

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**A TRPC6 és a melegszenzitív TRPV csatornák  
szerepe humán podocyták biológiai folyamatainak  
szabályozásában**

Kardosné Ambrus Lídia

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás



**DEBRECENI EGYETEM**  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

Debrecen, 2019

**A TRPC6 és a melegszenzitív TRPV csatornák szerepe  
humán podocyták biológiai folyamatainak szabályozásában**

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az Elméleti Orvostudományok tudományágban

Írta: Kardosné Ambrus Lídia  
okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Bíró Tamás, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus  
tagok: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora  
Dr. Szőke Éva, PhD

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet, ÉTK 2.303. szoba  
2017. szeptember 7. 12 óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora  
Dr. Sántha Péter, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus  
tagok: Prof. Dr. Papp Zoltán, az MTA doktora  
Dr. Szőke Éva, PhD  
Prof. Dr. Tóth Attila, az MTA doktora  
Dr. Sántha Péter, PhD

Az értekezés védésének helyszíne és időpontja: Debreceni Egyetem ÁOK,  
Bőrgyógyászati Intézet tanterme  
2019. október 14. 11 óra

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### **A vese szerepe a kiválasztásban és a filtrációs barrier**

A vese legfőbb feladata a szervezet homeosztázisának fenntartása, melyet kiválasztó működése révén az elektrolitok és a vízháztartás állandó szinten tartásával ér el. A vizeletképzés a glomerulusokban kezdődik, ahol a kapillárisokból filtráció során Starling-erők hatására folyadék szűrődik át a Bowman-tok ürterébe. Ennek a filtrátumnak az összetétele a tubulusrendszeren áthaladva jelentősen módosul a szabályozott reabszorpció, vagy szekréció által, így jön létre a végleges vizelet, mely az ureteren keresztül, távozik a veséből.

A glomerulus kapilláris fal három különálló, de mégis szorosan egymásra ható rétegből áll. A legbelső réteget a fenesztrált endothelium képezi, míg a legkülső réteget a podocyták alkotják. A glomeruláris fal harmadik eleme az endothelium és a podocyták között található glomeruláris bazál membrán (GBM). A glomeruláris kapilláris fal, vagyis ez a három réteg képezi a filtrációs barrier, melyen keresztül létrejövő ultrafiltráció függ a vérben keringő anyagok méretétől, töltésétől, valamint a glomerulusban lévő nettó filtrációs nyomástól. Fiziológias körülmények között a nettó filtrációs nyomás 15 Hgmm, mely a kapillárisból a Bowman-tok felé, azaz a filtráció irányába hat.

A filtrációs barrier elemei különböző mértékben és más-más adottságaikkal járulnak hozzá a szűréshez. A glomeruláris kapillárisok különböznek a szervezet más területein lévő kapillárisoktól. Itt a kapillárisfalban nincs körkörös simaizom gyűrű, valamint erősen perforált, mivel az endothel sejtek rétege nem folyamatos, ezért a sejtek között 60-100 nm-es pórusok, fenesztrák alakultak ki. Így az endothelium a nagyméretű rések és a hiányzó diaphragma miatt nem jelent számottevő gátat a vérben keringő anyagok számára. Annál nagyobb jelentőséggel bír a töltés szerinti szűrés szempontjából, mivel az endothel sejtek közti fenesztrákat a luminális oldal felől bonyolult szerkezetű glycocalyx fedi, mely erősen negatív töltésű.

A GBM szerkezetileg nem amorf, az alkotó fibrillumok egy magasan szervezett labirintusa, mely heterogén pórusokat formál. Ezek a 4-10 nm átmérőjű pórusok teszik lehetővé, hogy a GBM fizikai szűrőként funkcionáljon, és ne engedje át a 10 nm-nél nagyobb molekulákat. Mivel számos negatív töltéssel rendelkező alkotója van, töltés barrierként is szerepelhet, viszont ez nem túl hatékony szűrést biztosít. Ha töltés szempontjából nem is olyan meghatározó a GBM, viszont szerkezetét és elhelyezkedését tekintve annál nagyobb jelentősége van, hiszen fizikailag is összeköti az endotheliumot a podocyták rétegével, így stabilizálja a glomeruláris filtrációs barrieret. Ha molekuláris szerkezete zavart szenved, súlyos proteinúriával járó betegségek alakulnak ki.

A podocyták a glomeruláris kapilláris fal legdisztálisabb rétegét képezik. Szerkezeti integritásuk kulcs fontosságú a glomeruláris filtrációs barrier kialakításában és fenntartásában. A podocyták más szempontból is lényeges szerepet kapnak, ezért multifunkcionális sejteknek mondhatók, hiszen ezek a sejtek termelik az endothel sejtek fejlődését, proliferációját, túlélését segítő proangiogén faktorokat, melyek közül a legfontosabb az érendothel növekedési faktor-A (VEGFA). Valamint a podocyták az endothel sejtekkel együtt részt vesznek a GBM kialakításában, mivel az  $\alpha 1\alpha 1\alpha 2$  (IV)-es kollagént az endothel termeli, az  $\alpha 3\alpha 4\alpha 5$  (IV)-es kollagént, pedig a podocyták.

A glomeruláris filtrációs apparátus mindhárom rétegének épsége szükséges a fiziológias filtráció létrejöttéhez, ha bármely réteg a háromból sérül proteinuria jön létre.

### **A podocyták és a podocyta eredetű betegségek kialakulása**

A legtöbb vesekárosodás első jele a proteinuria, mely korai következménye a podocytakárosodásnak. A podocyták terminálisan differenciált epithel sejtek, melyek egyedi és komplex sejtes szerveződésűek. A differenciált podocyták arborikus sejtesttel rendelkeznek, melyek különböző projekciókat

képeznek: a főnyúlványokat mikrotubulusok és intermedier filamentumok merevítik, míg a finomabb lábnyúlványok aktinban gazdag kitüremkedések, melyek fokális adhéziók révén kapcsolódnak a GBM-hoz. A szomszédos podocyták lábnyúlványai egy speciális sejtkapcsoló komplex, a résmembrán (slit diaphragm, SD) által fizikailag összekapcsolódnak, így képezik az utolsó kilépési gátat a primer filtrátummal szemben. A résmembrán a tight junctionhoz hasonló szoros illeszkedést biztosít a két sejt között, viszont alkotó fehérjéi közül hiányzik az e-kadherin, és szerkezetileg porózus. Az elmúlt két évtizedben a komplexet alkotó majd minden fehérjéről, vagy azokkal egy jelátviteli rendszerben lévő számos proteinnél kiderült, hogy mutációjuk, illetve nem megfelelő működésük szerepet játszik proteinuriával járó vesebetegségek kialakulásában.

A tartósan fennálló stresszorok hatására a podocyták patológiás átalakuláson mennek keresztül, amelynek központi mechanizmusa az ún. „foot process effacement” (FPE). A folyamat során a podocyták felszíne simább lesz, a lábnyúlványok rövidülnek, illetve fokozatosan egyszerűsödnek, visszahúzódnak, ezáltal ritkábban fordulnak elő a filtrációs rések. Ez a barrier funkciók súlyos károsodásához vezethet, ami végső soron proteinuriában nyilvánul meg. Számos kutatás számol be a podocyták molekuláris károsodásáról, illetve a proteinuria és a glomerulosclerosis kapcsolatáról. A fokális szegmentális glomerulosclerosis (FSGS) egy patológiás állapot, amely a podocytopathia következtében alakul ki, proteinuriával, nephrosis szindrómával jellemezhető, és meglehetősen gyakran a vesefunkció elvesztéséhez vezet. A FSGS-nak három formáját különítjük el: a degeneratív változások a klasszikus, az inflammatórikus események a félhold, míg a dedifferenciálódás a kollapszusos FSGS kialakulásához vezet.

Az elmúlt 20 évben megnőtt az idiopathiás FSGS megbetegedések előfordulása, melynek kialakulásáért mind genetikai okok, mind környezeti hatások egyaránt felelősek lehetnek. Genetikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy számos esetben a podocyták működésében fontos szerepet betöltő fehérjék

mutációja áll a betegség hátterében. Az SD komplex ioncsatornájának a tranziens receptor potenciál klasszikus (TRPC) családba tartozó TRPC6 fehérjének (TRPC6) a *gain-of-function* mutációja egy meglehetősen agresszív autoszómális domináns FSGS betegséget okoz.

### **TRP ioncsatornák a vesében és a TRPC6**

A tranziens receptor potenciál proteinek (TRP) családjába 50 fehérje tartozik, melyek közül 28 emlősökben expresszálódik. Ezeket szekvencia homológia alapján 6 alcsaládba soroljuk: klasszikus (TRPC), vanilloid (TRPV), melasztatin (TRPM), ankirin (TRPA), policisztin (TRPP) és mukolipin (TRPML). A TRPC alcsalád tagjai mutatják a legnagyobb homológiát a *Drosophila* TRP génnel, ezért kapták a klasszikus TRP elnevezést.

