

EGYETEMI DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

**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**

TARTALOMJEGYZÉK

1	Rövidítések jegyzéke	4
2	Bevezetés.....	5
3	Irodalmi áttekintés	6
3.1	A vese szerepe a kiválasztásban és a filtrációs barrier	6
3.2	Podocyta és podocyta eredetű betegségek.....	8
3.3	TRP ioncsatornák a vesében	12
3.3.1	TRP ioncsatornák	12
3.3.2	TRP csatornák szerepe a tubuláris transzportban (Ca^{2+} , Mg^{2+} reabszorpció, TRPV5/6, TRPM6).....	15
3.3.3	TRPC6 szerepe a filtrációs barrier kialakításában	16
3.3.4	Melegérzékeny TRPV csatornák a vesében	22
4	Célkitűzések	24
5	Anyagok és módszerek	25
5.1	Alkalmazott kémiai anyagok	25
5.2	Sejttenyésztés	26
5.3	RNS izolálás, reverz transzkripció, hagyományos reverz transzkripció polimeráz láncreakció (RT-PCR)	27
5.4	Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR).....	28
5.5	Immuncitokémia	28
5.6	Western blot	29
5.7	Az intracelluláris kalciumszint vizsgálata	31
5.7.1	Fluorimetriás $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ mérése egysejtes elrendezésben	31
5.7.2	Fluorimetriás $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ mérése többsejtes elrendezésben.....	32
5.7.3	Hóstimuláció	33
5.8	Patch-clamp mérés	33
5.9	RNS interferencia (RNSi).....	34
5.10	Stabil plazmid DNS transzfekció.....	34

5.11	Tranziens plazmid DNS transzfekció	35
5.12	Statisztikai analízis	35
6	Eredmények.....	36
6.1	A humán podocyták <i>in vitro</i> differenciációjának igazolása.....	36
6.2	A TRPC6 funkcionálisan aktív formában expresszálódik differenciáltott humán podocytákon	37
6.3	Számos PKC izoforma megtalálható differenciáltott humán podocytákon.....	40
6.4	A PKC rendszer endogén aktivitása tónusos gátlást fejt ki a TRPC6 csatornára	41
6.5	A PKC rendszer aktivációja csökkenti a TRPC6 ioncsatorna expresszióját differenciáltott podocytákon.....	45
6.6	A differenciáltott podocyták expresszálják a melegérzékeny TRPV1, TRPV2, TRPV3 és TRPV4 csatornákat.....	45
6.7	A podocyták reagálnak a hőmérséklet emelkedésére	48
6.8	A TRPV1 ioncsatorna funkcionálisan nem aktív differenciáltott podocytákon	49
6.9	A TRPV2 és a TRPV4 fehérjék aktív formában expresszálódnak differenciáltott podocytákon	50
6.10	A TRPV3 agonisták részben TRPV3-tól függetlenül emelik a podocyták intracelluláris Ca ²⁺ -szintjét.....	54
7	Megbeszélés	57
7.1	A PKC rendszer tónusos gátlást fejt ki a TRPC6 ioncsatorna működésére	57
7.2	A termoszenzitív TRPV1-4 csatornák kifejeződnek humán podocytákon.....	61
8	Összefoglalás.....	66
9	Summary	68
10	Irodalomjegyzék	69
11	Tárgyszavak.....	84
12	Köszönetnyilvánítás.....	85
13	Függelék.....	86

1 RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

4 α -PDD: 4 α -forbol 12,13-didekanoát
2-APB: 2-aminoetoxidifenil borát
AM: acetoxi-metilészter
aPKC: atípusos protein kináz C enzimesalád
BSA: borjúsérum-albumin
[Ca²⁺]_{IC}: intracelluláris Ca²⁺ koncentráció
CBD: kannabidiol
cPKC: klasszikus protein kináz C enzimesalád
DAG: diacilglicerol
EGF: epidermális növekedési faktor
EGFR: epidermális növekedési faktor receptor
ESL: endotheliális felszíni réteg (endothelial surface layer)
FBS: foetalis borjú savó
FPE: foot process effacement
FSGS: fokális szegmentális glomerulosclerosis
GBM: glomeruláris bazális membrán
IP3: inozitol 1,4,5-triszfoszfát
IPP: izopentenil-pirofoszfát
nPKC: novel protein kináz C enzimesalád
OAG: 1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol
PB1: Phox és Bem 1 domén
PBS: foszfát pufferezt sóoldat
PIP2: foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát
PKC: protein kináz C
PLC: foszfolipáz C
PMA: forbol 12-mirisztát 13-acetát
RTX: reziniferatoxin
SD: résmembrán (slit diaphragma)
SDS: nátrium-dodecil-szulfát
TRP: tranziens receptor potenciál
TRPC: tranziens receptor potenciál proteinek klasszikus családja
TRPM: tranziens receptor potenciál proteinek melasztatin családja
TRPP: tranziens receptor potenciál proteinek policisztin családja
TRPV: tranziens receptor potenciál proteinek vanilloid családja
VEGFA: érendothel növekedési faktor-A

2 BEVEZETÉS

A podocyták a nephron glomerulusában a filtrációs barrier disztális sejtrétegét, a Bowman-tok felőli oldalát alkotják. A differenciáltatott podocyták egy nagyméretű sejttesttel és interdigitáló lábnyúlványokkal rendelkeznek, melyek között speciális fehérjék szoros, tight junction-szerű kapcsolódása alkotja a résmembránt. Ez a két sejt közötti áthidaló komplexként a primer filtrátummal szemben az utolsó kilépési gátat képezi, és nagy jelentősége van a filtrációs barrier fenntartásában. A podocyták és a résmembrán károsodása proteinúriával járó nephropathiák kialakulásához vezethet.

Számos kutatás számol be a podocyták károsodása, a proteinuria és a follikuláris szegmentális glomerulosclerosis (FSGS) kapcsolatáról. Az elmúlt 20 évben megnőtt az idiopathiás FSGS megbetegedések előfordulása, melynek hátterében mind genetikai okok, mind környezeti hatások állhatnak (Haas és mtsai, 1995). Genetikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy számos esetben a podocyták működésében fontos szerepet betöltő fehérjék, úgymint a nephrin, podocin, α -aktinin-4 vagy a TRPC6 ioncsatorna mutációja kóroki szerepet játszik. A tranziens receptor potenciál ioncsatornák klasszikus alcsaládjába (TRPC) tartozó TRPC6 *gain-of-function* mutációja egy meglehetősen agresszív autoszómális domináns FSGS betegséget okoz (Winn és mtsai, 2005). A genetikai tényezők mellett azonban környezeti hatások is kiválthatják a TRPC6 rendellenes működését. Több kutatócsoport számolt be arról, hogy különböző sejtekben a PKC rendszer negatívan szabályozza a TRPC6 aktivációját és/vagy expresszióját (Zhang és Saffen, 2001; Bousquet és mtsai, 2010). Ezért munkánk során célul tűztük ki a PKC rendszer esetleges szabályozó szerepének feltárását humán podocytákon. Vizsgálni kívántuk a TRPC6 csatorna jelenlétét és funkcionalitását, illetve a PKC izoenzimek kifejeződését és esetleges szabályzó szerepét az általunk differenciáltatott humán podocytákon.

Ismert, hogy a disztális nephronban a meleg érzékeny TRPV1 és TRPV4 csatornák is kifejeződnek, és jelentős szerepet játszanak egyes renális funkciók szabályozásában (Zhu és Wang, 2008; Wang és Wang, 2009, 2011; Cohen, 2005; Kassmann és mtsai, 2013). Ezért munkánk második felében célunk volt a termoszenzitív TRPV1-V4 csatornák expressziójának és funkcionalitásának vizsgálata humán podocytákon.

A TRP csatornák működésének feltárása és a hozzájuk kapcsolódó Ca^{2+} -mediált jelátviteli útvonalak elemzése nagyban hozzásegíthet minket a primer és szekunder glomerulopathiák pathomechanizmusának jobb megértéséhez és esetleges újabb farmakológiai célpontok feltárásához.

3 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1 A vese szerepe a kiválasztásban és a filtrációs barrier

A vese kiválasztóműködése révén a szervezet homeosztázisának fenntartásáért felelős központi jelentőségű szerv. A kiválasztás során a vérplazmából a vese Malphigi-testjeiben a glomerulus kapilláris falon átszűrődve gyakorlatilag fehérjementes ultrafiltrátum képződik. Az ultrafiltrátum tovább halad a nephron tubulusrendszerében, melynek során összetétele intenzív transzport folyamatok hatására jelentősen megváltozik, térfogata kevesebb, mint 1%-ára csökken, és a végső kiválasztásra kerülő anyagok vizelet formájában kiürülnek a szervezetből.

Az ultrafiltrátum képződésének helye a glomeruláris kapilláris fal, ami három különálló, de mégis egymásra szorosan ható rétegből áll. A legbelső réteget a fenesztrált endothelium képezi, míg a legkülső réteget a Bowman-tok viscerális lemezét alkotó epithel sejtek, a podocyták alkotják. A szomszédos podocyták lábnyúlványokkal érintkeznek, így a kapcsolódás helyén létrejön egy résmembrán (slit diaphragma, SD), mely elfedi az endothel sejtek között lévő fenesztrátot. A glomeruláris fal harmadik eleme az endothelium és a podocyták között található glomeruláris bazális membrán (GBM). A glomeruláris kapilláris fal, vagyis ez a három réteg képezi a filtrációs barrieret. A három réteg bármelyikének sérülése esetén proteinuria alakulhat ki (Kestilä és mtsai, 1998; Sugimoto és mtsai, 2003; Nakagawa és mtsai, 2007; Jarad és Miner, 2009; Jeansson és mtsai, 2009; Salmon és mtsai, 2012a; Salmon és Satchell, 2012b). A filtrációs barrieren keresztül létrejövő ultrafiltráció függ a vérben keringő anyag méretétől, töltésétől, valamint a glomerulusban lévő nettó filtrációs nyomástól. Fiziológias körülmények között a glomerulus kapillárisokban a szervezet más területein előforduló kapillárisokhoz képest, magasabb hidrosztatikai nyomás uralkodik, mely körülbelül 45 Hgmm. A filtrátum keletkezéséhez ez a hidrosztatikai nyomás járul hozzá, mellyel ellentétes a plazma onkotikus nyomása (kb. 20 Hgmm), illetve a Bowman-tokban lévő folyadék hidrosztatikai nyomása, mely 10 Hgmm. Mivel a filtrációs barriernek köszönhetően a szűrlet gyakorlatilag fehérjementes, ezért a Bowman tokban az onkotikus nyomása 0 Hgmm-nek tekinthető. Az így létrejött nettó filtrációs nyomás 15 Hgmm, mely a kapillárisból a Bowman-tok irányába hat (Farquhar, 1975; Venkatachalam és Rennke, 1978; Kalluri, 2006).

A filtrációs barrier elemei különböző mértékben és más-más adottságaikkal járulnak hozzá a szűréshez. A glomerulusban lévő kapillárisok sok szempontból egyediek. A kapillárisfal nem tartalmaz prekapilláris sphinctereket, valamint erősen perforált, mivel az

endothel sejtek rétege nem folyamatos, ezért a sejtek között 60-100 nm-es pórusok, fenesztrák alakultak ki (Levick és Smaje, 1987). Így az endothelium a nagyméretű rések és a hiányzó diaphragma miatt nem jelent számottevő gátat a vérben keringő anyagok számára, csak az aggregálódott és óriás sejteket tartja vissza, a legtöbb anyag átjut rajta. 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 (Kanwar és mtsai, 1980; Jeansson és Haraldsson, 2005). Ez a fibrózus rácsszerű szerkezetet létrehozó glycocalyx a vérből számos molekulát megköt, így egy 200 nm-nél is vastagabb réteget formál, melyet endotheliális felszíni rétegnek nevezünk (ESL; endothelial surface layer). A filamentózus szerkezet és az erősen negatív töltés miatt a fenesztrák keskenyebbek és „visszatartóbbak” lesznek. Ha enzimatisz emésztés során megsemmisül az ESL bármelyik komponense, az ESL vékonyabb lesz, negatív töltést veszít, így fokozódik az albumin filtráció. Ezért tekinthető az ESL az endothelium esszenciális elemének, és alapvetően meghatározza a glomeruláris permeabilitást (Jeansson és Haraldsson, 2006; Dane és mtsai, 2013).

A GBM az endothel sejtek és a podocyták bazális membránjának fúziójából jön létre. 144 különböző proteint és proteoglikánt tartalmaz extracelluláris mátrixba ágyazottan, melyek közül a legfontosabbak a kollagének, a laminin és a heparán-szulfát (Timpl, 1989; Harvey és mtsai, 1998; Lennon és mtsai, 2014; Byron és mtsai, 2014). Szerkezetileg nem rendezetlen, 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 (Kubosawa és Kondo, 1985; Hironaka és mtsai, 1993). Számos negatív töltéssel rendelkező alkotója van, tehát töltésbarrierként is szerepelhet, viszont ez nem túl hatékony szűrést biztosít, mivel bizonyított, hogyha a GBM-ban 50%-kal lecsökkentjük a fix anionos töltésű helyek számát, a vizelet albuminkoncentrációjára ez semmilyen hatást nem gyakorol (Harvey és mtsai, 2007). Mindeztáig tisztázatlan a töltésbarrier helye a filtrációs apparátusban, viszont valószínűleg a podocyták és az endothel sejtek glycocalyxa hatékonyabb töltésbarrier, mint a GBM. 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 barriert. Ha molekuláris szerkezete zavart szenved, súlyos proteinuriával járó betegségek jelennek meg, úgymint a Pierson és Alport szindróma, melyek az esszenciális β 2 laminin, illetve a IV-es

típusú kollagén abnormalitásainak következtében alakulnak ki (Miner és Sanes, 1994; Matejas és mtsai, 2010).

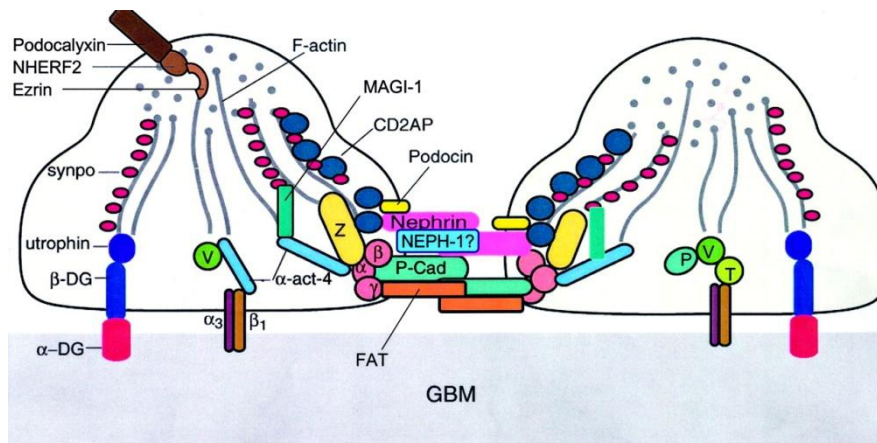
A podocyták a glomeruláris kapilláris fal legdisztálisabb rétegét képezik. A differenciált podocyták arborikus sejttesttel rendelkeznek, melyek különböző projekciókat képeznek: a főnyúlványokat mikrotubulusok és intermedier filamentumok merevítik, míg a finomabb lábnyúlványok aktinban gazdag kitüremkedések, melyek fokális adhéziók révén kapcsolódnak a GBM-hoz. A szomszédos podocyták lábnyúlványai a résmembrán által fizikailag összekapcsolódnak, mely tight junctionhoz hasonló szoros illeszkedést biztosít a két sejt között, viszont különbözik attól, mivel alkotó fehérjéi közül hiányzik az e-kadherin, és szerkezetileg porózus (Tassin és mtsai, 1994). 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 proteinúriával járó vesebetegségek kialakulásában. Ezek a kutatási eredmények rávilágítanak arra, hogy a podocyták szerkezeti integritása kulcsfontosságú a glomeruláris filtrációs barrier kialakításában és fenntartásában (Scott and Quaggin, 2015). 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). Emellett 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 (Abrahamson és mtsai, 2009).

3.2 Podocyták és podocyta eredetű betegségek

A podocyták terminálisan differenciált epithel sejtek, melyek egyedi és komplex sejtes szerveződéssel rendelkeznek. Maga a sejt három különböző szegmensre osztható: úgymint a terjedelmes sejttest, mely betüremkedik az urináris térbe; a főnyúlványok, melyek végignyúlnak a kapilláris mentén; és az ezekből kitüremkedő lábnyúlványok. A kapcsolódó sejtek lábnyúlványai, mint az ujjak fűződnek össze. A sejtek közötti filtrációs rést elfedő résmembránba extracellulárisan elhelyezkedő fehérjék ágyazódnak, melyek egy komplexet alkotnak, és intracellulárisan elhelyezkedő citoskeletális fehérjékhez kapcsolódnak (Matovinović és mtsai, 2009).

A podocyták polarizált epithel sejtek luminális/apikális, bazális és jukcionális doménnel rendelkeznek. A bazális domén feladata a sejtek rögzítése a GBM-hoz $\alpha 1\beta 3$ integrin és α -, β -disztroglikánok által. Az apikális membrán ujszerű kitüremkedéseket

növeszt a Bowman-tok ürterébe. Az apikális membrán és a SD is vastag felszíni réteggel borított, mely gazdag szialo-glikoproteinekben, úgymint podokalyxinben, podoendinben, melyek erős negatív töltést biztosítanak a podocytáknak. Ez korlátozza a negatív töltésű fehérjék átjutását a vizeletbe, illetve megakadályozza, hogy a podocyták a parietális epithel sejtekkel kapcsolatba lépjenek, valamint elkülöníti egymástól a szomszédos sejteket (Pavenstädt és mtsai, 2003). A junkcionális domént a podocyták közti SD és az abba ágyazott fehérjekomplex alkotja. A komplex elsőként felfedezett alkotója a nephrin, mely strukturális és jelátviteli fehérje is egyben, intracellulárisan podocinhoz és CD2-asszociált fehérjéhez (CD2AP) kapcsolódik. Számos egyéb protein vesz részt a SD kialakításában, mint a P-cadherin, ZO-1 (zonula occludens-1), FAT, Neph-1, -2, -3, melyek többsége intracellulárisan citoszkeletális fehérjékkel kapcsolódik. A podocyták nagyon fejlett citoszkeletális hálózattal rendelkeznek, mely biztosítja az egyedi sejtalakot, a nyúlványok kialakítását. A sejtestben és a nyúlványokban a mikrotubulusok és intermedier filamentumok, mint a vimentin és dezmin dominálnak. A membrán alatt vékony aktin filamentumok húzódnak. A citoszkeletont az aktin, miozin, α -aktinin, talin, paxillin és vinkulin képezik, melyek nemcsak a sejtalak fenntartásáért felelősek, hanem biztosítják az átalakulást, a különböző körülményekhez való adaptáció során. Ez által a citoszkeletális váz által képes a podocyta sejtréteg ellátni fő feladatát a kapilláris fal támasztását, és ellenállni a kapilláris nyomásnak (1. ábra; Mundel és Shankland, 2002).



1. ábra: Két interdigitáló podocyta lábnyúlvány és a köztük létrejövő résmembrán molekuláris szerkezete (Mundel és Shankland, 2002)

A podocyták három doménre oszthatóak: bazális doménjük révén a bazális membránhoz horgonyozottak; lumenális doménjük a Bowman-tok ürterébe nyúlik; míg a szomszédos podocytákkal a junkcionális domén révén létesítenek kapcsolatot. Az interdigitáló sejtek között létrejött junkciót résmembránnak (slit diaphragma, SD) nevezzük. α -act4: α -aktinin-4; α 3 β 1: α 3 β 1 integrin; α -DG: α -disztroglikán; β -DG: β -disztroglikán; Na(+)/H(+)/ERF2: Na(+)/H(+) kicserélő regulatorikus faktor 2; P: paxillin; P-cad: P-cadherin; Synpo: synaptopodin; T: talin; V: vinculin; Z: ZO-1.

A podocyták számos élettani kihívásnak vannak kitéve: nyomásváltozások, vérplazma összetételének változása, ozmotikus hatások, pH, glükózkoncentráció, metabolitok felszaporodása, stb. Funkciójuk betöltése során ezekhez a körülményekhez tudnak alkalmazkodni, dinamikus változásokra képesek. A különböző stresszorokhoz való adaptációjuk során a stressznek kitett sejtek számos fehérje expresszióját növelik, mint például citoskeletális fehérjék, dezmin, vimentin, vagy magas glükóz szint hatására növelik a VEGF szintézisét, de antioxidánsokat is termelnek a károsító reaktív szabadgyökök lekötésére (Nagata, 2016).

A legtöbb esetben a vesekárosodás első jele a proteinuria, mely korai következménye a podocytakárosodásnak. 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 nem egy passzív folyamat, hanem energiaigényes aktin átrendeződés áll a háttérben. Az aktin hálózat, illetve az aktin-kapcsolt fehérjék átalakulása eredményezi a megváltozott sejtalakot patológiás körülmények között, melynek eredményeként a podocyták nem képesek ellátni legfőbb feladataikat (Shankland, 2006). Így a barrier funkciók súlyos károsodása jön létre, ami végső soron proteinuriában nyilvánul meg (D'Agati és mtsai, 2011).

Számos kutatás számol be a podocyták molekuláris károsodása, illetve a proteinuria és a glomerulosclerosis kapcsolatáról (Vincenti és Ghiggeri, 2005; Daskalakis és Winn, 2006; Mukerji és mtsai, 2007; Benoit és mtsai, 2010). A krónikus vesebetegségekből a vesefunkció romlása a fiziológiásan működő glomerulusok elvesztéséből adódik. Az esetek nagy többségében a glomerulusvesztés a podocyták károsodásával kezdődik. A podocytákat ért negatív hatások következtében a podocyták a fentebb leírt FPE során átalakulnak, melynek következménye a barrier funkció elvesztése, a proteinuria, mely súlyosbodó vesebetegségek kiinduló pontja (Pavenstädt és mtsai, 2003). A korai podocytakárosodás visszafordítható, ha az aktin hálózat visszanyeri épségét, a lábnyúlványok ismét kialakulnak, és az interdigitáló podocyták újra barrier képeznek a proteinvesztés megakadályozására, tehát a FPE időben visszafordítható.

A FSGS is egy podocytopathia következtében kialakuló patológiás állapot, mely az esetek többségében nephrosis szindrómához társul, és meglehetősen gyakran a vesefunkció elvesztéséhez vezet. A FSGS-nak három formáját különítjük el: a degeneratív változások eredményezik a klasszikus formát, az inflammatorikus események a félhold forma kialakulásához vezetnek, illetve a dedifferenciálódás vezet a kollapszusos FSGS-hoz (Kriz és

LeHir, 2005). A degeneratív forma fordul elő a leggyakrabban. Ebben az esetben az elvesztett podocytaikat a megmaradó podocytaik pótolják, méghozzá úgy, hogy megnő a sejttest. Viszont a megmaradó sejtek nem tudják teljesen fedni a GBM-t, így a GBM és a parietális epithel sejtek összenőnek (tuft adhézió). Ezen összenövésnek léziókat formálnak, így alakul ki a szegmentális glomerulosclerosis, majd a későbbiekben az egész lebenyre kiterjedhetnek. Mindemellett megjelenik egy kóros irányú filtráció az interstitium felé (Kriz és mtsai, 1998; Kriz és mtsai, 2001).

A glomerulus gyulladással kapcsolatos folyamatai kezdetben nem érintik a podocytaikat, viszont a folyamat előrehaladtával a gyulladással kapcsolatos mediátorok hatására a podocytaik kóros hiperfunkciója alakul ki, számos apró nyúlványt fejlesztenek az apikális membránból. Ezek a mikrovilluszok minden irányba kiterjednek, elérik a parietális epithel sejteket, azok között áthatolva a parietális epithel sejtek bazális membránjához kapcsolódnak, annak mentén terjednek, így az epithel sejteket leválasztják a bazális membránról (Le Hir és mtsai, 2001). Ennek következtében a parietális epithel sejtek proliferálnak, melyek félhold alakot hoznak létre az urináris térben. Ha a gyulladással kapcsolatos folyamatokat még idejében megszüntetjük, akkor a fiziológiai működés helyre áll, ha tovább folytatódnak, akkor az egyre nagyobb félholdak az urináris térben obstrukcióhoz vezetnek.

Az érett podocytaik nem képesek proliferálni, viszont egyes kóros esetekben mégis élénk proliferációt mutatnak, mint a HIV fertőzötteknél jelentkező kollapszus FSGS-ban. Ebben a betegségben a proliferáló podocytaik nem differenciált sejtek, amelyek átvehetnék a régi sejtek helyét, hanem dedifferenciáltak (Barisoni és mtsai, 1999). A sejtek alakja teljesen különbözik a normál sejtektől, és számos citoskeletális fehérje hiányzik. Ez a kóros sejtproliferáció obstrukcióhoz vezet azáltal, hogy a Bowman-tokot feltöltik a dedifferenciált sejtek, majd a folyamat előrehaladtával a glomerulus kollapszusa következik be.

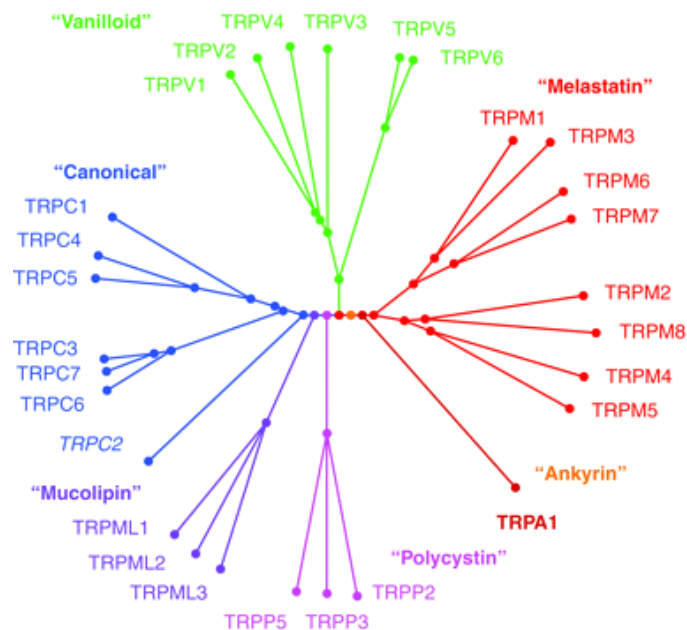
Az elmúlt 20 évben megnőtt az idiopathiás FSGS megbetegedések előfordulása, melynek kialakulásáért mind genetikai okok, mind környezeti hatások egyaránt felelősek lehetnek (Haas és mtsai, 1995). Genetikai vizsgálatok rámutattak arra, hogy számos esetben a podocytaik működésében fontos szerepet betöltő fehérjék mutációja áll a betegség hátterében. A nephrint kódoló NPHS1 génben bekövetkezett mutáció felelős a veleszületett autoszomális recesszív nephrosis szindróma, az úgynevezett Finn-típusú nephropathia kialakulásáért (Santín és mtsai, 2009; Ovunc és mtsai, 2012). Egy másik SD fehérje a podocin is hasonló jelentőséggel bír, hiszen az azt kódoló NPHS2 gén mutációja kapcsolatba hozható a szteroidrezisztens idiopathiás nephrosis szindrómával, valamint a familiális autoszomális recesszív és a felnőtt korban előforduló FSGS betegségekkel (Boute és mtsai, 2000; Kerti és mtsai, 2013).

