluorescencyjnych, które były porównywalne do wartości kontrolnych (Ryc. 23B).

A



**B**

**Ryc. 23.** Wpływ insuliny na ilość i wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie egzogenego białka GFP-RFP-LC3 oraz profil fluorescencyjny autofagosomów i autofagolizosomów w żywych podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: reprezentatywne zdjęcia podocytów po nukleofekcji powstałe poprzez nałożenie na siebie zdjęć wykonanych dla widma zielonego (białko GFP) i czerwonego (białko RFP). Lewa kolumna: warunki kontrolne – dzień (D) 0, 1, 2, 3, 4 i 5, prawa kolumna: po inkubacji podocytów z insuliną (300 nM) – 60 minut, dzień (D) 1, 2, 3, 4 i 5. Panel B: zmiany wielkości sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z autofagolizosomów w stosunku do wielkości sygnału pochodzącego z autofagosomów pod wpływem insuliny. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM,  $n = 15-30$  zdjęć z dwóch niezależnych hodowli podocytów. Kontrola – podocyty hodowane bez egzogennej insuliny.

### 5.3 Udział reaktywnych form tlenu w regulacji autofagii przez insulinę

#### 5.3.1 Wpływ apocyniny na stymulowany insuliną poziom białek autofagalnych

W celu zbadania kwestii, czy wpływ insuliny na poziom białek autofagalnych jest zależny od reaktywnych form tlenu (ROS), podocyty eksponowano na insulinę, a następnie na apocyninę (2h, 100  $\mu$ M), inhibitor oksydazy NAD(P)H – enzymu będącego głównym źródłem ROS w podocytach.

Stwierdzono, że apocynina znosi efekt działania insuliny w zakresie ilości białek LC3, Atg5-Atg12, AMPK, mTOR, bekliny1 i JNK1 (Tabela 6).



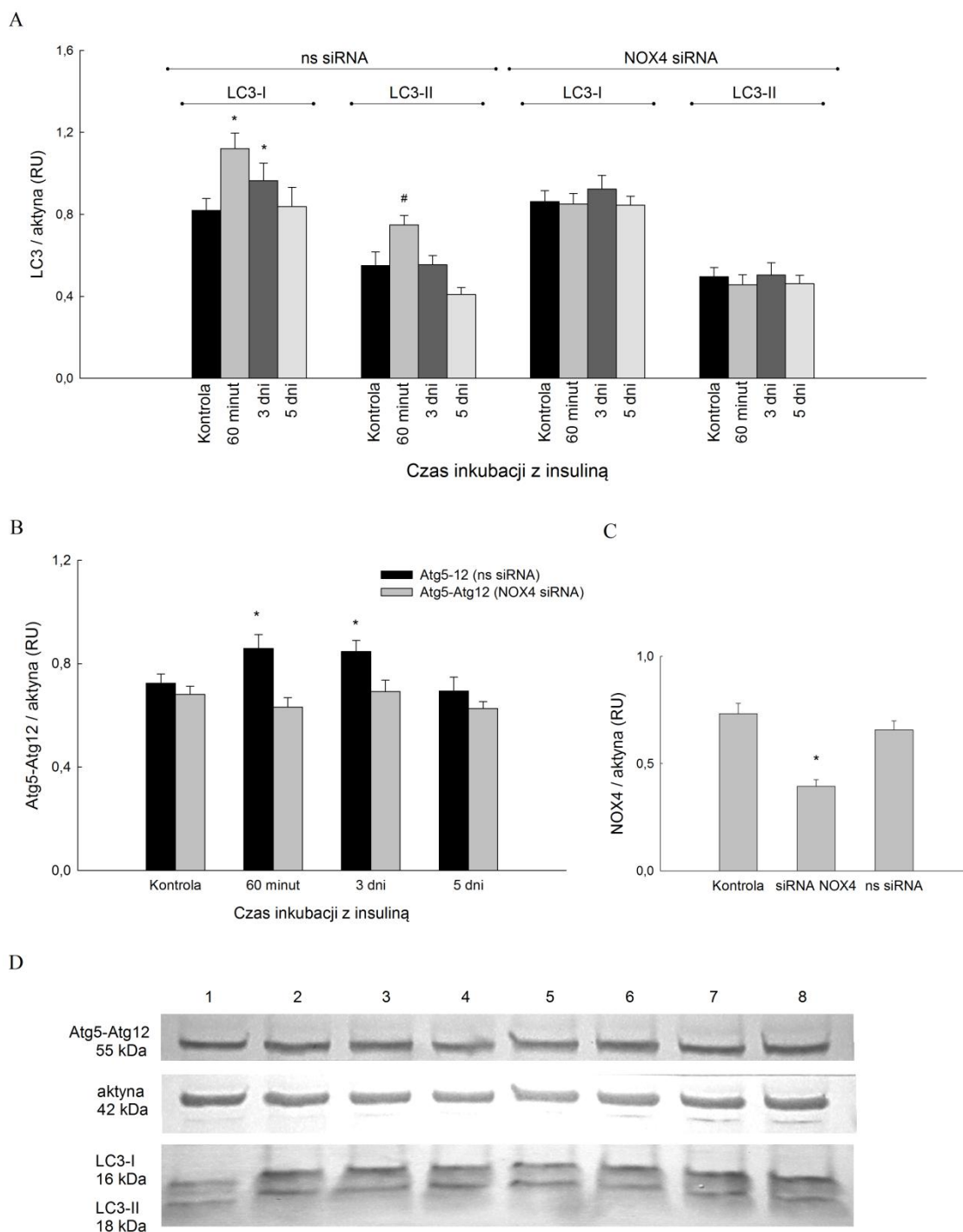
**Tabela 6.** Efekt działania insuliny na poziom białek autofagalnych w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej w obecności apocyniny

	INS 60 minut		INS 3 dni		INS 5 dni	
	- APO	+ APO	- APO	+ APO	- APO	+ APO
LC3-I / aktyna	1,46 ± 0,11*	0,95 ± 0,04	1,26 ± 0,11*	0,82 ± 0,08	1,16 ± 0,11	0,84 ± 0,11
LC3-II / aktyna	1,58 ± 0,11*	0,84 ± 0,09	1,19 ± 0,09*	0,81 ± 0,13	1,00 ± 0,10	0,83 ± 0,16
Atg5-Atg12 / aktyna	1,09 ± 0,07	0,99 ± 0,07	1,16 ± 0,04*	0,99 ± 0,03	1,16 ± 0,04*	1,02 ± 0,08
p-AMPK / AMPK	0,50 ± 0,14*	0,88 ± 0,18	1,27 ± 0,11**	0,63 ± 0,09	1,04 ± 0,08**	0,82 ± 0,24
Beklina 1 / aktyna	1,05 ± 0,06	0,77 ± 0,03	1,26 ± 0,09	1,09 ± 0,16	1,34 ± 0,14*	0,90 ± 0,07
p-mTOR / mTOR	1,71 ± 0,22*	1,19 ± 0,09	1,87 ± 0,32*	0,74 ± 0,06	2,29 ± 0,44*	0,81 ± 0,12
p-p46 / p46 (JNK1)	1,21 ± 0,11	1,02 ± 0,09	1,20 ± 0,13	1,11 ± 0,19	0,99 ± 0,08	1,12 ± 0,27
p-p54 / p54 (JNK1)	1,20 ± 0,03*	0,90 ± 0,09	1,08 ± 0,12	1,03 ± 0,13	1,01 ± 0,12	1,10 ± 0,16

Podocyty inkubowano z insuliną (300 nM) przez 60 minut, 3 dni lub 5 dni (kontrola: -APO) oraz 2 godziny przed końcem doświadczenia z apocyniną (100 µM) (próby badane: +APO). Analizie poddano ilość LC3-I, LC3-II, Atg5-Atg12 i bekliny 1 w stosunku do aktyny, oraz p-AMPK Thr<sup>172</sup> w stosunku do AMPK, p-mTOR Ser<sup>2448</sup> do mTOR, p-JNK1 (p-p46 i p-p54, Thr<sup>183</sup>/Tyr<sup>185</sup>) do JNK1 (p46 i p54). Wyniki zostały normalizowane do kontroli -APO lub +APO bez insuliny przyjętych jako 1; \*p<0,05 vs. Kontrola -APO, \*\*p<0,05 vs. INS 60 minut -APO, n = 4-10.

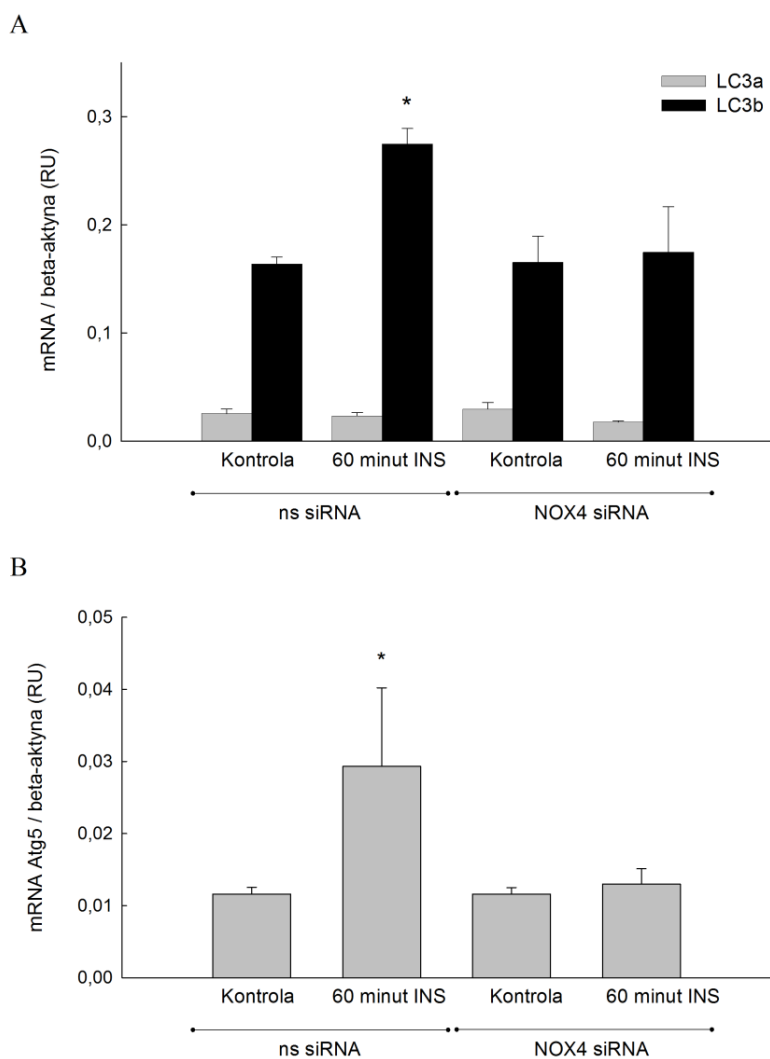
### 5.3.2 Wpływ insuliny na ilość białek autofagalnych po wyciszeniu NOX4 (siRNA NOX4)

W celu potwierdzenia udziału ROS w regulacji autofagii przez insulinę, przeprowadzono kolejne doświadczenia, w przebiegu których wyciszono ekspresję mRNA NOX4 (katalitycznej podjednostki oksydazy NAD(P)H), metodą transfekcji podocytów z użyciem specyficznych, małych cząstek interferującego RNA (siRNA), po czym komórki inkubowano z insuliną (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni). Stwierdzono, że wyciszenie podjednostki NOX4, powodujące zmniejszenie ilości białka NOX4 o ok. 46%,  $p < 0,05$  (Ryc. 24D), znosi stymulujący wpływ insuliny na poziom LC3-I (60 min, 3 dni) oraz LC3-II (60 min) (Ryc. 24A i C). Podobny efekt siRNA NOX4 stwierdzono w przypadku kompleksów Atg5-Atg12, których ilość po wyciszeniu NOX4 i inkubacji z insuliną nie ulegała zwiększeniu, podczas gdy w podocytach transfekowanych kontrolnym siRNA (ns siRNA) insulina powodowała zwiększenie ilości kompleksów Atg5-Atg12 o ok. 18% po 60 minutach ( $0,73 \pm 0,04$  vs.  $0,86 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ ) i o ok. 16% po 3 dniach inkubacji ( $0,73 \pm 0,04$  vs.  $0,85 \pm 0,04$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 24B i C).



**Ryc. 24.** Udział podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H w działaniu insuliny na poziom białka LC3 i Atg5-Agt12 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Podocyty transfekowano NOX4 siRNA lub kontrolnym siRNA (ns siRNA), a następnie inkubowano w obecności insuliny (300 nM; 60 min, 3 i 5 dni). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM. Panel A: ilość LC3-I i LC3-II w odniesieniu do aktyny, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola LC3-I ns siRNA; # $p < 0,05$  vs. Kontrola LC3-II ns siRNA,  $n = 12$ . Panel B: ilość kompleksów Atg5-Atg12 w stosunku do aktyny, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola ns siRNA,  $n = 8$ . Panel C: obraz reprezentatywnych immunoblotów: ścieżki 1-4 – ns siRNA: Kontrola (1), 60 minut (2), 3 dni (3), 5 dni (4); ścieżki 5-8 – NOX4 siRNA: Kontrola (5), 60 minut (6), 3 dni (7), 5 dni (8). Panel D: ilość białka NOX4 po transfekcji siRNA NOX4 oraz ns siRNA. RU – jednostki względne.

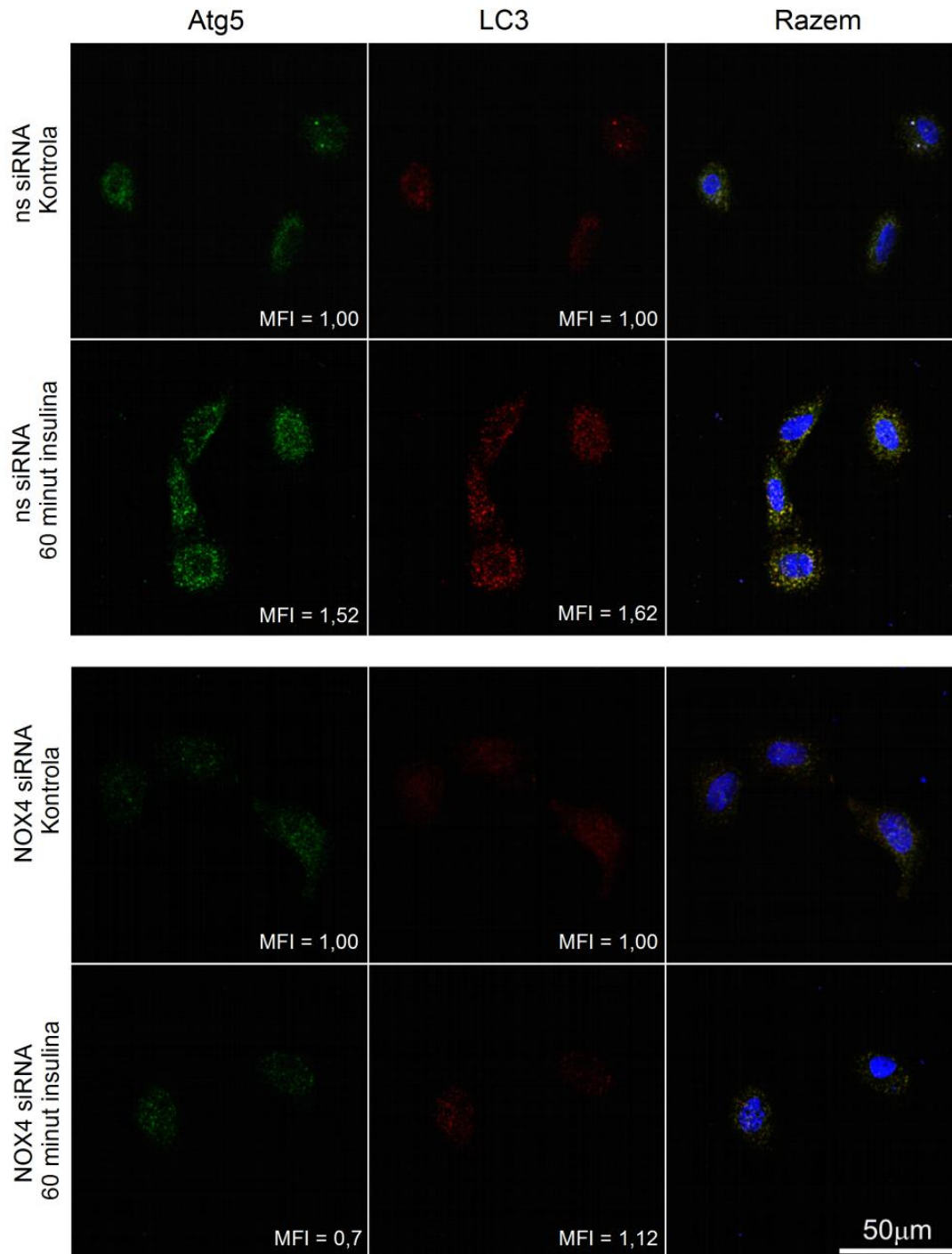
Ze względu na fakt, iż największy efekt działania insuliny na poziom białek LC3-I, LC3-II i ilość kompleksów Atg5-Atg12 obserwowano po 60 minutach inkubacji, w kolejnym etapie zbadano wpływ insuliny na poziom ekspresji mRNA *LC3a*, *LC3b* i *Atg5* po wyciszeniu ekspresji NOX4 i godzinnej stymulacji insuliną. W podocytach po transfekcji siRNA NOX4 insulina nie powodowała zmian w ekspresji mRNA *LC3b* ( $0,17 \pm 0,02$  vs.  $0,18 \pm 0,04$ ) (Ryc. 25A) oraz mRNA *Atg5* ( $0,012 \pm 0,001$  vs.  $0,013 \pm 0,002$ ) (Ryc. 25B). Natomiast w podocytach kontrolnych, tj. transfekowanych z użyciem kontrolnego siRNA, po godzinnej inkubacji z insuliną stwierdzono zwiększony o ok. 70% poziom ekspresji mRNA *LC3b* ( $0,16 \pm 0,01$  vs.  $0,27 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ). Podobne obserwacje poczyniono dla ekspresji mRNA *Atg5*. Wyciszenie NOX4 zapobiegało stymulującemu wpływowi insuliny (60 min) na ekspresję mRNA *Atg5*, podczas gdy w podocytach transfekowanych kontrolnym siRNA insulina powodowała 2,5-krotne zwiększenie poziomu mRNA *Atg5* ( $0,012 \pm 0,001$  vs.  $0,029 \pm 0,010$ ,  $p < 0,05$ ). Nie stwierdzono statystycznie znamienego wpływu insuliny na poziom ekspresji mRNA *LC3a* w podocytach czy to z wyciszonym NOX4, czy też po transfekcji kontrolnym siRNA (Ryc. 25A).