A TRP csatornák szerkezetére jellemző, hogy négy, hat transzmembrán doménből álló alegység (TM1-6) alkot egy funkcionális csatornát, ahol a TM5 és TM6 között lévő hurkok formálják a kation áteresztő pórust. A citoplazmatikus N- és C-terminálisok számos regulatórikus domént tartalmaznak, melyek szabályozzák a csatorna nyitását.

A legtöbb TRP csatorna  $\text{Ca}^{2+}$ -ra permeábilis, ezért az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  ( $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ ) jelátvitel modulátorainak tekinthetők. Számos ingerlékeny és nem-ingerlékeny szövetben megtalálhatóak, éppen ezért szerteágazó funkciókban vesznek részt: egészen a szenzoros működéstől, a homeosztatisz funkciókig, a motoros működéseken, izomkontrakción, vazo-motoros reguláción át. A vese jól mutatja, hogy a TRP csatornák milyen széleskörű funkcióval bírnak, hiszen számos TRP csatorna expresszálódik végig a nephronban, melyek elengedhetetlenek a vese fiziológiás működéséhez. Egyre több bizonyíték szolgál arra, hogy a csatornákat érintő változások szerepet játszanak szerzett és öröklött vesebetegségekben. Ismert, hogy a TRPC6 csatorna *gain-of-function* mutációja FSGS-hoz vezet. A TRPP2 malformációja autoszómális-domináns policisztás vesebetegség kialakulását eredményezi, a TRPM6 fehérje mutációja

másodlagos hypokalaemiával kísért hypomagnesaemiát okoz, valamint a TRPV1 csatorna károsodása renális hipertenzióban játszik szerepet. A TRPV5, TRPV6 és TRPM6 a disztális tubulus epithel sejtjeiben elengedhetetlenek a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{Mg}^{2+}$  reabszorpciójához.

A TRPC6 a vesében a glomerulus mindhárom sejtfeleségében expresszálódik: a podocytákban, az endothel és a mesangiális sejtekben is, illetve a gyűjtőcsatorna területén. A podocyták membránjában SD proteinekkel interakcióban részt vesz a filtrációs barrier kialakításában. Podocinnal, nephrinnel,  $\alpha$ -aktinin-4-gyel és más SD fehérjékkel komplexet alkotva esszenciális szerepet tölt be a podocyta funkciók ellátásában. A TRPC6 csatorna és a nephrin kapcsolata igen fontos, mivel a nephrin kötődve a foszforilált TRPC6-hoz megakadályozza a TRPC6 transzlokációját. A megemelkedett TRPC6 expresszió általános jelenség a proteinuriával járó vesebetegségekben. A TRPC6 funkcionálisan kapcsolódik az aktinhálózathoz, mely átrendeződik csatorna overexpressziója esetén. Mindez arra utal, hogy a TRPC6 szerepet játszik a patológiás állapotok létrehozásában. Kóros körülmények között aktiválódása, megemelkedett  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -t eredményez, mely az SD abnormalitásához és/vagy a lábnyúlványok csökkenéséhez vezet. Számos esetben a TRPC6 aktivációja felerősíti a kóros folyamatokat.

A TRPC6 ioncsatorna a TRP szupercsalád klasszikus családjának tagja. A TRPC csatornák nem szelektív kation csatornaként funkcionálnak,  $\text{Na}^+$ -okat és  $\text{Ca}^{2+}$ -okat engednek be a sejtbe. A TRPC6 csatornát közvetlenül aktiválja a diacilglicerol (DAG) és származékai, a protein kináz C (PKC) rendszertől függetlenül, ezért a DAG „klasszikus receptorának” nevezhető. Emellett  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -hoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak is szabályozhatják működését. A felszabaduló  $\text{Ca}^{2+}$  a DAG-lal együtt PKC enzimeket aktivál, melyek szabályozzák számos a  $\text{Ca}^{2+}$ -jelátvitelben szerepet játszó protein, így TRP csatornák aktivitását is.

## A protein kináz C (PKC) rendszer

A PKC izoenzimek olyan lipid-aktivált szerin/treonin protein kinázok, melyek számos szignalizációs útvonal részeként nagyon sokféle sejtfolyamat szabályozásában vesznek részt. Működésükre általánosan jellemző, hogy receptoraktivációt követően a foszfolipáz C (PLC) enzim hasítja a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP<sub>2</sub>) DAG-ra és inozitol 1,4,5-trifoszfátra (IP<sub>3</sub>), melyek további útvonalakat indítanak el. A DAG aktiválja a PKC izoenzimeket, melyek különböző fehérjéket foszforilálnak, míg az IP<sub>3</sub> hozzájárul az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub> emelkedéséhez.

A PKC alcsalád 10 tagot számlál, melyek aktivációs mintázatuk alapján három csoportra különülnek. Az első csoport a klasszikus PKC izoenzimeket (cPKC) foglalja magába, ezek a PKC $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$  és - $\gamma$ , melyek aktiválódásukhoz DAG-t, vagy analógjait, mint a forbol 12-mirisztát 13-acetátot (PMA) és Ca<sup>2+</sup>-ot is igényelnek. A második csoportba a novel PKC-k (nPKC) tartoznak, melyek Ca<sup>2+</sup>-inszenzitív izoenzimek, csak DAG-ra érzékenyek, ezek a PKC $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\eta$  és - $\theta$ . A harmadik csoport pedig a DAG- és Ca<sup>2+</sup>-inszenzitív atípusos PKC-k (aPKC) családja, melynek két tagja van, a PKC $\lambda/\iota$  és - $\zeta$ .

2001-ben írták le először, hogy a PKC rendszer negatívan szabályozza a TRPC6 ioncsatornát. A TRPC6-ot közvetlenül nem aktiválja a PKC rendszer, de a PMA hatására indukált PKC enzim általi foszforiláció, szabályozza a csatorna működését, mégpedig csökkenti az aktivációját. A TRPC6-nak egy nem-kanonikus foszforilációs pontja, mégpedig a 488-as szerin (Ser<sup>488</sup>) aminosav az, ami a PKC $\delta$  izoenzim targetjeként szolgál, így a Ser<sup>488</sup> foszforilációja révén negatívan szabályozza a TRPC6 ioncsatorna működését.

A humán podocytaiban expresszálandó TRPC6 ioncsatorna PKC általi szabályozásáról az irodalomban mindeztidáig kutatási eredmény nem található.

## **Melegszenzitív TRPV csatornák a vesében**

A vesében a melegérzékelő TRPV csatornák közül a TRPV1 és TRPV4 játszik fontos szerepet. A TRPV1 csatorna központi jelentőségű a filtrációban, valamint a  $\text{Na}^+$  és víz homeosztázisban. Krónikus vesebetegségekben, a vese gyulladáshoz vezető folyamatokban, valamint akut vesebetegségekben a TRPV1 aktivátorok jótékony, renoprotektív hatásúak. A TRPV4 ioncsatorna a nephron vízimpermeábilis szakaszain expresszálódik. A renális epithel sejtekben ozmoszenzorként működik, de renális endothel és simaizom sejtekben is kifejeződik.

Arról azonban mindezt eddig irodalmi adat nincs, hogy a glomerulus podocytaiban mely TRPV csatornák expresszálódnak, illetve milyen funkcionális szerepet töltenek be a podocyta biológiai folyamataiban.

## CÉLKITŰZÉSEK

Vizsgálataink első felében célul tűztük ki a humán podocyta sejtvonalon expresszáldó TRPC6 ioncsatorna PKC rendszer általi esetleges szabályozásának elemzését.

Kísérleteinket differenciáltatott, kondicionálisan immortalizált humán podocyta sejtvonalon végeztük. Munkánk során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

1. Az általunk differenciáltatott humán podocyta sejtvonal expresszáldja-e a TRPC6 ioncsatornát, illetve az funkcionálisan aktiválható-e?
2. Mely PKC izoformák expresszáldódnak differenciáltatott humán podocytákon?
3. Mely PKC izoenzimek szabályozhatják a TRPC6 csatorna működését?

Kísérleteink második felében a melegszenzitív TRPV1-V4 csatornákat vizsgáltuk differenciáltatott humán podocytákon.

Felvetődő kérdéseink:

1. A melegérzékelő TRPV1-V4 ioncsatornák közül melyek expresszáldódnak differenciáltatott humán podocyta sejtvonalon?
2. A humán podocyták reagálnak-e hőstimulációra?
3. A TRPV1-V4 csatornák közül melyek funkcionálisan aktívak humán podocytákon?

# ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

## Alkalmazott kémiai anyagok

A kísérleteink során felhasznált anyagokból a kezeléshez szükséges koncentrációhoz képest ezerszeres törzseket készítettünk az anyagok megfelelő oldószerével. Közvetlenül a kísérletek megkezdése előtt a törzseket tenyésztőoldatban ezerszeresére hígítva értük el a végkoncentrációt, így kezeléskor az oldószer mennyisége legfeljebb 0,1 % volt.

## Sejttenyésztés

Az immortalizált humán podocytaikat nephrectomiából származó podocytaikból hozták létre. Az izolált sejteket hőmérséklet-szenzitív tsA58 T-antigénnel transzfektáltak, így a sejtek 33°C-os közegben képesek proliferálni, majd „nem-permisszív” hőmérsékleten tartva őket (37°C) differenciálódnak. A differenciálódás nyomán következő, hiszen a proliferáló, macskaköszterű sejtek megnövekedett sejttessel, nyúlványok fejlesztésével arborikus alakot vesznek fel, illetve továbbra is expresszálják a podocytaikra jellemző fehérjéket (WT-1, nephrin, podocin), és megjelenik a synaptopodin citoskeletális fehérje, mely így differenciálódási markernek tekinthető.

Kísérleteink során a podocytaikat 33°C-on, „permisszív” közegben, 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú párasított atmoszférában RPMI-1640 tápoldatban tenyésztettük, melyet 10% foetalis borjú savóval, 50 U/ml penicillinnel, 50 µg/ml streptomycinnel, 1,25 µg/ml fungizonnal, illetve inzulin-transzferrin-szelén keverékével (1:100) egészítettük ki. A terminálisan differenciált tenyészet létrehozásához restriktív közeget alkalmaztunk, egy hétig 37°C-os termosztált („nem-permisszív”) közegben inkubáltuk a sejteket, majd ezt követően a 7. napon végeztük el a méréseket.

A HEK293 sejteket 10% FBS-t, 50 U/ml penicillint, 50 µg/ml streptomycint, 1,25 µg/ml fungizont és 2 mM L-glutamint tartalmazó DMEM médiumban tenyésztettük 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú párasított közegben. A

HEK293T sejtek tápoldatát L-glutamin helyett nem-eszenciális aminosavak elegyével egészítettük ki. Mindkét sejtípus esetében a tenyésztés 37°C-os termosztátban, 5% CO<sub>2</sub>-tartalmú párásított közegben történt.

### **RNS izolálás, reverz transzkripció, hagyományos reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)**

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol reagenssel izoláltuk, melynek 1 µg-jából DNáz kezelést követően, „High Capacity cDNA Kit” és RNasin ribonukleáz inhibitor alkalmazásával GeneAmp® PCR System 2400 DNA Thermal Cycler készülékkel reverz transzkripciót (RT) végeztünk. A cDNS mintából polimeráz láncreakcióval (PCR) mutattuk ki a keresett transzkripteket. A PCR termékek elválasztása EZ-Vision DNS festékkel 1,5 %-os agaróz gélen történt.

### **Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR)**

A podocyta minták teljes RNS tartalmát TRIzol reagens segítségével izoláltuk, majd annak 1 µg-jából reverz transzkripciót követően, 5' nukleáz módszerrel, specifikus primerek és próbák alkalmazásával Q-PCR-t végeztünk a TaqMan Universal PCR Master Mix protokoll szerint. A génexpressziók relatív értékét minden esetben  $\Delta$ CT módszerrel, a megfelelő belső kontroll gén expressziós szintjére normalizálva határoztuk meg.

### **Immuncitokémia**

A podocytaikat 6 lyukú tenyésztőedényben steril fedőlemezre szélesztettük, és egy hétig differenciáltattuk. A 7. napon a lemezeket fixáltuk, permeabilizáltuk, majd blokkolást követően egy éjszakán át jelöltük elsődleges antitestekkel. Majd fluorescein-izotiocianáttal (FITC) konjugált másodlagos antitestek segítségével a fluoreszcens mikroszkóp számára láthatóvá tettük a fehérjéket. A sejtmagokat propidium-jodid, illetve DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festékek alkalmazásával jelöltük, majd konfokális mikroszkóppal képeket készítettünk.

## Western blot

A sejteket Petri-csészékbe szélesztettük, majd mintagyűjtéskor proteáz inhibitor koktélt tartalmazó detergens mixben vettük fel, és szonikátorral ultrahangos feltárást végeztünk. Ezután desztillált víz és nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapuffer hozzáadásával 1 mg/ml koncentrációjú mintákat készítettünk, majd poliakrilamid gélelektroforézissel (SDS-PAGE) elválasztottuk a fehérjéket, melyeket ezt követően nitrocellulóz membránra transzferáltunk. A szabad kötőhelyek blokkolására tejporos PBS-ben mostuk a membránokat, majd azokat egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitestek megfelelő hígításaival. Másnap, mosást követően torna-peroxidázzal konjugált másodlagos antitesttel jelöltük a membránokat, majd az immunjeleket kemilumineszcens SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate-Enhanced Chemiluminescence kittel tettük láthatóvá, és gél dokumentáló rendszerrel rögzítettük. A jelek intenzitását az optikai denzitás meghatározásával számszerűsítettük.

## Fluorimetriás $[Ca^{2+}]_{IC}$ mérése egysejtes elrendezésben

A differenciáltatott podocyták  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -jának mérését egyedi sejteken a Photon Technology International (PTI) Delta Scan™ rendszer segítségével határoztuk meg. A proliferáló podocytákat fedőlemezre szélesztettük, majd differenciáltatást követően fluoreszcens Fura-2 festék acetoximetilészter konjugált formájával (Fura-2 AM) inkubáltuk. A tápoldatot az extracelluláris észterázok gátlására neosztigminnel egészítettük ki. A festékkel töltött sejteket tartalmazó tárgylemezt egy speciális mérőkádban invertáló fluoreszcens mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük, és külső perfúziós rendszer segítségével adagoltuk a mérőanyagokat 0,35 ml/perces sebességgel a kiválasztott sejtre. A gerjesztő hullámhosszt kettős hullámhosszú monokromátorral (Delta Scan™ rendszer) a Fura-2 két állapotának megfelelően 340 nm (szabad molekula) és 380 nm ( $Ca^{2+}$ -t kötő molekula) között váltogattuk, majd az emissziót 510 nm-es

hullámhosszon fotoelektron-sokszorozóval detektáltuk. A jeleket 10 Hz-es mintavételi gyakorisággal rögzítettük. Az  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t a 340 ( $F_{340}$ ) és 380 ( $F_{380}$ ) nm-es hullámhosszokon mért fluoreszcencia intenzitások hányadosából számítottuk ki ( $R=F_{340}/F_{380}$ ).

### **Fluorimetriás $[Ca^{2+}]_{IC}$ mérése többsejtes elrendezésben**

A podocytaát 96 lyukú lemezre szélesztettük, majd differenciáltattuk. A mérés napján 1  $\mu$ M Fluo-4 AM festéket tartalmazó Hank oldattal inkubáltuk a sejteket, közben elkészítettük a kezelőanyagok megfelelő hígításait. A mérés során 494 nm excitációs és 516 nm emissziós hullámhosszok mellett detektáltuk a fluoreszcens jeleket, majd  $F_1/F_0$  összefüggésben ábrázoltuk, ahol  $F_0$  az agonista adagolása előtti alapvonal átlagos fluoreszcencia intenzitása, illetve  $F_1$  a kezelést követő aktuális fluoreszcencia intenzitás. Abban az esetben, ha gátlószert alkalmaztunk, a mérést megelőző 30 percben adagoltuk a sejtekhez az inhibitor megfelelő koncentrációját, és ezt követően végeztünk méréseket az agonisták hozzáadásával.

### **Patch-clamp mérés**

A podocytaát Petri-csészében differenciáltattuk, majd teljes sejtes elrendezésben vizsgáltuk a kezelőanyag elektrofiziológiai hatásait. A kísérlet alatt 0 mV tartópotenciál mellett mértük a transzmembrán áramokat, 2 másodpercenként 400 ms-os ciklushosszal -120 és +100 mV között változtatva a membránpotenciált.

### **Hőstimuláció**

A differenciáltatott podocytaát 1  $\mu$ M Fluo-4 AM festékkel töltöttük, majd invertáló fluoreszcens mikroszkóp segítségével, 9 másodpercenként képet készítettünk autofókusz módban. A mérés során 50°C-ra előmelegített puffert pipettáztunk a sejtek közvetlen környezetébe, mely a sejtekhez érve 40-45°C körüli lehetett. Kontroll esetben szobahőmérsékletű puffer oldatot alkalmaztunk.