A podocyták citoskeletális rendezettségében nagy jelentőségű aktin-kötő fehérjének, az α -aktinin-4-nek a génjében (ACTN4) végbemenő mutáció felnőtt korban megjelenő FSGS megbetegedést eredményez (Kaplan és mtsai, 2000; Weins és mtsai, 2005). A SD ioncsatornájának a tranziens receptor potenciál klasszikus (TRPC) családba tartozó TRPC6 fehérjének (TRPC6) a *gain-of-function* mutációja egy meglehetősen agresszív autoszómális domináns FSGS betegség okozója (Winn és mtsai, 2005; Reiser és mtsai, 2005; Heeringa és mtsai, 2009).

3.3 TRP ioncsatornák a vesében

3.3.1 TRP ioncsatornák

1969-ben Cosens és Manning felfedeztek egy olyan *Drosophila* mutánst, melynek retinális sejtjei hosszantartó fény hatására nem folyamatos, hanem tranziens válasszal reagáltak. A fotoreceptor sejtek vizsgálata során kimutatták, hogy folyamatos fény hatására a normál plató fázisos receptor potenciál helyett tranziens receptor potenciál keletkezik, így ezeket a mutáns fehérjét tranziens receptor potenciál (TRP) proteineknek nevezték el (Cosens és Manning, 1969). Húsz évvel később a *trp* gén szekvenálása feltárta, hogy egy Ca^{2+} -permeábilis kationcsatornáról van szó (Montell és Rubin, 1989).



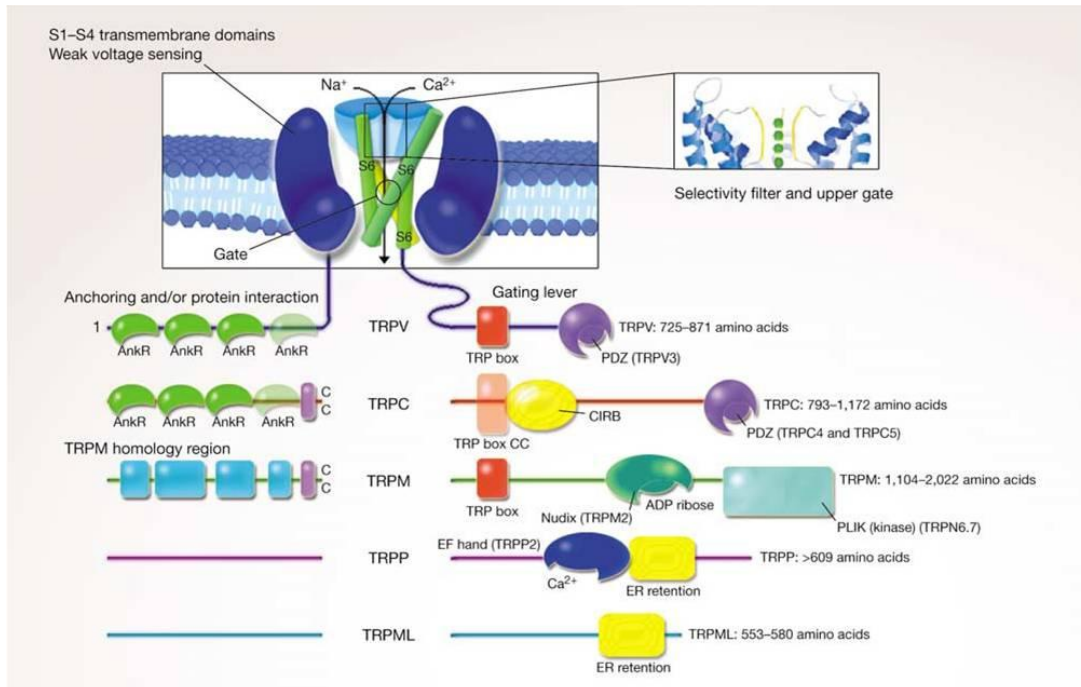
2. ábra: TRP szupercsalád (Gees és mtsai, 2010)

Az emlősökben megtalálható 28 TRP csatornát hat alcsaládba sorolhatjuk: ezek a klasszikus (TRPC), a vanilloid (TRPV), a melasztatin (TRPM), az ankyrin (TRPA), a policisztin (TRPP) és a mukolipin (TRPML) családok.

1995-ben írták le az első emlős *trp* fehérjét (Wes és mtsai, 1995), majd az elkövetkező évek alatt számos *trp* gént azonosítottak. Ezek közül emlősökben 28 TRP csatorna

expresszálódik (2. ábra), melyeket szekvencia homológia alapján 6 alcsoaldba sorolnak: úgymint TRPC (klasszikus/cannonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melasztatin), TRPA (ankirin), TRPP (policisztin) és TRPML (mukolipin). A TRPC alcsoald tagjai mutatják a legnagyobb homológiát a *Drosophila* TRP génnel, ezért kapták a klasszikus TRP elnevezést. A többi alcsoald az első felfedezett tagról kapta a nevét: a TRPV család a vanilloid receptor-1 (VR1, TRPV1), a TRPM a tumorszupresszor melasztatin 1 (TRPM1), a TRPA az ankirin-transzmembránprotein-1 (ANKTM1, TRPA1), a TRPML a mukolipin 1 (TRPML1) és a TRPP család a policisztin-2 (PKD2, TRPP2) fehérje homológjait foglalja magába (Montell, 2005; Pedersen és mtsai, 2005; Gees és mtsai, 2010).

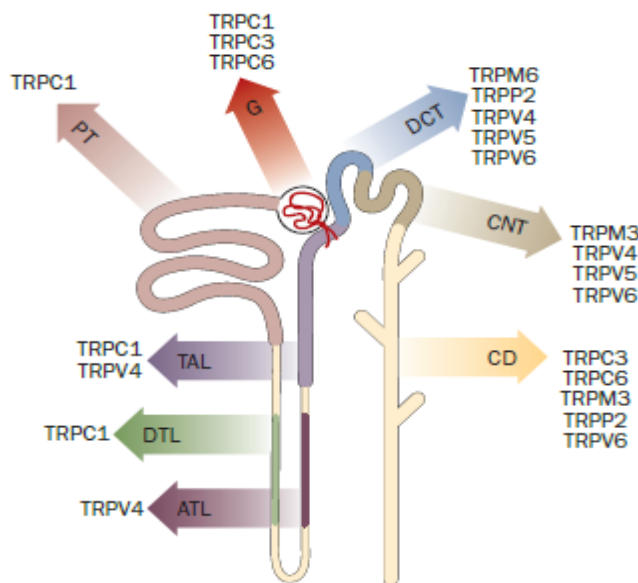
A TRP csatornák alapvető szerkezete megegyezik a feszültség-függő K^+ -csatornák felépítésével: négy, hat transzmembrán doménből (TM1-6) álló alegység alkot egy funkcionális csatornát, ahol a TM5 és TM6 között lévő hurkok formálják a kation áteresztő pórust. A rendkívül hosszú citoplazmatikus N- és C-terminálisok számos regulatórikus domént tartalmaznak, melyek szabályozzák a csatorna nyitását (3. ábra). A négy kapcsolódó alegység lehet azonos, vagy jellemzően az alcsoaldon belül eltérő alegységekből létrejött heterotetramer, melynek a funkciója valószínűleg eltér a homotetramerekétől (Clapham, 2003).



3. ábra: TRP csatornák szerkezete (Clapham, 2003)

A TRP csatornák rendkívül hosszú citoplazmatikusan elhelyezkedő N- és C-terminálisokkal rendelkeznek, melyek számos szabályzó domént tartalmaznak. Az N-terminálison a TRPC és TRPV család tagjai 3-4, míg a TRPA1 fehérje 14 ankirin (AnkR) kötőhellyel rendelkezik (a TRPA csatornát az ábra nem mutatja). A C-terminálison többféle szabályzó domént található: TRP box, CRIB domént: kalmodulin kötőhely, EF hand: Ca²⁺ kötőhely, Nudix: ADP ribóz kötőhely. A TRPM csatornák egyedülállóan enzim aktivitással rendelkező doménnel rendelkeznek, mely egy foszfolipáz C (PLC) interakciós kináz (PLIK domént).

A legtöbb TRP csatorna Ca^{2+} -ra permeábilis, viszont a Ca^{2+} -szelektivitásuk nagyon változó. A TRPM4/5 csatorna gyakorlatilag Ca^{2+} -ra nézve impermeábilis ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} < 0,05$), de az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$) által szabályozott, míg a TRPV5 és TRPV6 Ca^{2+} -ra specifikusnak mondható ($P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}} > 100$; Voets és mtsai, 2001). A TRP csatornák éppen ezért az intracelluláris Ca^{2+} -jelátvitel modulátorainak tekinthetők. A szabad citoszólikus Ca^{2+} számos sejt folyamatban játszik kulcsszerepet, a megtermékenyítéstől, a sejtprolifерáción, a sejt differenciáción át, a szekréción és a kontraktilitáson keresztül egészen a sejthalálig. A TRP csatornák kiemelkedő szerepük van az $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ szabályozásában: egyrészt sejt felszíni Ca^{2+} -permeábilis csatornaként, hozzájárulnak a Ca^{2+} belépéséhez, másrészt kation csatornaként megváltoztatják a membrán potenciált, így befolyásolják a Ca^{2+} belépés hajtóerejét. Mindemellett alternatív Ca^{2+} permeábilis útvonalak, illetve az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadítást is szabályozzák. Egyes TRP csatornák nem csak sejt felszíni csatornaként működnek, hanem intracelluláris organellek membránjában is megtalálhatóak, így ők maguk is részt vesznek a Ca^{2+} -raktárak ürítésében (Gees és mtsai, 2010).



4. ábra: TRP csatornák expressziója humán nephronban (Woudenberg-Vrenken és mtsai, 2009)

A TRP csatornák számos tagja kifejeződik a vesében. A nephron minden szegmensében előfordul TRP csatorna, melyek jelentős szerepet töltenek be a nephron fiziológiás működésében. (G: glomerulus; PT: proximális tubulus; DTL: Henle-kacs vékony leszálló szár; ATL: Henle-kacs vékony felszálló szár; TAL: Henle-kacs vastag felszálló szár; DCT: disztális kanyarulat csatorna; CNT: összekötő szegmentum; CD: gyűjtőcsatorna)

A TRP csatornák számos ingerlékeny és nem-ingerlékeny szövetben megtalálhatóak, és szerzteágazó funkciókban vesznek részt: a szenzoros működéstől, mint a feromonok, íz, fájdalom és hőmérsékletérzékelés, a homeosztatis funkciókig, úgymint a Ca^{2+} és Mg^{2+} reabszorpció, ozmoreguláció, továbbá motoros működésekben, izomkontrakcióban, vazomotoros regulációban is. A vese jól mutatja, hogy a TRP csatornák milyen széleskörű funkcióval bírnak, hiszen számos TRP csatorna expresszálódik végig a nephronban (4. ábra, Woudenberg-Vrenken és mtsai, 2009). Ezek a TRP csatornák elengedhetetlenek a vese

fiziológias működéséhez: a TRPC3 ioncsatorna vazopresszin hatására elősegíti a Ca^{2+} -belépését a gyűjtőcsatorna principális sejtjeibe (Goel és mtsai, 2007); a TRPM3 és TRPV4 csatornák ozmoszenzorként működhetnek (Grimm és mtsai, 2003; Mutai és Heller, 2003), míg a TRPP1/TRPP2 komplex mechanoszensor szerepet tölt be a renális epithel sejtek ciliáiban (Nauli és mtsai, 2003). Egyre több bizonyíték utal arra, hogy a csatornákat érintő változások szerepet játszanak szerzett és öröklött vesebetegségekben. Ismert, hogy a TRPC6 csatorna *gain-of-function* mutációja FSGS-hoz vezet (Winn és mtsai, 2005). A TRPP2 malformációja autoszomális-domináns policisztás vesebetegség kialakulását eredményezi (Grantham, 2008). A TRPM6 fehérje mutációja másodlagos hypokalaemiával kísért hypomagnesemiát okoz (Schlingmann és mtsai, 2002), a TRPV1 csatorna károsodása renális hipertenzióban játszik szerepet (Nilius és mtsai, 2007), a TRPC1 csatorna a diabéteszes nephropathia kialakulásában vesz részt (Du és mtsai, 2007), míg a TRPV5 alacsony expressziós szintje hozzájárul az idiopatiás hyperkalcaemia és az angolkór tüneteinek kialakulásához (Müller és mtsai, 2002; Woudenberg-Vrenken és mtsai, 2009).

3.3.2 TRP csatornák szerepe a tubuláris transzportban (Ca^{2+} , Mg^{2+} reabszorpció, TRPV5/6, TRPM6)

A vesében előforduló TRP csatornák fontos szerepet töltenek be a vese fiziológias működésében. A TRPV5, TRPV6 és TRPM6 a disztális tubulus epithel sejtjeiben elengedhetetlenek a Ca^{2+} és Mg^{2+} reabszorpciójához (Minke, 2006).

A Ca^{2+} esszenciális a fiziológias sejtműködéshez. Három folyamat szabályozza a szervezet Ca^{2+} -szintjét, és tartja azt egyensúlyban: az intestinális abszorpció, a vesékben végbemenő reabszorpció és a csontban történő raktározás. A vesében a Ca^{2+} mozgása paracelluláris (passzív) és transzcelluláris (aktív) transzport révén valósul meg. Az aktív Ca^{2+} reabszorpció a disztális kanyarulat csatorna és az összekötő szegmens területén megy végbe az epithel sejtek apikális membránjában expresszálandó TRPV5 és TRPV6 ioncsatornák segítségével (Hoenderop és mtsai, 2005). A TRPV5 és TRPV6 csatornák a vanilloid család többi tagjától különböznek, mivel a TRPV1-4 egyik tulajdonsága, hogy hőmérséklet növekedés hatására bizonyos hőmérséklet tartományban aktiválódnak, viszont a TRPV5 és TRPV6 csatornákra ez nem jellemző. Ezen túl a legfontosabb sajátosságuk, ami miatt egyedülállóak a TRP szupercsaládban, hogy a legnagyobb Ca^{2+} -szelektivitással rendelkeznek, mivel a $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^{+}}$ értéke nagyobb 100-nál (Voets és mtsai, 2001). A két csatorna nagymértékű homológiát mutat. A funkcionális TRPV5 és TRPV6 csatornák többnyire homotetramerek, de heterotetramereket is alkothatnak (Gees és mtsai, 2010), illetve jellemző

rájuk, hogy fiziológias körülmények között folyamatosan aktívak. A nephronban a TRPV5 ioncsatorna felelős a Ca^{2+} reabszorpciójáért a disztális kanyarulat csatorna és az összekötő tubulus szegmensekben. A TRPV5 csatornán a sejtbe belépő Ca^{2+} kalbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ és kalbindin- $\text{D}_{28\text{K}}$ kalciumkötő fehérjékhez kapcsolódik, amely fehérjék a bazolaterális membránhoz szállítják a Ca^{2+} -ot, ahol $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger és a Ca^{2+} -ATPáz pumpálja ki a sejtéből. A megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ gátolja a TRPV5 csatornát, így megvédve a sejtet a Ca^{2+} toxicitástól. A TRPV5 csatornát direkt módon szabályozza több Ca^{2+} homeosztázisban jelentős regulátor, úgymint a calcitriol, a parathormon, az ösztrogén és a Klotho enzim. A TRPV6 ioncsatorna az intestinális Ca^{2+} abszorpcióban játszik fontosabb szerepet (Hsu és mtsai, 2007; Woudenberg-Vrenken és mtsai, 2009; Zhou és Greka, 2016).

A vese az ultrafiltrátum Mg^{2+} tartalmának 3-5%-át üríti a vizelettel, mivel a filtrált Mg^{2+} nagyobb része reabszorbeálódik a disztális kanyarulat csatornában. Végig a nephron mentén paracelluláris transzporttal, míg a korai kanyarulat csatorna szegmensben a TRPM6 csatorna által aktív transzporttal reabszorbeálódik a filtrált magnézium 5-6%-a (Dimke és mtsai, 2011). A TRPM6 és TRPM7 ioncsatornák nagy homológiát mutatnak, és mindkettő fontos a Mg^{2+} transzportban. A TRPM7 csatorna ubiquiter, míg a TRPM6 dominánsan a vesében és az intestinumban expresszálódik, és résztvesz a Mg^{2+} abszorpcióban és reabszorpcióban. A vese kanyarulat csatorna szakaszán az epithel sejtek apikális membránjában található (Gees és mtsai, 2010). A TRPM6-ot számos faktor szabályozza, úgymint az alacsony Mg^{2+} -szint, ösztrogén és az epidermális növekedési faktor (EGF). Az EGF volt az első magnesiotrop hormon. Az epithel sejtek basolaterális membránjában helyezkedik el az EGFR, melynek aktiválódásakor intracelluláris útvonalak révén stimulálja a TRPM6 ioncsatornát, így a Mg^{2+} felvételt. Az EGFR gátlása megakadályozza a TRPM6 ioncsatorna transzlokációját az apikális membránba, így hypomagnesaemiát eredményez (Woudenberg-Vrenken és mtsai, 2009).

3.3.3 TRPC6 szerepe a filtrációs barrier kialakításában

Klinikai adatok azt mutatják, hogy a proteinúriával járó vesebetegségben szenvedők közel 50-60%-ánál 10 éven belül kialakul a végstádiumú vesebetegség (Woudenberg-Vrenken és mtsai, 2009). Nemrégiben a figyelem középpontjába került a TRPC6 ioncsatorna. Kimutatták, hogy az autoszomális domináns FSGS esetek egy meglehetősen agresszív formájának kialakulásáért a TRPC6 ioncsatorna *gain-of-function* mutációja felelős (Hofstra és mtsai, 2013). Nemcsak az örökletes FSGS, hanem a nem-genetikus, szerzett nephropathiák egy részében is a TRPC6 ioncsatorna fokozott expresszióját írták le, mint például a

membranosus glomerulonephritis és a minimal change nephropathia esetében (Möller és mtsai, 2007). Tehát bizonyítottan mind a megnövekedett csatornaaktivitás, mind a fokozott TRPC6 expresszió patológiásan emelkedett intracelluláris Ca^{2+} -szintet eredményez, mely podocytopathiához vezet (Ilatovskaya és Staruschenko, 2015).

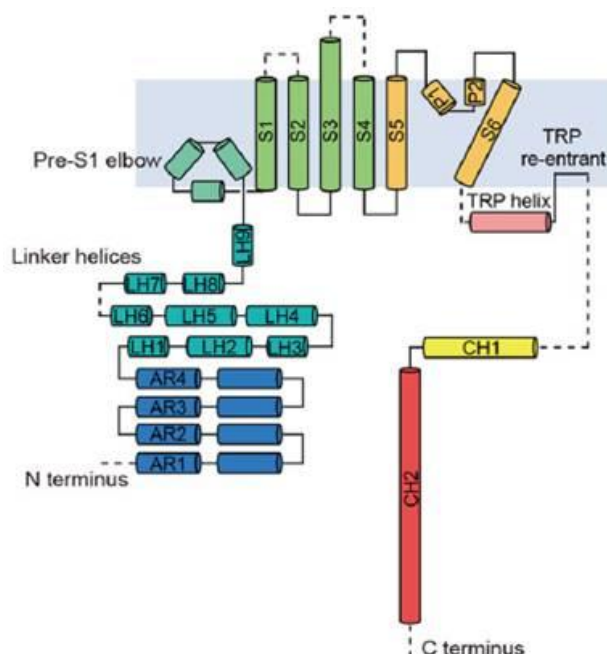
A TRPC6 a vesében expresszálódik a glomerulus mindhárom sejtfeleségében: a podocytákban, az endothel és a mesangiális sejtekben is, illetve a gyűjtőcsatorna területén (Dietrich és mtsai, 2010). A podocyták membránjában SD proteinekkel interakcióban részt vesz a filtrációs barrier kialakításában. Podocinnal, nephrinnel, α -aktinin-4-gyel és más SD fehérjékkel komplexet alkotva esszenciális szerepet tölt be a podocyta funkciók ellátásában (Reiser és mtsai, 2005). A TRPC6 csatorna és a nephrin kapcsolata igen fontos, mivel a TRPC6 csatorna tirozin foszforilációját követően komplexet alkot a foszfolipáz $C\gamma 1$ -gyel (PLC $\gamma 1$), és ennek a komplexnek a kialakulása az előfeltétele a TRPC6 membránlokalizációjának. A nephrin kötődve a foszforilált TRPC6-hoz gátolja a komplex kialakulását, így megakadályozza a TRPC6 transzlokációját. Olyan FSGS esetekben, ahol a TRPC6 szenvedett mutációt, a módosult TRPC6 fehérje inszenzitív a nephrin fehérjére, így az ioncsatorna sejtfelszíni expressziójának és aktivitásának nincs akadálya (Kanda és mtsai, 2011; Szabó és mtsai, 2015). A megemelkedett TRPC6 expresszió általános jelenség a proteinúriával járó vesebetegségeken. A TRPC6 funkcionálisan kapcsolódik az aktin hálózathoz, mely átrendeződik TRPC6 overexpresszió esetén. Mindez arra utal, hogy a TRPC6 szerepet játszik a patológiás állapotok létrehozásában. Kóros körülmények között aktiválódása, megemelkedett $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t eredményez, mely a SD abnormalitásához és/vagy a lábnyúlványok csökkenéséhez vezet. Számos esetben a TRPC6 aktivációja felerősíti a kóros folyamatokat (Möller és mtsai, 2007).

A proteinuria egyik leggyakoribb kiváltó oka az albumintúlterhelés, melynek következtében a TRPC6 aktiváció révén megemelkedik a GRP78 stressz fehérje szintje, illetve a kaspáz-12 apoptózist indukál a podocytákban (Chen és mtsai, 2011). A hosszútávon fennálló albumin túlterhelés növeli a TRPC6 ioncsatorna expresszióját is, melynek következtében megemelkedik az $[Ca^{2+}]_{IC}$, csökken a nephrin és a synaptopodin szintje, mely F-aktin elváláshoz vezet, így csökken a lábnyúlványok száma (Jiang és mtsai, 2011).

3.3.3.1 A TRPC6 szerkezete, aktivációja és szabályozása

A TRPC6 ioncsatorna a TRP szupercsalád klasszikus családjának tagja. Ebbe a családba hét protein tartozik (TRPC1-7), melyek szekvencia homológia alapján két alcsaládot alkotnak, úgymint a TRPC1/4/5 és a TRPC2/3/6/7 (Zhu és mtsai, 1996; Strübing és mtsai,

2001; Strübing és mtsai, 2003; Trebak és mtsai, 2003). A TRPC csatornák nem szelektív kation csatornaként funkcionálnak, Na^+ -okat és Ca^{2+} -okat engednek be a sejtbe, a $P_{\text{Ca}^{2+}}/P_{\text{Na}^+}$ arányuk körülbelül 1,5:1 és 6:1 között van (Clapham és mtsai, 2001). A TRPC6 csatorna a TRPC3 fehérjével mutat a legnagyobb hasonlóságot, mivel ~73%-ban egyezik génjeik DNS szekvenciája (Li és mtsai, 2019). A TRP csatornák általános szerkezete jellemző a TRPC6-ra is. Négy egyforma alegység alkot egy funkcionális csatornát (homotetramer), de a TRPC3-mal heterotetramert is képezhetnek, melynek így más lesz a funkciója. Az alegységek az általános TRP szerkezetnek megfelelően transzmembrán „rétegre” és citoplazmatikus „rétegre” tagolhatók. A transzmembrán régió tartalmazza a feszültség-szenzor-szerű egységet, illetve az S5 és S6 domén között lévő hurok alkotja a pórus régiót. A TRPC3/6 csatornákra jellemző sajátosság, hogy az S3 az extracelluláris tér felé meghosszabodott, illetve az S3-S4 összekötő szakasz is hosszabb, így ez képezi a „pszeudo” extracelluláris domént (ECD; Fan és mtsai, 2018). Az intracelluláris N-terminális domén (NTD) 4 ankirin ismétlődést (AR1-4) és 9 kapcsoló hélixet (LH1-9) tartalmaz (Azumaya és mtsai, 2018). A C-terminálison (CTD) található egy összekötő hélix (CH1) és egy coiled-coil hélix (CH2), illetve egy TRP box domén. A membránba nyúló TRP visszatérő domén (TRP re-entrant) feladata a CTD-on található Pre-S1 könyök résszel és az S1 szegmensekkel való kapcsolódás (5. ábra; Tang és mtsai, 2018).

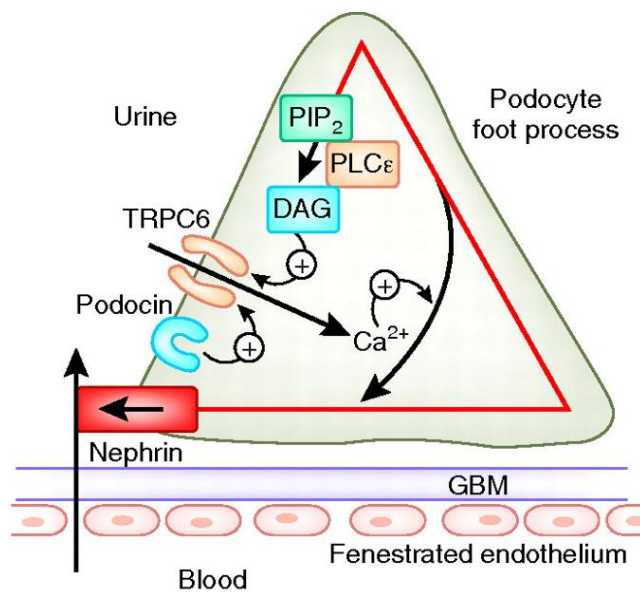


5. ábra: TRPC6 ioncsatorna egy alegységének szerkezete (Tang és mtsai, 2018)

A TRPC6 ioncsatornára is az általános TRP szerkezet a jellemző, négy alegység alkot egy funkcionális csatornát. Az alegységek transzmembrán doménből (TMD) és intracelluláris doménből (ICD) állnak. A TMD-t 6 szegmens képezi (S1-6), az S5 és S6 között lévő P1 és P2 egység (pórus 1 és -2) vesz részt a pórus kialakításában. Az ICD pedig az N-terminálison 4 ankirin (AR1-4) ismétlést, 9 kapcsoló (LH1-9) és a membránba ágyazottan Pre-S1 könyök régiót tartalmaz, míg a C terminálison két hélix (CH1 és CH2), a TRP domén, illetve a Pre-S1 könyökkel kapcsolódó szintén membránba nyúló TRP visszatérő domén található.