**Ryc. 25.** Udział podjednostki NOX4 oksydazy NAD(P)H w działaniu insuliny na ekspresję *LC3a*, *LC3b* oraz *Atg5* na poziomie mRNA w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Podocyty transfekowano NOX4 siRNA lub kontrolnym siRNA (ns siRNA), a następnie inkubowano w obecności insuliny (300 nM; 60 min). Panel A: ekspresja mRNA *LC3a* i *LC3b* w stosunku do mRNA beta-aktyny, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola *LC3b* ns siRNA,  $n = 9$ . Panel B: ekspresja mRNA *Atg5* w stosunku do mRNA beta-aktyny, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola ns siRNA,  $n = 6$ . Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM. Kontrola – podocyty hodowane bez egzogennej insuliny. RU – jednostki względne.

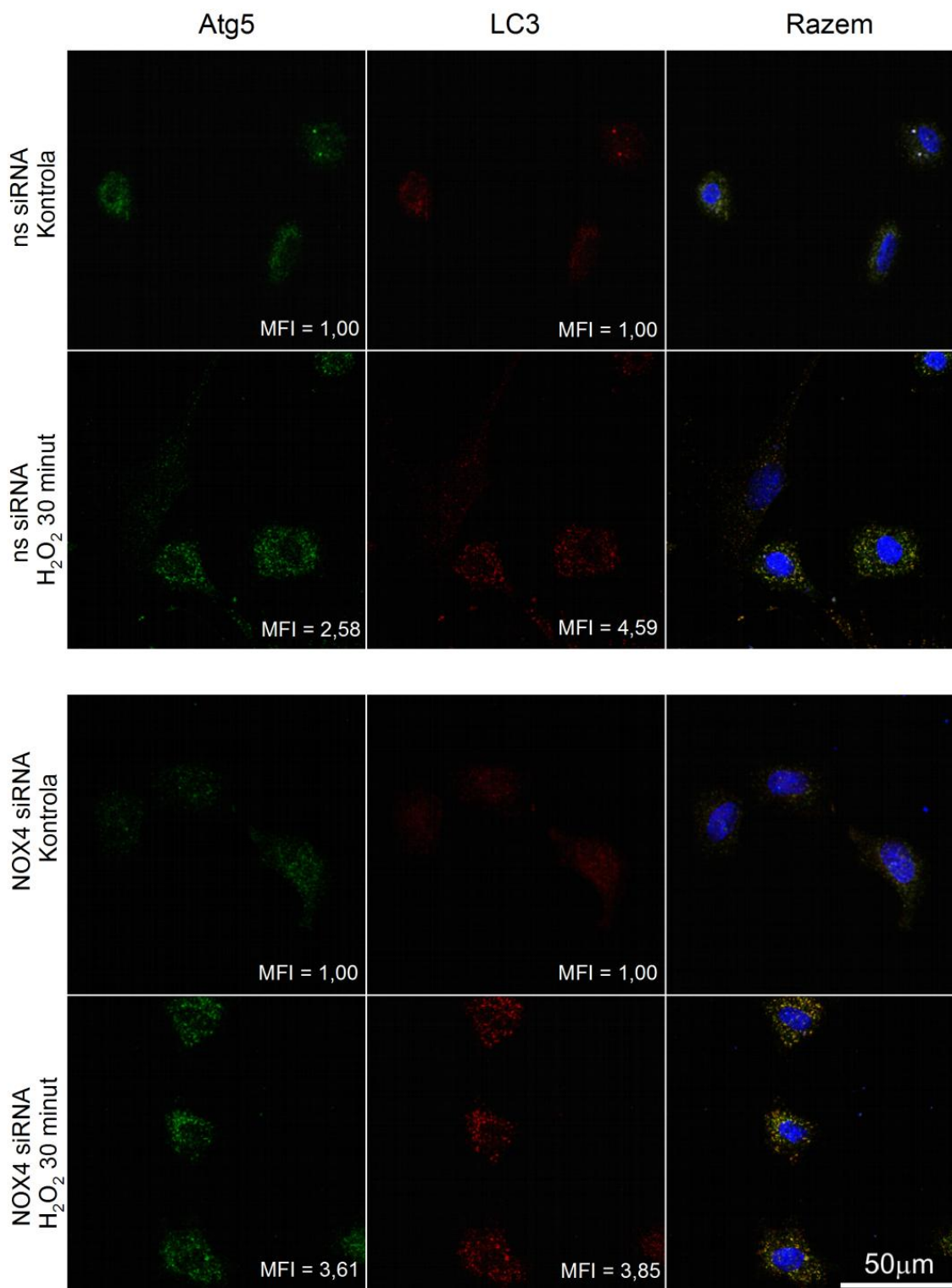
Wpływ insuliny na poziom białek LC3 i Atg5 w podocytach po wyciszeniu ekspresji NOX4 zbadano również metodą barwienia immunofluorescencyjnego komórek i ich obrazowania w mikroskopii konfokalnej (Ryc. 26). W podocytach transfekowanych ns siRNA, 60-minutowa inkubacja z insuliną powodowała zwiększenie ilości skupisk LC3 i Atg5 ( $MFI_{LC3} = 162\%$ ,  $MFI_{Atg5} = 152\%$ ). Natomiast nie stwierdzono wpływu insuliny w podocytach z wyciszoną ekspresją NOX4, gdzie wielkość sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od LC3 i Atg5 była porównywalna

( $MFI_{Atg5} = 112\%$ ) lub mniejsza ( $MFI_{LC3} = 70\%$ ) od wartości uzyskanych w warunkach kontrolnych (Ryc. 26).



**Ryc. 26.** Wpływ insuliny na ilość i rozmieszczenie białek Atg5 i LC3 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej z wyciszoną ekspresją NOX4. Obrazy z immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia białek Atg5 (kolor zielony) i LC3 (kolor czerwony) w podocytach transfekowanych NOX4 siRNA lub kontrolnym siRNA (ns siRNA) i po inkubacji z insuliną (300 nM; 60 min). Jądra komórkowe wybarwione DAPI (kolor niebieski). MFI – średnia intensywność fluorescencji (normalizowana do kontroli). Kontrola – podocyty hodowane bez egzogennej insuliny.

W celu potwierdzenia udziału ROS w aktywacji autofagii przez insulinę zastosowano chemiczny donor wolnych rodników – nadtlenek wodoru. Stosując metodę immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej stwierdzono, że egzogenny H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 μM, 30 min) powoduje zwiększenie ilości białek Atg5 i LC3 w podocytach transfekowanych siRNA NOX4, jak i kontrolnym siRNA (ns siRNA): wartości MFI uległy zwiększeniu do 258% dla Atg5 i 459% dla LC3 w komórkach transfekowanych siRNA NOX4, natomiast w komórkach transfekowanych ns siRNA wartości MFI wynosiły 361% dla Atg5 i 385% dla LC3 (Ryc. 27).



**Ryc. 27.** Wpływ egzogenego nadtlenku wodoru na ilość i rozmieszczenie białek Atg5 i LC3 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej z wyciszoną ekspresją NOX4. Obrazy z immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej wewnątrzkomórkowego rozmieszczenia białek Atg5 (kolor zielony) i LC3 (kolor czerwony) w podocytach transfekowanych siRNA NOX4 lub kontrolnym siRNA (ns siRNA) i po inkubacji z H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM, 30 minut). Jądra komórkowe wybarwione DAPI (kolor niebieski). MFI – średnia intensywność fluorescencji (normalizowana do kontroli). Kontrola – podocyty hodowane bez egzogennej insuliny.



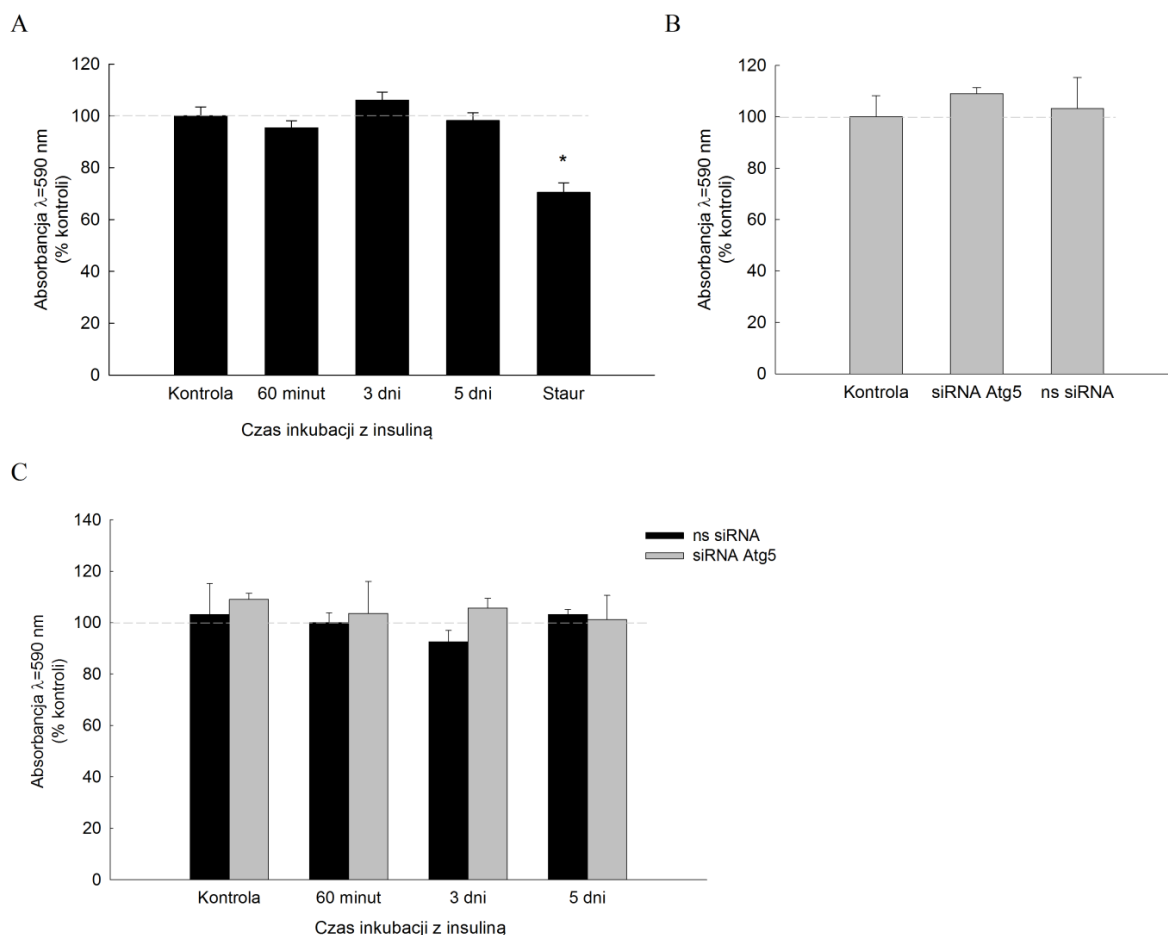
Uzyskane wyniki sugerują, iż insulina moduluje proces autofagii w pierwotnych podocytach szczurzych głównie na etapie dojrzewania i zamykania struktur autofagalnych, a regulacja autofagii przez insulinę odbywa się za pośrednictwem reaktywnych form tlenu.

## **5.4 Wpływ insuliny na żywotność podocytów**

### *5.4.1 Wpływ insuliny na żywotność podocytów po transfekcji siRNA Atg5*

Żywotność podocytów oceniano na podstawie ich aktywności metabolicznej stosując test MTT. Nie stwierdzono statystycznie znaczącego wpływu insuliny (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni) na żywotność podocytów (Ryc. 28A). Kontrolę pozytywną stanowiły podocyty stymulowane 0,5  $\mu$ M staurosporyną (Staur, 0,5  $\mu$ M, 3 godziny), których żywotność zmniejszyła się o 30% w porównaniu do podocytów hodowanych w warunkach standardowych (Kontrola) (Ryc. 28A).

Nie stwierdzono aby transfekcja siRNA Atg5 lub ns siRNA powodowała zmiany w żywotności podocytów w standardowych warunkach (Ryc. 28B), jak również miała wpływ na żywotność podocytów po inkubacji z insuliną (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni) (Ryc. 28C).



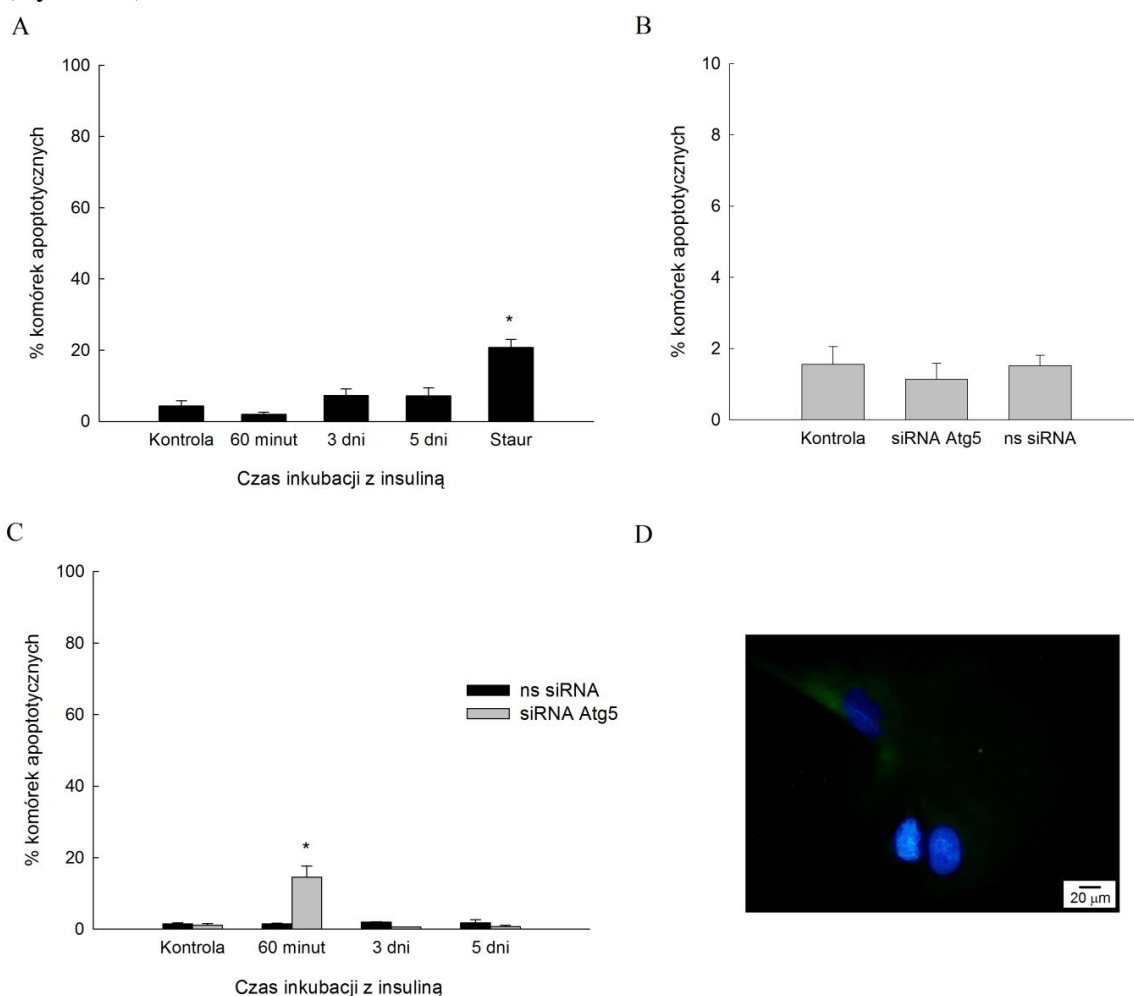
**Ryc. 28.** Żywotność podocytów szczurzych hodowli pierwotnej oceniana przy pomocy testu MTT. Panel A: wpływ insuliny (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni) oraz staurosporyny (Staur; 0,5 μM, 3 godziny), \*p<0,05, n = 9. Panel B: wpływ transfekcji siRNA Atg5 lub ns siRNA po 5 dniach hodowli (n = 3). Panel C: wpływ insuliny (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni) po transfekcji podocytów siRNA Atg5 lub ns siRNA, n = 3. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SEM. Kontrola – podocyty hodowane bez egzogennej insuliny.

#### 5.4.2 Wpływ insuliny na liczbę podocytów ulegających apoptozie po transfekcji siRNA Atg5

Odsetek podocytów ulegających apoptozie oceniano na podstawie liczby podocytów wybarwionych aneksyną V znakowaną FITC w stosunku do całkowitej liczby podocytów.

Nie stwierdzono znamiennej zmiany wpływu insuliny (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni) na odsetek podocytów wybarwionych aneksyną V-FITC (Ryc. 29A). Staurosporyna (0,5 μM, 3 godziny), zastosowana jako kontrola pozytywna, powodowała zwiększenie odsetka podocytów FITC-pozytywnych do odsetkowej wartości 21, p < 0,05 (Ryc. 29A).

W kolejnych doświadczeniach przeprowadzonych z zastosowaniem podocytów transfekowanych siRNA Atg5, stwierdzono, że insuliną (300 nM) w krótkim czasie inkubacji, tj. 60 minut, zwiększała odsetek podocytów FITC-pozytywnych ( $1,5\% \pm 0,4$  vs.  $14,5\% \pm 3,1$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 29C), natomiast takiego efektu nie stwierdzono dla dłuższych czasów inkubacji tj. po 3 i 5 dniach (Ryc. 29C, D). Nie stwierdzono zmian w liczbie podocytów wybarwionych aneksyną V-FITC po inkubacji z insuliną we wszystkich punktach czasowych dla warunków kontrolnych (transfekcja ns siRNA) (Ryc. 29B).