## **RNS interferencia (RNSi)**

A podocytaikat Petri-csészékbe és a fluoreszcens kalciumszint mérésekhez 96 lyukú lemezekre szélesztettük, majd egy hétig differenciáltattuk. Szérummentes Optimem oldat felhasználásával 40 nM humán TRPV3 specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal transzfektáltuk a sejteket Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX transzfekciós reagens segítségével. A transzfekció negatív kontrolljaként Stealth RNAi Negative Control duplaszálú siRNS-t alkalmaztunk, ami semmilyen ismert mRNS szekvenciájával nem mutat homológiát. A kontroll csoportot pedig csak Optimem mediummal, transzfekciós reagenssel, illetve a megfelelő oldószerekkel kezeltük. 48 órával a transzfekciót követően a sejtekből RNS mintát készítettünk, és Q-PCR technikával ellenőriztük a transzfekció hatékonyságát, illetve fluoreszcens kalciumszint méréseket végeztünk.

## **Stabil plazmid DNS transzfekció**

A HEK293 sejteket 35 mm átmérőjű Petri-csészében tenyésztettük, majd 70-80%-os konfluencia elérésekor Optimem médium és TRPC6-ot tartalmazó vektor hozzáadásával, Lipofectamin<sup>TM</sup> 2000 reagenssel transzfekciót végeztünk a gyártó ajánlása szerint. 3 és fél óra elteltével a médiumot lecseréltük szelektáló tápoldatra, mely 750 µg/ml geneticint tartalmazott.

A szelektált sejteket 500 µg/ml geneticint tartalmazó tápoldatban tenyésztettük tovább, majd RNS és fehérjemintát készítettünk hagyományos PCR és Western blot kísérletekhez.

## **Tranziens plazmid DNS transzfekció**

A TRPV csatornákat tranziensen overexpresszáló HEK293T sejtvonalakat hoztunk létre. A humán TRPV1-et pCAGGSM2-IRES-GFP-R1R2 vektor, míg a TRPV2, TRPV3 és TRPV4 izoformákat pCINeoIRES-GFP vektorok segítségével juttatuk be a sejtekbe.

A HEK293T sejteket Petri-csészékben szaporítottuk, majd 50-60%-os konfluenciánál TransIT-293 transzfekciós reagenssel és a megfelelő plazmid DNS-sel transzfectáltuk. A transzfekció után 48 órával a sejtekből fehérjemintát készítettünk a Western blot kísérletekhez.

### **Statisztikai analízis**

Mérési adataink feldolgozását OriginPro 8.6 szoftverrel végeztük. A dózis-hatás összefüggések vizsgálata során logisztikus dózis-hatás görbéket illesztettünk az alábbi egyenlet felhasználásával:

$y = A_2 + (A_1 - A_2) / (1 + (x/x_0)^p)$ , ahol  $A_1$ : kiindulási, minimális érték ( $y_{\min}$ ),  $A_2$ : végső, maximális érték ( $y_{\max}$ ),  $x_0$ : középérték (EC50) és  $p$  a számított kitevő.

A statisztikai analízist részben OriginPro 8.6 és IBM SPSS Statistics 23.0 szoftver segítségével végeztük. Két csoport összehasonlítása esetén Student-féle  $t$ -próbát alkalmaztunk, több csoport átlagainak különbségét pedig egyutas variancia analízissel (ANOVA) és Bonferroni, vagy Dunnett post-hoc tesztekkel vizsgáltuk,  $p < 0,05$  szignifikancia szintek mellett.

## EREDMÉNYEK

### **A humán podocyták *in vitro* differenciációjának igazolása az általunk differenciáltatott tenyészetben**

Kísérleteinket differenciáltatott humán podocytákon végeztük. A sejteket hét napig „nem-permisszív” közegben, azaz 37°C-on tenyésztettük a differenciált állapot eléréséhez. Az érési folyamat során a podocyták magas szinten expresszálják a podocyta-specifikus podocin és az aktinhoz kötődő synaptopodin fehérjéket. Az általunk differenciáltatott sejteken Western-blot technikával és immuncitokémiával is igazoltuk a két keresett marker fehérje jelenlétét, tehát elmondható, hogy a differenciáltatás sikeres volt.

### **A TRPC6 funkcionálisan aktív formában expresszálódik differenciáltatott humán podocytákon**

Hagyományos RT-PCR-val, valamint Western blottal és immuncitokémiával végzett kísérleteink azt mutatják, hogy a nem-differenciáltatott és a differenciáltatott humán podocyták mRNS és fehérje szinten is expresszálják a TRPC6 csatornát.

A kísérleteinkben alkalmazott TRPC6 antitest specificitásának megállapításához létrehoztunk egy TRPC6-ot overexpresszáló HEK293 sejtenyészetet (HEK293-TRPC6), majd ismét hagyományos PCR és Western-blot kísérletet végeztünk. A HEK293-TRPC6 sejtek markánsan expresszálták mind a TRPC6-ot kódoló transzkriptet, mind a TRPC6 fehérjét. Így igazoltuk, hogy az általunk alkalmazott TRPC6 antitest TRPC6-ra specifikus.

Következő lépésben a humán podocytákon kifejeződő TRPC6 csatorna funkcionalitását vizsgáltuk, Fluo-4 festék alkalmazásával fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$ -méréseket végezve. Kísérleteinkben 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerolt (OAG) alkalmaztunk TRPC6 aktivátorként, mely dózisfüggő  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -emelkedéseket váltott ki differenciáltatott sejteken. Megismételve méréseinket alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú közegben, az OAG-által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -szint-emelkedés teljes

mértékben elmaradt, tehát az általunk mért  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -emelkedést a külső térből beáramló  $Ca^{2+}$  hozza létre.

### **Számos PKC izoforma megtalálható differenciáltotott humán podocytaon**

Következő lépésben meghatároztuk a PKC izoformák mintázatát az általunk differenciáltotott humán podocytaokból származó mintákon. Elsőként Q-PCR technikát alkalmaztunk az izoenzimek mRNS szintű kimutatásához. A klasszikus családba tartozó PKC $\alpha$  és - $\gamma$ ; a novel PKC $\delta$ , - $\epsilon$ , - $\eta$  és - $\theta$ ; valamint az atípusos PKC $\zeta$  expresszálódik humán podocytaon. Kísérleteinkben a PKC $\beta$  görbéje nem érte el a detekciós küszöböt, valamint a PKC $\lambda/1$  vizsgálatára nem volt lehetőségünk. Western blot technikával végzett kísérleteink megerősítették a Q-PCR-val kapott eredményeket, miszerint ezek az izoenzimek kifejeződnek humán podocytaon, valamint a PKC $\beta_1$  és - $\beta_2$  izoformák is kimutathatóak fehérjszinten.

### **A PKC rendszer endogén aktivitása tónusos gátlást fejt ki a TRPC6 csatornára**

Ezt követően arra kerestük a választ, hogy a kimutatott PKC izoenzimek endogén aktivitása hatást gyakorol-e a TRPC6 csatorna működésére. Csoportgátlószerek alkalmazásával csökkentettük a PKC izoenzimek aktivitását, majd vizsgáltuk az OAG által kiváltott  $Ca^{2+}$ -szint-emelkedések változását. Kísérleteinkben három gátlószert használtunk, a GF109203X-szet, mely a klasszikus és a novel csoportra egyaránt hatással van; a Gö6976-ot, a klasszikus család inhibitorát, illetve a PKC $\delta$  antagonistáját, a rottlerint. Méréseinkben mindhárom antagonistá jelentősen növelte az OAG-által kiváltott TRPC6-mediált  $Ca^{2+}$ -választ. Ez alapján arra következtethetünk, hogy a klasszikus és novel PKC izoenzimek fiziológias körülmények között tónusos gátlást fejtenek ki a TRPC6 ioncsatornára.

Megvizsgáltuk ennek ellenkezőjét is. Méréseinkben exogén módon, az általános PKC aktivátor PMA-val, fokoztuk a PKC rendszer aktivációját,

melynek következtében nagymértékben csökkent az OAG által kiváltott TRPC6-mediált  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -emelkedés. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a klasszikus és novel PKC izoformák exogén stimulálása jelentősen gátolja a TRPC6 csatorna működését.

Általánosan elfogadott, hogy a PKC izoformák aktivációját a fehérjék down-regulációja jelzi. Annak feltérképezésére, hogy a PMA kezelés (30 perc, 60 perc, 24 óra) hatására, mely PKC izoformák aktiválódása révén jön létre a TRPC6 csatorna gátlása, vizsgáltuk a különböző PKC izoformák fehérjeszintű expresszióját Western blot technikával. A PMA nagymértékben csökkentette a PKC $\alpha$ , - $\beta_1$ , valamint a PKC $\eta$  expresszióját időfüggő módon. Érdekes módon a PKC $\beta_2$  expressziós szintje 30 perc elteltével csökkent, viszont hosszabb időtartamú kezelés hatására ez a csökkenés elmaradt. Tehát a TRPC6 csatornára valószínűleg a PKC $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$  illetve a - $\eta$  aktivációja lehet negatív hatással.