A TRPC6 csatorna aktivációjáról elmondható, hogy a diacilglicerol (DAG) és származékai közvetlenül, a protein kináz C (PKC) rendszertől függetlenül aktiválják, ezért a DAG „klasszikus receptorának” nevezhető (Hofman és mtsai, 1999). A DAG direkt

aktivációja mellett $[Ca^{2+}]_{IC}$ -hoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak is szabályozhatják a TRPC6 működését. A felszabaduló Ca^{2+} a DAG-lal együtt PKC enzimeket aktivál, melyek szabályozzák számos a Ca^{2+} -jelátvitelben szerepet játszó protein, így TRP csatornák aktivitását is (Venkatachalam és mtsai, 2003). A TRPC6 ioncsatorna bazális aktivitása nagyon alacsony podocytaokban, de számos jelátviteli folyamat képes fokozni ezt az aktivitást poszttranszlációs módosítások, pl. foszforiláció révén (Dietrich és mtsai, 2003; Dryer és Reiser, 2010). A TRPC6 ioncsatorna működését mechanikai ingerek is szabályozhatják: az ioncsatorna ugyan nem mechanoszenzitív, de a SD komplex tagjaként podocinnal kapcsolódva, képes reagálni a mechanikai ingerre is (6. ábra; Huber és mtsai, 2007; Dietrich és mtsai, 2010).

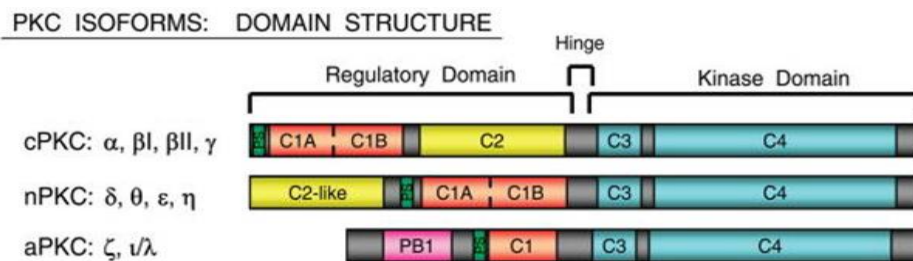


6. ábra: A TRPC6 aktivációja podocytaokban (Dietrich és mtsai, 2010)
A TRPC6 aktiválható direkt módon diacil glicerollal (DAG), mely a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfát (PIP₂) hasítása során keletkezik, illetve közvetett módon mechanikai inger hatására, melyet a podocin érzékel, és közvetít a TRPC6 csatorna felé. PLCε, foszfolipáz Cε; GBM, glomeruláris bazál membrán)

3.3.3.2 A protein kináz C (PKC) rendszer

A PKC izoenzimek olyan lipid-aktivált szerin/treonin protein kinázok, melyek számos szignalizációs útvonal részeként nagyon sokféle sejtfolymat szabályozásában vesznek részt, mint például a proliferáció, a differenciáció, a migráció, az adhézió és az apoptózis folyamatai. A PKC enzimek működésére általánosan jellemző, hogy G-protein-kapcsolt receptorok, vagy más növekedési faktor-dependens receptorok aktiválódásakor beinduló PLC útvonal részeként aktiválódnak. A PLC enzim hasítja a foszfatidil-inozitol-4,5-biszfoszfátot (PIP₂) DAG-ra és inozitol 1,4,5-trifoszfátra (IP₃), melyek további útvonalakat indítanak el. A DAG aktiválja a PKC izoenzimeket, melyek különböző fehérjéket foszforilálnak a szerin/treonin oldalán, míg az IP₃ intracelluláris receptorokhoz kötődve hozzájárul az $[Ca^{2+}]_{IC}$ emelkedéséhez (Steinberg, 2008).

A protein kináz A (PKA) és protein kináz G (PKG) családdal együtt a PKC izoenzimek alkotják az AGC protein kinázok családját. A PKC alcsalád 10 tagot foglal magába, melyek aktivációs mintázatuk alapján három csoportra különülnek (7. ábra; Newton, 1995; Webb és mtsai, 2000). Az első csoport a klasszikus PKC izoenzimeket (cPKC) foglalja magába, ezek a PKC α , - β_1 , - β_2 és - γ , melyek aktiválásukhoz DAG-t, vagy analógjait, mint a forbol 12-mirisztát 13-acetátot (PMA) és Ca²⁺-ot is igényelnek. A második csoportba a novel PKC-k (nPKC) tartoznak, ezek Ca²⁺-inszenzitív izoenzimek, tehát stimulációjukhoz csak DAG-ra van szükség. Ide soroljuk a PKC δ , - ϵ , - η és - θ fehérjéket. A harmadik csoport pedig a DAG- és Ca²⁺-inszenzitív izoenzimeket foglalja magába, melyek teljesen különböznek az előző enzimektől, ugyanis aktivációjukhoz csak foszfatidilszerint (PS) igényelnek. Ez az atípusos PKC-k (aPKC) családja, melynek két tagja van, a PKC $\lambda/1$ és - ζ (Newton, 2018). A különböző aktivációs mintázat a szerkezeti különbségekből adódik.



7. ábra: A PKC izoformák szerkezete és csoportosítása (Steinberg, 2008; ábra: Newton, 2018)

A PKC enzimek szerkezetüket tekintve két doménből állnak, mégpedig az N-terminálison elhelyezkedő regulatórikus és a C-terminálison található katalitikus, vagy kináz doménből. Mindkét domén konzervatív (ábrán színessel jelölve), illetve variábilis (szürke) egységekből tevődik össze. A cPKC (klasszikus) és nPKC (novel) csoportra jellemző, hogy a regulatórikus domén tandem C1 (C1a és C1b, piros) doménből áll, melyek felelősek a DAG és a PMA érzékeléséért. A C2 domén (sárga) a cPKC családban a Ca²⁺-szenzor, míg az nPKC-k inszenzitívek Ca²⁺-ra. Az aPKC enzimek egy módosult C1 domént tartalmaznak, mely nem érzékeny sem DAG-ra, sem PMA-ra. Minden PKC-nál a C1 domén előtt található az autoinhibitorikus pszeudoszubsztrát (PS; zöld) egység. Az aPKC (atípusos) család minden tekintetben különbözik a c- és nPKC családtól, hiszen egy C1 doménjük van, amely sem DAG-ra, sem PMA-ra nem érzékeny, valamint nincs C2 doménjük, viszont rendelkeznek egy PB1 (rózsaszín) boxsal, mely más fehérjék PB1 boxát ismeri fel.

Minden PKC-ra jellemző, hogy egy regulatórikus és egy katalitikus doménből áll, melyek erősen konzervált régiókból (C1-4) és a köztük elhelyezkedő változó doménekből (V1-5) tevődnek össze. A regulatórikus domén a PKC enzim N-terminális végén található, inaktív konformációban tartja az enzimet, mivel van egy autoinhibitorikus pszeudoszubsztrát doménje, melyet PS doménnek nevezünk. Ez a domén intramolekuláris kapcsolatot létesít a kináz doménnel, így megakadályozva a szubsztrát kötődését az aktivációs maghoz. Az N-terminálison a PS domént követően minden PKC tartalmaz egy C1 domént, melynek nPKC-k esetében nagy, cPKC enzimeknél alacsony az affinitása DAG-ra, míg az aPKC csoport érzéketlen DAG aktivációra. A c- és nPKC családban a C1 domén tandem szerkezetű, tehát egy C1a és egy C1b egységből áll. A C1a-hoz kötődik a DAG, míg a C1b a PMA-hoz hasonló

szerkezetű szubsztrátokat köt. A sorban következő domén a C2-es, mely a cPKC enzimekben a Ca^{2+} érzékeléséért felelős. A Ca^{2+} kötését követően az enzim a plazmamembránba transzlokálódik, ahol anionos foszfolipidekhez kötődik, és interakcióba lép a PIP_2 -tal. A nPKC-k szerkezetileg eltérő C2 doménnel rendelkeznek, mivel abból hiányzik a Ca^{2+} által vezérelt savmaradék, így ezeknek az enzimeknek nagyon alacsony az affinitásuk Ca^{2+} -ra. Ez a fontos különbség szolgál alapul a cPKC és nPKC izoenzimek eltérő farmakológiai tulajdonságaihoz. A harmadik csoportba tartozó aPKC enzimek sokkal nagyobb különbséget mutatnak szerkezetileg a többi PKC izoenzimhez képest, hiszen hiányzik a C2 doménjük, illetve módosult C1 doménjük is csak egy ciszteinben gazdag régiót tartalmaz, mely PIP_2 -ot és ceramidokat köt, de DAG-ot és PMA-ot nem. Továbbá rendelkeznek egy PB1 (Phox és Bem 1) elnevezésű egységgel, mely interakciókat létesít más PB1 domént tartalmazó fehérjékkel. Minden PKC enzim regulatórikus és katalitikus doménje között található egy V3 domén, mely a proteolitikus enzimek (kalpain, tripszin) számára biztosít hasítási helyet, ezzel szabályozva az enzimaktivitást (Li és Gobe, 2006; Newton, 2018).

A PKC enzimek aktivációs mechanizmusa két fő szakaszra osztható. Az első szakaszban kofaktorok által több foszforilációs lépésen keresztül stabilizálódik a kináz domén szerkezete, azaz „éretté” válik az enzim. A második szakaszban történik a tényleges aktiváció, ebben a fázisban az inaktív enzim citoszólikusan helyezkedik el egy stabil konformációban, és készen áll a másodlagos hírvivő általi aktivációra (Lipp és Reither, 2011). A cPKC családnál az aktiváció egy kétlépcsős folyamat. A PIP_2 hasítása révén megemelkedik a Ca^{2+} -szint, így a Ca^{2+} kötődik a C2 doménhez, és az enzim a plazmamembránba transzlokálódik, ahol kapcsolatba lép anionos foszfolipidekkel, így megváltozik az enzim konformációja, és a C2 domén leválik a kináz doménről. Következő lépésben a C1b domén DAG-t köt, megtörténik a második konformációváltozás, a PS domén leválik a szubsztrátkötő egységről, így aktívá téve az enzimet. A nPKC-k esetében az aktivációhoz elegendő a DAG megléte, illetve ezekből az enzimekből hiányzik a plazmamembrán szenzor, ezért más intracelluláris membránokhoz is transzlokálódhatnak, mint például a Golgi apparátushoz, vagy a mitokondriumhoz, esetleg a sejtmaghoz. Az aPKC-k sem Ca^{2+} -ot, sem DAG-ot nem igényelnek, aktiválódáskor a PB1 domén kötődik egy másik fehérje PB1 boxához.

A PKC izoenzimek kifejeződése és megoszlása a különböző sejtekben nagymértékben eltérő. Vannak olyan izoformák, melyek ubiquiternek tekinthetők, mint például a $\text{PKC}\alpha$, ugyanakkor más izoformák csak egy-egy szövetre jellemzőek. Az viszont egyértelműen megállapítható, hogy nincs a szervezetünknek olyan sejtfelesége, mely valamely PKC izoformát ne expresszálna. Ebből adódóan a PKC-k számos sejt folyamat szabályzásában

vesznek részt, mint például a proliferáció, a differenciáció, a sejtciklus és a sejthalál (Webb és mtsai, 2000). Jól ismert, hogy a PKC család tagjainak központi szerepe van a diabéteszes nephropathia (DN) pathogenezisében. A betegség két jellemző tüneteért, az albuminuriáért és a renális hypertrophiaért is a PKC izoenzimeket teszik felelőssé. A PKC α emelkedett expressziója eredményezi a résmembrán instabilitását, mivel a nephrin fehérje endocitózist serkenti, a PKC β enzim pedig részt vesz a hyperglycaemia indukálta renális fibrózis kialakításában (Teng és mtsai, 2014). A novel PKC izoformák közül az PKC ϵ -ról írták le, hogy emelkedett expressziója és aktivitása figyelhető meg diabéteszes körülmények között. PKC ϵ knock-out egerek tanulmányozása során az albuminuria szintje magasabb volt, ezért a PKC ϵ -nak protektív szerepet tulajdonítanak (Meier és mtsai, 2007), csakúgy, mint az atípusos PKC ν/λ izoformának is, amelyről kimutatták, hogy magas szinten expresszálódik podocytákban, és segítik az újonnan szintetizálódott nephrin sejtmembránba jutását, így megőrizve a résmembrán integritását (Satoh és mtsai, 2014).

2001-ben írták le először, hogy a PKC rendszer negatívan szabályozza a TRPC6 ioncsatornát (Zhang és Saffen, 2001). 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. Bousquet és munkatársai kimutatták, hogy a 12 lehetséges PKC foszforilációs hely közül ebben egyik sem vesz részt, hanem egy nem-kanonikus foszforilációs pont, mégpedig a 488-as szerin (Ser⁴⁸⁸) aminosav az, ami a PKC δ izoenzim targetjeként szolgál (Bousquet és mtsai, 2010), így a PKC δ a Ser⁴⁸⁸ foszforilációja révén negatívan szabályozza a TRPC6 ioncsatorna működését.

A humán podocytákban expresszálódó TRPC6 ioncsatorna PKC általi szabályozásáról az irodalomban mindeztidáig kutatási eredmény nem található.

3.3.4 Melegérzékeny TRPV csatornák a vesében

A TRPV5/6-tal szemben a TRPV1-4 ioncsatornák nem Ca²⁺ szelektívek, Ca²⁺-ra és Na⁺-ra nézve a permeabilitásuk (P_{Ca2+}/P_{Na+}) ~1 és ~15 közé tehető (Gees és mtsai, 2010). Egyedülálló módon ezek a csatornák hőérzékenyek, mégpedig a magas hőmérsékleti tartományban aktiválódnak: a TRPV1 42°C felett, míg ettől magasabb tartományban a már károsítóan magas hőmérséklet (>52°C) aktiválja a TRPV2-t. A TRPV3 fiziológias körülmények között 30-33°C felett aktiválódik, míg a TRPV4 24°C feletti hőmérsékletre érzékeny (Clapham, 2003). A hőmérséklet mellett mechanikai hatások is aktiválhatják őket. A TRPV2 csatorna az ér simaizom sejtjeiben a falfeszülésre érzékeny (Muraki és mtsai, 2003; Beech és mtsai, 2004), valamint a TRPV4 ioncsatorna is mechanoszenzor és ozmoszenzor is

egyben, a hypotoniás sejtduzzadás az egyik legfőbb aktivátora (Liedtke és Friedman, 2003; Suzuki és mtsai, 2003). Mindemellett szenzoros funkciókban is nagyon fontos szerepet töltenek be a termoTRP-k. A TRPV1 csatornát először fájdalomérző neuronokon írták le. Gyulladásos körülmények között a felszabaduló mediátorok szenzitizálhatják a TRPV1 ioncsatornát, így az már alacsonyabb hőmérsékleten aktiválódik, ami termális hyperalgesia kialakulásához vezet, vagyis a gyulladt bőrterületen fokozott fájdalom és meleg érzékeléshez (Caterina és mtsai, 2000).

A vesében a melegérzékeny TRPV-k közül a TRPV1 és TRPV4 játszik fontos szerepet. A TRPV1 csatorna a filtráció szabályozásában, valamint a Na^+ és víz homeosztázisban vesz részt, mivel a renális pelvist beidegző érzőrostokon kifejeződő csatorna aktivációjának hatására nő a filtrációs ráta, illetve fokozódik a Na^+ és víz exkréciója (Zhu és Wang, 2008). A csatorna a tubulusszakaszokon is expresszálódik, illetve a kismedencét és az uretert beidegző szenzoros neuronokon, ahol alacsony nyomású baroreceptorként funkcionál, és mechanikai stimuláció hatására neurotranszmitterek felszabadulását szabályozza (Guo és mtsai, 1999). Krónikus vesebetegségekben, mint a renális fibrózis esetében, valamint a vese gyulladásos folyamataiban a TRPV1 aktivátorok jótékony hatásúak (Wang és Wang, 2009, 2011). Emellett a TRPV1-nek renoprotektív szerepet is tulajdonítanak akut vesebetegségekben, mint az ischaemiás vesekárosodás (acut ischaemic kidney injury; AKI; Kassmann és mtsai, 2013).

A TRPV4 ioncsatorna a nephronban olyan tubulus szakaszokon expresszálódik, amelyek nem vízimpermeábilisak, tehát a vékony és vastag felszállószárban, az összekötő szegmensben és a gyűjtőcsatorna sejtjeinek bazolaterális membránjában (Cohen, 2005). A renális epithel sejtekben ozmoszenzorként működik. Hypotoniás körülmények között a TRPV4 aktivációja előfeltétele a vékony felszálló szárban az ATP felszabadulásnak, így a sejtek válaszkészségének a hypoosmotikus körülményekre (Silva és Garvin, 2008). A TRPV4 nemcsak az epithel, hanem a renális endothel és simaizom sejtekben is kifejeződik, így fontos szerepet tölt be a vaszkuláris tónus szabályozásában is (Kassmann és mtsai, 2013).

Arról azonban mindezidáig irodalmi adat nincs, hogy a glomerulus podocytáiban mely TRPV csatornák expresszálódnak, illetve milyen funkcionális szerepet töltenek be a podocyták biológiai folyamataiban.

4 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 (Saleem és mtsai, 2002). 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 expresszáldnak differenciáltatott humán podocytákon?
3. Mely PKC izoenzimek szabályozhatják a TRPC6 csatorna működését?

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

Munkánk során felvetődő kérdéseink:

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

5 ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

5.1 Alkalmazott kémiai anyagok

A kísérleteink során felhasznált anyagokat az 1. táblázatban ismertetjük. Munkánk során a kezeléshez szükséges koncentrációhoz képest ezerszeres töménységű törzsoldatokat készítettünk az anyagok megfelelő oldószerével, melyeket használatig a gyártó által előírt hőmérsékleten tároltunk. Közvetlenül a kísérletek megkezdése előtt a törzsoldatokat tenyésztőoldatban ezerszeresére hígítva értük el a végkoncentrációt, így kezeléskor az oldószer mennyisége legfeljebb 0,1 % volt. A kontroll csoport minden esetben az oldószer azonos hígítással készült elegyét kapta.

1. táblázat: A kísérleteinkben alkalmazott kémiai anyagok bemutatása

Anyag neve	Rövidítés	Hatás	Forgalmazó cég
AMG 9810	AMG	TRPV1 antagonist	Tocris Bioscience (Bristol, Egyesült Királyság)
2-aminoetoxidifenil borát	2-APB	TRPV3 agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
eugenol	EUG	TRPV3 agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
4α-forbol 12,13-dodekanoát	4 α -PDD	TRPV4 agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
forbol-12-mirisztát-13-acetát	PMA	általános PKC agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
GF109203X	GF	klasszikus és novel PKC inhibitor	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
Gö6983	GÖ	klasszikus PKC inhibitor	Calbiochem (Nottingham, Egyesült Királyság)
GSK1016790A	GSK	TRPV4 agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
HC067047	HC	TRPV4 antagonist	Tocris Bioscience (Bristol, Egyesült Királyság)
izopentenil-pirofoszfát	IPP	TRPV3 inhibitor	Echelon Biosciences (Salt Lake City, UT, Egyesült Államok)
kannabidiol	CBD	TRPV2/V4 agonista	Tocris Bioscience (Bristol, Egyesült Királyság)
kapszaicin	CAPS	TRPV1 agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
kapszazepin	CAPZ	TRPV1 antagonist	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
karvakrol	CARV	TRPV3 agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
1-oleoil-2-acetil-sn-glicerol	OAG	TRPC6 agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
reziniferatoxin	RTX	TRPV1 agonista	Santa Cruz (Heidelberg, Németország)

rottlerin	ROTT	PKC δ inhibitor	Calbiochem (Nottingham, Egyesült Királyság)
ruténium vörös	RR	általános TRP antagonist	Research Biochemicals International (Natick, MA, Egyesült Államok)
tímol	THY	TRPV3 agonista	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
tranilaszt	TRAN	TRPV2 inhibitor	Caymen Chemical Company (Ann Arbor, MI, Egyesült Államok)

5.2 Sejttenyésztés

Kísérleteinket kondicionáltan immortalizált humán podocytaokon végeztük, melyeket kollaborációs partnerünk professzor Hermann Pavenstädt (Münsteri Egyetem, Münster, Németország) bocsátott rendelkezésünkre. Kísérletes körülmények között az izolált differenciáltatott podocyta nagyon gyorsan dedifferenciálódnak, elvesztik nyúlványaikat, illetve a synaptopodin fehérjét sem expresszálják. Mivel a differenciáltatott podocyta nem képesek proliferálni, ezért a sejtek *in vitro* differenciálását követően, azokat nem lehet tovább szaporítani. Az eddig említett problémák kiküszöbölésére hozták létre a kondicionáltan immortalizált humán podocyta sejtvonalat (Saleem és mtsai, 2002). Nephrectomiából származó mintából izolált podocytaokat 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, mind molekuláris szinten, mind morfológiailag követhető, hiszen a proliferáló, macskaköszérű sejtek a differenciáltság során megnövekedett sejttel, nyúlványok fejlesztésével arborikus alakot vesznek fel, illetve továbbra is expresszálják a podocytaakra jellemző fehérjéket (WT-1, nephrin, podocin), ezen túl megjelenik a synaptopodin citoskeletális fehérje, mely így differenciálódási markernek tekinthető.

Kísérleteink során a podocytaokat 33°C-on, „permisszív” közegben, 5% CO₂-tartalmú párásított atmoszférában RPMI-1640 (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Ausztria) tápoldatban tenyésztettük, melyet 10% foetalis borjú savóval (FBS; Invitrogen, Paisley, Egyesült Királyság), 50 U/ml penicillinnel, 50 µg/ml streptomycinnel, 1,25 µg/ml fungizonnal (mindhárom PAA Laboratories GmbH), illetve inzulin-transzferrin-szelén keverékével (1:100, Invitrogen) egészítettük ki. A tápoldatot minden második napon lecseréltük. Nagy figyelmet fordítottunk arra, hogy a tenyészet ne érje el a 100%-os konfluenciát, mely a differenciáció idő előtti beindulásához vezetne, ezért 80-90%-os konfluenciánál passzáltuk a sejteket.

A bemutatott kísérletek egy részét proliferáló, nem-differenciáltottnyészeten végeztük, míg munkánk nagyobb hányadát differenciáltottn humán podocytaon való vizsgálatok teszik ki. A terminálisan differenciált nyészeten létrehozásához restriktív közeget alkalmaztunk, azaz egy hétig 37°C-os termosztált („nem-permisszív”) közegeben inkubáltuk a sejteket, majd ezt követően a 7. napon végeztük el a méréseket.

A HEK293 sejteket DMEM médiumban (PAA Laboratories GmbH) tenyésztettük 10% FBS (Invitrogen), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin, 1,25 µg/ml fungizon (mindhárom PAA Laboratories GmbH) és 2 mM L-glutamin (LifeTechnologies Magyarország Kft., Budapest, Magyarország) hozzáadásával. A HEK293T sejtek tápoldatát L-glutamin helyett nem-esszenciális aminosavak elegyével (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Egyesült Államok) egészítettük ki. Mindkét sejtípus esetében a tenyésztés 37°C-os termosztátban, 5% CO₂-tartalmú párásított közegeben történt.

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

A sejtek teljes RNS tartalmát TRIzol reagenssel (Invitrogen) a gyártó által ajánlott protokoll szerint izoláltuk. A minta teljes RNS 1 µg-jából kiindulva elsőként DNáz kezeléssel az esetleges DNS szennyezéseket elimináltuk, majd „High Capacity cDNA Kit” és RNasin ribonukleáz inhibitor (mindhárom Life Technologies Hungary Kft.) segítségével GeneAmp® PCR System 2400 DNA Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, Egyesült Államok) készüléssel reverz transzkripciót (RT) végeztünk. Az így kapott cDNS mintából, GoTaq® DNS Polimeráz, 5X szintelen GoTaq® reakció puffer (mindkettő Promega, Madison, WI, Egyesült Államok), dNTP (10 mM; Life Technologies Hungary Kft.) és specifikus primerek (TRPC6, 86 bp, forward 5'- TCAATCTGGTGCCGAGTCCAAAGT -3', reverz 5'- TTTATGGCCCTGGAACAGCTCAGA -3'; Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium) hozzáadásával ugyancsak a GeneAmp® PCR System 2400 DNA Thermal Cycler (Applied Biosystems) készüléssel polimeráz láncreakció (PCR) végeztünk az alábbi hőprofilal: 94°C 2 perc; majd 35 ismétléssel 94°C 30 mperc, 59°C 1 perc, 72°C 1 perc; és végül 72°C 7 perc. A kísérleteinkben belső kontrollként a gliceraldehid 3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH, 322 bp, forward 5'-AATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3', reverz 5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG-3'; Integrated DNA Technologies) gén kifejeződését vizsgáltuk. A PCR termékek elválasztása EZ-Vision (Amresco, Solon, OH, Egyesült Államok) DNS festék jelenlétében 1,5 %-os agaróz gélen történt, majd UV-fénnyel

megvilágítva KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company, NY, Egyesült Államok) segítségével rögzítettük a jeleket.