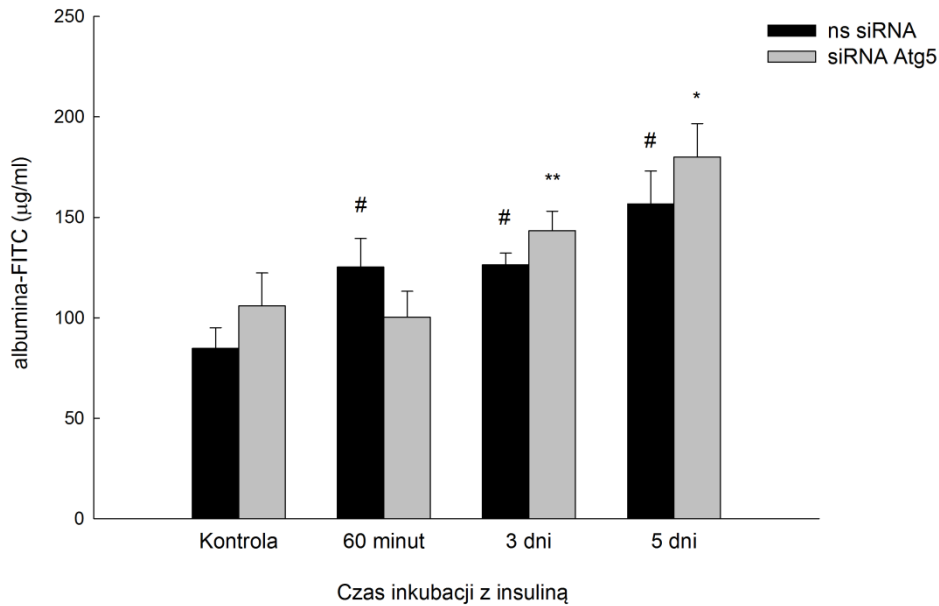
**Ryc. 29.** Wpływ insuliny i transfekcji siRNA Atg5 na odsetek podocytów ulegających apoptozie. Panel A: wpływ insuliny (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni) oraz staurosporyny (Staur, 0,5 μM, 3 godziny), \* $p < 0,05$  vs Kontrola. Panel B: wpływ transfekcji siRNA Atg5 lub ns siRNA po 2 dniach hodowli. Panel C: wpływ insuliny (300 nM; 60 minut, 3 i 5 dni) po transfekcji podocytów siRNA Atg5 lub ns siRNA, \* $p < 0,05$ . Kontrola – podocyty hodowane bez egzogennej insuliny. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM, otrzymane na podstawie zliczeń ze 100 zdjęć dla każdego preparatu pochodzącego z dwóch niezależnych hodowli (średnia liczba zliczeń dla jednego preparatu to 2,5 tys. komórek). Panel D: reprezentatywne zdjęcie podocytów po barwieniu aneksyną V-FITC (widoczna jedna komórka FITC-pozytywna o zabarwieniu zielonym oraz 2 komórki (jądra komórkowe) FITC-negatywne).

## 5.5 Udział autofagii w regulacji funkcji podocytów stymulowanych insuliną

### 5.5.1 Wpływ insuliny na przepuszczalność dla albuminy warstwy podocytów po transfekcji siRNA Atg5

Podocyty stanowią główną barierą dla przepuszczalności albuminy w kłębuszku nerkowym, dlatego podjęto próbę zbadania potencjalnego udziału autofagii w modulacji przepuszczalności warstwy podocytów przez insulinę. Stwierdzono, że insulina zwiększa przepuszczalność dla albuminy warstwy podocytów po transfekcji kontrolnym siRNA: po 60 minutach obserwowano zwiększenie przepuszczalności dla albuminy o 47% ( $85 \pm 10 \mu\text{g/ml}$  vs.  $125 \pm 14 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,05$ ), po 3 dniach o 48% ( $85 \pm 10 \mu\text{g/ml}$  vs.  $126 \pm 6 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,05$ ), a po 5 dniach inkubacji odnotowano wzrost przepuszczalności o 84% ( $85 \pm 10 \mu\text{g/ml}$  vs.  $156 \pm 16 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 30).

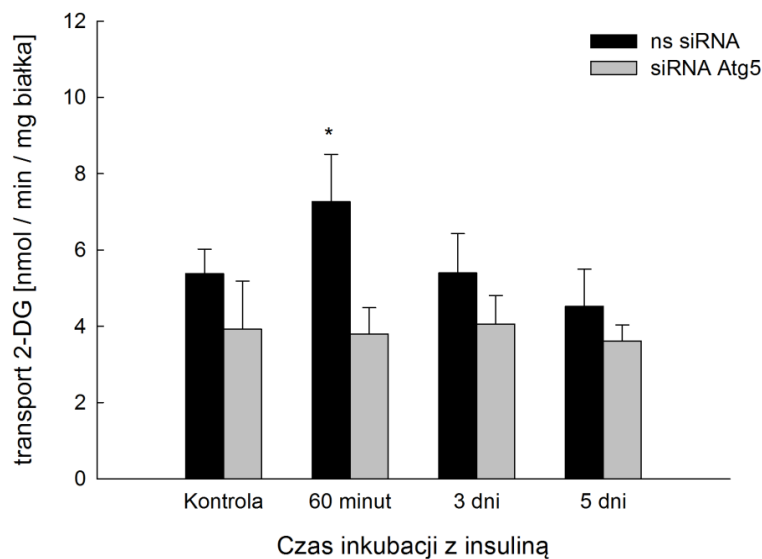
Krótkotrwała (60 minut) inkubacja z insuliną podocytów po transfekcji siRNA Atg5 nie powodowała zmian w przepuszczalności warstwy podocytów dla albuminy ( $106 \pm 16 \mu\text{g/ml}$  vs.  $100 \pm 13 \mu\text{g/ml}$ ). Jednakże po 3 i 5 dniach inkubacji zaobserwowano znaczny i postępujący w czasie wzrost przepuszczalności podocytów dla albuminy, która po 3 dniach inkubacji zwiększyła się o ok. 43% w porównaniu do przepuszczalności 60 minucie inkubacji z insuliną ( $100 \pm 13 \mu\text{g/ml}$  vs.  $143 \pm 10 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,05$ ), a po 5 dniach zwiększyła się o ok. 70% w porównaniu do kontroli ( $106 \pm 16 \mu\text{g/ml}$  vs.  $180 \pm 17 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 30). Wydaje się więc, iż modulacja aktywności autofagii może wpływać na efekt działania insuliny na przepuszczalność podocytów dla albuminy.



**Ryc. 30.** Wpływ insuliny (300 nM) na przepuszczalność dla albuminy podocytów po transfekcji siRNA Atg5. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM, # $p < 0,05$  vs. Kontrola ns siRNA, \*\* $p < 0,05$  vs. 60 minut siRNA Atg5, \* $p < 0,05$  vs. Kontrola siRNA Atg5,  $n = 3$ . Kontrola – podocyty hodowane bez egzogennej insuliny.

#### 5.5.2 Wpływ insuliny na aktywność dokomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozy w podocytach po transfekcji siRNA Atg5

Stwierdzono, że insulina (300 nM, 60 min) zwiększa aktywność dokomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozy (2-DG) w podocytach po transfekcji kontrolnym siRNA ( $5,38 \pm 0,64$  nmol/min/mg białka vs.  $7,27 \pm 1,23$  nmol/min/mg białka,  $p < 0,05$ ), natomiast efekt ten jest zniesiony w podocytach po transfekcji siRNA Atg5 ( $3,92 \pm 1,26$  nmol/min/mg białka vs.  $3,80 \pm 0,69$  nmol/min/mg białka) (Ryc. 31). Nie stwierdzono aby insulina po 3 i 5 dniach inkubacji wpływała statystycznie znamienne na aktywność dokomórkowego transportu 2-DG w podocytach po transfekcji czy to siRNA Atg5, czy też ns siRNA (Ryc. 31). Przedstawione wyniki wskazują, iż długotrwała stymulacja insulinowa może prowadzić do insulinooporności podocytów, a obniżenie aktywności autofagii może przyspieszać ten proces.

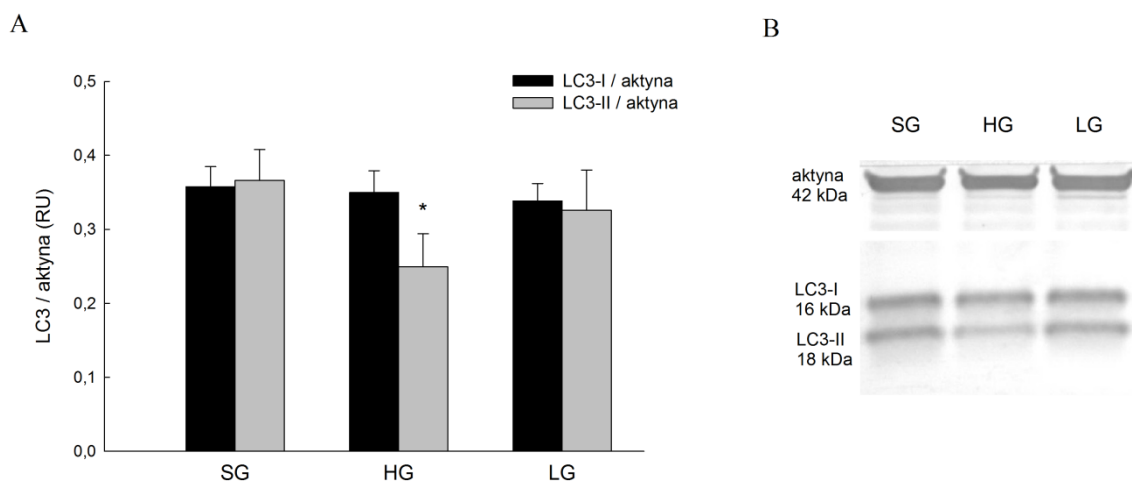


**Ryc. 31.** Wpływ insuliny (300 nM) na aktywność dokomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozy (2-DG) w podocytach po transfekcji siRNA Atg5. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SEM, \*p<0,05 vs. Kontrola ns siRNA, n = 4-8. Kontrola – podocyty hodowane bez egzogennej insuliny.

## 5.6 Aktywność autofagii w podocytach hodowanych w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy

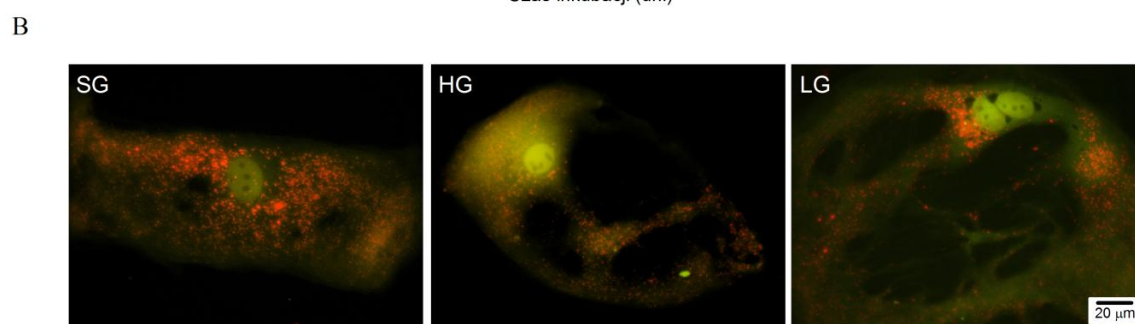
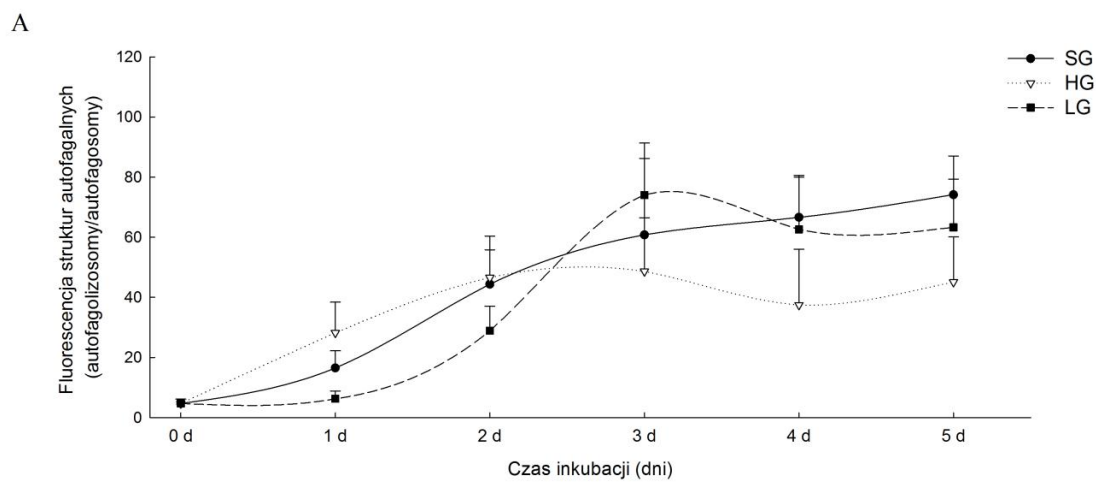
W celu zbadania, czy zmniejszona wrażliwość podocytów na insulinę, jaką obserwuje się po 5 dniach hodowli w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy (30 mM), jest związana ze zmianami aktywności autofagii, w kolejnych doświadczeniach analizie poddano poziom białek autofagalnych w podocytach hodowanych w środowisku o standardowym (11 mM) oraz wysokim (30 mM) stężeniu D-glukozy.

W podocytach hodowanych przez 5 dni w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy (HG) stwierdzono zmniejszoną o ok. 32% ilość LC3-II w porównaniu do środowiska standardowego (SG), tj.  $0,37 \pm 0,04$  vs.  $0,25 \pm 0,05$ ,  $p < 0,05$ , natomiast nie stwierdzono zmian w ilości LC3-I (Ryc. 32A i B). Ponadto, nie stwierdzono zmian w ilości LC3-I i LC3-II w podocytach hodowanych przez 5 dni w środowisku z 11 mM D-glukozą i 19 mM L-glukozą (LG, kontrola osmotyczna) w porównaniu do warunków SG (Ryc. 32A i B).



**Ryc. 32.** Wpływ wysokiego stężenia glukozy na ilość LC3 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Podocyty hodowano przez 5 dni w obecności 30 mM D-glukozy (HG), 11 mM D-glukozy (SG) lub 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG). Panel A: poziom LC3-I i LC3-II w stosunku do aktyny. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. SG LC3-II/aktyna,  $n = 12$ . Panel B: obraz reprezentatywnych immunoblotów.

Przeprowadzono ocenę wielkości sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z autofagolizosomów w stosunku do wielkości sygnału pochodzącego z autofagosomów w żywych podocytach hodowanych w warunkach HG po nukleofekcji z wykorzystaniem plazmidowego DNA kodującego LC3 oraz białka GFP i RFP. Stwierdzono, że stosunek wartości sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z autofagolizosomów do sygnału z autofagosomów zwiększał się przez 2 dni hodowli we wszystkich badanych warunkach (SG, LG i HG) (Ryc. 33A). W kolejnych dniach hodowli (3-5 dni) obserwowano dalsze zwiększanie wartości analizowanego stosunku sygnału fluorescencyjnego w podocytach hodowanych w warunkach SG i LG, podczas gdy w komórkach hodowanych w HG wartość tego parametru nie ulegała dalszemu zwiększeniu (Ryc. 33A i B).

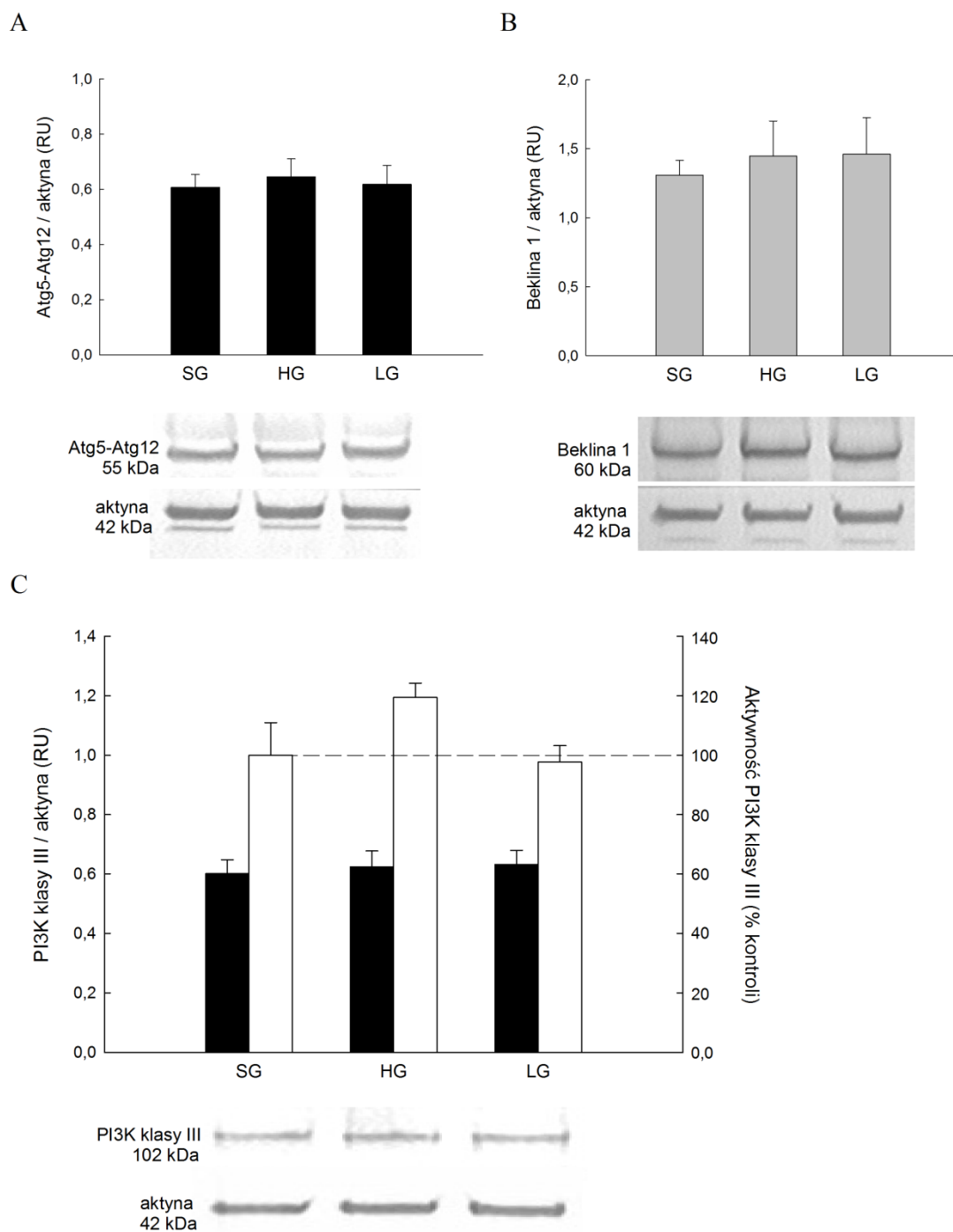


**Ryc. 33.** Efekt wysokiego stężenia glukozy na ilość i wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie egzogenego białka GFP-RFP-LC3 oraz profil fluorescencyjny autofagosomów i autofagolizosomów w żywych podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Panel A: zmiany wielkości sygnału fluorescencyjnego pochodzącego z autofagolizosomów w stosunku do wielkości sygnału pochodzącego z autofagosomów w podocytach hodowanych w obecności wysokiego stężenia D-glukozy (30 mM; HG), standardowego stężenia D-glukozy (11 mM; SG) lub w obecności 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM,  $n = 10-20$  zdjęć z dwóch niezależnych hodowli podocytów. Panel B: reprezentatywne zdjęcia podocytów po nukleofekcji i po 5 dniach hodowli w badanych środowiskach.