### **A PKC rendszer aktivációja csökkenti a TRPC6 ioncsatorna expresszióját differenciáltatott podocytákon**

Glomeruláris mesangialis sejteken végzett kutatások azt mutatják, hogy a PMA kezelés csökkenti a TRPC6 csatorna expresszióját. Ezért Western blot technikával megvizsgáltuk, hogy a PKC stimuláció PMA-val befolyásolja-e a differenciáltatott podocytákon kifejeződő TRPC6 szintjét. Kísérleteinkben a PKC rendszer aktiválása jelentős és időfüggő TRPC6 down-regulációt eredményezett.

### **A differenciáltatott podocyták expresszálják a melegszenzitív TRPV1, TRPV2, TRPV3 és TRPV4 csatornákat**

Irodalmi adat kevés szól arról, hogy a glomerulusban lévő podocytákon milyen egyéb TRP ioncsatornák expresszálódnak, azok a TRPC6-hoz hasonlóan funkcionálisak-e, illetve részt vesznek-e a podocyták életfolyamataiban. Az ismert, hogy a vese tubulusokban a TRPV család hőérzékeny tagjai is kifejeződnek, azonban a Bowman-tok podocytáin eddig még nem vizsgálták

jelenlétüket. Ezért kísérleteinket tovább folytatva megvizsgáltuk a melegszenzitív TRPV1-4 csatornák kifejeződését az általunk differenciáltatott podocytaikon. Elsőként Q-PCR technikával kimutatattuk, hogy mRNS szinten mind a négy ioncsatorna megtalálható, mégpedig a TRPV1 és TRPV4 magasabb, míg a TRPV2 és TRPV3 alacsonyabb szinteken expresszálódnak. Immuncitokémiai és Western blot kísérleteink megerősítették a csatornák jelenlétét. A TRPV2-4 intenzív jelölődést mutattak, míg a TRPV1 esetében lényegesen halványabb festődést tapasztaltunk. Az általunk alkalmazott antitestek specificitását az egyes TRPV csatornákat tranziensen overexpresszáló HEK293T sejteken ellenőriztük.

### **A podocytaik reagálnak a hőmérséklet emelkedésére**

A TRPV1-4 fehérjék közös sajátossága, hogy a meleg hőmérséklet különböző tartományaiban aktívak, illetve  $\text{Ca}^{2+}$ -ra nézve nagy a permeabilitásuk. Ezeket a tulajdonságokat kihasználva vizsgáltuk a csatornák aktivitását humán podocytaikon. Fluoreszcens  $\text{Ca}^{2+}$ -érzékeny Fluo-4 festékkel töltöttük a sejteket, majd kb. 45-50°C-ra melegített pufferrel hőstimulációt végeztünk. A sejtek reagáltak a hőmérsékleti ingerre, mivel nőtt a Fluo-4 festék fluoreszcencia intenzitása. Ezek a kísérleteink megmutatták, hogy a differenciáltatott podocytaik érzékenyek a meleg hőmérsékletre, ami a hőérzékeny TRPV csatornák funkcionalitására utalhat.

### **A TRPV1 ioncsatorna funkcionálisan nem aktív differenciáltatott podocytaikon**

A TRPV1 funkcionalitásának elemzésére a TRPV1 potens és specifikus aktivátorát a kapszaicint alkalmaztuk. Kapszaicin kezelés hatására még nagyon magas 1 mM-os koncentrációban sem tapasztaltunk  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -emelkedést, melyet a specifikus TRPV1 antagonisták (kapszazepin, AMG 9810) egyike sem befolyásolt. Ezért megismételtük a kísérletet reziniferatoxinnal, mely a TRPV1 ultrapotens aktivátora, de sem alacsonyabb, sem magasabb koncentrációban nem

eredményezett  $\text{Ca}^{2+}$ -választ. Megállapíthatjuk, hogy a TRPV1 csatorna a magas mRNS szintű expressziója ellenére, nem alkot funkcionális csatornát a differenciáltatott humán podocytákon.

### **A TRPV2 és a TRPV4 fehérjék aktív formában expresszálódnak differenciáltatott podocytákon**

A TRPV2 csatorna aktivátoraként a fitokannabinoid kannabidiolt (CBD-t) alkalmaztuk, mely 10  $\mu\text{M}$  koncentrációban mérsékelt  $\text{Ca}^{2+}$ -választ eredményezett. Ez a  $\text{Ca}^{2+}$ -jel alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -ot tartalmazó közegben elmaradt. A TRPV2 antagonistával tranilaszttal előkezelve a sejteket, a CBD alacsonyabb  $\text{Ca}^{2+}$ -emelkedést eredményezett, mely arra utal, hogy a TRPV2 valóban funkcionál a differenciáltatott podocytákon.

Több kutatócsoport beszámolt arról, hogy a CBD gyenge TRPV4 agonista is, ezért megismételtük a kísérletet a potens és specifikus TRPV4 antagonistával HC067047 jelenlétében. A HC067047 a tranilaszthoz hasonlóan csökkentette a CBD által létrehozott  $\text{Ca}^{2+}$ -szint-emelkedést, ami arra utal, hogy a válasz kialakításában nemcsak a TRPV2, hanem a TRPV4 csatorna is részt vesz.

Az ultrapotens TRPV4-szelektív GSK1016790A-val tovább vizsgáltuk a TRPV4 csatorna aktivációját. A GSK1016790A dózisfüggő módon növelte a  $\text{Ca}^{2+}$ -tranziensek csúcsértékeit, és már nM-os koncentráció tartományban jelentős  $\text{Ca}^{2+}$ -választ eredményezett. Elemezve a kapott görbéket, nemcsak a tranziensek maximuma, hanem a meredeksége is nőtt az agonista koncentrációjának függvényében. Megismételve kísérleteinket 1  $\mu\text{M}$  HC067047-tel történő előkezelést követően, a GSK1016790A hatása nagymértékben csökkent. Ez alátámasztja eddigi feltevésünket, miszerint a GSK1016790A valóban a TRPV4 csatorna nyitása révén fejti ki hatását. Alacsony  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú közegben, kisebb mértékű, de hasonlóan dózisfüggő  $\text{Ca}^{2+}$ -választ tapasztaltunk GSK1016790A kezelés hatására. Tehát a GSK1016790A nemcsak a sejtfelszíni membránban elhelyezkedő TRPV4

csatornákat aktiválja, hanem az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$ -raktárak felszínén lévőket is. Az a tény azonban, hogy csökkentett  $\text{Ca}^{2+}$ -tartalmú közegben a GSK10167902A dózis-hatás görbéje jobbra tolódott, azt jelzi, hogy a TRPV4 csatornák többsége a plazma membránban helyezkedik el. Ezt tovább bizonyítja a GSK1016790A-val teljes sejtes konfigurációban végzett patch-clamp mérésünk, ahol az agonista a TRPV4 ioncsatornára jellemző áram-feszültség karakterisztikával bíró transzmembrán áramot indukált, amit a HC067047 ugyancsak gátolt.

A  $4\alpha$ -PDD szintén potens TRPV4 agonista, mely a GSK1016790A-hoz hasonló, de kisebb mértékű  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -emelkedést váltott ki humán podocytákon, mely HC067047 előkezelés hatására csökkent. Ezen eredményeink még inkább alátámasztják, hogy a TRPV4 funkcionálisan aktív differenciáltatott podocytákon.

### **A TRPV3 agonisták részben TRPV3-tól függetlenül emelik a podocyták $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját**

Kereskedelmi forgalomban specifikus TRPV3 agonista és antagonisták jelenleg nem érhető el. Az irodalomban nem szelektív, de potens TRPV3 agonistaként számos növényi eredetű anyagot írtak le, úgymint az eugenolt, a timolt és a karvakrolt. Kísérleteinkben mindhárom anyag markáns  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -emelkedést váltott ki, mely hatás dózisfüggőnek bizonyult, viszont a dózis-hatás görbe nem szigmoid lefutású. Valószínűleg a TRPV3 aktiváción kívül más mechanizmusok is hozzájárulhatnak az  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$  növekedéséhez.

A szintetikus TRPV3 aktivátor 2-aminoetoxidifenil borát (2-APB) ugyancsak dózisfüggő módon növelte a sejtek  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját, illetve dózis-hatás összefüggése szigmoid alakú görbével jellemezhető.

Mivel TRPV3 specifikus inhibitor sem áll rendelkezésünkre, ezért kísérleteink következő részében az általános TRP gátló ruténium vörössel, illetve az endogén TRPV3 antagonisták izopentenil-pirofoszfáttal (IPP) végeztünk előkezeléseket. A ruténium vörös az eugenol kivételével csökkentette

a többi aktivátor által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz nagyságát, míg az IPP csak a 2-APB kezelésre volt hatással.