5.4 Kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (Q-PCR)

A podocytá minták teljes RNS tartalmát TRIzol reagens (Invitrogen) segítségével izoláltuk, majd annak 1 µg-jából kiindulva az előző fejezetben leírtak szerint reverz transzkripciót végeztünk. A kapott cDNS mintából 5' nukleáz módszerrel és ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) segítségével kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakciót végeztünk. Az amplifikáció TaqMan primerek és próbák (PKC α assay ID: Hs00176973_m1; PKC β assay ID: Hs00176998_m1; PKC γ assay ID: Hs00177010_m1; PKC δ assay ID: Hs00178914_m1; PKC ϵ assay ID: Hs00178455_m1; PKC ζ assay ID: Hs00177051_m1; PKC η assay ID: Hs00178933_m1; PKC θ assay ID: Hs00234704_m1; PKC λ / ι assay ID: Hs00995854_m1; TRPV1 assay ID: Hs00218912_m1; TRPV2 assay ID: Hs00275032_m1; TRPV3 assay ID: Hs00376854_m1; TRPV4 assay ID: Hs00222101_m1; mind Applied Biosystems) alkalmazásával a TaqMan Universal PCR Master Mix protokoll (Applied Biosystems) szerint történt. Háztartási géneként a gliceraldehid 3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH; assay ID: Hs99999905_m1), a peptidil-prolil izomeráz A (ciklofillin A; PPIA; assay ID: Hs99999904_m1) és a β -aktin (ACTB; assay ID: Hs99999903_m1; mindhárom Applied Biosystems) transzkriptjeit mutattuk ki. Minden kísérletet három technikai ismétléssel végeztünk el. A génexpressziók relatív értékét minden esetben Δ CT módszerrel a megfelelő belső kontroll gén expressziós szintjére normalizálva határoztuk meg. A PKC izoenzimek vizsgálatakor a GAPDH szerepelt mint belső kontroll, míg a TRPV1-4 csatornák esetében a GAPDH, a PPIA és a ACTB gének expressziós szintjének geometriai átlagával számoltunk.

5.5 Immuncitokémia

A podocytákat 6 lyukú tenyésztőedényben steril fedőlemezre szélesztettük 5000 sejt/lyuk sűrűségben, és egy hétig inkubáltuk 37°C-on a terminális differenciáció eléréséhez. A 7. napon az immár differenciáltatott podocytákat tartalmazó lemezeket 5 percig 4°C-os acetonnal fixáltuk, majd 0,6% Triton-X-100-at (Sigma-Aldrich) tartalmazó foszfát pufferelt sóoldattal (PBS; 115 mM NaCl, 20 mM Na₂PO₄, pH 7.4; Sigma-Aldrich) permeabilizáltuk a sejteket 10 percig szobahőmérsékleten. Ezután a lemezeket háromszor mostuk PBS-sel, majd 1% borjúsérum-albumint (BSA; Sigma-Aldrich) tartalmazó permeabilizáló oldattal blokkoltuk (30 perc, szobahőmérséklet) az esetleges aspecifikus kötőhelyeket. Újabb mosási

lépést követően a 2. táblázatban felsorolt elsődleges antitestek blokkoló oldattal történő megfelelő hígításaival egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a sejteket. Másnap ismét háromszor mostuk a fedőlemezeket PBS-ben, majd 1:200 arányban blokkoló oldatban hígított fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált, a megfelelő faj ellen termeltetett másodlagos antitesttel (Alexa-Fluor®-488, Invitrogen) inkubáltuk egy órán át 4°C-on. A sejtmagokat propidium-jodid festéket tartalmazó fedőmédiummal (Vector Laboratories, Peterborough, Egyesült Királyság) tettük láthatóvá, majd Zeiss LSM 510 Meta konfokális mikroszkóppal (Zeiss, Oberkochen, Németország) képeket készítettünk. Negatív kontrollként az elsődleges antitest elhagyásával festett lemezeket használtuk.

A TRPV csatornákkal való jelölés pár lépésben különbözött. A fixálás 4% paraformaldehidet (Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS-ben történt, a permeabilizáló és blokkoló oldatban a Triton-X-100 aránya 0,3% volt, valamint a sejtmag jelölésére DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) festéket (Vector Laboratories) alkalmaztunk.

2. táblázat: Az immuncitokémiához alkalmazott elsődleges antitestek összefoglalása

Antitest	Faj	Hígítás	Forgalmazó cég
Podocin	nyúl	1:1000	Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság)
Synaptopodin	egér	1:100	Progen (Heidelberg, Németország)
TRPC6	nyúl	1:50	Alomone Labs (Jerusalem, Izrael)
TRPV1	egér	1:50	Novus Biologicals (Littleton, CO, Egyesült Államok)
TRPV2	nyúl	1:100	Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság)
TRPV3	nyúl	1:100	Abcam (Cambridge, Egyesült Királyság)
TRPV4	nyúl	1:50	Novus Biologicals (Littleton, CO, Egyesült Államok)

5.6 Western blot

A sejteket 96 mm átmérőjű Petri-csészékbe szélesztettük, majd egy részüket 33°C-on szaporítottuk tovább 90%-os konfluencia eléréséig, másik részüket pedig 37°C-os termosztátban egy hétig differenciáltattuk. Mintagyűjtéskor 60 µl proteáz inhibitor koktélt (1:100, Sigma-Aldrich) tartalmazó detergens mixben (50 mM TRIS HCl, 150 mM NaCl, 1 (V/V)% Triton X-100, 1 (V/V)% Igepal CA 630, 0,5 (V/V)% nátrium deoxikolat; Sigma-Aldrich) vettük fel a sejteket, majd szonikátorral ultrahangos feltárást végeztünk jégen. Ezután BSA hígítási sor (Sigma-Aldrich) és BCA Protein „Assay” (Pierce, Rockford, IL, Egyesült Államok) segítségével meghatároztuk a fehérjekoncentrációt, majd desztillált víz és nátrium-dodecil-szulfát (SDS) mintapuffer (10 V/V% glicerin, 2 V/V% SDS, 0,062 M Tris,

0,02 M ditiotreitolt, 0,002 V/V% brómfenolkék és 5 V/V% β -merkaptotanol; Sigma-Aldrich) hozzáadásával 1 mg/ml koncentrációjú mintákat készítettünk, melyeket 100°C-on 10 percig főztünk. Az így elkészített mintákból egységnyi mennyiséget (6 μ g/lyuk) használva SDS poliakrilamid gélelektroforézist (SDS-PAGE) végeztünk 10%-os gélen (10% Mini Protean TGX gél, BioRad, Hercules, CA, Egyesült Államok) 100 V konstans feszültséggel. Az elválasztott fehérjéket Trans-Blot® Turbo™ (BioRad) készülék segítségével nitrocellulóz membránra (Trans-Blot® Turbo™ Midi Nitrocellulose Transfer Packs, BioRad) transzferáltuk (1,3 A 25 V, 7 perc). Ezt követően a szabad kötőhelyek blokkolására 5 (m/V)% tejpóros PBS-ben 20 percig szobahőmérsékleten mostuk a membránt, majd 4°C-on egy éjszakán át inkubáltuk az elsődleges antitestet (3. táblázat) megfelelő hígításával 5% tejpóros PBS-ben.

3. táblázat: Western blot technika során alkalmazott elsődleges antitestek összegzése

Antitest	Faj	Hígítás	Forgalmazó cég
Podocin	nyúl	1:100	Santa Cruz (Heidelberg, Németország)
Synaptopodin	egér	1:100	Progen (Heidelberg, Németország)
TRPC6	nyúl	1:500	Alomone Labs (Jerusalem, Izrael)
PKCα	nyúl	1:100	Biomol Res Lab (Plymouth Meeting, PA, Egyesült Államok)
PKCβ_1	nyúl	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
PKCβ_2	nyúl	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
PKCγ	nyúl	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
PKCδ	nyúl	1:100	Biomol Res Lab (Plymouth Meeting, PA, Egyesült Államok)
PKCϵ	nyúl	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
PKCζ	nyúl	1:100	Biomol Res Lab (Plymouth Meeting, PA, Egyesült Államok)
PKCη	nyúl	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
PKCθ	nyúl	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
PKCι	nyúl	1:50	Santa Cruz (Heidelberg, Németország)
TRPV1	kecske	1:100	Santa Cruz (Heidelberg, Németország)
TRPV2	nyúl	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)
TRPV3	nyúl	1:200	Alomone Labs (Jerusalem, Izrael)
TRPV4	nyúl	1:100	Alomone Labs (Jerusalem, Izrael)
β-aktin	nyúl	1:1000	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Egyesült Államok)

Másnap 30 perces 0,1 V/V% Tween 20-at tartalmazó PBS-ben (PBST; Sigma-Aldrich) történő mosást követően torna-peroxidázzal konjugált, 1:1000-ben 5% tejpóros PBS-ben hígított másodlagos antitesttel (BioRad) inkubáltuk a membránt szobahőmérsékleten

egy órán át. Ismételt PBST oldatos mosást követően kemilumineszcens SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate-Enhanced Chemiluminescence kittel (Pierce) tettük láthatóvá az immunjeleket, melyeket LAS-3000 Intelligent Dark Box (Fuji, Tokió, Japán) és KODAK Gel Logic 1500 Imaging System (Eastman Kodak Company) gél dokumentáló rendszerrel rögzítettünk. A kemilumineszcens jelek intenzitását az optikai denzitás meghatározásával számszerűsítettük a KODAK Molecular Imaging Systems (KODAK) szoftversegítségével.

5.7 Az intracelluláris kalciumszint vizsgálata

A differenciáltatott podocyták kalciumszintjének változásait kétféle módszerrel vizsgáltuk: egyedi sejteken, illetve többsejtes elrendezésben sejtcsoportokon is végeztünk méréseket. A mérőrendszerek különböztek, viszont a mérések alapelve mindkét esetben hasonló volt. A sejtek kalciumszintjének érzékelésére fluoreszcens kalcium érzékeny Fura-2 és Fluo-4 festékeket alkalmaztunk. Ezek a festékek a hozzájuk kapcsolt acetoxi-metilészter (AM) csoport révén bejutnak a sejtbe, majd nem-specifikus észterázok lehasítják az AM csoportot, és a szabaddá vált festékmolekula szabad Ca^{2+} -okat köt. A Fura-2 festék esetében a Ca^{2+} -okat kötött és nem kötött festékmolekula gerjesztési maximuma eltér, így két megfelelően választott hullámhosszon gerjesztve a sejteket, az emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából következtethetünk az intracelluláris Ca^{2+} -szint változásaira. A Fluo-4 festék esetében pedig a Ca^{2+} -okat kötő festékmolekulának nő a fluoreszcencia intenzitása.

5.7.1 Fluorimetriás $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ mérése egysejtes elrendezésben

A differenciáltatott podocyták $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -jának mérését egyedi sejteken a Photon Technology International (PTI) Delta Scan™ rendszer (Photon Technology International, New Brunswick, NJ, Egyesül Államok) segítségével határoztuk meg. A proliferáló podocytákat 24 lyukú tenyésztő lemezekben 5000 sejt/lyuk sűrűségben fedőlemezre szélesztettük, majd egy hétig „nem-permisszív” közegben tenyésztve differenciáltattuk azokat. A mérés napján (7. nap) a fedőlemezeket 10 μM Fura-2 AM (Invitrogen) festékkel 37°C-on egy órán át inkubáltuk. A tápoldatot neosztigminnel (Sigma-Aldrich) egészítettük ki, mely gátolja az extracelluláris észterázokat. Ezt követően lecseréltük a tápoldatot normál Tyrode oldatra (NTY; 137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 11,8 mM HEPES, 1 g/l glükóz; pH 7,4; mind Sigma-Aldrich), hogy a sejtek adaptálódhassanak, és kialakuljon az equilibrium (szobahőmérséklet, legalább 30 perc). A festékkel töltött sejteket

tartalmazó tárgylemezt egy speciális mérőkádban invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot; Nikon, Tokió, Japán) tárgyasztalára helyeztük, és a mérés alatt folyamatos perfúziót végeztünk NTY oldattal egy külső perfúziós rendszer segítségével. A mérőanyagokat 250 µm-es belső átmérőjű lokálperfúziós kapilláris tű (Perfusion PencilTM; AutoMate Scientific Inc., San Francisco, CA, Egyesült Államok) és perfúziós rendszer (Valve BankTM 8 version 2.0, AutoMate Scientific, Inc., Berkeley, CA, Egyesült Államok) segítségével 0,35 ml/perces sebességgel a kiválasztott sejtre adagoltuk. A gerjesztő hullámhosszt kettős hullámhosszú monokromátorral (Delta ScanTM rendszer) a Fura-2 két állapotának megfelelően 340 nm (szabad molekula) és 380 nm (Ca²⁺-t kötő molekula) között váltogattuk, majd az emissziót 510 nm-es hullámhosszon fotoelektron-sokszorozóval detektáltuk 10 Hz-es mintavételi gyakorisággal. Az [Ca²⁺]_{IC}-t a 340 (F₃₄₀) és 380 (F₃₈₀) nm-es hullámhosszokon mért fluoreszcencia intenzitások hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$) számítottuk ki az alábbi képlet segítségével (Grynkiewicz és mtsai, 1985):

$$[Ca^{2+}]_{IC} = K_D * (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * (F_{380}[0] / F_{380}[Ca^{2+}])$$

Az egyenlet állandó paramétereit (K_D – disszociációs konstans; R_{min} , R_{max} , - minimális és maximális fluoreszcencia hányadosok; $F_{380}[0]/F_{380}[Ca^{2+}]$ – Ca²⁺-mentes közegben és telítő Ca²⁺-koncentráció mellett 380 nm extinkciós hullámhosszon mért fluoreszcencia intenzitások hányadosa) előzetes kalibrációs kísérletekben határoztuk meg.

5.7.2 Fluorimetriás [Ca²⁺]_{IC} mérése többsejtes elrendezésben

A differenciáltatott podocyták intracelluláris Ca²⁺-szintjének változását többsejtes elrendezésben kétféle készülékkel követtük nyomon. A 5. ábrán bemutatott kísérletet a FlexStation II³⁸⁴, míg az összes többi kísérletet az újabb FlexStation 3 fluoreszcens microplate olvasó készülék (mindkettő Molecular Devices, Sunnyvale, CA Egyesült Államok) segítségével végeztük. A differenciálódási protokollnak megfelelően a 96 lyukú lemezre 20000 sejt/lyuk sűrűségben kirakott sejteket egy hétig 37°C-on tenyésztettük. A mérés napján Hank oldatban (136.8 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.34 mM Na₂HPO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.81 mM MgSO₄, 1.26 mM CaCl₂, 5.56 mM glucose, 4.17 mM NaHCO₃, pH 7.2, mind Sigma-Aldrich) mostuk a sejteket, melyet 1% BSA-val és 2,5 mM probeneciddel (Life Technologies Magyarország Kft.) egészítettünk ki. A probenecid elősegíti a festékmolekula sejtben maradását, mivel gátolja az anion transzportereket. Ezután 1 µM Fluo-4 AM (Life Technologies Magyarország Kft.) festéket tartalmazó Hank oldattal 30 percig inkubáltuk a sejteket 37°C-on. Mindeközben a kezelőanyagokat a korábban elkészített 1000-szeres koncentrációjú törzsoldatokból hígítottuk Hank oldatban, majd kimértük egy 96 lyukú

tenyésztőedény megfelelő helyeire. A 30 perc elteltével háromszori mosást követően 100 µl Hank oldattal további 20 percig inkubáltuk a sejteket 37°C-on. Ezután következett a mérés, mely minden esetben 300 másodpercig tartott. A 40. másodpercben az agonistákat, majd a 240. másodpercben pozitív kontrollként ATP-t (VWR International Kft., Debrecen, Magyarország) mértünk a sejtekhez, hogy ellenőrizzük a sejtek válaszadási képességét. Azoknál a kísérleteknél, ahol valamilyen antagonistával végeztünk előkezeléseket, az utolsó lépésben kimért 100 µl Hank oldat tartalmazta az inhibitor megfelelő koncentrációban. Annak megállapítására, hogy az agonista hatására létrejövő Ca^{2+} -szint-emelkedés nem az intracelluláris kalcium raktárakból, hanem a sejtfelszíni csatornák nyitásának következményeként az extracelluláris térből származik, a kísérleteket elvégeztük alacsony kalciumtartalmú közegben is. Ebben az esetben a Hank oldathoz nem adtunk CaCl_2 -ot, hanem azzal ekvimoláris mennyiségű glükózzal egészítettük ki. A mérés során a 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.

5.7.3 Hóstimuláció

A podocyttákat 35 mm átmérőjű Petri-csészékben tenyésztettük, és differenciáltattuk egy hétig. A mérés napján 1 µM Fluo-4 AM festékkel töltöttük a sejteket, majd 300 µl szobahőmérsékletű normál pufferrel (Hank oldat: 136.8 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.34 mM Na_2HPO_4 , 0.44 mM KH_2PO_4 , 0.81 mM MgSO_4 , 1.26 mM CaCl_2 , 5.56 mM glucose, 4.17 mM NaHCO_3 , pH 7.2, mind Sigma-Aldrich) Olympus IX83 invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Olympus, Tokió, Japán) tárgyasztalára helyeztük a Petri-csészét. A sejtekről 9 másodpercenként képet készítettünk, autofókusz módban. A mérés során 1 ml 50°C-ra előmelegített puffert pipettáztunk a sejtek közvetlen környezetébe. Tekintve a kis térfogatot, a puffer oldat hőmérséklete a sejtekhez érve 40-45°C körüli lehetett. Kontroll esetben szobahőmérsékletű puffer oldatot adagoltunk a sejtekre.

5.8 Patch-clamp mérés

A podocyttákat 35 mm átmérőjű Petri-csészében differenciáltattuk, majd teljes sejtes elrendezésben Axopatch 1.D erősítő és Clampex 10.2 szoftver (Molecular Devices) segítségével vizsgáltuk a GSK1016790A kezelés elektrofiziológiai hatásait. A mérés során a külső oldat 150 mM NaCl-ot, 6 mM CsCl-ot, 5 mM CaCl_2 -ot, 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES-t (4-[2-hidroxietil]-1-piperazin-etánszulfonsav) és 10 mM glükózt (mind Sigma-Aldrich)

tartalmazott, pH-ját NaOH-dal 7,4-re állítottuk be. A pipettákban lévő oldat 100 mM aszpartát, 20 mM CsCl, 1 mM MgCl₂, 0,08 mM CaCl₂, 4 mM Na₂ATP, 10 mM EGTA és 10 mM HEPES összetevőkből állt (mind Sigma-Aldrich), melynek 7,2-es pH-ját CsOH hozzáadásával értük el, így a pipettaoldat Cs-aszpartát végkoncentrációja hozzávetőlegesen 100 mM volt. 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.

5.9 RNS interferencia (RNSi)

A podocytákat 60 mm átmérőjű Petri-csészékbe (100000 sejt/csésze) és a fluoreszcens kalciumszint mérésekhez 96 lyukú lemezekre (20000 sejt/lyuk) szélesztettük, majd egy hétig tenyésztettük 37°C-os termosztátban. A 7. napon a differenciáltatott sejteken lecseréltük a tápoldatot friss médiumra, majd szérummentes Optimem (Invitrogen) oldat felhasználásával 40 nM humán TRPV3 specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS (siRNS) oligonukleotidokkal (Stealth RNAi, Invitrogen, ID: HSS136315) transzfektáltuk LipofectamineTM RNAiMAX transzfekciós reagens (Invitrogen) segítségével. A kísérletben kétféle kontroll csoportot alkalmaztunk: a transzfekció negatív kontrolljaként a scrambled siRNS elnevezéssel illettük azt a sejtcsoportot, melyet Stealth RNAi Negative Control (Invitrogen) duplaszálú siRNS-sel transzfektáltunk, ami semmilyen ismert mRNS szekvenciájával nem mutat homológiát; a kontroll csoportot pedig csak OptiMem médiummal, transzfekciós reagenssel, illetve a megfelelő oldószerekkel kezeltük. A transzfekciót követően 48 óra elteltével a Petri-csészékben lévő sejtekből RNS mintát készítettünk, és Q-PCR technikával ellenőriztük a transzfekció hatékonyságát, illetve a 96 lyukú lemezekon elvégeztük a fluoreszcens kalciumszint méréseket.

5.10 Stabil plazmid DNS transzfekció

A TRPC6-ot overexpresszáló HEK293 sejteket LipofectaminTM 2000 transzfekciós reagens (Life Technologies Magyarország Kft.) segítségével transzfektáltuk a gyártó ajánlása szerint. A humán TRPC6-ot tartalmazó vektort (EX-U0193-M09) kollaborációs partnerünktől, Kedei Noémitől (National Institutes for Health, Bethesda, MD, Egyesült Államok) kaptuk.

A HEK293 sejteket 35 mm átmérőjű Petri-csészében tenyésztettük, majd 70-80%-os konfluencia elérésekor a tápoldatot lecseréltük szérummentes OptiMem médiumra (Invitrogen), majd 12 µg plazmid DNS-t és 30 µl LipofectaminTM 2000 reagens (Life

Technologies Magyarország Kft.) mértünk a sejtekre. 3 és fél óra elteltével a médiumot lecseréltük szelektáló tápoldatra, mely a normál tápoldattól annyiban különbözött, hogy 750 µg/ml geneticint (Life Technologies Magyarország Kft.) is tartalmazott.

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

5.11 Tranziens plazmid DNS transzfekció

Munkánk során a TRPV csatornák kimutatására használt antitestek specificitásának ellenőrzésére a csatornákat tranziensen overexpresszáló HEK293T sejt vonalakat 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, melyeket Prof. Thomas Voets (Laboratory of Ion Channel Research, KU Leuven, Leuven, Belgium) bocsátott a rendelkezésünkre.

A HEK293T sejteket 96 mm átmérőjű Petri-csészékben szaporítottuk, majd 50-60%-os konfluenciánál TransIT-293 transzfekciós reagens (MirusBio, Madison, WI, Egyesült Államok) segítségével transzfektáltuk. 36 µl TransIT-293 reagenst és 12 µl plazmid DNS-t 600 µl szérummentes OptiMem médiumban (Invitrogen) elegyítettünk, majd a keveréket 20 perc inkubáció után óvatosan a sejtekre mértük. A transzfekció után 48 órával összegyűjtöttük a sejteket, és fehérjemintát készítettünk a Western blot kísérletekhez.

5.12 Statisztikai analízis

Mérési adataink feldolgozását OriginPro 8.6 szoftverrel (OriginLab Corporation, Northampton, MA, Egyesült Államok) végeztük. Eredményeinket átlag±SEM formában adtuk meg. A dózis-hatás összefüggések vizsgálata során logisztikus dózis-hatás görbéket illesztettünk az alábbi egyenlet felhasználásával:

$$y = A2 + (A1 - A2) / (1 + (x/x0)^p)$$

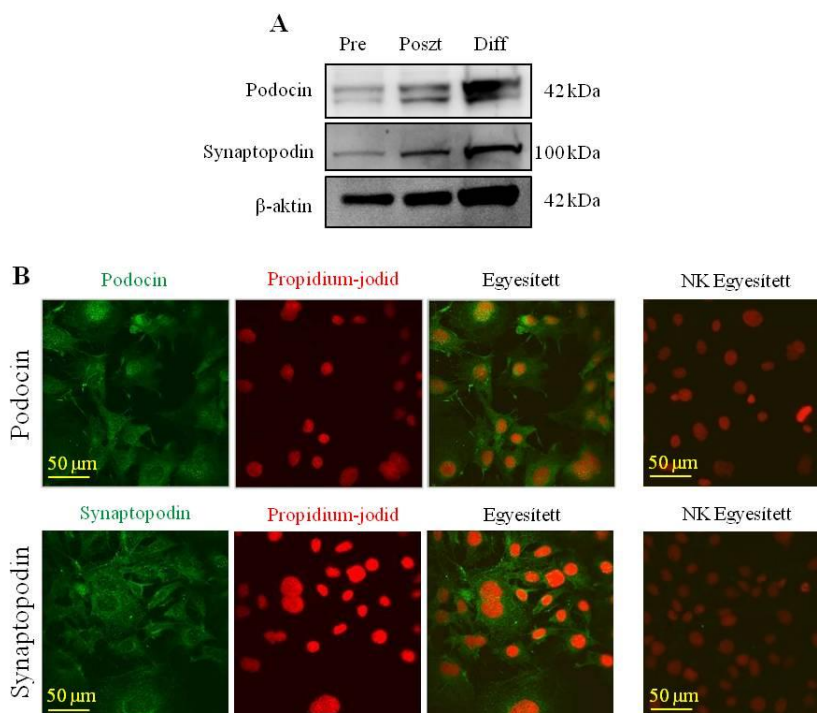
Az egyenlet számított paraméterei: A1: kiindulási, minimális érték (y_{min}), A2: végső, maximális érték (y_{max}), $x0$: középérték (EC50) és p a számított kitevő.

A statisztikai analízist részben OriginPro 8.6 (OriginLab Corporation), részben IBM SPSS Statistics 23.0 (IBM, Armonk, NY, USA) szoftver segítségével végeztük. A statisztikai analízishez két csoport összehasonlítása esetén Student-féle 2-oldalú t -próbát alkalmaztunk, több csoport átlagait pedig egyutas variancia analízissel (ANOVA) és Bonferroni, vagy Dunnett post-hoc tesztek segítségével hasonlítottuk össze, $p < 0,05$ szignifikancia szintek mellett.

6 EREDMÉNYEK

6.1 A humán podocyta *in vitro* differenciációjának igazolása

Mivel a podocyta differenciáltatása *in vitro* körülmények között kritikus lépés, ezért a kísérletek megkezdése előtt az általunk alkalmazott differenciáltatási protokoll hatékonyságát ellenőriztük. Ahogy az „Anyagok és módszerek” fejezetben ismertettük, a sejteket hét napig „nem-permisszív” közegben, azaz 37°C-on tenyésztettük a differenciált állapot eléréséhez. Az érési folyamat során a podocyta morfológiai és molekuláris változásokon mennek keresztül: a megnövekedett sejtest arborikus alakot vesz fel, lábnyúlványokat fejlesztenek, illetve magas szinten expresszálják az érett podocyta jellemző markereket, mint például a podocyta-specifikus podocin membránfehérjét és az aktinhoz kötődő synaptopodin fehérjét (Saleem és mtsai,2002; Mundel és mtsai, 1997).