W kolejnych doświadczeniach zbadano ilość kompleksów Atg5-Atg12 oraz poziom bekliny 1 i PI3K klasy III w podocytach hodowanych przez 5 dni w warunkach HG.

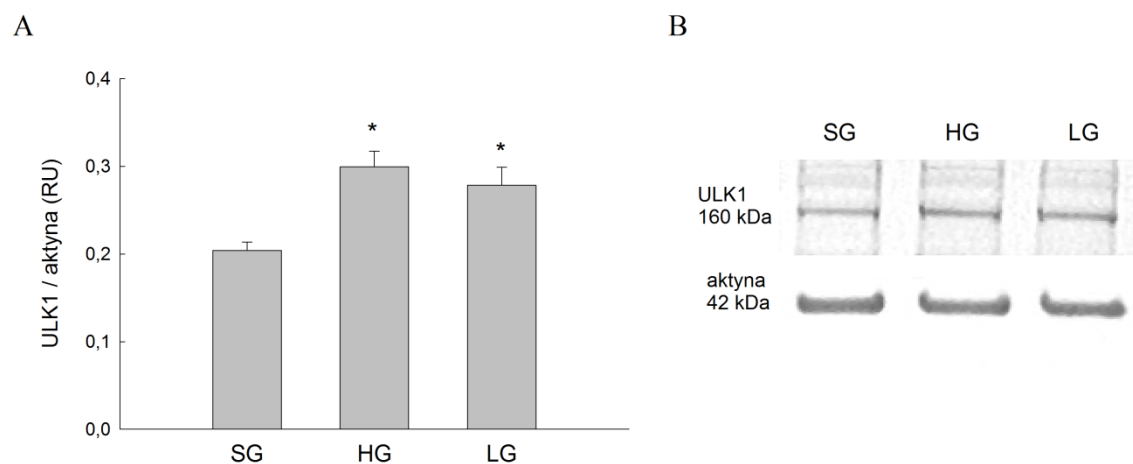
Nie stwierdzono zmian w ilości kompleksów Atg5-Atg12 oraz poziomie bekliny 1 w warunkach HG w porównaniu do warunków SG i LG (Ryc. 34A). Nie stwierdzono także zmian w ilości białka PI3K klasy III (Ryc. 34B i C). Aktywność PI3K klasy III była zwiększona o ok. 19% w podocytach hodowanych w warunkach HG, aczkolwiek zmiana ta nie była statystycznie znamienna (Ryc. 34C).





**Ryc. 34.** Wpływ wysokiego stężenia glukozy na ilość kompleksów Atg5-Atg12 oraz poziom bekliny 1 i PI3K klasy III oraz aktywność PI3K klasy III w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Podocyty hodowano przez 5 dni w obecności 30 mM D-glukozy (HG), 11 mM D-glukozy (SG) lub 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG). Panel A: ilość kompleksów Atg5-Atg12 w stosunku do aktyny,  $n = 6$ . Panel B: ilość bekliny 1 w stosunku do aktyny,  $n = 3$ . Panel C: ilość PI3K klasy III (czarne słupki,  $n=9$ ) oraz normalizowana do kontroli (SG) aktywność enzymatyczna PI3K klasy III (szare słupki,  $n=3$ ). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM. Obrazy reprezentatywnych immunoblotów zamieszczono pod odpowiednimi wykresami.

Ponadto, stwierdzono zwiększony poziom białka ULK1 w odniesieniu do aktyny o ok. 47% ( $0,20 \pm 0,01$  vs.  $0,30 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ) w podocytach hodowanych w warunkach HG (Ryc. 35A i B). Zwiększenie ilości białka ULK1 w stosunku do aktyny o ok. 36% stwierdzono także w podocytach hodowanych w warunkach LG ( $0,20 \pm 0,01$  vs.  $0,28 \pm 0,02$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 35A i B).



**Ryc. 35.** Wpływ wysokiego stężenia glukozy na ilość białka ULK1 w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej. Podocyty hodowano przez 5 dni w obecności 30 mM D-glukozy (HG), 11 mM D-glukozy (SG) lub 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG). Panel A: ilość ULK1 w stosunku do aktyny. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. SG,  $n = 10$ . Panel B: obraz reprezentatywnych immunoblotów.

## 5.7 Udział autofagii w regulacji żywotności i apoptozy podocytów w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy

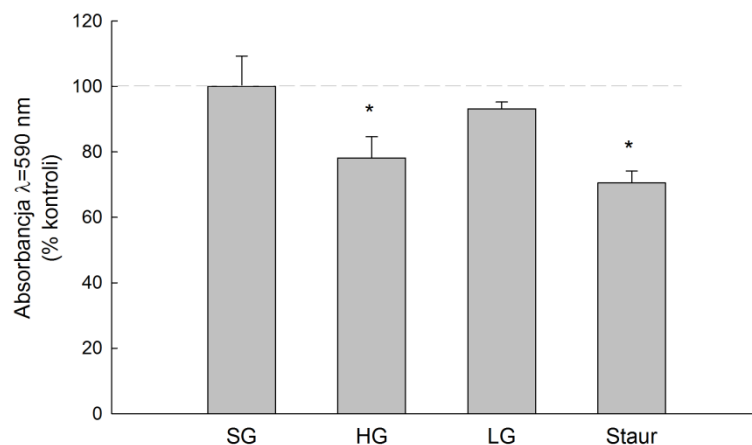
### 5.7.1 Żywotność podocytów w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy po transfekcji siRNA *Atg5*

Stwierdzono zmniejszenie o ok. 22% żywotności podocytów po 5 dniach hodowli w warunkach HG (Ryc. 36A) oraz o 30% pod wpływem staurosporyny ( $0,5 \mu\text{M}$ , 3 godziny; kontrola pozytywna) w porównaniu do podocytów hodowanych w warunkach SG (Ryc. 36A).

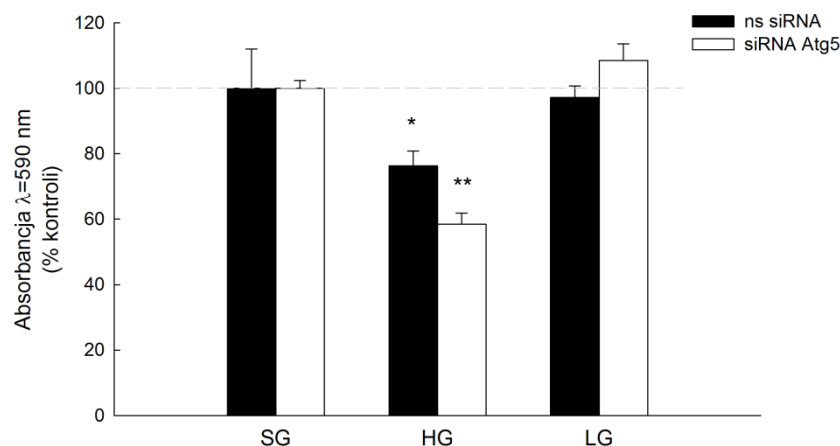
Transfekcja siRNA *Atg5* spowodowała zmniejszenie o ok. 42% żywotności podocytów po 5 dniach hodowli w środowisku HG w porównaniu do warunków SG,

podczas gdy żywotność podocytów po transfekcji kontrolnym siRNA i hodowanych przez 5 dni w warunkach HG uległa zmniejszeniu o ok. 24% (Ryc. 36B). Nie stwierdzono zmian w żywotności podocytów po transfekcji siRNA Atg5 w warunkach LG (Ryc. 36B).

A



B

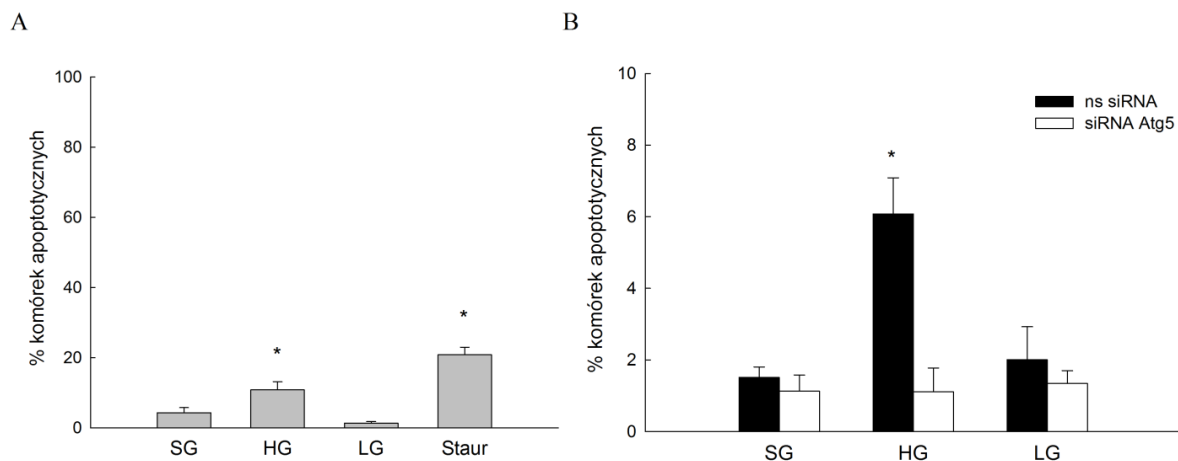


**Ryc. 36.** Żywotność podocytów szczurzych hodowli pierwotnej oceniana przy pomocy testu MTT. Panel A: podocyty hodowano przez 5 dni w środowiskach 30 mM D-glukozy (HG), 11 mM D-glukozy (SG), 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG) oraz w SG w obecności staurosporyny (Staur; 0,5  $\mu$ M, 3 godziny), \* $p < 0,05$  vs. SG,  $n = 6-7$ . Panel B: podocyty po transfekcji siRNA Atg5 lub ns siRNA i po 5 dniach hodowli w warunkach SG, HG lub LG, \* $p < 0,05$  vs. SG ns siRNA, \*\* $p < 0,05$  vs. SG siRNA Atg5,  $n = 3$ . Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM.

### 5.7.2 Wpływ wysokiego stężenia D-glukozy w środowisku hodowlanym na liczbę podocytów apoptotycznych po transfekcji siRNA Atg5

Po inkubacji podocytów przez 5 dni w warunkach HG odsetek podocytów wybarwionych aneksyną V-FITC był ponad 2-krotnie większy, niż w podocytach hodowanych w warunkach SG ( $4,3\% \pm 1,5$  vs.  $10,8\% \pm 2,3$ ,  $p < 0,05$ ) i ponad 8-krotnie większy, niż w warunkach LG ( $1,32\% \pm 0,4$  vs.  $10,8\% \pm 2,3$ ) (Ryc. 37A). Staurosporyna ( $0,5 \mu\text{M}$ , 3 godziny) zwiększała o 21% liczbę wybarwionych aneksyną V-FITC podocytów hodowanych w warunkach SG (Ryc. 37A).

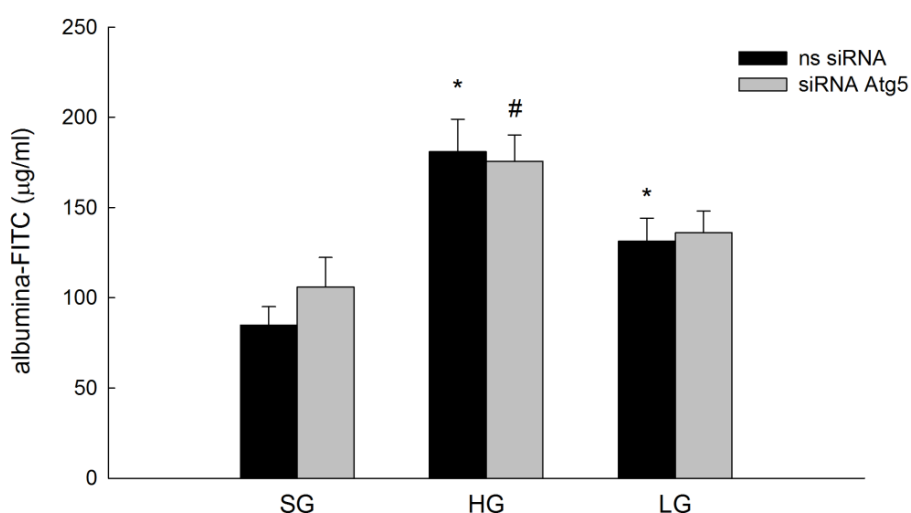
W hodowli podocytów po transfekcji ns siRNA i 5 dniach inkubacji w warunkach HG stwierdzono ok. 4-krotne zwiększenie liczby podocytów wybarwionych aneksyną V-FITC ( $1,5\% \pm 0,3$  vs.  $6,1\% \pm 1,01$ ,  $p < 0,05$ ), podczas gdy po transfekcji siRNA Atg5 nie stwierdzono istotnych zmian w odsetku podocytów FITC-pozytywnych (Ryc. 37B). Ponadto, odsetek podocytów FITC-pozytywnych po transfekcji siRNA Atg5 i hodowanych w warunkach LG był porównywalny do wartości otrzymanych dla podocytów po transfekcji ns siRNA i hodowanych w warunkach LG (Ryc. 37B).



**Ryc. 37.** Wpływ wysokiego stężenia D-glukozy w środowisku hodowlanym oraz siRNA Atg5 na odsetek podocytów szczurzych hodowli pierwotnej ulegających apoptozie. Panel A: odsetek podocytów ulegających wybarwieniu aneksyną V-FITC po 5 dniach hodowli w 30 mM D-glukozy (HG), 11 mM D-glukozy (SG), 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG) lub pod wpływem staurosporyny (Staur;  $0,5 \mu\text{M}$ , 3 godziny) w warunkach SG ( $*p < 0,05$  vs. SG). Panel B: odsetek podocytów ulegających wybarwieniu aneksyną V-FITC po transfekcji siRNA Atg5 lub ns siRNA i po 5 dniach hodowli w warunkach HG, SG oraz LG,  $*p < 0,05$  vs. SG ns siRNA. Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM, otrzymane na podstawie zliczeń ze 100 zdjęć dla każdego preparatu pochodzącego z dwóch niezależnych hodowli (średnia liczba zliczeń dla jednego preparatu to 2,5 tys. komórek).

### 5.8. Przepuszczalność dla albuminy warstwy podocytów hodowanych w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy po transfekcji siRNA Atg5

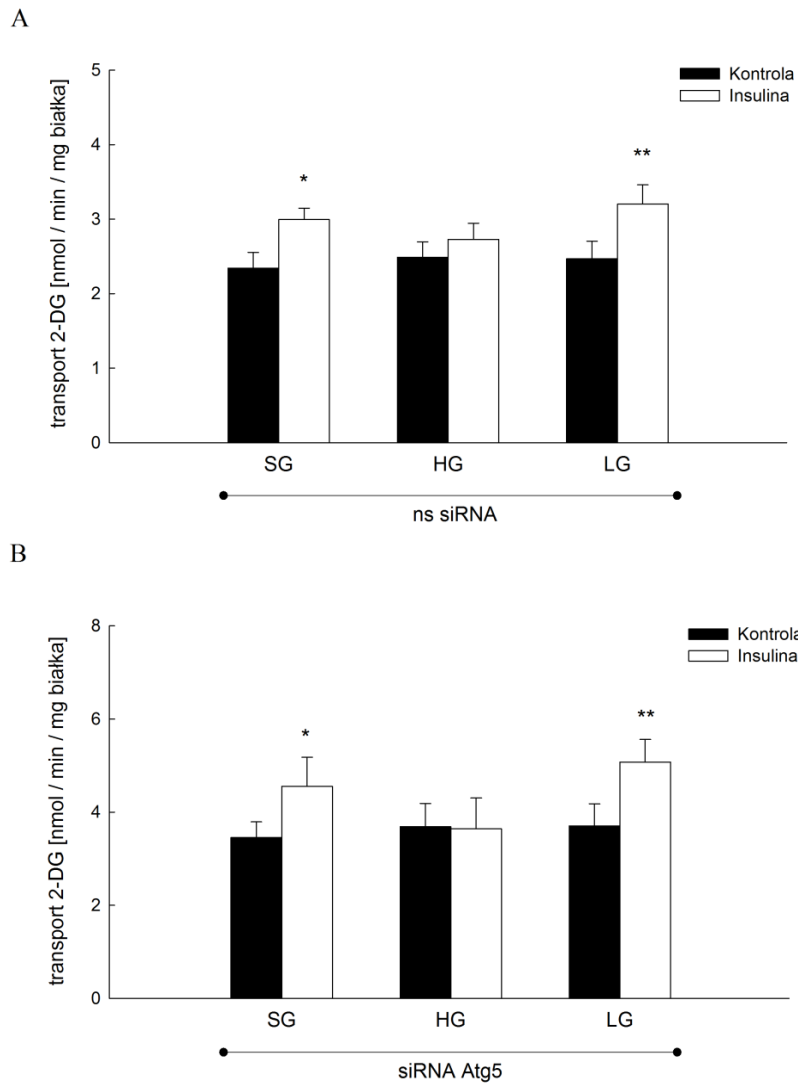
Stwierdzono, że wysokie stężenie D-glukozy w środowisku hodowlanym powoduje zwiększenie o ok. 110% przepuszczalności dla albuminy podocytów po transfekcji ns siRNA ( $85 \pm 10 \mu\text{g/ml}$  vs.  $181 \pm 18 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,05$ ) oraz o ok. 67% podocytów po transfekcji siRNA Atg5 ( $106 \pm 16 \mu\text{g/ml}$  vs.  $175 \pm 15 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 38). Ponadto, stwierdzono zwiększenie o 54% przepuszczalności dla albuminy podocytów po transfekcji ns siRNA i hodowanych w warunkach LG ( $85 \pm 10 \mu\text{g/ml}$  vs.  $131 \pm 13 \mu\text{g/ml}$ ,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 38).