RNS interferencia segítségével tovább vizsgáltuk a TRPV3 szerepét. A TRPV3 gén csendesítése sikeres volt, mivel a Q-PCR eredmények szerint jelentősen csökkent a TRPV3 mRNS expressziós szintje. Karvakrollal, timollal és 2-APB-tal megismételtük korábbi méréseinket, melyek során az aktivátorok ugyanakkora  $\text{Ca}^{2+}$ -választ váltottak ki a géncsendesített sejteken, mint kontroll esetben. Eredményeink arra utalnak, hogy a nem-specifikus TRPV3 aktivátorok növelik a differenciáltatott podocyták  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -ját, de ebben a TRPV3-nak csekély szerepe van, tehát valószínűleg az aktivátorok egyéb mechanizmusok révén fejtik ki hatásaikat.

## MEGBESZÉLÉS

A fokális szegmentális glomerulosclerosis (FSGS) egy patológiás jelenség, mely egyik gyakori oka a nephrosis szindrómának, mind gyermek, mind felnőtt korban. A FSGS esetek nagy százalékban vezetnek végstádiumú vesebetegséghez. A betegség kialakulásának korai szakaszában fokális, azaz gócos, illetve szegmentális, a glomerulus egy részét érintő sclerosisról van szó. Azonban a folyamat előrehaladtával, egyre több glomerulus lesz érintett. Elektronmikroszkópos vizsgálatok világítottak rá, hogy a FSGS alapvetően a podocyták betegsége. A podocyták lábnyúlványai sérülnek, mely folyamatot „foot process effacement”-nek nevezünk. A lábnyúlványok átalakulása az aktin hálózat átrendeződésének eredménye, megváltozik a podocyták alakja, visszahúzódnak a lábnyúlványok, így megszűnik a kapcsolat a szomszédos podocyták között.

Az, hogy mi okozza a primer FSGS megbetegedéseket, még mindig tisztázatlan. Az utóbbi évtizedek genetikai vizsgálatai rávilágítanak arra, hogy a podocyták számos fehérjéje szerepet játszik a FSGS kialakulásában. A résmembránt alkotó fehérjék, úgymint a nephrin, a podocin, vagy a TRPC6 ioncsatorna, vagy más szerkezeti fehérjék, például az  $\alpha$ -aktinin-4, mutációja FSGS megbetegedéshez vezet.

A TRPC6 fehérje mutációja a FSGS egy különösen agresszív formájának kialakulásáért felelős. Mind a csatorna alulműködése, mind a fokozott aktivitása, FSGS megbetegedést eredményez. Mivel akár a genetikus, akár a szerzett FSGS megbetegedések hátterében állhat a TRPC6 ioncsatorna megváltozott működése, ezért jelen munkánk első részében azt vizsgáltuk, hogy a PKC izoenzimekhez kapcsolódó jelátviteli útvonalak, amelyek fontos szerepet játszanak például egyes gyulladásszerű folyamatok kialakulásában, hogyan befolyásolhatják a TRPC6 működését. Ezt követően az eddig még podocytákon nem vizsgált melegérzékelő TRPV1-4 csatornák kifejeződését és funkcionalitását vizsgáltuk humán podocytákon.

## **A PKC rendszer tónusos gátlást fejt ki a TRPC6 ioncsatorna működésére**

Ismereteink szerint az irodalomban elsőként kimutattuk, hogy a differenciáltatott humán podocytákon kifejeződő TRPC6 regulációjában a PKC izoenzimek fontos szerepet játszanak. Eredményeink szerint a PKC izoenzimek folyamatos tónusos gátlást fejtenek ki a TRPC6 ioncsatornára. A humán podocytákban jelenlévő endogén PKC aktivitás gátlása csoportgátlószerek alkalmazásával, a TRPC6 ioncsatorna fokozott működését eredményezte. Kísérleteinkben a cPKC csoportot gátló GÖ6976-ot, a nPKC család esetében a GF109203X-et alkalmaztuk, illetve megvizsgáltuk a PKC $\delta$  izoenzimet gátló rottlerint is. Méréseink eredményei alapján elmondható, hogy az OAG által kiváltott Ca<sup>2+</sup>-szint-emelkedés mindhárom gátlószer alkalmazását követően sokkal nagyobb mértékű volt, mint kontroll esetben, ahol nem történt előkezelés. Munkánk során arra is kísérletet tettünk, hogy megállapítsuk melyik PKC izoforma vehet részt ebben a folyamatban. Eredményeink azt mutatják, hogy a PKC $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$  és - $\eta$  fehérje szintje csökken a PMA kezelés hatására, tehát feltehetően ezek az izoformák szabályozhatják a TRPC6-ot.

A TRPC6 és a PKC rendszer számos fiziológias és patológias folyamatban vesz részt a vese működésében és azon belül a podocytákban. Azt, hogy a PKC rendszer negatívan szabályozza a TRPC6 működését, már korábban leírták mesangiál sejteken. Kimutatták, hogy a PMA csökkenti a TRPC6 csatorna expresszióját tenyésztett mesangiális sejteken. A mi kutatásaink most bebizonyították ennek a szabályzó mechanizmusnak a jelenlétét humán podocytákon is. Vizsgálataink szerint a PKC rendszer folyamatosan jelenlévő gátló hatást fejt ki a podocytákon kifejeződő TRPC6 működésére. Kutatásaink legfőbb üzenete, hogy ez a gátló hatás nem csak molekuláris expressziós szinten jelenik meg, hanem funkcionálisan is. Valamint azt is megállapítottuk, hogy mely izoformák által valósulhat meg a negatív szabályozás.

Kutatási eredményeinket megerősítendő, nagyon hasonló eredményeket írtak le más rendszerekben. A hátsó gerincvelőben található noradrenerg

neuronok magas szinten expresszálják a TRPC6-ot, melyek ugyancsak a PKC rendszer negatív szabályozása alatt állnak. Ezt a jelenséget simaizomsejtekben is megfigyelték, mivel a TRPC6-ot expresszáló sejtek GF109203X hatására emelkedett, míg PMA kezelés hatására csökkent  $\text{Ca}^{2+}$ -választ produkáltak TRPC6 agonista alkalmazását követően. Megállapították, hogy a PKC $\delta$  felelős ezért a negatív visszacsatolásért, mivel foszforilálja a TRPC6 448-as pozícióban található szerinjét. A mi rendszerünkben is megvizsgáltuk a PKC $\delta$  esetleges szerepét a rottlerin, mint PKC $\delta$  antagonistá alkalmazása révén. Kísérleteink azt mutatták, hogy a rottlerin előkezelés jelentősen növelte az OAG-által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -emelkedést, viszont a PMA kezelés nem volt hatással a PKC $\delta$  fehérje kifejeződésére. Ugyanakkor egyes kutatási eredmények azt bizonyítják, hogy a rottlerin más kinázokat is gátolhat (MAP kináz-aktiválta protein kináz-1 $\beta$ , vagy más néven Rsk-2, illetve p70 S6 kináz), tehát nem tekinthető teljes mértékben PKC $\delta$  specifikusnak, ezért nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy a rottlerin TRPC6 aktivitást fokozó hatását, más útvonalon keresztül fejti ki.

Kísérletes munkánknak jelentős klinikai vonatkozásai is vannak. A TRPC6 csatorna molekuláris és/vagy funkcionális zavara számos genetikai és szerzett vesebetegségben proteinuriával társul. A TRPC6 csatorna bármilyen patológiásan módosult kifejeződése, vagy működése kóros  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$  változásokhoz vezet, és kulcs szerepet tölt be a podocytopathiák kialakulásában. Érdekes módon számos esetben ez a jelenség valamely PKC izoforma megváltozott működésével is együttjár. Glomerulonephritiseknél a PKC $\beta_2$  emelkedett kifejeződését mutatták ki, valamint a PKC $\alpha$  és - $\beta$  up-regulációja figyelhető meg membranózus glomerulonephritisben. Azonban ezekben a vizsgálatokban nem volt egyértelmű bizonyíték arra, hogy az emelkedett PKC-szint fokozott PKC aktivitással is jár.

A mi eredményeink alátámasztják, hogy a PKC $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$  és - $\eta$  izoformák aktivációja fontos szerepet játszhat a TRPC6 csatorna expressziójának és működésének szabályozásában. Valószínűsíthető, hogy patológiás körülmények

között megváltozik a podocytaokon kifejeződő PKC enzimek expressziós és/vagy aktivációs mintázata, ami befolyásolja a TRPC6 aktivitását, és ez által a podocyta funkciókat. További preklinikai és klinikai vizsgálatok feltárhatják annak lehetőségét, hogy a célzott terápia, mely a PKC izoformák aktivitását módosítja, fokozza, esetleg sikeresen alkalmazható lehet megváltozott TRPC6 működéssel jellemezhető proteinuriával járó vesebetegségekben.