8. ábra: Az *in vitro* differenciáltatott humán podocyta expresszálják a podocin és a synaptopodin fehérjéket
A: A podocyta marker podocin és a differenciálódási marker synaptopodin kifejeződését fehérje-specifikus elsődleges és HRP-konjugált másodlagos antitestek alkalmazásával Western blot technikával mutattuk ki különböző konfluenciájú (Pre: prekonfluens; Poszt: posztkonfluens) és differenciáltatott (Diff) podocyta tenyészetekben. Belső kontrollként a β -aktin fehérje jelenlétét vizsgáltuk. **B:** További megerősítésként immuncitokémiai festést végeztünk a differenciált sejteken podocin/synaptopodin-specifikus primer és FITC-konjugált másodlagos antitestekkel (zöld jelölődés). A sejtmagot propidium-jodiddal festettük pirosra. Negatív kontrollként (NK) a primer antitest elhagyásával festett negatív metszeteket alkalmaztuk. Méretvonal: 50 μ m; nagyítás: 400x

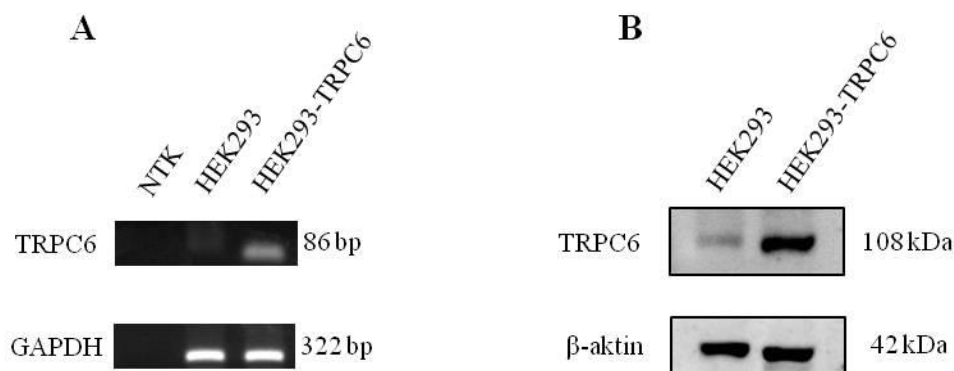
Azért, hogy biztosak lehessünk abban, hogy a tenyésztési protokollt követve valóban differenciáltatott podocyta sejteket kaptunk, ellenőriztük az említett fehérjék jelenlétét a

sejtekben. Mind a Western blot technika (8. A ábra), mind az immuncitokémiai festés (8. B ábra) igazolta, hogy az általunk differenciáltatott sejtek expresszálják a két keresett marker fehérjét, tehát elmondható, hogy a differenciáltatás sikeres volt.

6.2 A TRPC6 funkcionálisan aktív formában expresszálódik differenciáltatott humán podocytákon

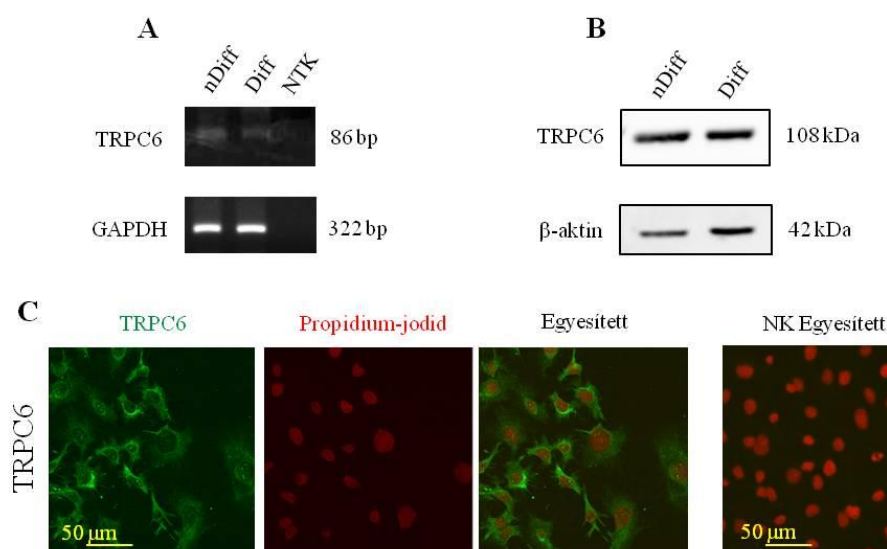
Irodalmi adatok alapján ismert, hogy a podocytákon megtalálható a TRPC6 (Reiser és mtsai, 2005), ezért következő lépésként ellenőriztük, hogy az általunk tenyésztett sejtek expresszálják-e az ioncsatornát. Ehhez először a kísérleteinkben alkalmazott TRPC6 antitest specificitását vizsgáltuk, ezért létrehoztunk egy TRPC6-ot overexpresszáló HEK293 sejttenyészetet (HEK293-TRPC6). A HEK293 egy olyan humán embrionális vese sejtvonál, melyet általánosan használnak transzfekciós kísérletekhez könnyű kezelhetősége miatt, ezért mi is ezzel a sejtvonallal dolgoztunk. A TRPC6-ot tartalmazó vektort kollaborációs partnerünk, Kedei Noémi (National Institutes for Health, Bethesda, MD, Egyesült Államok) készítette, és bocsátotta rendelkezésünkre. A sejtek transzfekcióját liposzóma segítségével végeztük el LipofectamineTM 2000 reagens alkalmazásával. A TRPC6-ot expresszáló sejteket a tápoldathoz adott geneticin segítségével szelektáltuk, kihasználva a vektorban található neomicin rezisztencia gén kifejeződését. Az overexpresszió tényét hagyományos RT-PCR-val és Western blottal ellenőriztük. A 9. ábra mutatja, hogy a HEK293-TRPC6 sejtek markánsan expresszálják mind a TRPC6-ot kódoló transzkriptet (9. A ábra), mind a TRPC6 fehérjét (9. B ábra). Ezzel az eredményünkkel igazoltuk, hogy az általunk alkalmazott TRPC6 antitest TRPC6-ra specifikus, így megerősítettük azt az állításunkat, hogy a humán podocyták expresszálják a TRPC6 fehérjét.

Ezt követően a podocytákon vizsgáltuk a TRPC6 kifejeződését. A TRPC6 mRNS szintű kimutatásához hagyományos RT-PCR technikát alkalmaztunk, mely igazolta, hogy a nem-differenciáltatott és a differenciáltatott humán podocyták egyaránt expresszálják a TRPC6 gént (10. A ábra). Western blottal és immuncitokémiával végzett fehérje szintű vizsgálataink egybehangzóan megerősítették a TRPC6 jelenlétét mindkét sejttenyészetben (10. B és C ábra).



9. ábra: TRPC6 expresszió TRPC6-ot overexpresszáló HEK293 sejteken

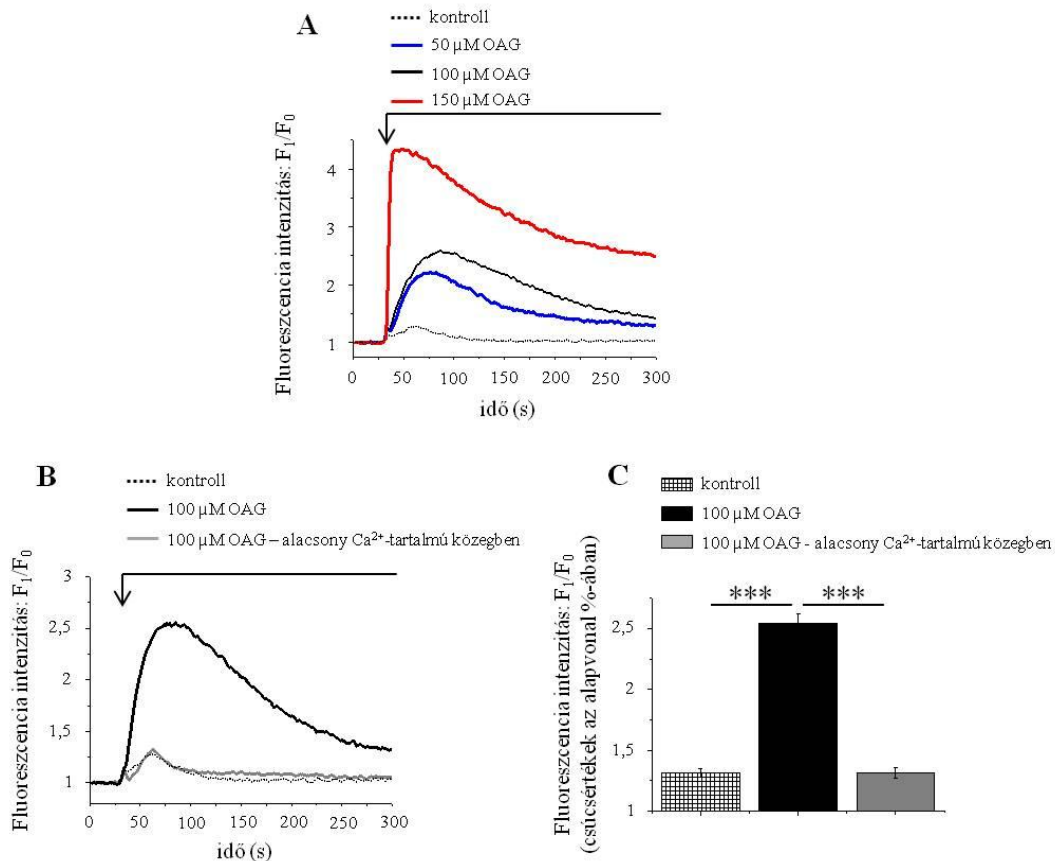
Nem-transzfektált, kontroll HEK293 tenyészetből és transzfektált HEK293-TRPC6 sejtekből RNS és fehérjemintát készítettünk. **A:** Hagyományos RT-PCR-ral mRNA szinten, **B:** Western blot technikával pedig fehérje szinten kimutattuk, hogy a transzfektált HEK293-TRPC6 sejtek magasabb szinten expresszálják a TRPC6-ot. Az RT-PCR méréseinkben a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH), míg a Western blottnál a β -aktint használtuk belső kontrollként. NTK: non-templát kontroll, ahol a minta nem tartalmazott templát cDNS-t.



10. ábra: A TRPC6 kifejeződése differenciáltotott humán podocytaon

A: A TRPC6 mRNA szintű expresszióját hagyományos RT-PCR technikával mutattuk ki nem-differenciáltotott (nDiff) és differenciáltotott (Diff) podocyta tenyészetekből származó mintákban. Háztartási géneként a gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenázt (GAPDH) detektáltuk. NTK: templát cDNS nélküli kontroll. **B:** A TRPC6 fehérje szintű vizsgálatához Western blot analízist végeztünk ugyancsak nem-differenciáltotott és differenciáltotott tenyészeteken. Kontrollként a β -aktin fehérjét jelöltük. **C:** Immuncitokémiával is megerősítettük a TRPC6 fehérje szintű megjelenését differenciáltotott humán podocytaonban, specifikus primer és FITC-konjugált másodlagos antitest (Alexa-Fluor®-488, zöld) alkalmazásával. A sejtmagot propidium-jodiddal festettük (piros). NK: negatív kontroll az elsődleges antitest elhagyásával készült festés. Kalibráció: 50 μ m; nagyítás: 400x

Következő lépésben a humán podocytákon kifejeződő TRPC6 csatorna funkcionalitását vizsgáltuk. Mivel a csatorna Ca^{2+} -ra permeabilis, Fluo-4 festék alkalmazásával fluoreszcens Ca^{2+} -méréseket végeztünk (11. ábra) az „Anyagok és módszerek” részben bemutatott többsejtes elrendezésben differenciáltot podocytákon. A sejteket Fluo-4 festékkel töltöttük egy órán át, majd a FlexStation II₃₈₄ félautomata pipettázó robot és egyben spektrofluoriméter használatával valós idejű Ca^{2+} -szint-mérést végeztünk.



11. ábra: A TRPC6 ioncsatorna funkcionálisan aktív differenciáltot humán podocytákon

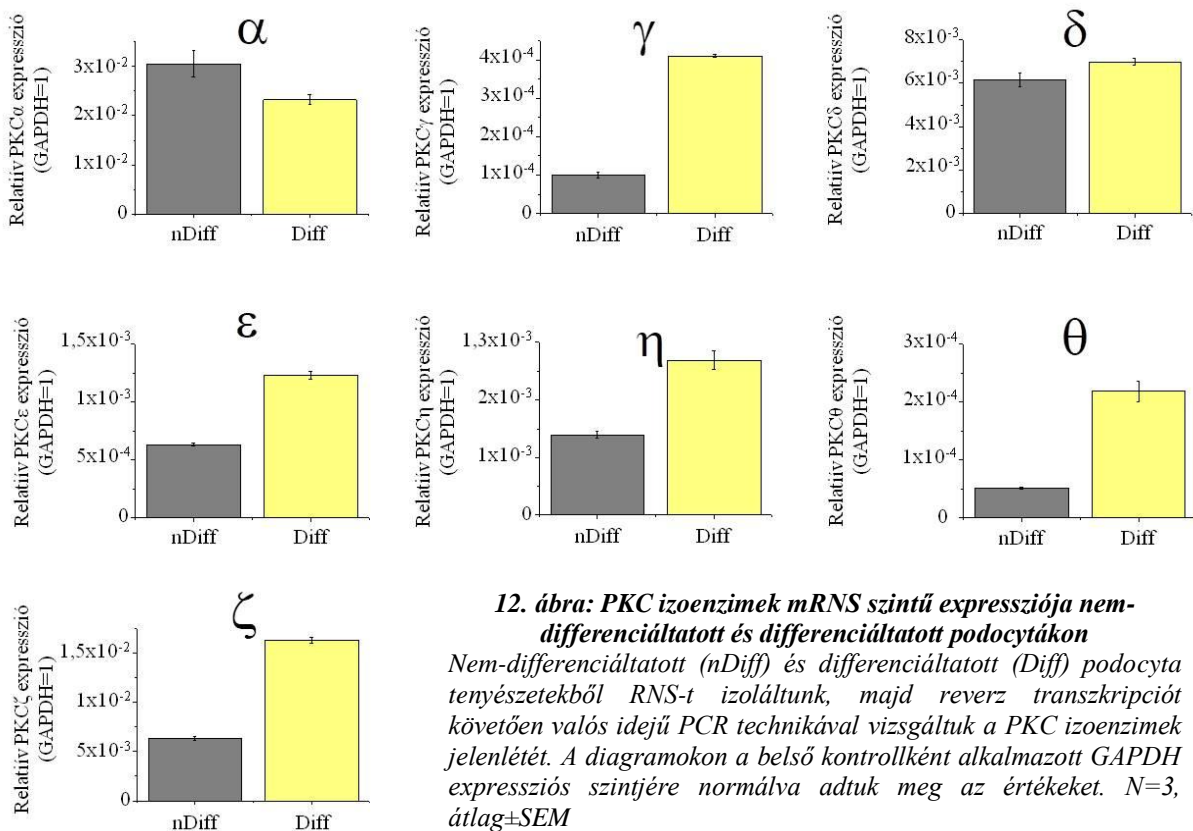
A: A TRPC6 csatorna aktivációjának vizsgálatára fluorimetriás intracelluláris Ca^{2+} -mérést végeztünk többsejtes elrendezésben. A nyíllal jelzett időpontban növekvő koncentrációban OAG-t adagoltunk a sejtekhez, mely dóziszfüggő intracelluláris Ca^{2+} -szint-emelkedést eredményezett. **B:** Megismételve a kísérletet csökkentett Ca^{2+} -tartalmú közegben a Ca^{2+} -válasz elmaradt. **C:** A B panelen látható mérések statisztikai elemzése. $N=3$, átlag \pm SEM, *** $p<0,001$

Kísérleteinkben OAG-ot alkalmaztunk, ami egy olyan DAG analóg, mely az irodalomban általánosan elfogadott TRPC6 aktivátorként (Hofmann és mtsai, 1999). A mérési protokoll alapján a 40. másodpercben különböző koncentrációjú OAG-ot pipettáztunk a sejtekre, majd a 240. másodpercben a sejtek válaszkészségét ellenőrizendő ATP-t adagoltunk. Munkánk során csak azokat a méréseket tekintettük relevánsnak, ahol a sejtek a mérés végén ATP hatására Ca^{2+} -választ produkáltak (ezt nem mutatjuk az ábrákon). Az OAG a differenciáltot podocytákon intracelluláris Ca^{2+} -szint-emelkedést váltott ki, melyet a Fluo-4

festék fluoreszcencia intenzitásának növekedése jelzett. Különböző koncentrációban alkalmazva az aktivátort, a kialakult Ca^{2+} -válasz dóziszfüggőnek bizonyult (11. A ábra). Megismételtük a kísérletet az OAG egy kiválasztott koncentrációjával alacsony Ca^{2+} -tartalmú közegben, és azt tapasztaltuk, hogy az OAG által kiváltott Ca^{2+} -szint-emelkedés teljes mértékben elmaradt (11. B és C ábra). Ez arra utal, hogy az aktivátor alkalmazásakor sejtfelszíni csatorna nyílik, így az általunk mért intracelluláris Ca^{2+} -szint-emelkedést a külső térből beáramló Ca^{2+} hozza létre. Ez az eredmény azt sugallja, hogy a Ca^{2+} -jel kialakításában feltehetően a sejtfelszíni TRPC6 csatorna vesz részt. A 11. C ábra mutatja a kapott eredmények statisztikai elemzését, ahol az oszlopdiagramok az ismétlések során kapott csúcsertekekből számolt átlagokat mutatják.

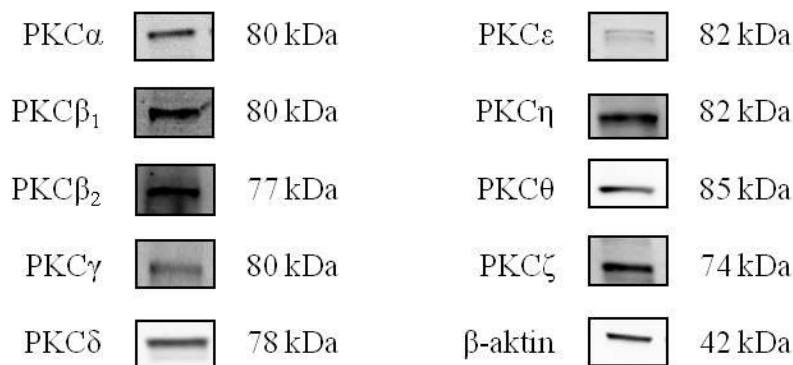
6.3 Számos PKC izoforma megtalálható differenciáltotott humán podocytákon

Számos irodalmi adattal rendelkezünk arra vonatkozóan, hogy a PKC rendszer különböző TRP csatornákat szabályoz, beleértve a TRPC6 ioncsatornát is (Shi és mtsai, 2004). Ismert, hogy a TRPC6-ot overexpresszáló HEK293 sejteken a PKC rendszer negatívan regulálja a TRPC6 működését (Bousquet és mtsai, 2010), ezért felvetődött a kérdés, hogy ugyanez a hatás érvényesül-e humán podocytákon expresszálódó natív TRPC6 fehérjén.



Munkánk következő lépésében meghatároztuk a PKC izoformák mintázatát az általunk differenciáltatott humán podocytaból származó mintákon. Elsőként Q-PCR technikát alkalmaztunk az izoenzimek mRNS szintű kimutatásához. Méréseink azt mutatják, hogy a klasszikus családba tartozó PKC α és - γ ; a novel PKC δ , - ϵ , - η és - θ ; valamint az atípusos PKC ζ expresszálódik humán podocytaon (12. ábra). Kísérleteinkben a PKC β expressziója nem érte el a detekciós küszöböt, a PKC λ vizsgálatára pedig nem volt lehetőségünk.

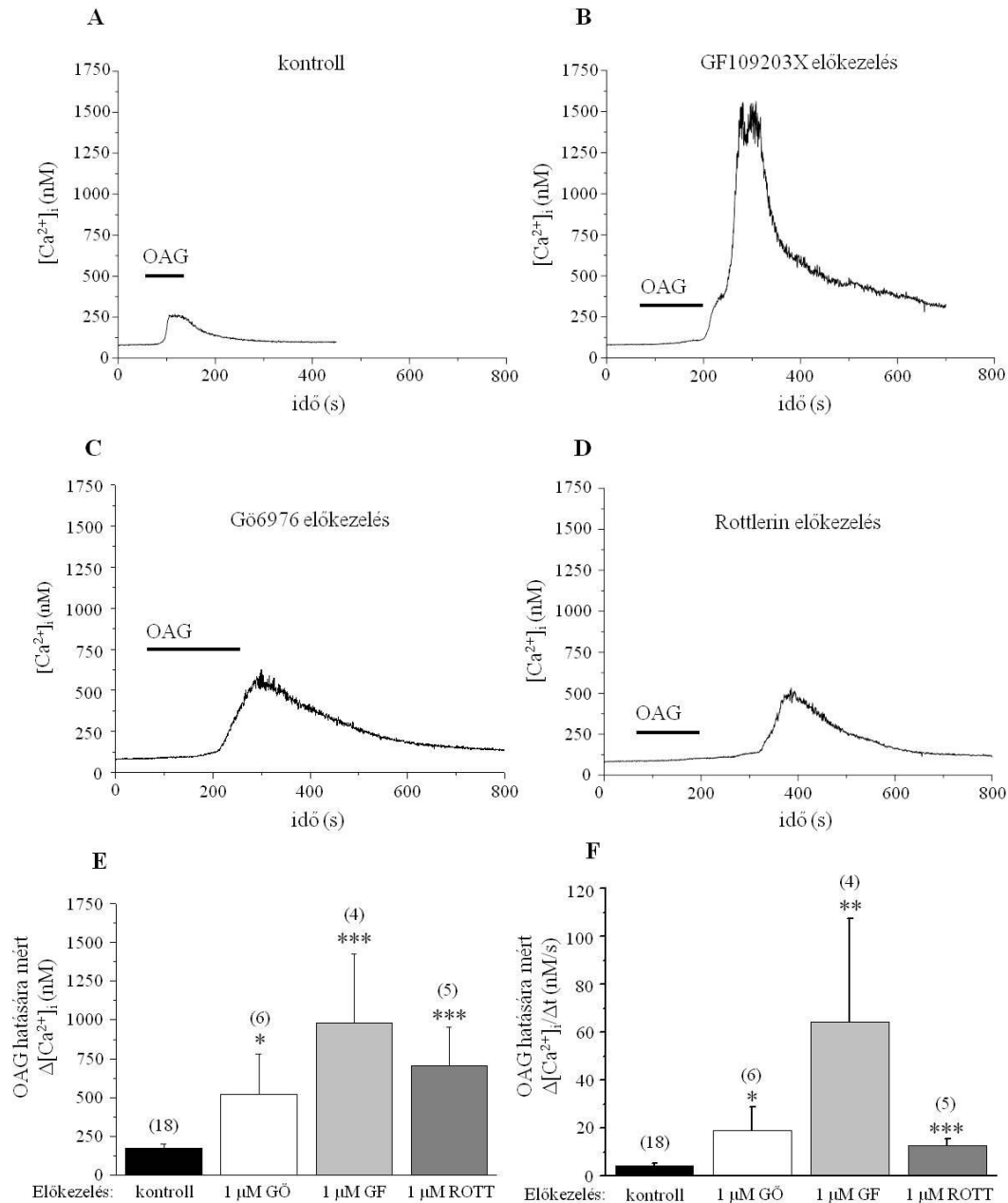
További vizsgálatokat végeztünk Western blottal, mely kísérletek megerősítették a Q-PCR-val kapott eredményeinket, sőt azon túlmenően sikerült kimutatnunk fehérjeszinten a PKC β_1 és - β_2 izoformák jelenlétét (13. ábra). A PKC λ kimutatására rendelkezésünkre állt megfelelő antitest, viszont nem tapasztaltunk jelölődést (az eredményt nem mutatjuk). Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a PKC rendszer minden izoformája, a PKC λ kivételével, expresszálódik differenciáltatott humán podocytaon.



13. ábra: PKC rendszer legtöbb eleme kifejeződik fehérje szinten differenciáltatott humán podocytaon
Differenciáltatott podocyta tenyészetekből előállított fehérjemintákban Western blot technika segítségével meghatároztuk a különböző PKC izoenzimek fehérjeszintű expresszióját. Kísérleteinkben a β -aktin fehérjét alkalmaztuk kontrollként.

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

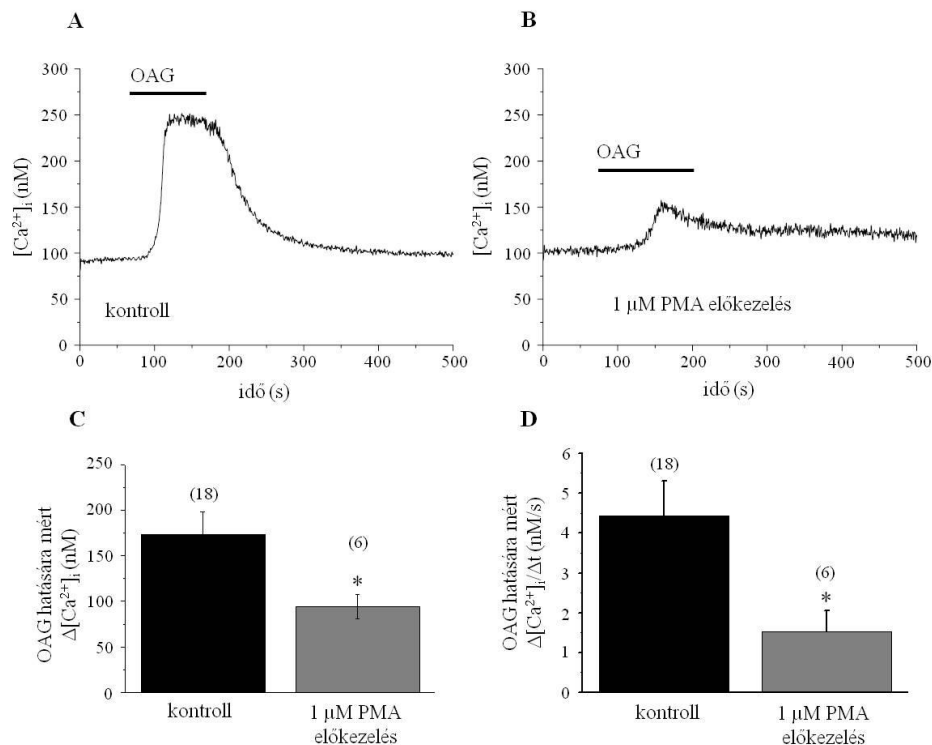
Következő lépésben arra kerestük a választ, hogy a kimutatott PKC izoenzimek endogén aktivitása hatást gyakorol-e a TRPC6 csatorna működésére. Ennek kiderítésére fluorimetriás $[Ca^{2+}]_{IC}$ -méréseket végeztünk egysejtes elrendezésben, melyekhez a sejteket Fura-2 fluoreszcens festékkel töltöttük, és különböző PKC inhibitorokat alkalmaztunk. 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 δ aktivitását gátló rottlerint.