**Ryc. 38.** Wpływ wysokiego stężenia D-glukozy w środowisku hodowlanym na przepuszczalność dla albuminy podocytów po transfekcji siRNA Atg5 lub ns siRNA. Po transfekcji podocyty hodowano przez 5 dni w obecności 30 mM D-glukozy (HG), 11 mM D-glukozy (SG) lub 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie  $\pm$  SEM, \* $p < 0,05$  vs. SG ns siRNA, # $p < 0,05$  vs. SG siRNA Atg5,  $n = 3$ .

## 5.9 Wpływ insuliny na aktywność dkomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozy w podocytach hodowanych w środowisku o wysokim stężeniu D-glukozy po transfekcji siRNA Atg5

Hodowla podocytów w warunkach HG po transfekcji siRNA Atg5 znosiła stymulujący efekt działania insuliny (300 nM, 3 min) na aktywność dkomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozy (2-DG), podczas gdy w warunkach SG i LG insulina zwiększała aktywność dkomórkowego transportu 2-DG; SG:  $2,34 \pm 0,22$  nmol/min/mg białka vs.  $2,99 \pm 0,15$  nmol/min/mg białka,  $p < 0,05$  oraz LG:  $2,47 \pm 0,23$  nmol/min/mg białka vs.  $3,20 \pm 0,26$  nmol/min/mg białka,  $p < 0,05$  (Ryc. 39). Podobny charakter miały zmiany aktywności dkomórkowego transportu 2-DG po stymulacji przez insulinę w podocytach po transfekcji siRNA Atg5. A mianowicie, nie stwierdzono efektu działania insuliny (300 nM, 3 min) na aktywność dkomórkowego transportu 2-DG w podocytach po transfekcji siRNA Atg5 i hodowanych w warunkach HG. Jednakże obserwowano znamienne efekty insuliny na aktywność dkomórkowego transportu 2-DG w podocytach hodowanych w warunkach SG i LG; SG:  $3,45 \pm 0,34$  nmol/min/mg białka vs.  $4,55 \pm 0,63$  nmol/min/mg białka,  $p < 0,05$  oraz LG:  $3,71 \pm 0,47$  nmol/min/mg białka vs.  $5,07 \pm 0,49$  nmol/min/mg białka,  $p < 0,05$ ) (Ryc. 39).



**Ryc. 39.** Wpływ insuliny na aktywność dokomórkowego transportu 2-deoksy-[1,2-<sup>3</sup>H]-D-glukozy (2-DG) w podocytach po transfekcji siRNA Atg5 i hodowanych w środowisku o wysokim stężeniu glukozy. Podstawowa aktywność transportu 2-DG (Kontrola; czarne słupki) i po stymulacji insuliną (300 nM, 3 min; białe słupki) w podocytach po transfekcji ns siRNA (panel A) oraz siRNA Atg5 (panel B) i hodowanych przez 5 dni w środowisku 30 mM D-glukozy (HG), 11 mM D-glukozy (SG) lub 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy (LG). Wyniki przedstawiono jako wartości średnie ± SEM, \*p<0,05 vs. Kontrola SG, \*\*p<0,05 vs. Kontrola LG, n = 5-7.

## 6. Dyskusja

Autofagia należy do kluczowych mechanizmów zapewniających podocytom utrzymanie homeostazy wewnątrzkomórkowej poprzez usuwanie nieprawidłowo sfałdowanych białek i niefunkcjonalnych organelli [65, 67, 110, 111]. Podocyty, w porównaniu z innymi komórkami nerek, charakteryzują się wysoką aktywnością autofagii w warunkach fizjologicznych [112]. Na otrzymanych elektronogramach TEM pierwotnych podocytów obserwowano liczne (od kilkunastu do kilkudziesięciu na jednym przekroju komórki) struktury autofagalne, duże objętościowo jądro komórkowe, zajmujące ok. 30% ciała podocyta, w obrębie którego znajdowało się kilka jąder. W ciele komórek obserwowano także bardzo gęstą sieć cystem mitochondrialnych o różnorodnej wielkości i morfologii, rozmieszczonych w okolicy jądra komórkowego. Cechy te mogą wskazywać na wysoką aktywność metaboliczną podocytów umożliwiającą tym dzielącym się komórkom współtworzyć jedną z warstw bariery filtracyjnej, która ze względu na obciążenie funkcjonalne wynikające ze znacznej objętości filtrowanego osocza i ilości filtrowanych białek drobnocząsteczkowych oraz albuminy, stale musi podlegać proteomicznej odnowie. Pomimo uznanej roli autofagii i sygnałowania insulinowego w podocytach w patogenezie nefropatii cukrzycowej, bezpośredni wpływ insuliny, której wysokie stężenie we krwi występuje we wczesnych stadiach cukrzycy typu 2, na proces autofagii w podocytach dotychczas nie był przedmiotem badań lub wyniki tych badań nie znalazły się w obiegu naukowym. W niniejszej pracy zastosowano stosunkowo wysokie stężenie insuliny w środowisku hodowlanym (300 nM), znacznie wyższe od stężeń insuliny, jakie występują u ludzi, gdzie prawidłowe stężenie insuliny we krwi na czczo nie przekracza 150 pM, choć po pobudzeniu jej wydzielania przez glukozę lub po posiłku wartość stężenia insuliny wzrasta 3-10-krotnie. Stężenie insuliny we krwi u szczurów zdrowych mieści się w zakresie 250-500 pM [113, 114], a u szczurów z hiperinsulinemią wynosi ok. 900 pM [114]. Natomiast do hodowli immortalizowanych podocytów (mysich lub ludzkich) pożywka hodowlana jest uzupełniana roztworem ITS (insulina-transferyna-selenit), a stężenie insuliny w środowisku hodowlanym wynosi ok. 1,7  $\mu$ M [26]. Zatem, zastosowane stężenie insuliny w obecnie prezentowanych wynikach doświadczeń znajduje się w zakresie stężeń stosowanych przez badaczy prowadzących badania na podocytach, w tym również przez nasz zespół [114-116]. Należy dodać, iż w niektórych zespołach część badań prowadzonych jest przy stężeniu insuliny w zakresie 10-100 nM.



Warto nadmienić też, iż insulina znajdująca się w środowisku hodowlanym ulega częściowej degradacji, co prowadzi do zmniejszania stężenia tego hormonu w trakcie hodowli komórek [117].

Badania aktywności autofagii prowadzono w oparciu o analizę ilościową poziomu ekspresji mRNA i ilości białek dwóch ścieżek autofagalnych zaangażowanych w dojrzewanie autofagosomu, z których jedna prowadzi do utworzenia kompleksu białkowego Atg12-Atg5-Atg16, wbudowywanego do tworzącej się błony autofagosomalnej, a druga to ścieżka przekształceń LC3, w wyniku której powstaje lipidowana forma LC3 (LC3-II), także zakotwiczona w błonie autofagosomu. Głównymi markerami tych ścieżek są białka Atg5 i Atg12 (tworzące kompleks), a także białko LC3: forma LC3-I (forma wcześniejsza, bez przyłączonej fosfatydyloetanolaminy) i LC3-II. Są to białka stosowane jako markery autofagalne przez niektórych badaczy zajmujących się autofagią [118, 119].

Analizując poziom markerów autofagalnych należy mieć na uwadze, iż ilość białka, a szczególnie LC3, jest wypadkową pomiędzy jego powstawaniem a degradacją, dlatego wyniki uzyskane w badaniach ilości LC3 i Atg5 metodą Western blot potwierdzano także innymi metodami, między innymi, stosując PCR w czasie rzeczywistym i barwienia immunofluorescencyjne podocytów.

W niniejszej pracy stwierdzono, iż w podocytach insulina zwiększa ekspresję mRNA dwóch genów markerowych autofagii, *atg5* i *LC3* (*LC3a* i *LC3b* – warianty alternatywnego składania mRNA), co wskazuje, że insulina reguluje późniejsze etapy autofagalne – dojrzewanie i zamykanie autofagosomów. Dodatkowo, efekt działania insuliny zależał od czasu inkubacji, gdzie krótkotrwała obecność hormonu w środowisku powodowała wzrost aktywności autofagii, natomiast po długotrwałej stymulacji nie stwierdzono zmian w ekspresji mRNA badanych markerów autofagalnych. Ilość białka LC3 (formy LC3-I i LC3-II) była także wyraźnie większa po krótkiej inkubacji podocytów z insuliną, ale już nie po 5 dniach hodowli. Interpretując uzyskane wyniki należy mieć na uwadze, że część puli LC3-II jest także degradowana w autofagolizosomach. W celu dokładniejszego oznaczenia ilości obu form LC3, często stosuje się inhibitory proteaz lizosomalnych (pepstatyna, leupeptyna) lub czynniki alkalizujące wewnątrz lizosomów (chlorokina, chlorek amonu). Warto jednak nadmienić, iż wszystkie powyższe czynniki mają wiele ograniczeń, bowiem ich działanie nie

ogranicza się do hamowania autofagii, ale także wpływa na inne ścieżki wewnątrzkomórkowe [120].

Otrzymane wyniki doświadczeń wskazują, że insulina aktywuje autofagię na etapach dojrzewania i zamykania sferycznej struktury autofagosomu, gdzie oba badane markery, LC3 i Atg5, są niezbędnymi komponentami błony autofagosomalnej. Dotychczasowe doniesienia naukowe nie są poświęcone wpływu insuliny na autofagię w podocytach. Warto jednak nadmienić, iż w ostatnio opublikowanej pracy przedstawiono dane doświadczalne wskazujące, że w ludzkich immortalizowanych podocytach z wyciszoną ekspresją receptora insulinowego aktywność autofagii jest obniżona: obserwowano zmniejszoną ilość białek LC3-I, LC3-II, bekliny 1, a także mniejszą liczbę struktur autofagalnych [121]. Wydaje się więc, iż właściwa dokomórkowa sygnalizacja insulinowa jest niezbędna do prawidłowego przebiegu autofagii w podocytach.

Zatem, zbadano wpływ insuliny na ilość białka i fosforylację kinaz zaangażowanych w proces inicjacji autofagii: ULK1, mTOR i AMPK. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi, insulina powodowała zwiększenie fosforylacji mTOR (Ser<sup>2448</sup>) w odniesieniu do całkowitego poziomu białka mTOR [122], a efekt ten był zależny od czasu działania hormonu. Szlak PI3K/Akt/mTOR jest jednym z głównych szlaków wewnątrzkomórkowych aktywowanych w wyniku działania insuliny i regulującym m.in. translację białek i wzrost komórek [123]. Aktywna, szczególnie w warunkach nadmiaru substancji odżywczych, kinaza mTOR jest uznawana za inhibitor autofagii, choć w podocytach w warunkach fizjologicznych paradoksalnie zarówno autofagia, jak i szlak mTOR [74] odznaczają się wysoką aktywnością, co jest możliwe prawdopodobnie dzięki specyficznej organizacji przestrzennej ścieżek sygnalizacyjnych obu tych procesów, polegającej na wydzieleniu w podocytach specyficznych obszarów (kompartamentów cytoplazmatycznych) nazwanych TASCC (ang. *TOR-autophagy spatial coupling compartment*), mających na celu rozdzielenie tych dwóch szlaków [74].

Ze względu na fakt, iż kinaza mTOR jest inhibitorem autofagii, wydaje się, iż jej długotrwała stymulacja przez insulinę w przebiegu doświadczeń (czego wyrazem było ponad 2-krotne zwiększenie fosforylacji mTOR po 5 dniach) mogła wpływać negatywnie na aktywność autofagii w podocytach, co objawiało się zmniejszeniem

poziomu LC3 obserwowanym po 5 dniach inkubacji w porównaniu do wcześniejszych punktów czasowych. Ponadto, po godzinnej inkubacji z insuliną zwiększonej aktywności mTOR towarzyszyła mniejsza aktywność AMPK, oceniana na podstawie poziomu fosforylacji treoniny w pozycji 172. Aktywacja AMPK prowadzi do zahamowania białka Raptor (aktywatora kompleksu mTORC1), a także do aktywacji kompleksu stwardnienia guzowego (TSC – z ang. *tuberous sclerosis complex*) hamującego mTOR, co może leżeć u podstaw przeciwnego efektu insuliny na iloraz p-AMPK/AMPK i p-mTOR/mTOR. Długotrwała ekspozycja podocytów na insulinę powodowała przywrócenie aktywności AMPK do poziomu, który po 5 dniach hodowli był obserwowany w komórkach kontrolnych, co może świadczyć o desensytyzacji tej ścieżki sygnalizacyjnej na działanie insuliny. Z doniesień naukowych wynika, iż długotrwałe działanie wysokiego stężenia insuliny dodatnio koreluje z rozwojem insulinooporności [124-126]. Pomimo zmian, jakie powodowała insulina w poziomie fosforylacji mTOR i AMPK, nie stwierdzono efektu insuliny na ilości białka ULK1, które jest regulowane przez obie te kinazy. W warunkach fizjologicznych ULK1 podlega fosforylacji na wielu resztach aminokwasowych i występuje w kompleksie z AMPK oraz z innymi białkami autofagalnymi np. Atg13, Atg101, FIP200. Aktywność ULK1 jest zależna od jej fosforylacji, m.in. przez mTOR, AMPK, Akt, a także jest regulowana przez autofosforylację [77]. Do tej pory zidentyfikowano 27 miejsc fosforylacji ULK1, w tym 6 miejsc fosforylacji ULK1 dla AMPK, 2 miejsca dla mTOR, jedno miejsce dla Akt, jedno prawdopodobne miejsce fosforylacji katalizowanej przez kinazę białkową aktywowaną przez cAMP (PKA) [127], a także 2 miejsca autofosforylacji (Ser1042 i Thr1046). Stwierdzono także, że ULK1 katalizuje reakcję fosforylacji białka Raptor (tym samym hamując aktywność swojego inhibitora mTOR) [128], a także wszystkich 3 podjednostek AMPK ( $\alpha$ 1,  $\beta$ 2,  $\gamma$ 1) [129]. W warunkach niedoboru substancji odżywczych następuje rozległa defosforylacja ULK1 z następczym odłączeniem AMPK od kompleksu białkowego, co prowadzi do indukcji autofagii. Fosfatazy katalizujące proces defosforylacji ULK1 na chwilę obecną nie są poznane [130]. Do przywrócenia aktywności ULK1 do bazowego poziomu dochodzi poprzez jej ponowną fosforylację przez mTOR i przyłączenie AMPK [58].

W niniejszej pracy, zbadano wpływ insuliny na ilość białka ULK1, natomiast nie badano aktywności białka ULK1 (np. fosforylacji), zatem na tym etapie badań nie można w sposób konkludywny ustalić znaczenia insuliny w regulacji autofagii na etapie

inicjacji. Dalsze badania powinny by objąć analizę poziomu fosforylacji ULK1 w niektórych kluczowych dla jej aktywności miejscach (np. Ser555 [131], Ser638 i Ser758 [58]), bądź zbadanie stopnia fosforylacji białek efektorowych dla ULK1, takich, jak AMBRA1 [132], Atg9 [133], beklina 1 [134].

W niniejszej pracy przeprowadzono także ocenę efektu insuliny na etap nukleacji i elongacji błony autofagosomalnej, w którym uczestniczy między innymi kompleks bekliny 1 i PI3K klasy III. W zależności od konfiguracji białek w kompleksie, może on wykazywać aktywność promującą bądź hamującą tworzenie autofagosomów [135]. Obecność bekliny1 w kompleksie jest niezbędna do aktywności PI3K klasy III. Stwierdzono, że insulina zwiększa poziom bekliny 1, co może być związane ze współistniejącym zwiększeniem ilości białka p54 JNK, które katalizuje fosforylację Bcl-2, inhibitora bekliny 1, i powoduje jego dysocjację od kompleksu beklina1/PI3K klasy III. Zwiększony, aczkolwiek statystycznie nieznamienne, poziom fosforylacji p54 JNK1 (Thr183 i Tyr185) zanotowano po 60. minucie i po 3 dniach inkubacji podocytów z insuliną. Pomimo zwiększonego poziomu bekliny 1 nie obserwowano zwiększenia ilości białka oraz aktywności PI3K klasy III pod wpływem insuliny, co może świadczyć, iż stymulacja aktywności autofagii przez insulinę na etapie dojrzewania i zamykania autofagosomów zachodzi niezależnie od aktywacji kompleksu PI3K klasy III/beklina 1. Aktywacja autofagii bez udziału kompleksów PI3K klasy III i bekliny 1 była przedmiotem wcześniejszych badań [136-138]. Wykazano np., że delecja genu BCN1, kodującego beklinę 1, w komórkach HeLa praktycznie nie wpływa na poziom białka LC3-II podczas aktywacji autofagii przez nadtlenuk wodoru lub w warunkach głodu [137], co więcej, nienasycone kwasy tłuszczowe aktywowały autofagię także niezależnie od bekliny 1 [138].