Kóros körülmények között számos mediátor szintje emelkedhet, melyek aktiválják a TRPC6 ioncsatornát, mint például az angiotenzin II (Ang II) szintje. Az Ang II kulcsszerepet játszik a proteinuria kialakulásában és a vesekárosodás progressziójában számos vesebetegségben, mint például a FSGS-ben is. Az Ang II kapcsolódva a podocyta membránjában található angiotenzin-1 receptorhoz (AT1R), aktiválja a PLC $\beta$  enzimet, melynek működése során IP<sub>3</sub> és DAG keletkezik, mely utóbbi a PKC rendszert aktiválja. Így az Ang II a PKC rendszeren keresztül gátolhatja a TRPC6 működését. Emellett a DAG közvetlenül aktiválhatja a TRPC6-ot, ilyen módon az AT1R-hoz kapcsolódó szignalizációs útvonalak akár ellentétesen is szabályozhatják a csatorna működését. A TRPC6 által megemelkedett [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub>-t érzékeli a Ca<sup>2+</sup>-függő foszfatáz a kalcineurin, amely defoszforilálja a cNFAT fehérjét, és a sejtmagba jutva NFAT transzkripciós komplexet alkot más nukleáris elemekkel. Ez a komplex fokozza a TRPC6 gén transzkripcióját, így növelve a csatorna denzitását a sejtfelszíni membránban, mely megnövekedett Ca<sup>2+</sup>-influxot jelent, és podocyta károsodáshoz vezet. Ezek a folyamatok indokolják a proteinuria terápiajában az AT1R blokkoló (ARB), illetve az Ang II konvertáz enzim (ACE) inhibitor alkalmazását.

Annak felfedezése, hogy az Ang II a TRPC6-on keresztül fejti ki hatását, egy új lehetőséget jelent a proteinuriás megbetegedések kezelésében az ACE gátlók és az ARB-k mellett. A TRPC6 csatorna, mint támadáspont, ígéretes, hiszen leírták, hogy mind a genetikusan öröklődő FSGS-ban, mind a szerzett proteinuriás betegségekben a TRPC6 csatorna túlműködése, vagy emelkedett

expressziója mutatható ki, tehát a betegségek kialakulásában részt vesz. Már folynak kutatások a TRPC6 expressziójának változtatására (géncsendesítés), illetve magasan specifikus TRPC6 antagonistá felfedezésére. 2010-ben már beszámoltak arról, hogy kis interferáló RNS-t eljuttattak specifikusan a podocytákhoz, és sikeresen csendesítették a TRPC6-ot. 2018-ban pedig azonosították a (2-(benzo[d][1,3]dioxol-5-ylamino)thiazol-4-yl)((3 S,5 R)-3,5-dimetilpiperidin-1-yl)metanont (BTDM), mint specifikus nagy affinitású TRPC6 antagonistát.

Az elmondható, hogy a proteinuria kialakulásáért egy nagyon komplex, több szintű szignalizációs kaszkád károsodása a felelős, éppen ezért több támadásponton megvalósuló terápia kifejlesztése a cél. Mivel ennek eléréséhez a szignalizációs kaszkád minél pontosabb feltérképezése vezet, reményeink szerint ehhez a mi kutatásunk is hozzájárult a TRPC6 csatorna szabályozásának feltárása révén.

### **A termoszenzitív TRPV1-4 kifejeződik humán podocytákon**

Munkánk második részében kimutattuk, hogy a differenciáltotott humán podocyták funkcionális formában expresszálják a TRPV család melegszenzitív tagjait, a TRPV1-V4-et. mRNS szintű vizsgálataink eredménye alapján a TRPV1 és TRPV4 csatorna dominánsan, míg a TRPV2 és TRPV3 mRNS transzkriptek alacsonyabb szinten expresszálódnak. Vizsgálva a TRPV csatornák funkcionalitását, elsőként a TRPV1 csatorna aktivációját elemeztük. Érdekes módon sem a specifikus agonista kapszaicin, sem az ultrapotens RTX nem váltott ki  $Ca^{2+}$ -választ a podocytákban. A kapszaicin markáns aktivációt eredményezett humán mintákban és rágeszálókban, viszont számos más fajokban kapszaicin-inszenzitív formában expresszálódik. A trigeminális és dorzális ganglionban, valamint keratinocytákban azonosítottak egy kapszaicin inszenzitív splice variánst a TRPV1b-t. A TRPV1b koexpresszálódhat TRPV1-gyel, ebben az esetben a TRPV1b domináns negatív hatást fejt ki. A mi

esetünkben mind az érzéketlenséget okozó mutációk, mind a negatív hatást kifejtő TRPV1b jelenléte magyarázat lehet a TRPV1 csatorna aktiváció ellenére elmaradó funkcionalitására.

A TRPV1-gyel ellentétben a TRPV2 csatornának nem csak molekuláris jelenlétét, hanem funkcionális aktivitását is igazoltuk. A TRPV2 agonista CBD mérsékelt  $\text{Ca}^{2+}$ -választ generált a podocyták membránjában, amely folyamat a TRPV2 antagonistákkal gátolhatóan bizonyult. Ezzel párhuzamosan a CBD által kiváltott  $\text{Ca}^{2+}$ -influxot a TRPV4 antagonistákkal HC067047 is csökkentette, így feltételezhetően a CBD szignalizációban a TRPV4 csatorna szerepet játszhat. Ez összhangban áll korábbi, részben munkacsoportunk által publikált adatokkal, mely szerint a CBD a TRPV4-et is aktiválhatja.

A TRPV4-et vizsgálva, a klasszikus agonista  $4\alpha$ -PDD és a hyperpotens TRPV4 agonista GSK1016790A gyors és robusztus  $\text{Ca}^{2+}$ -választ váltott ki, mely jelentősen csökkent HC067047 jelenlétében. A TRPV4 feszültség-függő karakterizációja is GSK1016790A alkalmazásával markáns transzmembrán áram kialakulását igazolta, melyet a HC067047 szintén gátolt. Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy a molekuláris szintű kimutatásainkkal egybehangzóan a TRPV4 lehet a domináns termoszenzitív TRPV csatorna humán podocytákon.

További eredményeink alapján a TRPV3 csatorna funkcionális kifejeződése kérdéses. Habár molekuláris szintű vizsgálataink igazolták a TRPV3 fehérje jelenlétét, a kvantitatív PCR mérések alacsony TRPV3 mRNS kifejeződést mutattak a TRPV4-hez képest. A TRPV3 csatornának a mai napig nincs kereskedelmi forgalomban kapható, effektív és specifikus agonistája, sem antagonistája. Munkánk során növényi anyagokat alkalmaztunk TRPV3 agonistaként, névszerint karvakrolt, timolt és eugenolt, melyek potensek, de nem tekinthetők TRPV3 specifikusnak. Ugyanez elmondható a szintetikus 2-APB-ről is. Kísérleteinkben az említett agonisták mindegyike jelentős  $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -emelkedést váltott ki, melynek forrása főleg az extracelluláris tér volt, abban az

esetben, ha az anyagokat 1 mM koncentráció alatt alkalmaztuk, de csak a 2-APB hatása szaturálódott, és mutatott szigmoid dózis-hatás összefüggést. A kísérletekben meghatározott  $EC_{50}$  érték (~500  $\mu$ M) magasabb volt, mint a korábbi elektrofiziolgiai vizsgálatokban meghatározott érték (~42  $\mu$ M). Emellett az általános TRP gátló ruténium vörös csak részben gátolta az agonisták hatását, illetve az endogén TRPV3 inhibitor IPP csak a 2-APB hatását gátolta részlegesen. Ezzel ellentétben a TRPV3 géncsendesítés nem befolyásolta az agonisták hatását. Eredményeink arra utalnak, hogy feltehetően a TRPV3 agonistaként általunk alkalmazott anyagoknak számos off-target hatása van, melyek részben más TRP csatornákat is magukba foglalhatnak, és egyéb folyamatok is részt vehetnek a sejtek  $Ca^{2+}$ -szintjének emelésében. Farmakológiai eredményeink alapján a TRPV3 csatorna funkcionalitása humán podocytákon kérdéses, melynek tisztázásához további vizsgálatok szükségesek.