14. ábra: A PKC inhibitorok növelik a TRPC6-mediált Ca^{2+} -emelkedést differenciáltotott humán podocytákon Fluorimetriás $[Ca^{2+}]_i$ -mérés egysejtes elrendezésben. **A:** Kontroll esetben nem történt előkezelés. A mérés során a vonallal jelzett időpontban 200 μ M OAG-ot adtunk a sejtekhez. **B-D:** Az általános PKC gátló GF109203X-szel (1 μ M), a klasszikus PKC izoformákat blokkoló Gö6976-tal (1 μ M), illetve a PKC δ inhibitor rottlerinnel (1 μ M) 30 percig előkezeljük a sejteket, melyek így OAG hatására nagyobb mértékű választ produkáltak. **E-F:** Az A-D paneleken bemutatott Ca^{2+} -tranziensek statisztikai elemzése. **E:** a mérések amplitúdójának, míg **F:** a tranziensek maximális meredekségének elemzése. Átlag \pm SEM; az esetszám az oszlopokon jelölve; * p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001 a kontroll esetben mért értékekhez képest

A mérések napján a differenciáltotott sejteket 30 percig előkezeljük az egyes gátlószerekkel, majd a mérés megkezdését követően 200 μ M OAG-ot adagoltunk a vizsgált sejt közelébe, így aktiválva a TRPC6-ot. Ahogy a 14. ábra mutatja, mindhárom inhibitor jelentősen növelte az OAG által kiváltott TRPC6-mediált Ca^{2+} -választ. Ez alapján arra

következtethetünk, hogy a klasszikus és novel PKC izoenzimek fiziológiás körülmények között tónusos gátlást fejtenek ki a TRPC6 ioncsatornára.

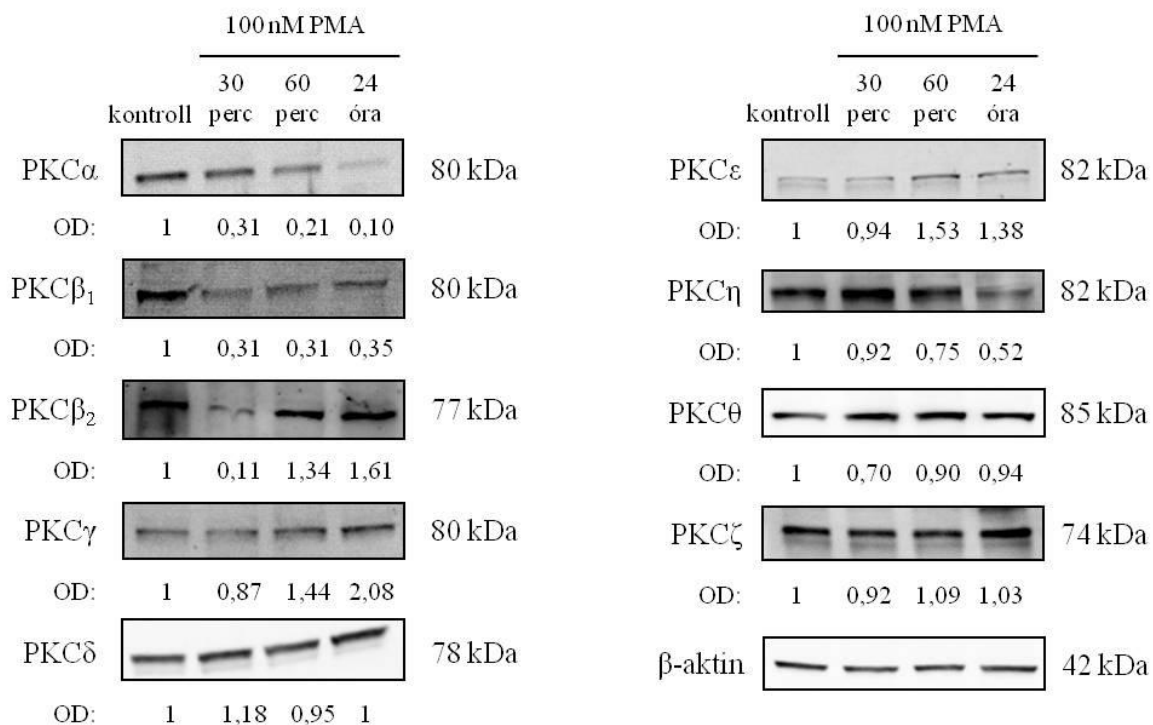


15. ábra: A forbol-12-mirisztát-13-acetát (PMA) gátolja a TRPC6 csatorna aktivitását humán podocyttákban
 Fluorimetriás $[Ca^{2+}]_{IC}$ -mérés egycytes elrendezésben. **A:** Kontroll esetben nem történt előkezelés. A mérés során a vonallal jelzett időpontban 200 μ M OAG-ot adtunk a sejtekhez. **B:** Az általános PKC aktivátor PMA-tal (1 μ M) történő előkezelés hatására (30 perc) a TRPC6 aktivátor OAG adagolásakor (az ábrán vonallal jelzett) csak kismértékű Ca^{2+} -szint-emelkedést tapasztaltunk. **C-D** A bemutatott Ca^{2+} -jelek statisztikai elemzését mutatja. A mért Ca^{2+} -jelek amplitúdója (**C**) és a transziensek maximális meredeksége (**D**) átlag \pm SEM a különböző független mérésekben, ahol az esetszám az oszlopokon jelzett. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest

Mivel a PKC rendszer gátlása a TRPC6 csatorna fokozott aktivációját eredményezte, így megfogalmazódott bennünk az a kérdés, hogy ennek az ellenkezője, tehát a PKC rendszer aktivációjának fokozása befolyásolja-e a TRPC6 funkcionalitását. Ezért megvizsgáltuk, hogy a podocytták által expresszált PKC-k aktivációjának exogén fokozása milyen hatással van a TRPC6 csatorna működésére. Ehhez ismét Fura-2 festéket alkalmazva $[Ca^{2+}]_{IC}$ -mérést végeztünk egycytes elrendezésben. Kísérleteinkben a PKC rendszer stimulálásához az „általános” PKC aktivátor PMA-ot használtuk, mely a klasszikus és novel izoenzimeket egyaránt aktiválja. A korábbi mérési protokollnak megfelelően 30 percig előkezeltük a sejteket 1 μ M PMA-tal, majd a mérés során 200 μ M OAG-gal aktiváltuk a TRPC6 csatornát. Eddigi eredményeinkkel összhangban és a vártak megfelelően a PKC rendszer aktiválása PMA-tal nagymértékben csökkentette az OAG által kiváltott TRPC6-mediált $[Ca^{2+}]_{IC}$ -

emelkedést (15. ábra). 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 követi, amely így az aktivációs folyamat indirekt jelzője (Papp és mtsai, 2003; Géczy és mtsai, 2012). Annak feltérképezésére, hogy a PMA kezelés hatására, mely PKC izoformák aktiválódása révén jön létre a TRPC6 csatorna gátlása, a differenciáltatott podocytaikat 100 nM PMA-tal előkezeltük, majd vizsgáltuk a különböző PKC izoformák fehérjeszintű expresszióját Western blot technikával. A PMA nagymértékben csökkentette a klasszikus családba tartozó PKC α és a - β_1 szintjét, valamint a Ca²⁺-inszenzitív novel PKC η expresszióját időfüggő módon (16. ábra). Érdekes módon a PKC β_2 expressziós szintje 30 perc elteltével csökkent, viszont hosszabb időtartamú kezelés hatására ez a csökkenés elmaradt. A többi PMA-szenzitív izoforma, illetve a PMA-inszenzitív PKC ζ fehérjeszintű kifejeződése nem változott a kezelés hatására. Tehát a TRPC6 csatornára valószínűleg a PKC α , - β_1 , - β_2 , illetve a - η aktivációja lehet negatív hatással.

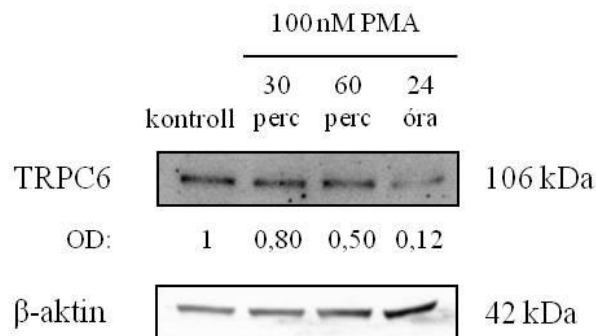


16. ábra: A PKC izoenzimiek aktivációjának vizsgálata differenciáltatott humán podocytaikon

A differenciáltatott humán podocyta tenyészeteket 100 nM PMA-tal előkezeltük, majd a jelzett időpontokban fehérje mintát készítettünk, és Western blot technikával vizsgáltuk a kezelés hatását a PKC izoenzimiek fehérjeszintű kifejeződésére. A kontroll (0 perc) esetében nem végeztünk előkezelést. A megjelenő sávokat denzitometráltuk, majd az így kapott optikai denzitás (OD) értékeket a kezeletlen kontroll minta OD értékére normalizáltuk. Belső kontrollként a β -aktin fehérjét mutattuk ki. A bemutatott képek több kísérletről származó reprezentatív ábrák ($n=3$, kivéve a PKC α , - δ és - ϵ , ahol $n=6$, 4 és 4 az esetszám).

6.5 A PKC rendszer aktivációja csökkenti a TRPC6 ioncsatorna expresszióját differenciáltatott podocytákon

Eddigi munkánk során azt tapasztaltuk, hogy az általunk létrehozott tenyészetekben a PKC rendszer akut aktivációja jelentősen csökkenti TRPC6 ioncsatorna működését. Glomeruláris mesangialis sejteken végzett kutatások ugyanakkor azt mutatják, hogy a PMA kezelés csökkenti a TRPC6 csatorna kifejeződését is (Graham és mtsai, 2011; Wang és mtsai, 2013). Ezért megvizsgáltuk, hogy a PKC stimuláció PMA-tal befolyásolja-e a differenciáltatott podocytákon kifejeződő TRPC6 szintjét is. A korábban bemutatott módon 100 nM PMA-tal 30 és 60 perces, illetve hosszabb időtartamú 24 órás kezelést végeztünk differenciáltatott podocytákon, majd az elkészített mintákban Western blottal vizsgáltuk a TRPC6 fehérje kifejeződését. Ahogy azt a 17. ábra mutatja a PKC rendszer aktiválása jelentős és időfüggő TRPC6 down-regulációt eredményezett.

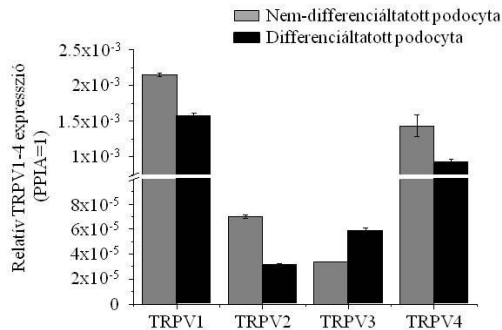


17. ábra: A PKC rendszer aktivációja csökkenti a TRPC6 fehérje expresszióját differenciáltatott podocytákban Különböző időtartamú PMA (100 nM) kezeléseket végeztünk differenciáltatott humán podocytá tenyészeteken, majd Western blot technikával elemeztük a TRPC6 ioncsatorna expresszióját. Az immunsávok optikai denzitását (OD) a kezeletlen 0 perces kontroll minta denzitásával hasonlítottuk össze. Belső kontrollként a β -aktin fehérjét mutattuk ki. n=3

6.6 A differenciáltatott podocyták expresszálják a melegérzékeny TRPV1, TRPV2, TRPV3 és TRPV4 csatornákat

Kevés irodalmi adat 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 fiziológias folyamatainak szabályozásában. Az ismert, hogy a vese tubulusokban a TRPV család hőérzékeny tagjai is kifejeződnek (Kassmann és mtsai, 2013), azonban a Bowman-tok podocytáin eddig még nem vizsgálták jelenlétüket. Ezért kísérleteinket tovább folytatva megvizsgáltuk a meleg hőmérsékletre aktiválódó TRPV1-4 csatornák jelenlétét az általunk differenciáltatott podocytákon. Elsőként Q-PCR technikával kimutatattuk, hogy mRNS szinten mind a négy ioncsatorna expresszálódik nem-

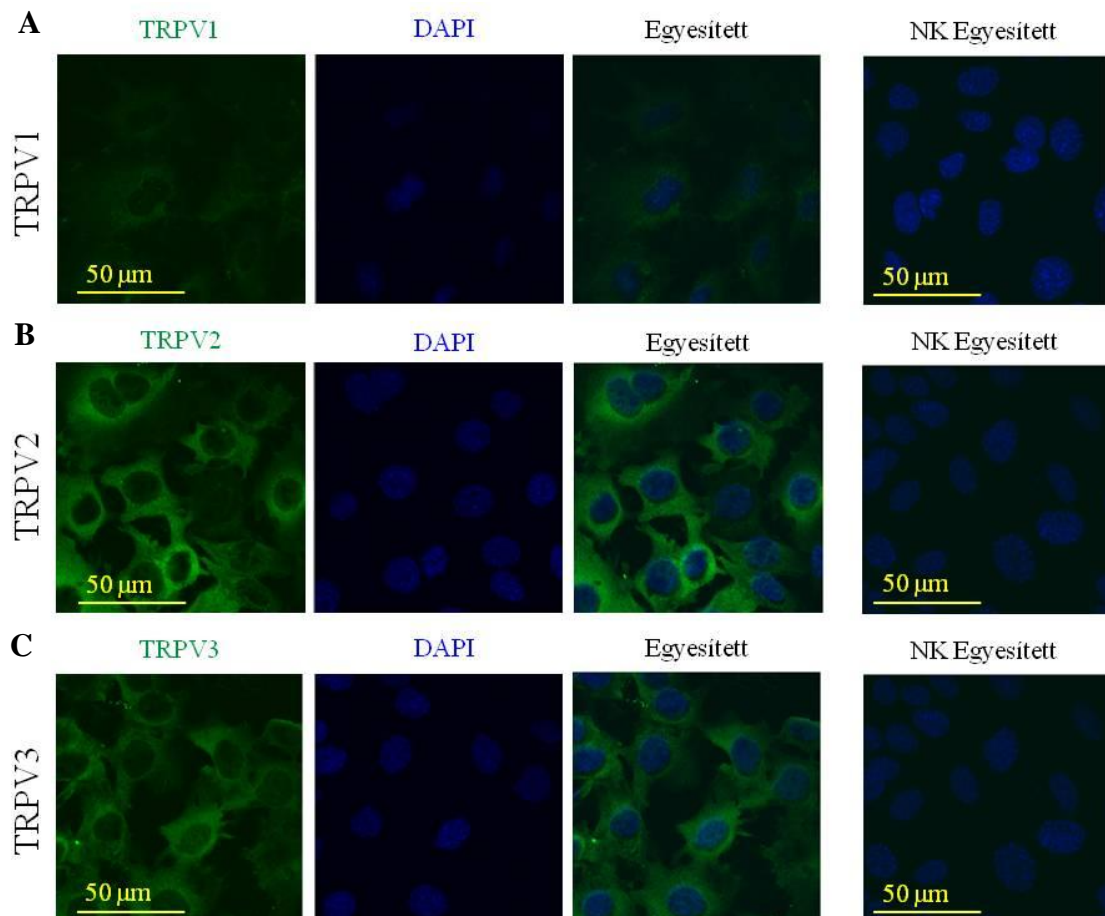
differenciáltatott és differenciálatott podocytaikon is (18. ábra). Megfigyeléseink szerint a TRPV1 és a TRPV4 ioncsatornák magasabb, míg a TRPV2 és a TRPV3 alacsonyabb szinteken expresszálódnak.

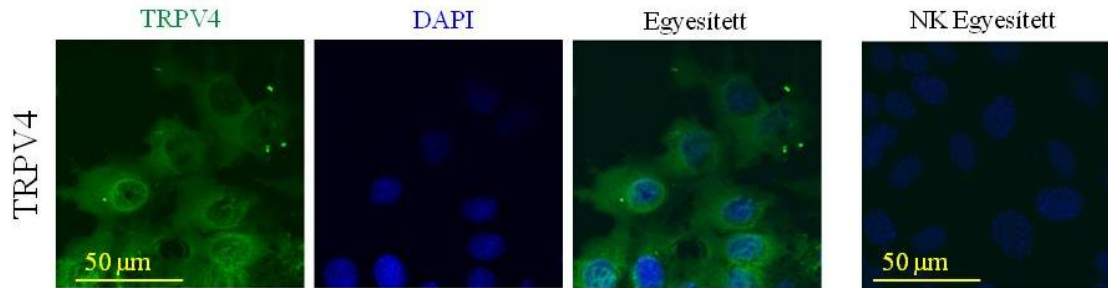


18. ábra: A TRPV1-V4 csatornák kifejeződnek humán podocytaikon

Nem-differenciáltatott és differenciáltatott podocyt tenyészetekből RNS mintát készítettünk, majd reverz transzkripciót követően *Q*-PCR-t végeztünk. A mért értékeket a belső kontrollként használt ciklofilin A (*PPIA*) expresszióra normáltuk. $N=3$; átlag \pm SEM

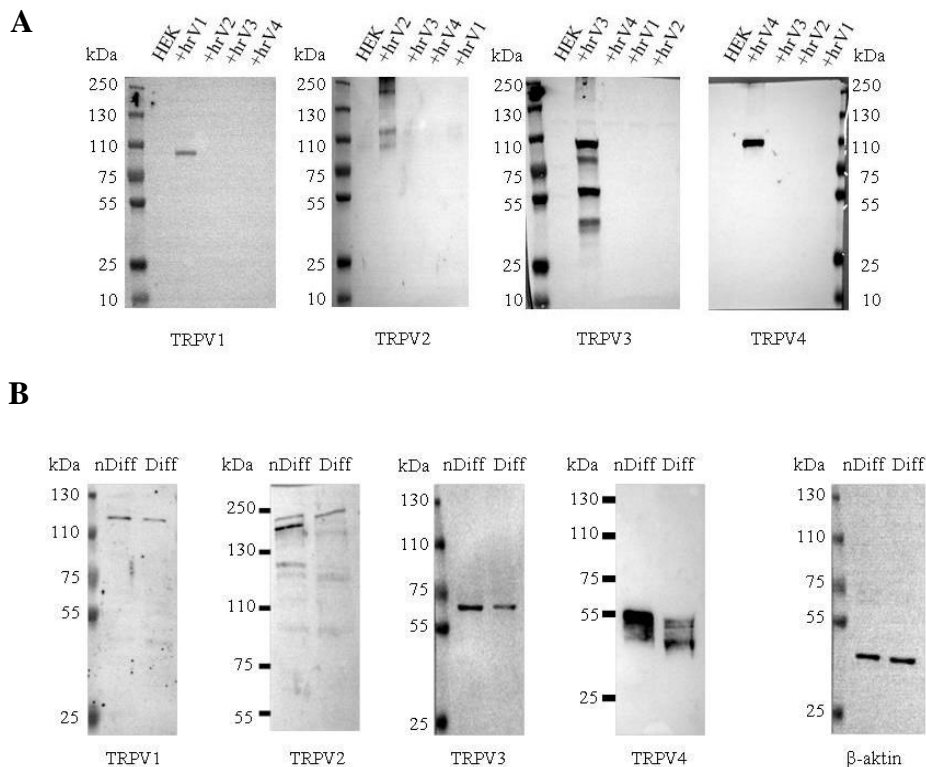
Az mRNA szintű méréseinket fehérje szintű vizsgálatok követték, a korábbiakhoz hasonlóan immuncitokémiát és Western blot technikát alkalmaztunk. Mindkét módszer megerősítette a csatornák jelenlétét. A TRPV2-4 csatornák intenzív jelölődést mutattak (19. B-D ábra), míg a TRPV1 csatorna esetében lényegesen halványabb festődést tapasztaltunk, de egyértelműen pozitív jelölődés látható a primer antitest elhagyásával készült negatív kontroll festéshez képest (19.A. ábra).



D

19. ábra: A TRPV1-V4 ioncsatornák fehérje szinten expresszálódnak differenciáltotott humán podocytaon
A-D: A TRPV1-V4 fehérjéket immuncitokémiával mutattuk ki, ehhez specifikus primer és fluoreszcensen jelölt (Alexa-Fluor®-488, zöld szín) másodlagos antitesteket használtunk. A sejtmagokat DAPI reagenssel jelöltük (kék szín). A negatív kontroll (NK) festések a specifikus primer antitest elhagyásával készültek. Méretvonal: 50 µm; nagyítás: 600x

A Western blot során használt antitestek specificitását az egyes TRPV csatornákat transziensen overexpresszáló HEK293T sejtekből készült fehérje minták segítségével igazoltuk (20. A ábra). Az alkalmazott antitestek nem-differenciáltotott és differenciáltotott podocyta tenyészetekben egyaránt jelölték a keresett fehérjéket (20. B ábra), viszont nem minden esetben azonos molekulalúlynál.

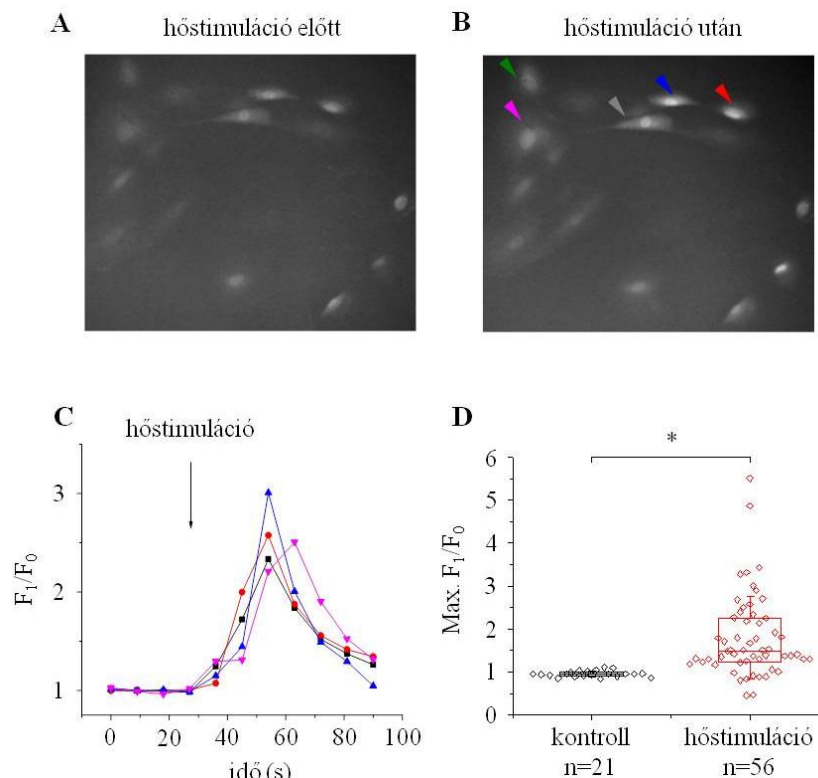


20. ábra: A TRPV1-V4 csatornák fehérje szintű expressziójának megerősítése humán podocytaon
A: Western blot technikával teszteltük az alkalmazott specifikus primer antitestek szelektivitását a különböző TRPV csatornákat overexpresszáló HEK293T sejtvonalakon. **B:** Igazoltuk, hogy a TRPV1-V4 fehérjék kifejeződnek nem-differenciáltotott (nDiff) és differenciáltotott (Diff) humán podocyta tenyészetekben is. Kontrollként mindkét esetben a β -aktin fehérjét jelöltük a membránokon. HEK: nem transzfektált kontroll csoport, +hrV1/V2/V3/V4: az adott TRPV csatornát overexpresszáló HEK293T tenyészet

A TRPV1 és a TRPV2 a podocytákban nagyobb molekulasúlynál festődött, illetve a TRPV3 antitest a TRPV3-at overexpresszáló HEK293T sejtekben több sávot is jelölt, de a podocytákban ezek közül csak egy jel volt detektálható. A TRPV4 esetében a specifikus antitest a TRPV4-et overexpresszáló HEK293T sejtekben az ioncsatornát a vártnak megfelelő molekulasúlynál festette, viszont a podocytákból készített mintákban ugyancsak egy markáns jel detektálható, de alacsonyabb molekula tömegnél. Összegezve a molekuláris szintű kimutatásainkat elmondható, hogy a differenciáltatott podocyták expresszálják a TRPV1-4 csatornákat mRNA és fehérje szinten egyaránt.

6.7 A podocyták reagálnak a hőmérséklet emelkedésére

A TRPV1-4 fehérjék közös sajátossága, hogy a meleg hőmérséklet különböző tartományaiban aktívak, illetve Ca^{2+} -ra nézve nagy a permeabilitásuk. Ezeket a tulajdonságokat kihasználva vizsgáltuk a csatornák aktivitását. A podocytákat 35 mm átmérőjű Petri-csészékbe szélesztettük, majd „nem-permisszív” közegben 7 napig tenyésztettük a differenciált állapot eléréséig.