Zwiększona ilość kompleksów Atg5-Atg12 po stymulacji insulinowej potwierdza tezę, iż proces dojrzewania i zamykania autofagosomów podlega pozytywnej regulacji przez insulinę. Efekt ten był uwidoczniony za pomocą barwienia immunofluorescencyjnego i mikroskopii konfokalnej, w której detekcji podlegały białka LC3 i Atg5. Obserwowano znaczny wzrost sygnału fluorescencyjnego w stymulowanych insuliną podocytach, aczkolwiek efekt ten miał charakter przejściowy. Jest to zgodne z wynikami otrzymanymi w badaniach poziomu ekspresji mRNA i ilości białek LC3 i Atg5 z zastosowaniem metod PCR w czasie rzeczywistym i Western blot. Zahamowanie stymulującego efektu działania insuliny na autofagię

w podocytach wraz z czasem inkubacji może mieć związek z jednej strony z wzrastającą ilością fosforylowanej kinazy mTOR Ser<sup>2448</sup>, będącej wykładnikiem jej aktywności, a z drugiej strony, może wynikać ze zmniejszonej wrażliwości komórek na działanie insuliny [124-126].

Chcąc prześledzić dynamikę powstawania autofagosomów i autofagolizosomów w żywych podocytach, zastosowano nukleofekcję z użyciem plazmidu kodującego GFP-RFP-LC3 z następczą 5 dniową hodowlą i analizą sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od egzogenego białka co 24 godziny. Ze względu na fakt, iż podocyty ekspresyjnie GFP-RFP-LC3 miały zmienioną morfologię (komórki często „zlewały się” ze sobą, tworząc duże, wielojądrzaste twory cytoplazmatyczne), niemożliwe było dokładne określenie liczby komórek w polu widzenia, dlatego też analizowanym parametrem był stosunek wielkości sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od autofagolizosomów (barwa czerwona, pochodząca tylko od RFP, gdyż białko GFP jest wrażliwe na niskie pH i po fuzji autofagosomu z lizosomem barwa zielona zanika) do wielkości sygnału fluorescencyjnego pochodzącego od autofagosomów (barwa żółta – wynik nakładających się widm o długości odpowiadającej barwie czerwonej i zielonej, odpowiednio, RFP i GFP). Wielkość tego ilorazu odpowiada stosunkowi ilości autofagolizosomów (AL; późnych struktur autofagalnych) do autofagosomów (AF; struktur wcześniejszych) [139, 140]. Zaobserwowano, że w obu układach doświadczalnych, tj. w nieobecności i obecności egzogennej insuliny, stosunek AL/AF zwiększał się wraz z czasem prowadzonej hodowli, co mogło być związane ze stresem komórkowym powstałym w wyniku nukleofekcji i stałej nadekspresji egzogenego białka. Dodatkowo, z doniesień naukowych wynika, iż nukleofekcja plazmidowym DNA negatywnie wpływa na przeżywalność komórek, zarówno w wyniku samej procedury, jak i wskutek toksyczności spowodowanej ekspresją transgenu [141, 142]. Niska, ok. 10% efektywność nukleofekcji podocytów w przeprowadzonych doświadczeniach oraz ich zmieniona morfologia są trudnymi do eliminacji ograniczeniami tej metody i wydaje się, że mogą one mieć wpływ na otrzymane wyniki dotyczące wartości AL/AF, które w tej sytuacji należy interpretować ostrożnie, bardziej w kontekście trendu, niż znamiennych statystycznie różnic. Precyzyjne prześledzenie zmian ilości struktur autofagalnych w żywych komórkach w dłuższym czasie wymagałoby stabilnej transfekcji, np. dokonanej przy pomocy transdukcji lentiwirusowej.

W następnej kolejności przeprowadzono badania nad mechanizmem stymulacji autofagii przez insulinę. We wcześniej przeprowadzonych w naszym zespole pracach wykazaliśmy, że insulina zwiększa aktywność oksydazy NAD(P)H (o ok. 40%) w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej, czego wynikiem jest zwiększona produkcja nadtlenu wodoru [114]. Ze względu na fakt, iż nadtlenek wodoru jest znanym aktywatorem autofagii [143, 144], postanowiono zbadać, czy efekt wywierany przez insulinę na późne etapy autofagii w podocytach jest zależny od aktywacji oksydazy NAD(P)H i reaktywnych form tlenu. W tym celu przeprowadzono farmakologiczne (apocynina) i molekularne (siRNA) wyciszenie aktywności tego enzymu. Apocynina jest inhibitorem oksydazy NAD(P)H ( $IC_{50} = 10 \mu M$ ), która hamuje przemieszczanie podjednostki cytoplazmatycznej  $p47^{phox}$  do błony komórkowej i tworzenie funkcjonalnego kompleksu enzymatycznego, między innymi, z podjednostką katalityczną NOX4 [114]. Nie stwierdzono efektu insuliny w obecności apocyniny na poziom białek zaangażowanych w dojrzewanie autofagosomów: LC3-I, LC3-II, Atg5-Atg12, a także na poziom fosforylacji kinaz uczestniczących w regulacji początkowych etapów autofagii – mTOR i AMPK. Apocynina znosiła również efekt insuliny na ilość białka 1, jak i poziom fosforylacji p53 JNK1. Wyniki te wskazują na aktywację autofagii w podocytach pod wpływem ROS. Ze względu na fakt, iż apocynina nie jest związkiem o wysokiej selektywności i dodatkowo może wpływać na stan oksydoredukcyjny (np. zwiększając wewnątrzkomórkowe stężenie  $H_2O_2$  i zmniejszając stosunek GSH/GSSG [145]), aktywność oksydazy NAD(P)H zahamowano na poziomie mRNA katalitycznej podjednostki NOX4 (będącej ilościowo główną izoformą w nerkach) z zastosowaniem posttranskrypcyjnego wyciszenia ekspresji genu (siRNA). Warunki transfekcji podocytów z użyciem siRNA NOX4, w wyniku której zarówno poziom białka NOX4, jak i aktywność oksydazy NAD(P)H są zmniejszone o ok. 40%, zostały zoptymalizowane uprzednio w naszym zespole [114]. Po wyciszeniu NOX4 insulina nie powodowała zmian w poziomie LC3-I, LC3-II oraz w ilości kompleksów Atg5-Atg12 w podocytach. Nie stwierdzono także efektu insuliny na poziomie ekspresji genów *LC3b* i *Atg5* w podocytach po zahamowaniu NOX4. Zniesienie wpływu insuliny na ilość struktur autofagalnych w podocytach ze zmniejszoną aktywnością NOX4 potwierdzono również metodą immunofluorescencyjnej mikroskopii konfokalnej (barwienie LC3 i Atg5). W celu dodatkowego potwierdzenia udziału ROS w stymulacyjnym działaniu insuliny na autofagię, przeprowadzono inkubację podocytów z zahamowaną ekspresją mRNA

NOX4 w obecności egzogenego nadtlenu wodoru. Stwierdzono znaczne zwiększenie ilości struktur autofagosomalnych (skupisk LC3 i Atg5), co przemawia za tym, że aktywacja autofagii przez insulinę w podocytach może zachodzić poprzez stymulację aktywności NOX4 i zwiększenia produkcji H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Aktywacja autofagii przez nadtlenek wodoru, generowany w wyniku działania insuliny, może następować w wyniku kilku różnych zdarzeń wewnątrzkomórkowych. Najbardziej wyraźny efekt działania insuliny obserwowano na etapie dojrzewania autofagosomów, gdzie istotną rolę odgrywa proteaza Atg4, która tuż po translacji LC3 bierze udział w przekształceniu LC3 do LC3-I poprzez cięcie proteolityczne bezpośrednio za glicyną w pozycji 120. Poza tym, proteaza Atg4 bierze udział również w „odzyskiwaniu” frakcji LC3 związanej z zewnętrzną błoną autofagosomalną poprzez hydrolizę wiązania pomiędzy LC3 i PE, dzięki czemu powstaje nowa pula cytoplazmatycznego LC3-I wykorzystywana w kolejnych cyklach przemian. Zatem aktywność Atg4 podlega ścisłej regulacji: proteaza powinna być aktywna w miejscach tworzenia się LC3-I z LC3, później jej aktywność powinna ulegać zmniejszeniu aby umożliwić przemianę LC3-I do LC3-II, a z kolei do delipidacji LC3 i jego ponownego odzyskania z błony autofagosomalnej Atg4 powinna ponownie być aktywna. Z doniesień naukowych wynika, że kluczowym regulatorem aktywności proteazy Atg4 jest nadtlenek wodoru, który utlenia cysteinę w pozycji 81, znajdującej się w miejscu katalitycznym enzymu, czego efektem jest zmniejszona aktywność tej proteazy [87]. Można przypuszczać, że nukleacja oraz początkowe stadia biogenezy autofagosomów, gdzie aktywność Atg4 powinna być zahamowana, mogą zachodzić w pobliżu mitochondriów, gdzie fizjologiczne stężenie reaktywnych form tlenu jest wyższe, niż w innych obszarach wewnątrzkomórkowych [146]. Należy nadmienić także, iż inne enzymy uczestniczące w przemianach LC3 (Atg7 i Atg3), a także w koniugacji Atg5-Atg12 (Atg7 i Atg10), zawierają reszty cysteinowe w swoich miejscach katalitycznych, a więc podobnie jak Atg4 ich aktywność może być regulowana przez ROS.

Nadmierna i długotrwała produkcja ROS prowadzi do stresu oksydacyjnego i uszkodzenia komórek. Podocyty są szczególnie wrażliwe na stres tlenowy z powodu niskiego potencjału do aktywacji enzymów antyoksydacyjnych, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa, peroksydaza glutationowa i katalaza [147]. Przedłużająca się i nadmiernie wysoka aktywność autofagii jest dla komórek szkodliwa i może skutkować ich autofagową śmiercią [55]. Biorąc pod uwagę taką możliwość, zbadano czy

długotrwała stymulacja insulinowa nie wpływa na żywotność podocytów oraz czy zwiększenie aktywności autofagii aktywuje także ścieżki apoptotyczne. Wyniki analiz wykazały, że insulina nie wpływa na przeżywalność i apoptozę komórek. Stąd można przypuszczać, iż zależna od działania insuliny aktywacja autofagii ma na celu zapobieżenie bądź redukcję stresu oksydacyjnego. Znaczenie autofagii dla żywotności i funkcji podocytów oceniano w komórkach z zahamowaną ekspresją mRNA Atg5. Zastosowane warunki transfekcji podocytów z użyciem siRNA Atg5 skutkowały zmniejszeniem ilości kompleksów Atg5-Atg12 o ok. 28%, a także ok. 3-krotnie mniejszym stosunkiem autofagolizosomów do autofagosomów. Wyciszenie ekspresji mRNA Atg5 nie wpływało na żywotność podocytów oraz liczbę komórek ulegających apoptozie w standardowych warunkach hodowli (11 mM D-glukoza). Komórki z zahamowaną w ten sposób aktywnością autofagii poddano stymulacji insuliną. Insulina nie wpływała na żywotność podocytów po transfekcji siRNA Atg5, ocenianą na podstawie ich aktywności metabolicznej (test MTT). Natomiast w badaniach cech apoptotycznych podocytów, ocenianych na podstawie obecności fosfatydyloseryny w zewnętrznej warstwie błony komórkowej, w podocytach z zahamowaną autofagią obserwowano zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych po 60 minutach inkubacji z insuliną, a więc w czasie gdy stwierdzono także największy efekt działania insuliny na poziom białek LC3 i Atg5. Może to wskazywać na uruchomienie ścieżek pro-apoptotycznych w wyniku nadmiernej aktywacji autofagii przez insulinę oraz stresu tlenowego. Brak wpływu insuliny na żywotność podocytów ze zmniejszoną aktywnością autofagii (ocenianą w teście MTT) może wynikać ze stosunkowo niskiej czułości zastosowanego testu oraz z faktu, iż komórki we wczesnej fazie apoptozy wciąż wykazują aktywność metaboliczną [148].

Zaburzenia sygnałowania insulinowego w podocytach mają związek z rozwojem białkomoczu u chorych na cukrzycę [149]. We wcześniejszych badaniach naszego zespołu wykazano, że przepuszczalność warstwy podocytów *in vitro* dla albuminy znacznie zwiększa się już po 5 minutach stymulacji insuliną (300 nM), a efekt ten jest zależny od zwiększonej aktywności NOX4 i wzrostu produkcji ROS [114]. Zależność pomiędzy przepuszczalnością bariery filtracyjnej dla albuminy a procesem autofagii w podocytach zaobserwowano u myszy pozbawionych genu Atg5 w podocytach [112]. W niniejszej pracy postawiono pytanie, czy zwiększenie przepuszczalności podocytów dla albuminy, obserwowane po stymulacji insuliną, może zachodzić poprzez regulację



aktywności autofagii w tych komórkach. Po transfekcji podocytów niespecyficznym siRNA obserwowano znaczne zwiększenie (o 47%) przepuszczalności podocytów dla albuminy po 60 minutach inkubacji z insuliną. Natomiast nie stwierdzono tego efektu insuliny w podocytach z wyciszoną autofagią (siRNA Atg5). Uzyskane wyniki były odmienne od spodziewanych, w których zakładano, że osłabienie potencjału obronnego podocytów spowoduje dodatkowo pogorszenie ich funkcji, której wykładnikiem może być zwiększona przepuszczalność dla albuminy. Co więcej, w ostatnio opublikowanych pracach przedstawiono dowody doświadczalne wskazujące na istnienie związku pomiędzy nieprawidłowym przebiegiem autofagii i utratą podocytów oraz z rozwojem białkomoczu u zwierząt oraz chorych na cukrzycę [60]. Warto jednak nadmienić, iż w badaniach tych obserwowano także większą umieralność podocytów, co mogło wynikać ze zbyt silnego zahamowania autofagii – procesu pełniącego kluczową rolę w przeżywalności komórek [65, 150]. W przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy badaniach, efektywność wyciszenia mRNA dla Atg5 była na poziomie 28% i nie była związana z mniejszą żywotnością komórek lub apoptozą. Zahamowanie efektu insuliny na przepuszczalność podocytów z wyciszoną autofagią po 60 minutach mogło być związane z mniejszą wrażliwością komórek na jej działanie, co pokazały analizy dokomórkowego transportu egzogennej D-glukozy ([1,2-<sup>3</sup>H]-deoksy-D-glukozy; 2-DG). W wyniku 60 minutowej stymulacji insuliną, aktywność dokomórkowego transportu 2-DG w podocytach zwiększała się o ok. 35%. Po dłużej trwających inkubacjach podocytów z insuliną (3 i 5 dni) aktywność transportu 2-DG była porównywalna z aktywnością podstawową (bez stymulacji insulinowej), co może świadczyć o nabyciu przez podocyty insulinooporności. Z wcześniejszych prac doświadczalnych przeprowadzonych na innych typach komórek również wynika, iż długotrwała ekspozycja komórek na działanie insuliny prowadzi do zmniejszenia ich insulinooporności [124, 125, 151]. Jednak bezpośredni wpływ autofagii na rozwój insulinooporności w podocytach dotychczas nie był badany. W niniejszej pracy uzyskano wyniki, dowodzące, iż po zmniejszeniu aktywności autofagii w podocytach insulina nie powoduje zwiększania transportu dokomórkowego egzogennej 2-DG, a więc można wnioskować, iż zaburzenia autofagii obserwowane np. u chorych na cukrzycę, mogą pogarszać wrażliwość podocytów na insulinę, i w konsekwencji przyczyniać się do większej śmiertelności podocytów.

Innym czynnikiem odgrywającym rolę w patogenezie uszkodzenia nerek w cukrzycy jest hiperglikemia i/lub hiperosmia. W poprzednich pracach naszego zespołu wykazano, że podocyty szczurze hodowane w warunkach o wysokim stężeniu D-glukozy (30 mM, HG) po pięciu dniach wykazują zmniejszoną aktywność dokomórkowego transportu glukozy po stymulacji insuliną [152]. W podocytach hodowanych w środowisku HG stwierdzono zmniejszoną ilość LC3-II (o ok. 32%), a także mniejszy o ok. 40% stosunek liczby autofagolizosomów do autofagosomów. Nie obserwowano jednak zmian w ilości Atg5-Atg12, bekliny 1 oraz PI3K klasy III, chociaż aktywność PI3K klasy III była zwiększona o ok. 20%. Ponadto, stwierdzono znaczne (o ok. 50%) zwiększenie ilości białka ULK1, co było również obserwowane w podocytach hodowanych w obecności 11 mM D-glukozy i 19 mM L-glukozy, co może wskazywać na zależność poziomu białka ULK1 od wzrostu ciśnienia osmotycznego w środowisku zewnątrzkomórkowym. Do tej pory ukazało się niewiele doniesień naukowych dotyczących badań nad rolą stresu osmotycznego w regulacji autofagii, aczkolwiek istnieją przesłanki aby sądzić, iż autofagia może być aktywowana w wyniku zwiększonego ciśnienia osmotycznego w środowisku pozakomórkowym, np. w komórkach linii LLC-PK1 (ang. *Pig Kidney Epithelial Cells*) hodowanych w środowisku hipertonicznym obserwowano zwiększony poziom markerów autofagalnych (LC3, ATG12, PI3K i SQSTM1) [153].

Oceniając aktywność procesu autofagii w podocytach po długotrwałej hodowli w obecności wysokiego stężenia D-glukozy wydaje się, że zmniejszenie ilości późnych struktur autofagalnych, autofagolizosomów (AL) w stosunku do autofagosomów (AF), może mieć związek ze zmniejszoną ilością błonowej formy LC3 (LC3-II). Brak obserwowanych zmian w poziomie LC3-I może wskazywać na zahamowanie przemiany LC3-I do LC3-II, co przy niezmienionej ilości kompleksów Atg5-Atg12 może prowadzić do mniejszej ilości AL. Warto nadmienić, iż w niniejszej pracy nie był badany wpływ wysokiego stężenia D-glukozy na etap fuzji autofagosomów z lizosomami, w którym biorą udział GTPazy Rab oraz białka z rodziny SNARE (ang. *soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor-attachment protein receptor*).