A meleg hőmérsékletre érzékeny és mechanoszenzitív TRPV csatornákat korábban már vizsgálták a vesében és az urináris traktus alsó részében. Habár a TRPV1 szerepe bizonyított az urináris traktus funkcióinak szabályozásában, az urothelialis sejtekben való expressziója továbbra is vitatott. A TRPV4 az urináris traktus nem-neuronális sejtjeiben nagy számban expresszálódik. A vesében a TRPV4-et a vízre impermeábilis nephron szegmensekben írták le. Emellett mind a TRPV1, mind a TRPV4 kifejeződése és aktivitása bizonyított a vese érrendszerének endothel sejtjeiben.

Annak ellenére, hogy a melegszenzitív TRPV-k jelenléte igazolt a vesében, funkciójukról a tubuláris epithel különböző szegmenseiben található sejteken keveset tudunk, a podocytákra vonatkozóan pedig egyáltalán nem rendelkezünk adatokkal. A TRPV1, TRPV2 és a TRPV4 csatornák nemcsak hőmérsékletérzékenyek, hanem mechanikai ingerek és az ozmotikus változások is aktiválják őket. Az ozmoszenzoros funkciójukat nemcsak neuronális, hanem nem-neuronális sejteken pl. az urogenitális traktusban is leírták. Hypotonia hatására a hólyagfal feszülésének érzékeléséhez elengedhetetlen a TRPV1,

melynek aktivációja ATP felszabadulást eredményez. A TRPV1-nek azonban hipertonia esetében is szerepe lehet. A vese tubulusrendszerében a tubuláris áramlás és az ozmolaritás érzékelésében nagy jelentősége van a TRPV4 csatornának. Ezek az irodalmi adatok arra engednek következtetni, hogy a TRPV csatornák szerepet játszhatnak a filtrációs barrier ozmotikus inger hatására kialakuló változásaiban.

Az ozmotikus érzékelésen túl a TRPV4-nek kiemelkedő jelentősége van az epitheliális barrier kialakításában számos szövetben. A légutak epitheliumában a TRPV4 és az L-típusú  $\text{Ca}^{2+}$ -csatornák aktivációja révén a nyíró erők fokozzák az epitheliális barrierfunkciókat. A bőr epidermális keratinocytaiban, a funkcionálisan aktív TRPV4 interakcióban áll adhéziós fehérjékkel és az aktin hálózattal, erősítve a sejt-sejt kapcsolatokat és a barrier funkciókat. Valamint a hólyag urotheliumában és a vese gyűjtőcsatornáiban is leírták, hogy a TRPV4 asszociálódik  $\alpha$ -kateninnel. Ezek az adatok azt sugallják, hogy a TRPV4 részt vehet a podocyták  $\text{Ca}^{2+}$  homeosztázisának finomhangolásában, így a filtrációs barrier szabályozásában.

További vizsgálatok szükségesek a TRPV csatornák lehetséges szerepének feltárásához a podocyták fiziológias és patológias működésében, azonban valószínűsíthető, hogy farmakológiai célpontokként hozzájárulhatnak a primer és szekunder glomerulopathiák és a kapcsolódó betegségek kezeléséhez.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munkánk során egyes TRP csatornák kifejeződését, funkcionalitását és szabályozását vizsgáltuk humán podocytaikon. Kimutattuk, hogy a TRPC6 csatornát a PKC rendszer endogén aktivitása gátolja. Kísérleteinkben a PKC agonista PMA, jelentősen csökkentette a TRPC6 aktivátor OAG által kiváltható  $Ca^{2+}$ -jelet. Hosszú távú PMA kezelés a TRPC6 expresszióját is jelentősen csökkentette. Valamint a PKC rendszer exogén gátlása csoportgátlószerek alkalmazásával növelte a TRPC6 aktivitását. Kimutattuk, hogy a PKC $\alpha$ , - $\beta_1$ , -  $\beta_2$  és - $\eta$  fehérjék szintje csökken a PMA kezelés hatására, tehát feltehetően ezek az izoformák szabályozhatják a TRPC6-ot.

Munkánk második felében igazoltuk, hogy differenciáltotott humán podocytaikon kifejeződnek a melegszenzor TRPV1-V4 csatornák. A TRPV1 és a TRPV4 dominánsan, míg a TRPV2 és a TRPV3 alacsonyabb szinteken expresszálódnak. A TRPV1 csatorna a magas szintű mRNS jelenlét ellenére a specifikus agonista kapszaicin és reziniferatoxin (RTX) kezelés hatására sem mutatott aktivitást. Ezzel szemben kannabinoid (CBD) hatására a podocytaik mérsékelt  $Ca^{2+}$ -válaszokat mutattak, mely a TRPV2 antagonistá tranilasztal és a TRPV4 gátló HC067047-tel is gátolhatóan bizonyult. A TRPV4 agonisták, mind a GSK1016790A, mind a 4 $\alpha$ -PDD gyors és robusztus  $Ca^{2+}$ -választ generáltak, tehát a TRPV4 lehet a domináns termoszenzitív TRPV csatorna humán podocytaikon. A TRPV3 esetében a növényi eredetű aktivátorok és a szintetikus 2-APB jelentős  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -emelkedést váltottak ki. Ez a hatás azonban TRPV3 antagonistával (IPP), illetve általános TRP gátló ruténium vörössel csak részben volt gátolható, a TRPV3 gén csendesítése pedig nem befolyásolta az agonisták hatását, vagyis az általunk TRPV3 agonistaként alkalmazott anyagoknak számos off-target hatása lehet.

Eredményeink a TRP csatornák és az azokat reguláló jelátviteli folyamatok szerepére hívják fel a figyelmet a podocytaik működésének szabályozásában.

A dolgozatban bemutatott új tudományos eredmények:

- a humán podocytákon expresszálandó TRPC6 ioncsatornát negatívan szabályozza a PKC rendszer
- a PKC $\alpha$ , - $\beta_1$ , - $\beta_2$  és - $\eta$  izoenzimek vehetnek részt a TRPC6 csatorna gátlásában
- a PKC rendszer aktivációja a TRPC6 fehérje down-regulációját eredményezi
- a melegérzékeny TRPV1-4 csatornák kifejeződnek humán podocytákon
- a TRPV1 humán podocytákon nem alkot funkcionális ioncsatornát
- a TRPV2 és TRPV4 csatornák funkcionális csatornaként vannak jelen
- a TRPV3 ioncsatorna aktivátorok hatásukat jórészt a TRPV3-tól függetlenül fejtik ki

# FÜGGELÉK



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/275/2019.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Ambrus Lída  
Neptun kód: C5ZOYB  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10053939

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ambrus, L.**, Kelemen, B., Szabó, T., Bíró, T., Tóth, I. B.: Human podocytes express functional thermosensitive transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels.  
*Br. J. Pharmacol.* 174 (23), 4493-4507, 2017.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.14052>.  
IF: 6.81
2. **Ambrus, L.**, Oláh, A., Oláh, T., Balla, G., Saleem, M. A., Orosz, P., Zsuga, J., Bíró, K., Csernoch, L., Bíró, T., Szabó, T.: Inhibition of TRPC6 by protein kinase C isoforms in cultured human podocytes.  
*J. Cell. Mol. Med.* 19 (12), 2771-2779, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.12660>  
IF: 4.938





### További közlemények

3. Páyer, E., Szabó-Papp, J., **Ambrus, L.**, Szöllősi, A. G., Andrási, M., Dikstein, S., Kemény, L., Juhász, I., Szegedi, A., Bíró, T., Oláh, A.: Beyond the physico-chemical barrier: glycerol and xylitol markedly yet differentially alter gene expression profiles and modify signalling pathways in human epidermal keratinocytes.  
*Exp. Dermatol.* 27 (3), 280-284, 2018.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/exd.13493>  
IF: 2.608 (2017)
4. Oláh, A., **Ambrus, L.**, Nicolussi, S., Gertsch, J., Tubak, V., Kemény, L., Soeberdt, M., Abels, C., Bíró, T.: Inhibition of fatty acid amide hydrolase exerts cutaneous anti-inflammatory effects both in vitro and in vivo.  
*Exp. Dermatol.* 25 (4), 328-330, 2016.  
IF: 2.532
5. Szabó, T., **Ambrus, L.**, Zákány, N., Balla, G., Bíró, T.: Regulation of TRPC6 ion channels in podocytes: implications for focal segmental glomerulosclerosis and acquired forms of proteinuric diseases.  
*Acta Physiol. Hung.* 102 (3), 241-251, 2015.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/036.102.2015.3.2>  
IF: 0.814
6. Oláh, A., Tóth, I. B., Borbíró, I., Sugawara, K., Szöllősi, A. G., Czifra, G., Pál, B., **Ambrus, L.**, Kloepper, J. E., Camera, E., Ludovici, M., Picardo, M., Voets, T., Zouboulis, C. C., Paus, R., Bíró, T.: Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes.  
*J. Clin. Invest.* 124 (9), 3713-3724, 2014.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1172/JCI64628>  
IF: 13.262

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 30,964**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
11,748**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.06.24.