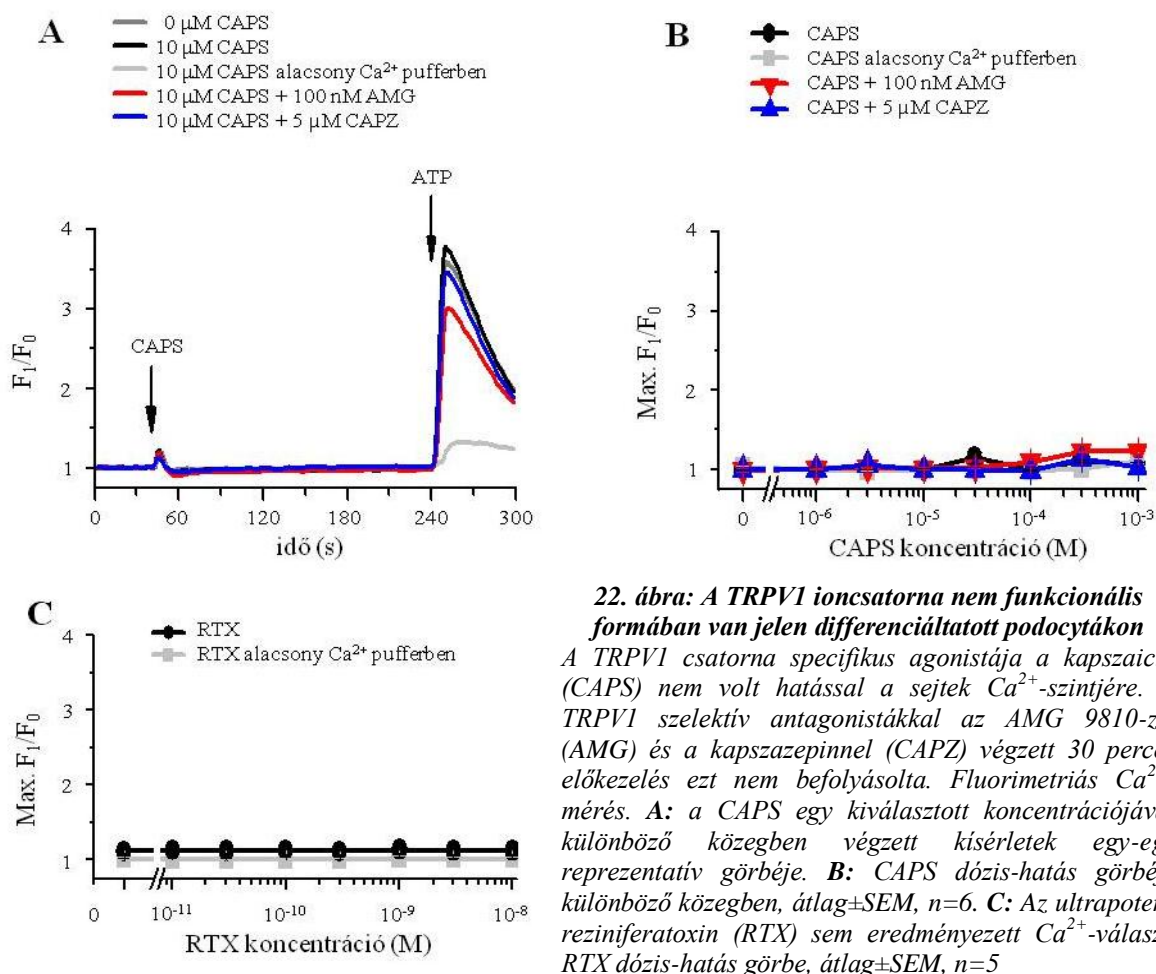
21. ábra: Hőstimuláció hatására nő a differenciáltatott humán podocyták intracelluláris Ca^{2+} -szintje
*Fluo-4 fluoreszcens festékkel töltöttük a sejteket, majd előmelegített oldatot juttattunk a környezetükbe, melyre azok fluoreszcencia intenzitás-növekedéssel reagáltak. A: hőstimuláció előtt; B: hőstimuláció alatt; C: a B képen azonos színnel jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitás-változásait mutatja hőstimuláció hatására; D: A kísérlet során leért összes adat elemzése; Mann-Whitney U-teszt, $*p < 0,05$, átlag \pm SD*

A mérés napján Ca^{2+} -érzékeny fluoreszcens Fluo-4 festékkel töltöttük a sejteket 30 percig, ezután Olympus IX83 invert mikroszkóp és Xcellence Pro live cell imaging program segítségével rögzítettük a fluoreszcencia intenzitás változásait. A mérés megkezdésekor a környezeti hőmérséklettel megegyező hőmérsékletű pufferben tartottuk a sejteket, így rögzítettük az alapvonalat, majd kb. 45-50°C-ra melegített puffer 1:1 arányban történő hozzáadásával hőstimulációt végeztünk. Az 21. ábra képei reprezentálják a hőstimuláció hatását, melyeken jól látható, hogy a sejtek reagáltak a hőmérsékleti ingerre, mivel a kontroll (21. A ábra) esethez képest nőtt a Fluo-4 festék fluoreszcencia intenzitása (21. B ábra). Ezek a kísérleteink megmutatták, hogy a differenciáltatott podocyta érzékenyek a meleg hőmérsékletre, ami a hőérzékeny TRPV csatornák funkcionalitására utalhat.

A méréseink során alkalmazott hőstimuláció nem elég specifikus ahhoz, hogy pontosan azonosítani tudjuk, melyek azok a csatornák, amelyek ebben a válaszban szerepet játszanak. Ezért további kísérleteket végeztünk a TRPV1-4 csatornákat egyesével vizsgálva, specifikus agonisták és antagonisták alkalmazásával.

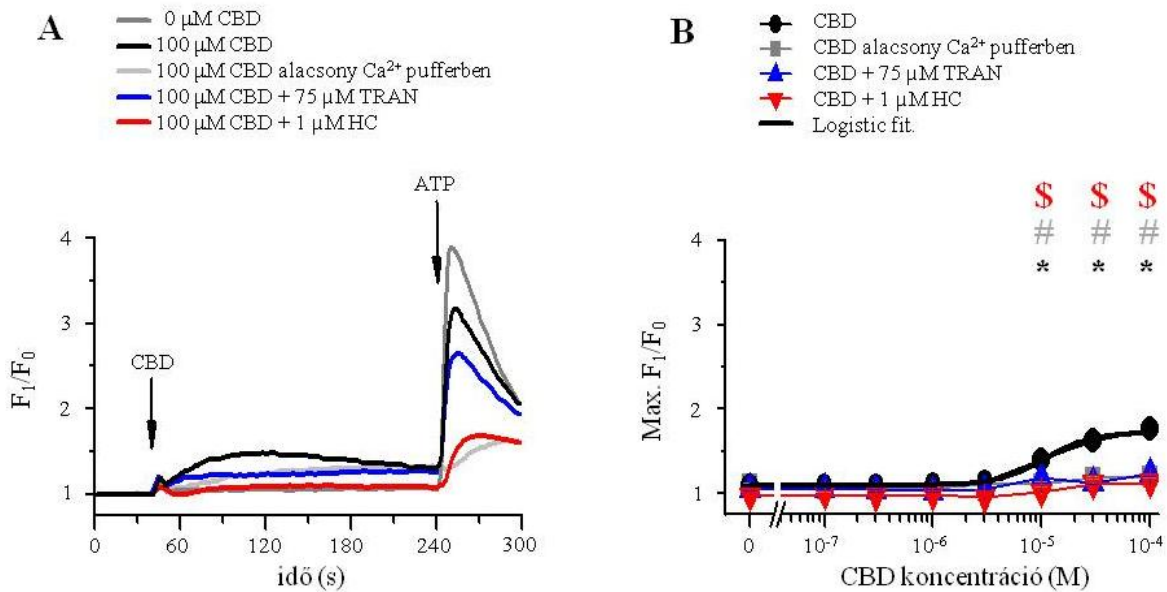
6.8 A TRPV1 ioncsatorna funkcionálisan nem aktív differenciáltatott podocytaon

A TRPV1 funkcionalitásának elemzésére fluorimetriás Ca^{2+} -mérést végeztünk többsejtes elrendezésben. A podocyta differenciálás után Fluo-4 festékkel töltöttük, majd a Ca^{2+} -szint-mérés során a 40. másodpercben kapszaicint adagoltunk a sejtekhez, mely a TRPV1 potens és specifikus aktivátora. Jól látható, hogy a kapszaicin kezelés egészen 1 mM koncentrációig, semmilyen változást nem okozott a sejtek intracelluláris Ca^{2+} -szintjében, és ezt az állapotot egyik specifikus TRPV1 antagonistá sem befolyásolta: sem a kapszazepin, sem az AMG 9810 előkezelés nem hozott változást (22. A és 22. B ábra). Megvizsgáltuk a TRPV1 ultrapotens aktivátorát, a reziniferatoxint (RTX) is. Kísérleteinkben nagyon széles tartományban alkalmaztuk a RTX-t, de sem alacsonyabb, sem magasabb koncentrációja nem bizonyult hatásosnak (22. C ábra). Megállapíthatjuk, hogy a TRPV1 csatorna viszonylag magas mRNS szintű expressziója ellenére, nem alkot funkcionális csatornát a differenciáltatott humán podocytaon.



6.9 A TRPV2 és a TRPV4 fehérjék aktív formában expresszálódnak differenciáltot podocytaon

A TRPV2 csatornának nincs specifikus agonistája, ezért kísérleteinkben a fitokannabinoid CBD-t alkalmaztuk agonistaként, mely egyben a TRPV4 ioncsatornát is aktiválja (Qin és mtsai, 2008). A csatorna aktivitásának mérését a korábban is alkalmazott módszerekkel vizsgáltuk. A differenciáltot sejteket Fluo-4 festékkel töltöttük, majd Flexstation 3 fluoreszcens microplate reader segítségével, valós idejű Ca^{2+} -mérést végeztünk. A CBD 10 μM koncentrációban mérsékelt Ca^{2+} -választ eredményezett, mely elmaradt alacsony Ca^{2+} -ot tartalmazó közegben. Ez az eredmény azt mutatja, hogy a CBD hatására sejt felszíni Ca^{2+} -csatorna nyílik, és ez felelős a Ca^{2+} -influx kialakításáért (23. A és 23. B ábra). TRPV2 antagonistaként tranilasztot alkalmaztuk 75 μM koncentrációban. Tranilasztal 30 percig előkezelve a sejteket, a CBD alacsonyabb Ca^{2+} -emelkedést eredményezett, mely arra utal, hogy a TRPV2 valóban funkcionál a differenciáltot podocytaon.

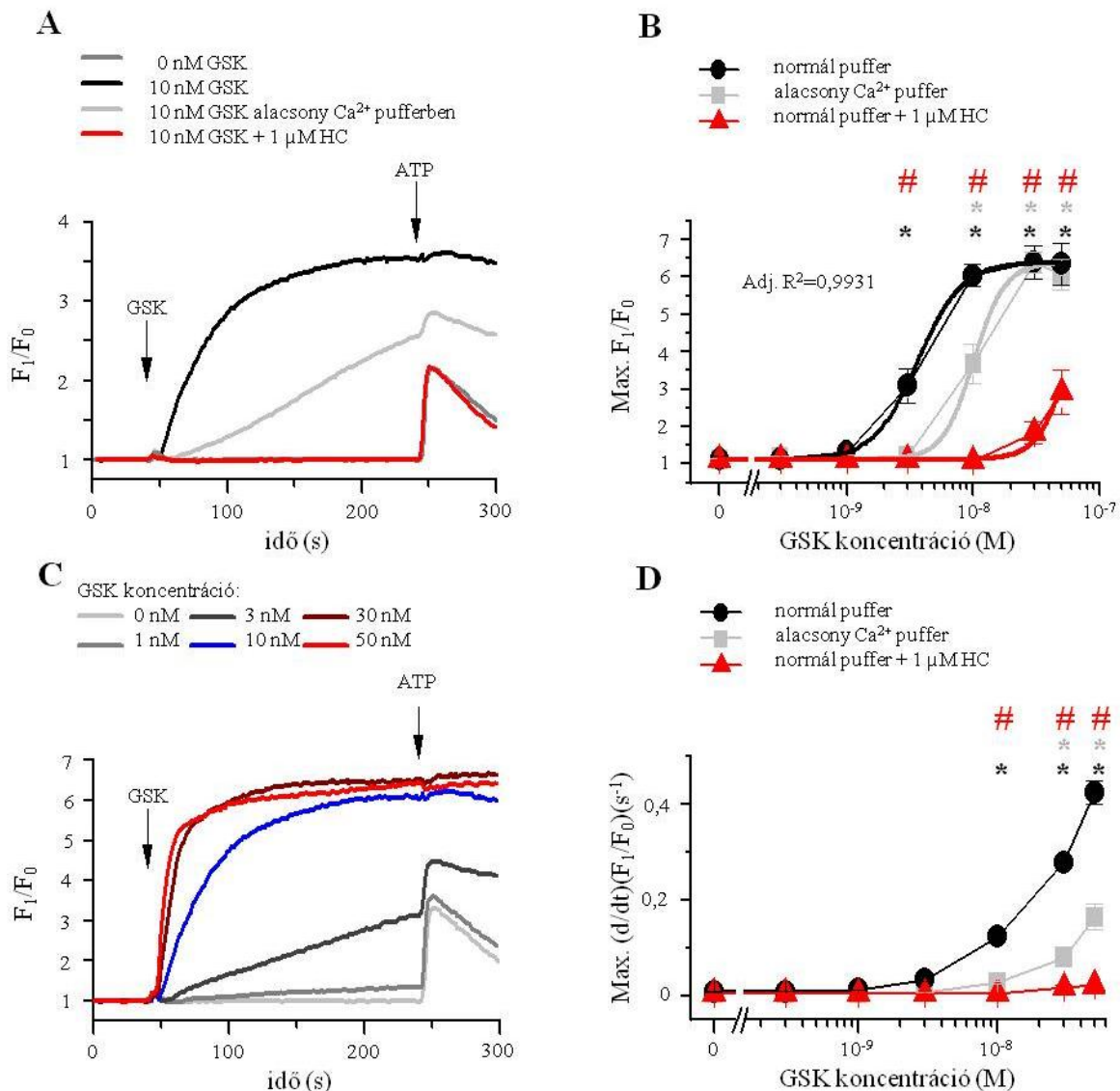


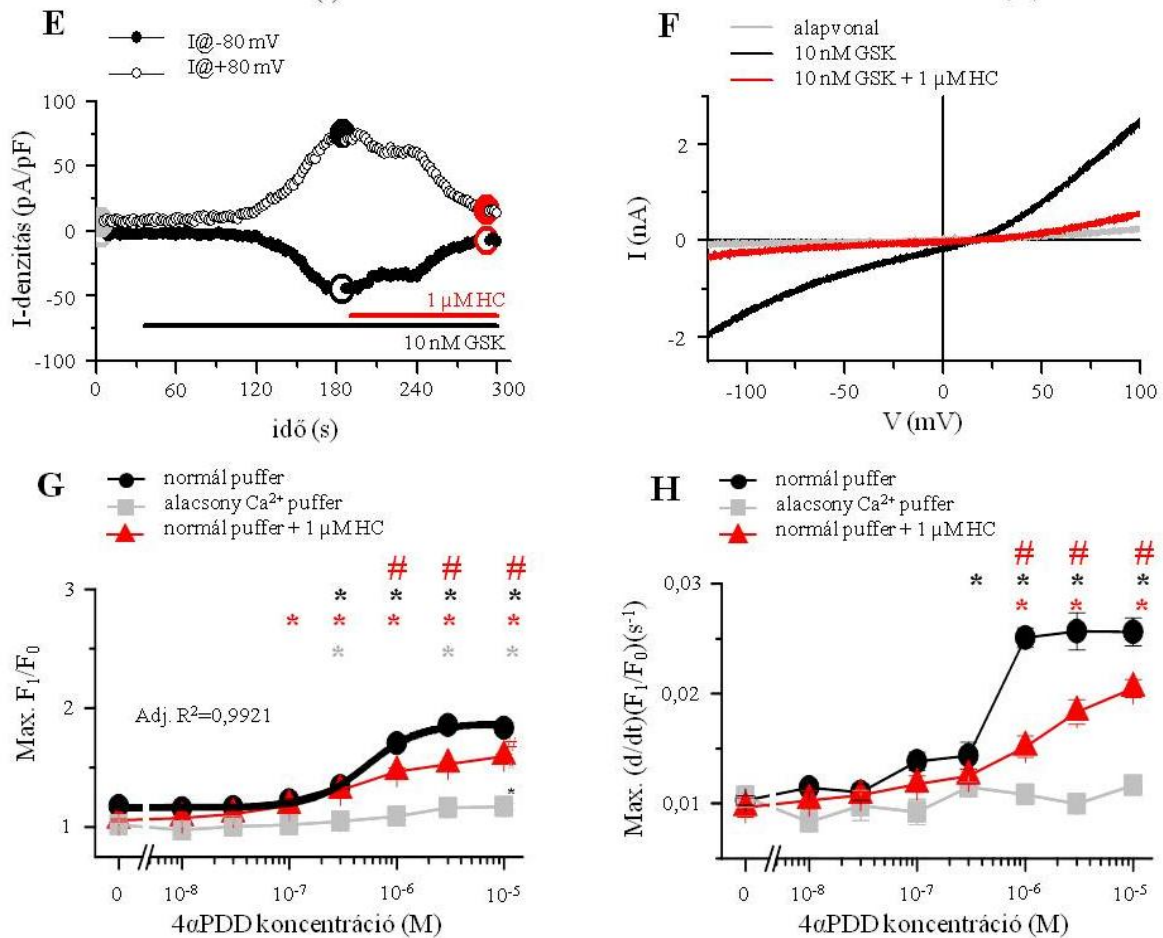
23. ábra: A kannabidiol aktiválja a TRPV2 és TRPV4 csatornákat differenciáltotott humán podocytaon
 A kannabidiol (CBD) növeli a differenciáltotott podocyta intracelluláris Ca^{2+} -szintjét. A TRPV2 antagonistá tranilaszttal (TRAN) és a TRPV4 gátló HC067047-tel (HC) végzett 30 perces előkezelés egyaránt csökkenti a CBD hatását. Fluorimetriás Ca^{2+} -mérés. **A:** CBD hatását reprezentáló görbék különböző körülmények között; **B:** CBD dózis-hatás görbe az A panelen bemutatott körülmények között, átlag \pm SEM, $n=6$, $*p<0,05$ a kontrollhoz képest, $^{\#}p<0,05$ a tranilaszttal előkezelte csoporthoz képest; $^{\$}p<0,05$ a HC067047 előkezelte sejtekkel összehasonlítva

Mivel több kutatócsoport, köztük a mi munkacsoportunk is leírta, hogy a CBD gyenge TRPV4 agonista (De Petrocellis és mtsai, 2012; Oláh és mtsai, 2014), ezért megismételtük a kísérletet a potens és specifikus TRPV4 antagonistá HC067047 jelenlétében (23. ábra). 1 μM HC064047 a tranilaszthoz hasonló mértékben csökkentette a CBD által létrehozott Ca^{2+} -szint-emelkedést, ami arra utal, hogy a válasz kialakításában nemcsak a TRPV2, hanem a TRPV4 csatorna is részt vesz. Ezzel az eredményünkkel mi is megerősítettük, hogy a CBD valóban TRPV4 agonista, illetve, hogy a TRPV4 is funkcionálisan aktív lehet differenciáltotott podocytaon.

Hogy igazoljuk az utóbbi állításunkat, tovább vizsgáltuk a TRPV4 csatorna aktivációját. Az eddigi protokollhoz hasonlóan többsejtes elrendezésben fluorimetriás Ca^{2+} -szint-méréseket végeztünk, ahol az ultrapotens, TRPV4-re szelektív GSK1016790A-t alkalmaztuk TRPV4 agonistaként. Méréseinkben a GSK1016790A dózisfüggő módon növelte a Ca^{2+} -tranziensek csúcértékeit, és már nM-os koncentráció tartományban jelentős Ca^{2+} -választ eredményezett (24. A-D ábra). Elemezve a kapott görbéket megállapítható, hogy nemcsak a tranziensek maximuma, hanem a meredeksége is nőtt a GSK1016790A koncentráció függvényében (24. B-D ábra). A tranziensek amplitúdója az általunk alkalmazott koncentrációkban körülbelül 30 nM-nál szaturálódik (24. B ábra), míg a meredeksége tovább fokozódik. Megismételve kísérleteinket 1 μM HC067047-tel történő előkezelést követően, a

GSK1016790A hatása nagymértékben csökkent (24. A-B és 24. D ábra). Ez alátámasztja eddigi feltevésünket, miszerint a GSK1016790A valóban a TRPV4 csatorna nyitása révén fejt ki hatását. Alacsony Ca^{2+} -tartalmú közegben megismételve kísérleteinket, kisebb mértékű, de hasonlóan dózisfüggő Ca^{2+} -választ tapasztaltunk GSK10167902A kezelés hatására (24.A-B ábra). Mindez arra utal, hogy a GSK1016790A nemcsak a sejtfelszíni membránban elhelyezkedő TRPV4 csatornákat aktiválja, hanem az intracelluláris Ca^{2+} -raktárak felszínén lévőket is. Az a tény azonban, hogy csökkentett 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 sejtés konfigurációban végzett patch-clamp mérésünk, ahol az agonista a TRPV4 ioncsatornára jellemző áram-feszültség karakterisztikával bíró transzmembrán áramot indukált, amit a specifikus antagonistá HC067047 ugyancsak gátolt (24. E-F ábra).





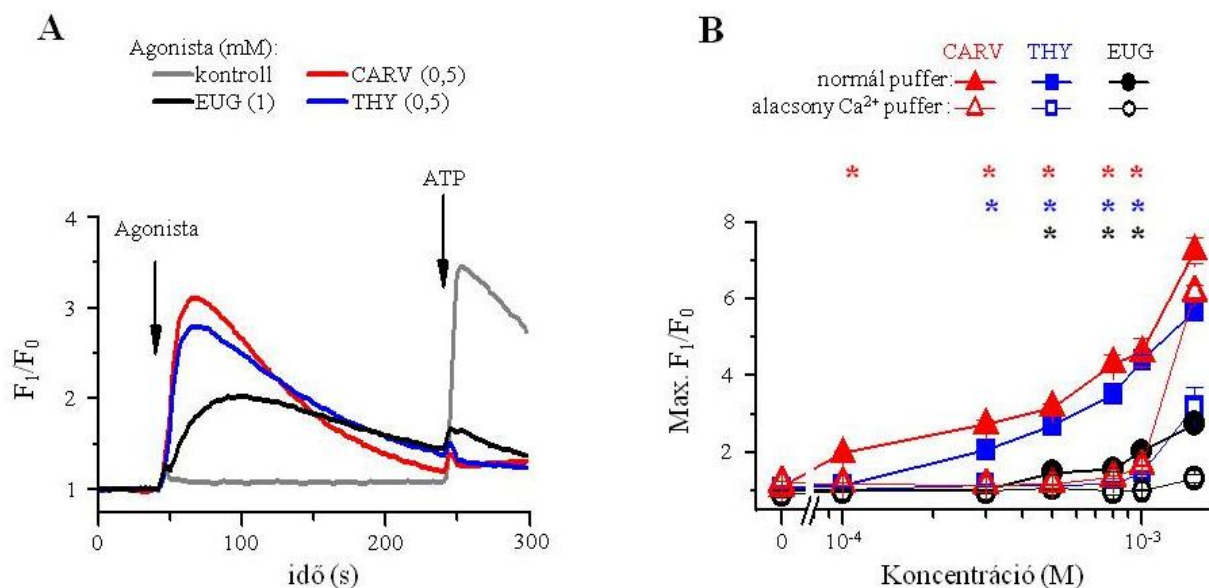
24. ábra: A TRPV4 ioncsatorna aktivációja humán podocytákon

Fluorimetriás Ca^{2+} -mérés. **A:** A TRPV4 agonista GSK1016790A (GSK) hatása normál és alacsony Ca^{2+} -tartalmú közegben, valamint a TRPV4 specifikus antagonistá HC067047-tel (HC) történő előkezelést követően. **B:** GSK dózis-hatás görbéje. A Ca^{2+} -tranziensek amplitúdóját az A panelen bemutatott körülmények között regisztráltuk. Átlag \pm SEM, n=6. **C:** A különböző GSK koncentrációk hatására kialakuló Ca^{2+} -tranziensek. **D:** A GSK által létrehozott Ca^{2+} -tranziensek meredekségének statisztikai elemzése. N=6. **E:** A GSK és a HC időfüggő hatása a podocyták transzmembrán áramára -80 és +80 mV-on. A kísérlet alatt 0 mV tartópotenciál mellett mértük a transzmembrán áramokat, 2 másodpercenként 400 ms alatt alkalmazott -120-tól +100 mV-ig terjedő feszültségrámpa segítségével változtatva a membránpotenciált. **F:** Az E panelen jelzett időpontban mért transzmembrán áramok I-V összefüggése. **G:** A TRPV4 aktivátor 4 α -PDD dóziszfüggő hatása a Ca^{2+} -jelek amplitúdójára. Átlag \pm SEM, n=5. **H:** A Ca^{2+} -tranziensek meredekségének változása a 4 α -PDD koncentráció függvényében. N=5. * $p < 0,05$ a kezeletlen kontrollhoz (0 nM GSK) képest, # $p < 0,05$ a HC előkezelt csoporthoz viszonyítva

A 4 α -PDD régebb óta ismert, potens TRPV4 agonista, ezért a 4 α -PDD hatását is megvizsgáltuk. Várakozásainknak megfelelően a GSK1016790A-hoz hasonló, de kisebb mértékű $[Ca^{2+}]_{IC}$ -emelkedést váltott ki a 4 α -PDD differenciáltatott podocytákon (24. G-H ábra). Alacsonyabb Ca^{2+} -tartalmú közegben ugyancsak csökkent a tranziensek amplitúdója, illetve normál oldatban a HC067047 előkezelés mérsékelte a 4 α -PDD hatására létrejött Ca^{2+} -szint-emelkedést (24. G-H ábra). Ezen eredményeink még inkább megerősítik állításunkat, miszerint a TRPV4 funkcionálisan aktív differenciáltatott podocytákon.

6.10 A TRPV3 agonisták részben TRPV3-tól függetlenül emelik a podocyták intracelluláris Ca^{2+} -szintjét

A TRPV3 ioncsatorna működésének elemzése jóval nehezebb feladat volt számunkra, mivel kereskedelmi forgalomban nincs elérhető specifikus TRPV3 agonista, sem antagonistá. Ezért olyan anyagokat alkalmaztunk, melyek eddigi vizsgálatok alapján a TRPV3 csatornát is aktiválják. Az irodalomban nem szelektív, de potens TRPV3 agonistaként számos növényi eredetű anyagot írtak le, ilyen például az eugenol, a timol és a karvakrol. Ezek hatásait vizsgálva megállapítottuk, hogy mindhárom anyaggal való kezelés markáns intracelluláris Ca^{2+} -szint-emelkedést váltott ki, így feltételezhető, hogy a TRPV3 csatorna funkcionál differenciáltot sejteken (25. A ábra). A kialakult Ca^{2+} -válasz dóziszfüggőnek bizonyult, viszont a dózis-hatás görbe a vizsgált koncentráció tartományban nem szigmoid alakú, még 1,5 mM koncentráció tartomány felett sem szaturálódik (25. B ábra). Ez felveti annak lehetőségét, hogy a TRPV3 aktiváció mellett, különösen nagyobb koncentrációk esetén, más mechanizmusok is hozzájárulhatnak az $[Ca^{2+}]_{IC}$ növekedéséhez.