Z wcześniejszych doniesień naukowych nie wynika jednoznacznie, czy autofagia jest aktywowana, czy też hamowana pod wpływem środowiska hiperglikemicznego, np. stwierdzono większą liczbę autofagosomów w podocytach szczurów cukrzycowych oraz zwiększoną ilość LC3 i bekliny 1 w unieśmiertelniczonych podocytach mysich

hodowanych w środowisku o wysokim stężeniu glukozy [66]. Inne badania natomiast dostarczyły danych doświadczalnych wskazujących na zmniejszenie poziomu markerów oraz struktur autofagalnych w różnych modelach doświadczalnych cukrzycy [68]. Zgodnie z ostatnio opublikowanymi wynikami badań, u chorych na cukrzycę oraz u zwierząt cukrzycowych i w immortalizowanych podocytach mysich zaobserwowano zmniejszoną ilość struktur autofagalnych oraz zmniejszony poziom LC3-II. Dodatkowo, stwierdzono większą śmiertelność podocytów narażonych na długotrwałe działanie wysokiego stężenia glukozy, w szczególności w wyniku apoptozy [60]. W niniejszej pracy po raz pierwszy przedstawiono wyniki badań dotyczących wpływu wysokiego stężenia glukozy na autofagię oraz apoptozę w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej.

Istnieje szereg mechanizmów odpowiedzialnych za aktywację apoptozy przez hiperglikemię. Wykazano, że wysokie stężenie glukozy indukuje reakcje nieenzymatycznej glikacji białek osocza i macierzy zewnątrzkomórkowej (albuminy, kolagenu, fibrynogenu, globulin), w wyniku czego powstają tzw. zaawansowane produkty glikacji (AGEs). AGEs, wiążąc się do swoich receptorów (RAGEs, ang. *receptors for advanced glycation end products*) na powierzchni komórek, powodują aktywację szlaku p38MAPK i czynnika transkrypcyjnego FOXO4, które indukują apoptozę [154]. Wysokie stężenie glukozy powoduje aktywację układu renina-angiotensyna II-aldosteron, co prowadzi do zwiększenia produkcji angiotensyny II, która indukuje apoptozę podocytów między innymi poprzez stymulację produkcji cytokiny TGF- $\beta$ 1, zwiększanie aktywności oksydazy NAD(P)H (stres oksydacyjny), a także poprzez zwiększanie ilości RAGEs na powierzchni podocytów [51]. Wysokie stężenie glukozy powoduje także reorganizację cytoszkieletu w tych komórkach i osłabienie ich interakcji z GBM (poprzez zmniejszanie ilości integryny  $\alpha$ 3 $\beta$ 1 oraz agryny), czego wynikiem jest odrywanie się podocytów od błony podstawnej i ich apoptoza [155].

Podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy zmniejszona aktywność autofagii, obserwowana w podocytach po długotrwałym narażeniu komórek na wysokie stężenie glukozy, może być jednym z mechanizmów prowadzących do uszkodzenia i śmierci podocytów w warunkach hiperglikemicznych. Po wyciszeniu autofagii i hodowli podocytów przez 5 dni w obecności 30 mM D-glukozy (HG) obserwowano zmniejszenie o 42% odsetka aktywnych metabolicznie komórek, podczas gdy

w komórkach kontrolnych (transfekowanych niespecyficznym siRNA) i hodowanych w tych samych warunkach ilość aktywnych metabolicznie podocytów zmniejszyła się o ok. 24%, co może wskazywać na protekcyjną rolę autofagii dla przeżywalności podocytów w hiperglikemicznym środowisku. Jednak w badaniach dotyczących apoptozy podocytów, zwiększenie odsetka komórek apoptotycznych obserwowano tylko w podocytach transfekowanych kontrolnym siRNA, a nie w komórkach z wyciszoną autofagią. Jak do tej pory nie jest znana przyczyna tej obserwacji.

W pracy stwierdzono, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami, zwiększenie przepuszczalności dla albuminy warstwy podocytów (transfekowanych niespecyficznym siRNA) po długotrwałym narażeniu komórek na działanie wysokiego stężenia glukozy, który to efekt był częściowo zależny od wzrostu ciśnienia osmotycznego. Po wyciszeniu autofagii obserwowano większą (o ok. 25%) przepuszczalność podocytów dla albuminy, aczkolwiek efekt ten nie był statystycznie znamieny. Po długotrwałym działaniu wysokiego stężenia glukozy, przepuszczalność dla albuminy podocytów z wyciszoną autofagią zwiększyła się do poziomu, jaki był obserwowany także w komórkach kontrolnych (transfekowanych ns siRNA) hodowanych przez 5 dni w HG, z czego można wnioskować, iż pomimo zahamowanej autofagii podocyty mogą uruchamiać inne mechanizmy obronne/adaptacyjne, które pozwalają w pewnym stopniu kompensować uszkodzenia powodowane przez czynniki zewnętrzne (np. HG). Jednym z takich mechanizmów adaptacyjnych może być hipertrofia podocytów, obserwowana między innymi w kłębuszkach nerkowych chorych na cukrzycę, a także w cukrzycowych modelach zwierzęcych i hodowlach komórkowych. Hipertrofia podocytów w HG jest wynikiem deregulacji wielu ścieżek sygnalizacyjnych, między innymi, nadmiernej aktywacji szlaku kinazy mTOR [156], oksydazy NAD(P)H [157], a także zwiększenia ilości inhibitorów kinaz zależnych od cyklin (p27, p21) [158]. Wykazano także, że hipertrofia podocytów poprzedza apoptozę w kłębuszkach szczurów z doświadczalnie wywołaną cukrzycą [159]. Rola autofagii w regulacji hipertrofii podocytów dotychczas nie była zbadana, choć mogłoby to być zasadne biorąc pod uwagę to, że oba procesy posiadają wspólne ścieżki sygnałowe (np. szlak mTOR) modulowane w przebiegu cukrzycy.

W warunkach fizjologicznych, zwiększone stężenie insuliny stymuluje szybki wychwyt glukozy przez podocyty dzięki przemieszczaniu transporterów glukozy do błony komórkowej, reorganizacji cytoszkieletu aktynowego i zwiększeniu ilości

kanałów potasowych i wapniowych w błonie komórkowej [28, 99]. Zaburzenie funkcji podocytów w cukrzycy typu 2 jest bezpośrednio związane z utratą insulino-wrażliwości, będącej skutkiem niekorzystnego i wieloczynnikowego działania środowiska hiperglikemicznego. Na podstawie badań przeprowadzonych wcześniej w naszym zespole, przyjęto, że insulinooporność podocytów rozwija się po 5 dniach hodowli w obecności wysokiego stężenia glukozy (30 mM), czego wykładnikiem jest brak aktywacji dokomórkowego transportu glukozy po stymulacji podocytów insuliną (300 nM, 3 min) [152]. W obecnej pracy zbadano, jaką rolę może mieć proces autofagii w rozwoju insulinooporności podocytów, indukowanej długotrwałym działaniem wysokiego stężenia glukozy. Po zahamowaniu autofagii (siRNA Atg5) i inkubacji podocytów w warunkach HG przez 5 dni stwierdzono brak aktywacji dokomórkowego transportu 2-DG po stymulacji insulinowej, a szybkość transportu 2-DG była porównywalna z komórkami kontrolnymi (transfekowanymi niespecyficznym siRNA). Stąd wydaje się, że zahamowanie procesu autofagii w podocytach w warunkach hiperglikemicznych nie jest przyczyną rozwoju ich insulinooporności, lecz może być następstwem mniejszej wrażliwości podocytów na działanie insuliny, rozwijającej się wskutek długotrwałego narażenia komórek na działanie wysokiego stężenia glukozy.

## 7. Wnioski

1. Podocyty szczurze hodowli pierwotnej, niepobudzone egzogennymi czynnikami, wykazują cechy morfologiczne i biochemiczne charakterystyczne dla autofagii, co sugeruje, iż autofagia w warunkach fizjologicznych może służyć zachowaniu integralności warstwy podocytarnej bariery filtracyjnej kłębuszków nerkowych.
2. Egzogenna insulina indukuje, za pośrednictwem reaktywnych form tlenu, proces autofagii na etapie dojrzewania i zamykania struktur autofagalnych w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej.
3. Autofagia warunkuje efektywne działanie insuliny w zakresie aktywności dokomórkowego transportu glukozy i przepuszczalności dla albuminy w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej.
4. Środowisko pozakomórkowe charakteryzujące się wysokim stężeniem glukozy powoduje obniżenie aktywności autofagii w podocytach szczurzych hodowli pierwotnej, co przyczynia się do zmniejszenia ich przeżywalności.
5. Zmiany aktywności autofagii w podocytach wywołane przez czynniki obecne w środowisku pozakomórkowym – hiperinsulinemię i hiperglikemię – jakie występują na początkowym etapie rozwoju cukrzycy typu 2, mogą być jednym z patomechanizmów nefropatii cukrzycowej prowadzącym do uszkodzenia przepuszczalności kłębuszkowej bariery filtracyjnej.

## 8. Piśmiennictwo

1. Roscioni, S.S., i wsp., *Microalbuminuria: target for renoprotective therapy PRO*. *Kidney Int*, 2014. **86**(1): p. 40-49.
2. Angielski, S. i Jankowski, M., *Anatomia i fizjologia nerek. W: Nefrologia*. 2004, Czelej.: Lublin.
3. Dane, M.J., i wsp., *A microscopic view on the renal endothelial glycocalyx*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2015. **308**(9): p. F956-66.
4. Scott, R.P. i Quaggin, S.E., *Review series: The cell biology of renal filtration*. *J Cell Biol*, 2015. **209**(2): p. 199-210.
5. Jeansson, M., i wsp., *Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(1): p. 114-122.
6. Nieuwdorp, M., i wsp., *Endothelial glycocalyx damage coincides with microalbuminuria in type 1 diabetes*. *Diabetes*, 2006. **55**(4): p. 1127-1132.
7. Broekhuizen, L.N., i wsp., *Effect of sulodexide on endothelial glycocalyx and vascular permeability in patients with type 2 diabetes mellitus*. *Diabetologia*, 2010. **53**(12): p. 2646-2655.
8. Salmon, A.H., i wsp., *Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction*. *J Am Soc Nephrol*, 2012. **23**(8): p. 1339-1350.
9. Haraldsson, B., i wsp., *Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria*. *Physiol Rev*, 2008. **88**(2): p. 451-487.
10. Suleiman, H., i wsp., *Nanoscale protein architecture of the kidney glomerular basement membrane*. *Elife*, 2013. **2**: p. e01149.
11. Suh, J.H. i Miner, J.H., *The glomerular basement membrane as a barrier to albumin*. *Nat Rev Nephrol*, 2013. **9**(8): p. 470-477.
12. Gast, C., i wsp., *Collagen (COL4A) mutations are the most frequent mutations underlying adult focal segmental glomerulosclerosis*. *Nephrol Dial Transplant*, 2015.
13. Neal, C.R., i wsp., *Three-dimensional reconstruction of glomeruli by electron microscopy reveals a distinct restrictive urinary subpodocyte space*. *J Am Soc Nephrol*, 2005. **16**(5): p. 1223-1235.
14. Salmon, A.H., i wsp., *Evidence for restriction of fluid and solute movement across the glomerular capillary wall by the subpodocyte space*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2007. **293**(6): p. F1777-86.
15. Kriz, W. i K. Endlich, *Hypertrophy of podocytes: a mechanism to cope with increased glomerular capillary pressures?* *Kidney Int*, 2005. **67**(1): p. 373-374.
16. Faul, C., i wsp., *Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton*. *Trends Cell Biol*, 2007. **17**(9): p. 428-37.
17. Weide, T. i Huber, T.B., *Signaling at the slit: podocytes chat by synaptic transmission*. *J Am Soc Nephrol*, 2009. **20**(9): p. 1862-1864.
18. Saleem, M.A., i wsp., *The molecular and functional phenotype of glomerular podocytes reveals key features of contractile smooth muscle cells*. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2008. **295**(4): p. F959-70.
19. Marshall, C.B. i Shankland, S.J. *Cell cycle and glomerular disease: a minireview*. *Nephron Exp Nephrol*, 2006. **102**(2): p. e39-48.
20. Lewko, B., i wsp., *Regulation of cGMP synthesis in cultured podocytes by vasoactive hormones*. *J Physiol Pharmacol*, 2006. **57**(4): p. 599-610.
21. Pavenstadt, H., i wsp., *Cell biology of the glomerular podocyte*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(1): p. 253-307.
22. Smoyer, W.E. i Mundel, P., *Regulation of podocyte structure during the development of nephrotic syndrome*. *J Mol Med*, 1998. **76**(3-4): p. 172-83.
23. Hara, M., i wsp., *Urinary podocalyxin is an early marker for podocyte injury in patients with diabetes: establishment of a highly sensitive ELISA to detect urinary podocalyxin*. *Diabetologia*, 2012. **55**(11): p. 2913-2919.

24. Alter, M.L., i wsp., *Early urinary and plasma biomarkers for experimental diabetic nephropathy*. Clin Lab, 2012. **58**(7-8): p. 659-71.
25. Inoue, K. i Ishibe, S., *Podocyte endocytosis in the regulation of the glomerular filtration barrier*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **309**(5): p. F398-405.
26. Rigotherier, C., i wsp., *IQGAP1 interacts with components of the slit diaphragm complex in podocytes and is involved in podocyte migration and permeability in vitro*. PLoS One, 2012. **7**(5): p. e37695.
27. Liu, B.C., i wsp., *High glucose induces podocyte apoptosis by stimulating TRPC6 via elevation of reactive oxygen species*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1833**(6): p.1434-1442.
28. Coward, R.J., i wsp., *The human glomerular podocyte is a novel target for insulin action*. Diabetes, 2005. **54**(11): p. 3095-3102.
29. Lewko, B., i wsp., *Characterization of glucose uptake by cultured rat podocytes*. Kidney Blood Press Res, 2005. **28**(1): p. 1-7.
30. Coward, R.J., i wsp., *Nephrin is critical for the action of insulin on human glomerular podocytes*. Diabetes, 2007. **56**(4): p. 1127-1135.
31. Diaz-Delfin, J., i wsp., *Hypoglycemic action of thiazolidinediones/peroxisome proliferator-activated receptor gamma by inhibition of the c-Jun NH2-terminal kinase pathway*. Diabetes, 2007. **56**(7): p. 1865-1871.
32. Nakamura, T., i wsp., *Renoprotective Effects of Various Angiotensin II Receptor Blockers in Patients with Early-Stage Diabetic Nephropathy*. Kidney Blood Press Res, 2010. **33**(3): p. 213-220.
33. Lee, H.W., i wsp., *A Podocyte-Based Automated Screening Assay Identifies Protective Small Molecules*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(11): p. 2741-2752.
34. Sato, Y., i wsp., *Urine podocyte mRNAs mark progression of renal disease*. J Am Soc Nephrol. 2009. **20**(5): p. 1041-1052.
35. Lioudaki, E., i wsp., *Increased Urinary Excretion of Podocyte Markers in Normoalbuminuric Patients with Diabetes*. Nephron, 2015. **131**(1): p. 34-42.
36. Pagtalunan, M.E., i wsp., *Podocyte loss and progressive glomerular injury in type II diabetes*. J Clin Invest, 1997. **99**(2): p. 342-348.
37. Taneda, S., i wsp., *Podocyte and endothelial injury in focal segmental glomerulosclerosis: an ultrastructural analysis*. Virchows Arch, 2015. **467**(4):p.449-58.
38. Fukuda, A., i wsp., *Angiotensin II-dependent persistent podocyte loss from destabilized glomeruli causes progression of end stage kidney disease*. KidneyInt, 2012. **81**(1):p.40-55
39. Wolf, G., *New insights into the pathophysiology of diabetic nephropathy: from haemodynamics to molecular pathology*. Eur J Clin Invest, 2004. **34**(12): p. 785-796.
40. Lewko, B. i Stepinski, J., *Hyperglycemia and mechanical stress: targeting the renal podocyte*. J Cell Physiol, 2009. **221**(2): p. 288-295.
41. Ziyadeh, F.N. i Wolf, G., *Pathogenesis of the podocytopathy and proteinuria in diabetic glomerulopathy*. Curr Diabetes Rev, 2008. **4**(1): p. 39-45.
42. Daroux, M., i wsp., *Advanced glycation end-products: implications for diabetic and non-diabetic nephropathies*. Diabetes Metab, 2010. **36**(1): p. 1-10.
43. Jauregui, A., i wsp., *Role of altered insulin signaling pathways in the pathogenesis of podocyte malfunction and microalbuminuria*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2009. **18**(6): p. 539-545.
44. van Timmeren, M.M., i wsp., *Oleic acid loading does not add to the nephrotoxic effect of albumin in an amphibian and chronic rat model of kidney injury*. Nephrol Dial Transplant, 2008. **23**(12): p. 3814-3823.
45. Manda, G., i wsp., *Redox Signaling in Diabetic Nephropathy: Hypertrophy versus Death Choices in Mesangial Cells and Podocytes*. Mediators Inflamm, 2015. **2015**: p. 604208.
46. Wiggins, J.E., i wsp., *Podocyte hypertrophy, "adaptation," and "decompensation" associated with glomerular enlargement and glomerulosclerosis in the aging rat: prevention by calorie restriction*. J Am Soc Nephrol, 2005. **16**(10): p. 2953-2966.



47. Zhou, L. i Liu, Y., *Wnt/beta-catenin signalling and podocyte dysfunction in proteinuric kidney disease*. Nat Rev Nephrol, 2015. **11**(9): p. 535-545.
48. Kobayashi, N., i wsp., *Podocyte injury-driven intracapillary plasminogen activator inhibitor type 1 accelerates podocyte loss via uPAR-mediated beta1-integrin endocytosis*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **308**(6): p. F614-26.
49. Schiffer, M., i wsp., *Apoptosis in podocytes induced by TGF-beta and Smad7*. J Clin Invest, 2001. **108**(6): p. 807-816.
50. Zhang, Y., i wsp., *High glucose increases Cdk5 activity in podocytes via transforming growth factor-beta1 signaling pathway*. Exp Cell Res, 2014. **326**(2): p. 219-229.
51. Das, R., i wsp., *Transforming Growth Factor beta1-induced Apoptosis in Podocytes via the Extracellular Signal-regulated Kinase-Mammalian Target of Rapamycin Complex 1-NADPH Oxidase 4 Axis*. J Biol Chem, 2015. **290**(52): p. 30830-30842.
52. Susztak, K., i wsp., *Glucose-induced reactive oxygen species cause apoptosis of podocytes and podocyte depletion at the onset of diabetic nephropathy*. Diabetes, 2006. **55**(1): p. 225-233.
53. Kanwar, Y.S., i wsp., *Diabetic nephropathy: mechanisms of renal disease progression*. Exp Biol Med (Maywood), 2008. **233**(1): p. 4-11.
54. Ilatovskaya, D.V., i wsp., *Podocyte injury in diabetic nephropathy: implications of angiotensin II - dependent activation of TRPC channels*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 17637.
55. Tsujimoto, Y. i Shimizu, S., *Another way to die: autophagic programmed cell death*. Cell Death Differ, 2005. **12 Suppl 2**: p. 1528-1534.
56. Yu, L., i wsp., *Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation*. Proc Natl Acad Sci, 2006. **103**(13): p. 4952-4957.
57. Zeng, C., i wsp., *Podocyte autophagic activity plays a protective role in renal injury and delays the progression of podocytopathies*. J Pathol, 2014. **234**(2): p. 203-213.
58. Shang, L., i wsp., *Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation and its subsequent dissociation from AMPK*. Proc Natl Acad Sci, 2011. **108**(12): p. 4788-4793.
59. Itakura, E., i wsp., *Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG*. Mol Biol Cell, 2008. **19**(12): p. 5360-5372.
60. Tagawa, A., i wsp., *Impaired Podocyte Autophagy Exacerbates Proteinuria in Diabetic Nephropathy*. Diabetes, 2016. **65**(3): p. 755-767.
61. Kawakami, T., i wsp., *Deficient Autophagy Results in Mitochondrial Dysfunction and FSGS*. J Am Soc Nephrol, 2015. **26**(5): p. 1040-1052.
62. Shengyou, Y. i Li, Y., *The effects of siRNA-silenced TRPC6 on podocyte autophagy and apoptosis induced by AngII*. J Renin Angiotensin Aldosterone Syst, 2015. **16**(4): p. 1266-1273.
63. Yamahara, K., i wsp., *The role of autophagy in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. J Diabetes Res, 2013. **2013**: p. 193757.
64. Tagawa, A., i wsp., *Impaired podocyte autophagy exacerbates proteinuria in diabetic nephropathy*. Diabetes, 2015. **65**(3): p. 755-767.
65. Yasuda-Yamahara, M., i wsp., *Emerging role of podocyte autophagy in the progression of diabetic nephropathy*. Autophagy, 2015. **11**(12): p. 2385-2386.
66. Ma, T., i wsp., *High glucose induces autophagy in podocytes*. Exp Cell Res, 2013. **319**(6): p. 779-789.
67. Lenoir, O., i wsp., *Endothelial cell and Podocyte Autophagy Synergistically protect from Diabetes-induced Glomerulosclerosis*. Autophagy, 2015. **11**(7):1130-1145.
68. Fang, L., i wsp., *Autophagy attenuates diabetic glomerular damage through protection of hyperglycemia-induced podocyte injury*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60546.
69. Inoki, K., i wsp., *mTORC1 activation in podocytes is a critical step in the development of diabetic nephropathy in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2181-2196.
70. Godel, M., i wsp., *Role of mTOR in podocyte function and diabetic nephropathy in humans and mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(6): p. 2197-2209.
71. Inoki, K. i Huber, T.B., *Mammalian target of rapamycin signaling in the podocyte*. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2012. **21**(3): p. 251-257.

72. Kim, J., i wsp., *AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1*. Nat Cell Biol, 2011. **13**(2): p. 132-141.
73. Cina, D.P., i wsp., *Inhibition of MTOR disrupts autophagic flux in podocytes*. J Am Soc Nephrol, 2012. **23**(3): p. 412-420.
74. Narita, M., i wsp., *Spatial coupling of mTOR and autophagy augments secretory phenotypes*. Science, 2011. **332**(6032): p. 966-970.
75. Steinberg, G.R. i Kemp, B.E., *AMPK in Health and Disease*. Physiol Rev, 2009. **89**(3): p. 1025-1078.
76. He, C. i Klionsky, D.J., *Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy*. Annu Rev Genet, 2009. **43**: p. 67-93.
77. Alers, S., i wsp., *Role of AMPK-mTOR-Ulk1/2 in the regulation of autophagy: cross talk, shortcuts, and feedbacks*. Mol Cell Biol, 2012. **32**(1): p. 2-11.
78. Kume, S., i wsp., *Role of nutrient-sensing signals in the pathogenesis of diabetic nephropathy*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 315494.
79. Hou, X., i wsp., *SIRT1 regulates hepatocyte lipid metabolism through activating AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2008. **283**(29): p. 20015-20026.
80. Canto, C., i wsp., *AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity*. Nature, 2009. **458**(7241): p. 1056-1060.
81. Dong, Y.J., i wsp., *Renal protective effect of sirtuin 1*. J Diabetes Res, 2014. **2014**: p. 843786.
82. Tanaka, Y., i wsp., *Autophagy as a therapeutic target in diabetic nephropathy*. Exp Diabetes Res, 2012. **2012**: p. 628978.
83. Papadimitriou, A., i wsp., *Theobromine increases NAD(+)/Sirt-1 activity and protects the kidney under diabetic conditions*. Am J Physiol Renal Physiol, 2015. **308**(3): p. F209-25.
84. Lee, I.H., i wsp., *A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy*. Proc Natl Acad Sci, 2008. **105**(9): p. 3374-3379.
85. Chuang, P.Y., i wsp., *In vivo RNA interference models of inducible and reversible Sirt1 knockdown in kidney cells*. Am J Pathol, 2014. **184**(7): p. 1940-1956.
86. Cao, Y., i wsp., *SIRT1 and insulin resistance*. J Diabetes Complications, 2016. **30**(1): p. 178-183.
87. Scherz-Shouval, R., i wsp., *Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4*. EMBO J, 2007. **26**(7): p. 1749-1760.
88. Scherz-Shouval, R. i Z. Elazar, *ROS, mitochondria and the regulation of autophagy*. Trends Cell Biol, 2007. **17**(9): p. 422-427.
89. Huang, J., i wsp., *Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases*. Proc Natl Acad Sci, 2009. **106**(15): p. 6226-6231.
90. Scherz-Shouval, R. i Elazar, Z., *Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology*. Trends Biochem Sci, 2011. **36**(1): p. 30-38.
91. Wang, Q., i wsp., *2-Deoxy-D-glucose treatment of endothelial cells induces autophagy by reactive oxygen species-mediated activation of the AMP-activated protein kinase*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17234.
92. Zhang, L., i wsp., *Redox signaling: Potential arbitrator of autophagy and apoptosis in therapeutic response*. Free Radic Biol Med, 2015. **89**: p. 452-465.
93. Zmijewski, J.W., i wsp., *Exposure to hydrogen peroxide induces oxidation and activation of AMP-activated protein kinase*. J Biol Chem, 2010. **285**(43): p. 33154-33164.
94. Hildeman, D.A., i wsp., *Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species*. Proc Natl Acad Sci, 2003. **100**(25): p. 15035-15040.
95. Wong, C.H., i wsp., *Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation*. PLoS One, 2010. **5**(4): p. e9996.
96. Yang, Z. i Klionsky, D.J., *Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation*. Curr Opin Cell Biol, 2010. **22**(2): p. 124-131.

97. Ni, Z., i wsp., *HCC cells with high levels of Bcl-2 are resistant to ABT-737 via activation of the ROS-JNK-autophagy pathway*. Free Radic Biol Med, 2014. **70**: p. 194-203.
98. De Rechter, S., i wsp., *Autophagy in renal diseases*. Pediatr Nephrol, 2015. **31**(5):737-752.
99. Welsh, G.I., i wsp., *Insulin signaling to the glomerular podocyte is critical for normal kidney function*. Cell Metab, 2010. **12**(4): p. 329-340.
100. Kim, E.Y., i wsp., *Insulin increases surface expression of TRPC6 channels in podocytes: role of NADPH oxidases and reactive oxygen species*. Am J Physiol Renal Physiol, 2012. **302**(3): p. F298-307.
101. Goginashvili, A., i wsp., *Insulin granules. Insulin secretory granules control autophagy in pancreatic beta cells*. Science, 2015. **347**(6224): p. 878-882.
102. Shi, L., i wsp., *Dihydromyricetin improves skeletal muscle insulin sensitivity by inducing autophagy via the AMPK-PGC-1alpha-Sirt3 signaling pathway*. Endocrine, 2015. **50**(2): p. 378-389.
103. Zhang, Y., i wsp., *Role of the ubiquitin-proteasome system and autophagy in regulation of insulin sensitivity in serum-starved 3T3-L1 adipocytes*. Endocr J, 2015. **62**(8): p. 673-686.
104. Liu, Y., i wsp., *Adiponectin stimulates autophagy and reduces oxidative stress to enhance insulin sensitivity during high-fat diet feeding in mice*. Diabetes, 2015. **64**(1): p. 36-48.
105. Liu, X., i wsp., *AMPK binds to Sestrins and mediates the effect of exercise to increase insulin-sensitivity through autophagy*. Metabolism, 2015. **64**(6): p. 658-665.
106. Ezaki, J., i wsp., *Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels*. Autophagy, 2011. **7**(7): p. 727-736.
107. He, C., i wsp., *Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 511-515.
108. Zhou, L., i wsp., *Autophagy-mediated insulin receptor down-regulation contributes to endoplasmic reticulum stress-induced insulin resistance*. Mol Pharmacol, 2009. **76**(3): p. 596-603.
109. Mundel, P. i Kriz, W., *Cell culture of podocytes*. Exp Nephrol, 1996. **4**(5): p. 263-266.
110. Kume, S. i Koya, D., *Autophagy: A Novel Therapeutic Target for Diabetic Nephropathy*. Diabetes Metab J, 2015. **39**(6): p. 451-460.
111. Yamamoto-Nonaka, K., i wsp., *Cathepsin D in Podocytes Is Important in the Pathogenesis of Proteinuria and CKD*. J Am Soc Nephrol, 2016.
112. Hartleben, B., i wsp., *Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice*. J Clin Invest, 2010. **120**(4): p. 1084-1096.
113. Zardooz, H., i wsp., *Plasma corticosterone, insulin and glucose changes induced by brief exposure to isoflurane, diethyl ether and CO2 in male rats*. Physiol Res, 2010. **59**(6): p. 973-978.
114. Piwkowska, A., i wsp., *Insulin increases glomerular filtration barrier permeability through dimerization of protein kinase G type Ialpha subunits*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1832**(6): p. 791-804.
115. Hale, L.J., i wsp., *Insulin directly stimulates VEGF-A production in the glomerular podocyte*. Am J Physiol Renal Physiol, 2013. **305**(2): p. F182-8.
116. Yamada, E., i wsp., *Synip phosphorylation is required for insulin-stimulated Glut4 translocation and glucose uptake in podocyte*. Endocr J, 2014. **61**(5): p. 523-527.
117. Mooradian, A.D. i Mariash, C.N., *Effects of insulin and glucose on cultured rat hepatocyte gene expression*. Diabetes, 1987. **36**(8): p. 938-943.
118. Hanada, T., i wsp., *The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy*. J Biol Chem, 2007. **282**(52): p. 37298-302.
119. Klionsky, D.J., i wsp., *Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy*. Autophagy, 2012. **8**(4): p. 445-544.

120. Mizushima, N., i wsp., *Methods in mammalian autophagy research*. Cell, 2010. **140**(3): p. 313-326.
121. Xu, Y., i wsp., *Autophagy downregulation contributes to insulin resistance mediated injury in insulin receptor knockout podocytes in vitro*. Peer J, 2016. **4**: p. e1888.
122. Scott, P.H., i wsp., *Evidence of insulin-stimulated phosphorylation and activation of the mammalian target of rapamycin mediated by a protein kinase B signaling pathway*. Proc Natl Acad Sci, 1998. **95**(13): p. 7772-7777.
123. Menon, S., i wsp., *Spatial control of the TSC complex integrates insulin and nutrient regulation of mTORC1 at the lysosome*. Cell, 2014. **156**(4): p. 771-785.
124. Liu, H.Y., i wsp., *Insulin is a stronger inducer of insulin resistance than hyperglycemia in mice with type 1 diabetes mellitus (T1DM)*. J Biol Chem, 2009. **284**(40) p. 27090-27100.
125. Gonzalez, E., i wsp., *Hyperinsulinemia leads to uncoupled insulin regulation of the GLUT4 glucose transporter and the FoxO1 transcription factor*. Proc Natl Acad Sci, 2011. **108**(25): p. 10162-10167.
126. Ciaraldi, T.P., i wsp., *Glucose transport in cultured human skeletal muscle cells. Regulation by insulin and glucose in nondiabetic and non-insulin-dependent diabetes mellitus subjects*. J Clin Invest, 1995. **96**(6): p. 2820-2827.
127. Dorsey, F.C., i wsp., *Mapping the phosphorylation sites of Ulk1*. J Proteome Res, 2009. **8**(11): p. 5253-5263.
128. Dunlop, E.A., i wsp., *ULK1 inhibits mTORC1 signaling, promotes multisite Raptor phosphorylation and hinders substrate binding*. Autophagy, 2011. **7**(7): p. 737-747.
129. Loffler, A.S., i wsp., *Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop*. Autophagy, 2011. **7**(7): p. 696-706.
130. Parzych, K.R. i Klionsky, D.J., *An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(3): p. 460-473.
131. Egan, D.F., i wsp., *Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy*. Science, 2011. **331**(6016): p. 456-461.
132. Di Bartolomeo, S., i wsp., *The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy*. J Cell Biol, 2010. **191**(1): p. 155-168.
133. Papinski, D., i wsp., *Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase*. Mol Cell, 2014. **53**(3): p. 471-483.
134. Russell, R.C., i wsp., *ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase*. Nat Cell Biol, 2013. **15**(7): p. 741-750.
135. Kang, R., i wsp., *The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis*. Cell Death Differ, 2011. **18**(4): p. 571-580.
136. Wu, C.A., i wsp., *Beclin-1-independent autophagy positively regulates internal ribosomal entry site-dependent translation of hypoxia-inducible factor 1alpha under nutrient deprivation*. Oncotarget, 2014. **5**(17): p. 7525-7539.
137. He, R., i wsp., *Divergent roles of BECN1 in LC3 lipidation and autophagosomal function*. Autophagy, 2015. **11**(5): p. 740-747.
138. Niso-Santano, M., i wsp., *Novel inducers of BECN1-independent autophagy: cis-unsaturated fatty acids*. Autophagy, 2015. **11**(3): p. 575-577.
139. Kimura, S., i wsp., *Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3*. Autophagy, 2007. **3**(5): p. 452-460.
140. Hetz, C., i wsp., *XBP-1 deficiency in the nervous system protects against amyotrophic lateral sclerosis by increasing autophagy*. Genes Dev, 2009. **23**(19): p. 2294-2306.
141. Lacoste, S., i wsp., *Granulocytes affect double-strand break repair assays in primary human lymphocytes*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e93185.
142. Mullins, C.S., i wsp., *Optimizing the process of nucleofection for professional antigen presenting cells*. BMC Res Notes, 2015. **8**: p. 472.
143. Wang, Y., i wsp., *ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy*. Autophagy, 2012.**8**(10):p.1462-1476.

144. Liu, G.Y., i wsp., *ROS activates JNK-mediated autophagy to counteract apoptosis in mouse mesenchymal stem cells in vitro*. *Acta Pharmacol Sin*, 2015. **36**(12): p. 1473-1479.
145. Aldieri, E., i wsp., *Classical inhibitors of NOX NAD(P)H oxidases are not specific*. *Curr Drug Metab*, 2008. **9**(8): p. 686-696.
146. Murphy, M.P., *How mitochondria produce reactive oxygen species*. *Biochem J*, 2009. **417**(1): p. 1-13.
147. Piwkowska, A., i wsp., *High glucose concentration affects the oxidant-antioxidant balance in cultured mouse podocytes*. *J Cell Biochem*, 2011. **112**(6): p. 1661-1672.
148. Al-Rubeai, M. i Fussenegger, M., *Cell Engineering: Apoptosis*. Vol. 4. 2006: Kluwer Academic Publishers.
149. Diez-Sampedro, A., i wsp., *Podocytopathy in diabetes: a metabolic and endocrine disorder*. *Am J Kidney Dis*, 2011. **58**(4): p. 637-646.
150. Riediger, F., i wsp., *Prorenin receptor is essential for podocyte autophagy and survival*. *J Am Soc Nephrol*, 2011. **22**(12): p. 2193-2202.
151. Qi, Y., i wsp., *Myocardial loss of IRS1 and IRS2 causes heart failure and is controlled by p38alpha MAPK during insulin resistance*. *Diabetes*, 2013. **62**(11): p. 3887-3900.
152. Jankowski, M., i wsp., *Expression of membrane-bound NPP-type ectophosphodiesterases in rat podocytes cultured at normal and high glucose concentrations*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **416**(1-2): p. 64-69.
153. Nunes, P., i wsp., *Hypertonic stress promotes autophagy and microtubule-dependent autophagosomal clusters*. *Autophagy*, 2013. **9**(4): p. 550-567.
154. Fukami, K., i wsp., *Role of AGEs in diabetic nephropathy*. *Curr Pharm Des*, 2008. **14**(10): p. 946-952.
155. Welsh, G.I. i Coward, R.J., *Podocytes, glucose and insulin*. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2010. **19**(4): p. 379-384.
156. Sakaguchi, M., i wsp., *Inhibition of mTOR signaling with rapamycin attenuates renal hypertrophy in the early diabetic mice*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. **340**(1): p. 296-301.
157. Gorin, Y., i wsp., *Nox4 NAD(P)H oxidase mediates hypertrophy and fibronectin expression in the diabetic kidney*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(47): p. 39616-39626.
158. Lee, S.H., i wsp., *Podocyte hypertrophy precedes apoptosis under experimental diabetic conditions*. *Apoptosis*, 2015. **20**(8):1056-1071.
159. Jung, D.S., i wsp., *Apoptosis occurs differentially according to glomerular size in diabetic kidney disease*. *Nephrol Dial Transplant*, 2012. **27**(1): p. 259-266.