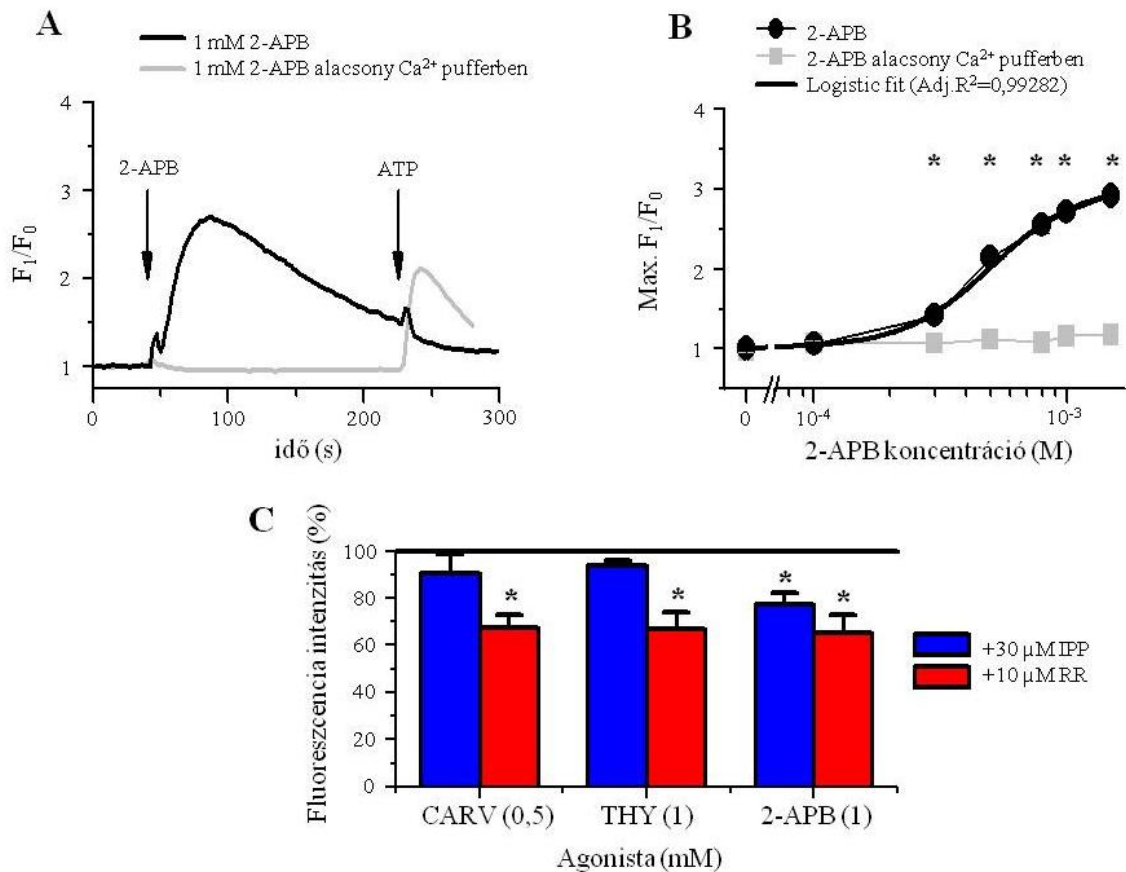
25. ábra: Növényi eredetű TRPV3aktivátorok hatása az ioncsatorna aktivációjára differenciáltot podocytákon

Fluorimetriás Ca^{2+} -mérés. **A:** A növényi eredetű eugenol (EUG), karvakrol (CARV) és timol (THY) kezelések által létrehozott Ca^{2+} -tranziensek. **B:** A TRPV3 agonisták dózis-hatás görbéi normál és alacsony Ca^{2+} -tartalmú közegben. Átlag±SEM, n=6, * $p < 0,05$ az adott színnel jelölt kezelés összehasonlítva az oldószerrel kezelt kontroll csoporttal, normál Ca^{2+} -tartalmú közegben

A növényi eredetű TRPV3 agonistákkal párhuzamosan kísérleteket végeztünk a szintetikus 2-aminoetoxidifenil boráttal (2-APB), mely ugyancsak hatékony, bár továbbra sem specifikus aktivátora a TRPV3 csatornának (Xu és mtsai, 2006). A 26. A és B ábra mutatja, hogy a 2-APB kezelés hatására nőtt a sejtek intracelluláris Ca^{2+} -szintje, mely hatás

dózisfüggőnek bizonyult, illetve ebben az esetben a dózis-hatás görbe szigmoid alakot vett fel.

Mivel TRPV3 specifikus inhibitor sem áll rendelkezésünkre, ezért kísérleteink következő részében az általános TRP gátló ruténium vörössel, illetve az endogén TRPV3 antagonistá izopentenil-pirofoszfáttal (IPP; Bang és mtsai, 2011) végeztünk előkezeléseket. A ruténium vörös az eugenol kivételével csökkentette a többi aktivátor által kiváltott Ca^{2+} -válasz nagyságát, míg az IPP csak a 2-APB kezelésre volt hatással (26. C ábra).

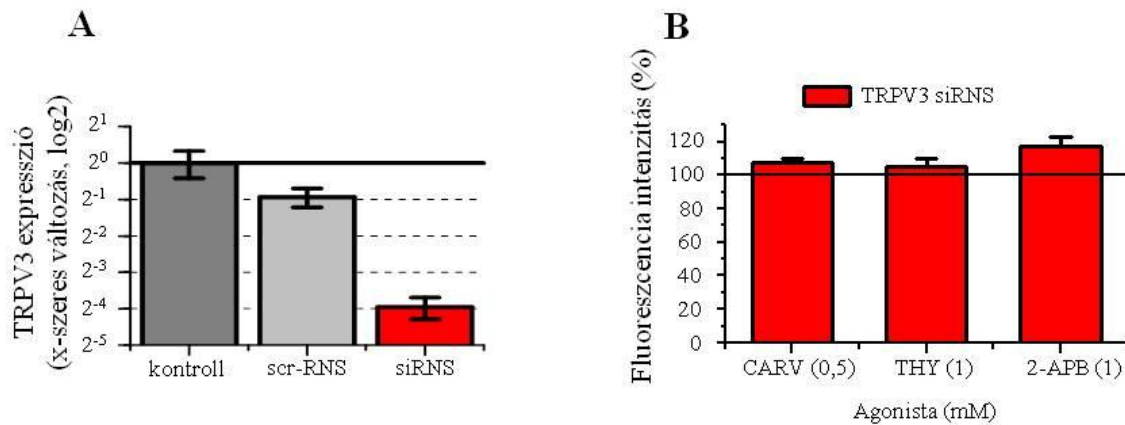


26. ábra: A TRPV3 ioncsatorna aktivációjának vizsgálata szintetikus agonista és antagonisták alkalmazásával differenciáltított podocytákon

Fluorimetriás Ca^{2+} -mérés. **A:** A szintetikus agonista 2-aminoetoxidifenil borát (2-APB) által kiváltott Ca^{2+} -tranziensek. **B:** A 2-APB dózis-hatás görbéje normál és nominálisan Ca^{2+} -mentes (alacsony Ca^{2+} -tartalmú) közegben. Átlag \pm SEM, $n=6$, * $p<0,05$ a 2-APB kezelés a kezeletlen kontrollhoz képest normál Ca^{2+} -tartalmú közegben. **C:** A TRPV3 antagonistá IPP és RR előkezelések hatása a karvakrollal (CARV), timollal (THY) és 2-APB-vel kiváltott Ca^{2+} -válaszokra az antagonistá nélkül alkalmazott aktivátorok által kiváltott Ca^{2+} válaszok százalékában. Átlag \pm SEM, $n=6$, * $p<0,05$ az anyag hatása összehasonlítva a gátlószerrel való előkezelést követően.

Ezt követően RNS interferencia segítségével tovább vizsgáltuk a TRPV3 szerepét a nem-specifikus aktivátorok által kiváltott Ca^{2+} -válaszokban. A podocytákat a TRPV3 mRNS-re specifikus siRNS-sel transzfektáltuk, majd Q-PCR-val ellenőriztük a TRPV3 expressziót. A 27. A ábra mutatja, hogy sikeres volt a géncsendesítés, mivel jelentősen csökkent a TRPV3

mRNS expressziós szintje a scrambled kontrollhoz képest. A TRPV3 géncsenedített sejteken megismételtük a korábbi Ca^{2+} -méréseket. A hatásosnak bizonyuló karvakrol, timol és 2-APB a TRPV3 csenedített differenciáltatott podocytákon is ugyanakkora Ca^{2+} -választ váltott ki, mint a kontroll, scrambled RNS-sel transzfektált sejteken (27. B ábra). Ez az eredmény azt bizonyítja, hogy a nem-specifikus TRPV3 aktivátorok növelik a differenciáltatott podocyták intracelluláris Ca^{2+} -szintjét, de ebben a TRPV3-nak csekély szerepe van, tehát valószínűleg az aktivátorok egyéb mechanizmusok révén fejtik ki hatásaikat.



27. ábra: A TRPV3 géncsenedítés nem befolyásolja a TRPV3 agonisták működését differenciáltatott podocytákon

A: A TRPV3 géncsenedítés ellenőrzése Q-PCR technikával. A kontroll esetben transzfekció nem történt, míg scr-RNS a Stealth RNAi Negative Control (Invitrogen) duplaszálú siRNS-sel, siRNS pedig a TRPV3 specifikus, duplaszálú kis interferáló RNS-sel transzfektált csoportot jelöli. Átlag±SEM, n=3. **B:** A TRPV3 géncsenedített podocyták Ca^{2+} válaszainak amplitúdója a scrRNS-sel transzfektált sejteken mért válaszok százalékában kifejezve. Átlag±SEM, n=6.

7 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 (D'Agati és mtsai, 2011). Legjellemzőbb tulajdonsága a glomeruláris hegesedés. A betegség kialakulásának korai szakaszában fokális, azaz gócos, csak néhány glomerulusra terjed ki, illetve szegmentális, a glomerulus egy részét érintő sclerosisról van szó. Azonban a folyamat előrehaladtával, egyre több glomerulus lesz érintett, és teljesen sclerotizál (D'Agati és mtsai, 2004; Sethi és mtsai, 2014). Elektronmikroszkópos vizsgálatok világítottak rá, hogy a FSGS alapvetően a podocyták betegsége, podocytopathiával jellemezhető (D'Agati, 2008). A podocyták lábnyúlványai sérülnek, mely folyamatot „foot process effacement”-nek nevezzük. A lábnyúlványok átalakulása az aktin hálózat átrendeződésének eredménye, megváltozik a podocyták alakja, visszahúzódnak a lábnyúlványok, így megszűnik a kapcsolat a szomszédos podocyták között. A kóros aktin átrendeződés visszafordítható, viszont a már kialakult FSGS állapotban irreverzibilis és progresszív (Shankland, 2006; Wiggins, 2007).

Az, hogy mi okozza a primer FSGS megbetegedéseket, még mindig nem tisztázott minden részletében. Az utóbbi évtizedek genetikai vizsgálatai rávilágítottak arra, hogy a podocyták számos fehérjéjének diszfunkciója szerepet játszik a FSGS kialakulásában (Kestilä és mtsai, 1998; Kaplan és mtsai, 2000; Boute és mtsai, 2000; Winn és mtsai, 2005; Santín és mtsai, 2009). A tranziens receptor potenciál család klasszikus alcsaládjába (TRPC) tartozó TRPC6 fehérje mutációja, a FSGS egy különösen agresszív formájának kialakulásáért felelős (Winn és mtsai, 2005; Reiser és mtsai, 2005; Heeringa és mtsai, 2009; Hofstra és mtsai, 2013). 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 gyulladásozó folyamatok kialakulásában, hogyan befolyásolhatják a TRPC6 működését. Ezt követően a podocytákon eddig még nem vizsgált melegérzékeny TRPV1-4 csatornák kifejeződését és funkcionalitását elemeztük humán podocytákon.

7.1 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 podocytaokban jelenlévő endogén PKC aktivitás gátlása csoportgátlószerek alkalmazásával, a TRPC6 ioncsatorna fokozott működését eredményezte. Kísérleteinkben a cPKC csoportot gátló GÖ6976-ot, a nPKC és cPKC családot is gátló a GF109203X-et alkalmaztuk, illetve megvizsgáltuk a PKC δ izoenzimet gátló rottlerin is. Méréseink eredményei alapján elmondható, hogy az OAG által kiváltott Ca²⁺-szint-emelkedés mindhárom gátlószer alkalmazását követően sokkal nagyobb mértékű volt, mint kontroll esetben, ahol nem történt előkezelés (14. ábra). A PKC rendszer aktiválása PMA-tal viszont jelentősen csökkentette a TRPC6 OAG által kiváltott aktiválhatóságát (15. ábra). Hosszú távú PMA kezelés emellett a TRPC6 expresszióját is nagymértékben csökkentette (17. ábra). Munkánk során arra is kísérletet tettünk, hogy megállapítsuk melyik PKC izoforma vehet részt ebben a folyamatban. Eredményeink azt mutatják, hogy a PKC α , - β_1 , - β_2 és - η fehérje szintje csökken a PMA kezelés hatására, tehát feltehetően ezek az izoformák szabályozhatják a TRPC6-ot (16. ábra).

Ahogy az „Irodalmi áttekintés” fejezetben is bemutattuk, a TRPC6 és a PKC rendszer számos fiziológiás és patológiás folyamatban vesz részt a vese működésében és azon belül a podocytaokban. Azt, hogy a PKC rendszer negatívan szabályozza a TRPC6 ioncsatorna működését, már korábban leírták mesangiális sejteken. Wang és munkatársai kimutatták, hogy a PMA csökkenti a TRPC6 csatorna expresszióját (Wang és mtsai, 2013) tenyésztett mesangiális sejteken. A mi kutatásaink most bebizonyították ennek a szabályzó mechanizmusnak a jelenlétét humán podocytaokon.

Fontos megjegyezni, hogy az általunk leírt mechanizmus nem példa nélküli az irodalomban. Min és munkatársai (2009) kimutatták, hogy 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 Ca²⁺-választ produkáltak TRPC6 agonista alkalmazását követően. Megállapították, hogy a PKC δ felelős ezért a negatív visszacsatolásért, mégpedig azáltal, hogy foszforilálja a TRPC6 448-as pozícióban található szerinjét (Bousquet és mtsai, 2010). A mi rendszerünkben is megvizsgáltuk a PKC δ esetleges szerepét a rottlerin, mint PKC δ antagonistá alkalmazása révén. Kísérleteink azt mutatták, hogy a rottlerin előkezelés jelentősen növelte az OAG által kiváltott Ca²⁺-emelkedést (14. ábra), viszont a PMA kezelés nem volt hatással a PKC δ fehérje kifejeződésére (16. ábra). Ugyanakkor egyes kutatási eredmények azt bizonyítják, hogy a rottlerin más kinázokat is gátolhat (MAP kináz-aktivált

protein kináz-1 β , vagy más néven Rsk-2, illetve p70 S6 kináz), tehát nem tekinthető teljes mértékben PKC δ specifikusnak (Alessi, 1997), ezért nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét sem, hogy a rottlerin TRPC6 aktivációt fokozó hatását, más útvonalon keresztül fejtse ki.

Kísérletes munkánknak jelentős klinikai vonatkozásai is vannak. Az „Irodalmi áttekintés” fejezetben korábban részletesen tárgyaltuk, hogy a TRPC6 csatorna molekuláris és/vagy funkcionális zavara számos genetikai és szerzett vesebetegségben proteinuriával társul (Möller és mtsai, 2007; Mottl és mtsai, 2013). A TRPC6 csatorna bármilyen patológiásan módosult kifejeződése, vagy működése kóros intracelluláris Ca²⁺-szint-változásokhoz vezet, ami kulcs szerepet tölt be a podocytopathiák kialakulásában. Érdekes módon számos esetben ez a jelenség valamely PKC izoforma megváltozott működésével is együttjár. Glomerulonephritiseknél a PKC β_2 emelkedett kifejeződését mutatták ki a proliferáló forma esetében (Ganz és mtsai, 1997), valamint a PKC α és - β up-regulációja figyelhető meg membranózus glomerulonephritisben (Rastaldi, és mtsai, 2006). 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 α , - β_1 , - β_2 és - η izoformák aktivációja fontos szerepet játszhat a TRPC6 csatorna expressziójának és működésének szabályozásában. Valószínűsíthető, hogy patológiás körülmények között megváltozik a podocytaikon kifejeződő PKC enzimek expressziós és/vagy aktivációs mintázata, ami befolyásolja a TRPC6 aktivitását és ezáltal 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.

A vad típusú TRPC6 emelkedett expressziója közös jellemzője a proteinuriával járó vesebetegségeknek (Möller és mtsai, 2007; Saleem, 2013). A TRPC6 csatorna funkcionális kapcsolatban áll a podocyta aktin hálózattal, mely átrendeződik fokozott TRPC6 jelenlét hatására (Faul és mtsai, 2007, Möller és mtsai, 2007). Patológiás körülmények között a TRPC6 csatorna túlműködése következtében emelkedett [Ca²⁺]_{IC} jön létre, melynek hatására kóros kapcsolatok alakulnak ki a podocyta szerkezeti fehérjéi között, sérül a SD, és megváltozik a podocyta lábnyúlványának szerkezete (Möller és mtsai, 2007; Durvasula és Shankland, 2008, Jauregui és mtsai, 2009; Nijenhuis és mtsai, 2011).

Érdekes módon a TRPC5 és TRPC6 csatornáknak ellentétes hatása van a podocyta aktin hálózatának és a sejt motilitásának RhoA és Rac1 általi szabályozására (Tian és mtsai, 2010; Schaldecker és mtsai, 2013; Tian és Ishibe, 2016). Emellett azt is leírták, hogy a vad-

típusú TRPC6 csatornának mechanoszenzitív szerepe van hypotoniás körülmények között FSGS betegségben (Wilson és Dryer, 2014), ami szintén arra utal, hogy az ozmotikus ingereknek és a TRP csatornák által mediál Ca^{2+} -jelnek nagy szerepe van a podocyták funkcióinak szabályozásában.

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-ban is (Szabó és mtsai, 2015; Hoffmann és mtsai, 2004). Progresszív krónikus nephropathiákban, gyulladós folyamatok és fibrózis esetén a renális interstitiumban megemelkedik az Ang II szintje (Ilatovskaya és Staruschenko, 2015), mely kapcsolódik a podocyták membránjában található angiotenzin-1 receptorhoz (AT1R). Az AT1R G-protein kapcsolt receptor lévén aktiválja a $\text{PLC}\beta$ enzimet, mely a PIP_2 -ot hidrolizálja. A keletkező IP_3 részt vesz a Ca^{2+} intracelluláris raktárakból való felszabadításában, és a Ca^{2+} belépés fokozásában, a DAG pedig a PKC rendszert aktiválja. Így az AT1R aktivációja a PKC rendszeren keresztül gátolhatja a TRPC6 működését. Emellett a felszabaduló DAG közvetlenül stimulálja a TRPC6-ot. Ilyen módon a TRPC6 szerepet játszhat az AT1R-hoz kapcsolódó szignalizációs útvonalak finomhangolásában is.

Jól ismert az Ang II és a TRPC6 kapcsolata: bizonyított, hogy az Ang II TRPC6 csatorna aktiváción keresztül albuminuriát okoz (Eckel és mtsai, 2011), illetve az Ang II indukálta apoptózis során változik a TRPC6 csatorna expressziója és működése (Zhang és mtsai, 2009), ez is mutatja a szoros kapcsolatot a mediátor és a csatorna között. Az AT1R aktiválódásakor a TRPC6 által megemelkedett $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{IC}}$ -t érzékeli a Ca^{2+} -függő foszfatáz a kalcineurin, melynek aktivációja a synaptopodin fehérje cathepsin L általi degradációjához vezet (Faul és mtsai, 2008). Mindemellett a kalcineurin defoszforilálja a cNFAT fehérjét, mely a sejtmagba jutva NFAT transzkripciós komplexet alkot más nukleáris elemekkel. Ez a komplex különböző gének transzkripcióját szabályozza, többek között a TRPC6 gén transzkripcióját is serkenti, így növelve a csatorna denzitását a sejtfelszíni membránban, mely megnövekedett Ca^{2+} -influxot jelent, és podocyta károsodáshoz vezet (Schlöndorff és mtsai, 2009). Éppen ezért a proteinuria terápiájában elsőként alkalmazott az AT1R blokkoló (ARB), illetve az Ang II konvertáz enzim (ACE) inhibitora, mely csökkenti az Ang II szintézisét.

Annak felfedezése, hogy az Ang II hatásában szerepet játszhat a TRPC6, egy új lehetőséget jelent a proteinuriás megbetegedések kezelésében az ACE gátlók és az ARB-k mellett. A TRPC6 csatorna, mint támadáspont, ígéretes, hiszen kimutatták, hogy mind a genetikusan öröklődő FSGS-ban, mind a szerzett proteinuriás betegségekben, úgymint,

membranous glomerulopathia, diabéteszes nephropathia vagy hypertenzió által kialakult proteinuriás megbetegedésekben a TRPC6 csatorna túlműködik és/vagy emelkedett az expressziója, ami alapján feltételezhető részvétele ezen betegségek kialakulásában is. Már folynak kutatások a TRPC6 expressziójának változtatására (géncsendesítés), illetve specifikus TRPC6 antagonisták kifejlesztésére. A klinikai alkalmazásban az jelent nehézséget, hogy az anyagokat hogyan juttathatják el specifikusan a podocytákhoz. Hauser és munkatársai 2010-ben már beszámoltak arról, hogy kis interferáló RNS-t eljuttattak specifikusan a podocytákhoz, és sikeresen csendesítették a TRPC6-ot (Hauser és mtsai, 2010). Tang és munkatársai 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 (Tang és mtsai, 2018).

Az elmondható, hogy a proteinuria kialakulásáért egy nagyon komplex, többszintű szignalizációs kaszkád károsodása a felelős, éppen ezért több támadásponton megvalósuló terápia kifejlesztése a cél. Olyan szerek kombinált alkalmazása lenne a leghatásosabb kezelés a proteinuriás megbetegedések esetében, melyek esetleg szinergista módon hatnak egymás működésére. Mivel ennek eléréséhez a szignalizációs kaszkád minél pontosabb feltérképezése vezet, reményeink szerint ehhez a mi kutatásunk is hozzájárult a TRPC6 csatorna szabályozásának feltárása révén. Vizsgálataink szerint a PKC rendszer folyamatosan jelenlévő gátló hatást fejt ki a podocytákon kifejeződő TRPC6 működésére. Kutatásaink legfőbb üzenete, hogy ez a gátló hatás nemcsak molekuláris/expressziós szinten jelenik meg, hanem funkcionálisan is (14.-15. ábra). Emellett azt is megállapítottuk, hogy ez a negatív szabályozás mely PKC izoformák által valósulhat meg.

7.2 A termoszenzitív TRPV1-4 csatornák kifejeződnek humán podocytákon

Munkánk második részében kimutattuk, hogy a differenciáltatott humán podocyták funkcionális formában expresszálják a TRPV család hőérzékeny tagjait, a TRPV1-V4-et (18-20. ábra). mRNS szintű vizsgálataink eredménye alapján a TRPV1 és TRPV4 csatorna dominánsan, míg a TRPV2 és TRPV3 mRNS transzkriptek alacsonyabb szinteken expresszálódnak (18. ábra). Ezen eredményeink összhangban vannak más kutatócsoportok kimutatásaival. 2013-ban Sacco és munkacsoportja által megjelentetett microarray adatok is alátámasztják kimutatásainkat (Da Sacco és mtsai, 2013), illetve izolált primer egér podocytákban is leírták a TRPV1-V4 csatornák jelenlétét (Boerries és mtsai, 2013). 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 (22. ábra). A TRPV1 csatornát korábban kapszaicin-receptornak tartották, mivel a kapszaicin markáns aktivációt eredményezett humán mintákban és rágcsálókban, viszont számos más fajban kapszaicin-inszenzitív TRPV1 csatornát is leírtak (Jordt és Julius, 2002; Gavva és mtsai, 2004). A legújabb kutatások kimutatták a kapszaicin TRPV1-hez való kötődésének molekuláris mechanizmusát, és azonosították azokat a kulcsfontosságú aminosavmaradékokat, amelyek mutációi csökkentették a kapszaicin-érzékenységet (Yang és mtsai, 2015). Továbbá Cantero-Recasens és munkatársai leírták, hogy a humán TRPV1 génben történő egyedi nukleáris polimorfizmusok csökkent kapszaicin-érzékenységet eredményeznek (Cantero-Recasens és mtsai, 2010). Mindemellett a trigeminális és dorzális ganglionban (Lu és mtsai, 2005; Charrua és mtsai, 2008; Mistry és mtsai, 2014), valamint a keratinocytákban (Pecze és mtsai, 2008) azonosítottak egy kapszaicin inszenzitív splice variánst a TRPV1b-t. A TRPV1b koexpresszálódhat TRPV1-gyel, ebben az esetben a TRPV1b domináns negatív hatást fejt ki, így zavart szenved a TRPV1 kapszaicin/vanilloid érzékenysége (Vos és mtsai, 2006). A mi esetünkben mind az érzéketlenséget okozó mutációk, mind a negatív hatást kifejtő TRPV1b jelenléte magyarázat lehet a TRPV1 csatorna aktiváció ellenére elmaradó funkcionalitására. Továbbá egyéb jelátviteli útvonalak jelenléte, melyek deszenzitizációt eredményezhetnek, vagy olyan kölcsönható molekulák, pl.: foszfinozitolok, melyek gátolják a csatorna működését, hasonlóképpen csökkenthetik a TRPV1 kapszaicin/vanilloid érzékenységet (Planells-Cases és mtsai, 2011; Rohacs, 2015). A lehetséges mechanizmusok azonosításához mindenképpen további kutatásokra van szükség.

Ellentétben a TRPV1-gyel a TRPV2 és a TRPV4 csatornáknak nem csak molekuláris jelenlétét, hanem funcionális aktivitását is igazoltuk. A TRPV2 aktivátor CBD mérsékelt Ca^{2+} -választ generált a podocytákon, ami a TRPV2 antagonistá tranelasztal gátolhatóan bizonyult. Ezzel párhuzamosan a CBD által kiváltott Ca^{2+} -influxot a TRPV4 antagonistá HC067047 is csökkentette, így feltételezhetően a CBD szignalizációban a TRPV4 csatorna szerepet játszhat (23. ábra). Ez összhangban áll korábbi, részben munkacsoportunk által publikált adatokkal, mely szerint a CBD a TRPV4-et is aktiválhatja (De Petrochellis és mtsai, 2012; Oláh és mtsai, 2014).

A TRPV4-et vizsgálva, a klasszikus agonista 4α -PDD és a hyperpotens TRPV4 agonista GSK1016790A gyors és robusztus Ca^{2+} -választ váltott ki, mely jelentősen csökkent HC067047 jelenlétében. A GSK1016790A emellett markáns transzmembrán áramokat is indukált, amelyek áram-feszültség karakterisztikája megfelelt a TRPV4 csatorna által mediált

áramoknak. Ezen áramok a HC067047-tel gátolhatóak voltak (24. ábra). Ezek az eredményeink azt mutatják, hogy a molekuláris szintű kimutatásainkkal egybehangzóan funkcionálisan is a TRPV4 lehet a domináns termoszenzitív TRPV csatorna humán podocytyákon.

További eredményeink alapján a TRPV3 csatorna funkcionális kifejeződése human podocytyákon kérdéses. Annak ellenére, hogy molekuláris szintű vizsgálataink igazolták a TRPV3 fehérje jelenlétét, a kvantitatív PCR vizsgálatok 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 a szintetikus 2-APB-t és növényi eredetű anyagokat alkalmaztunk TRPV3 aktivátorként, névszerint karvakrolt, timolt és eugenolt, melyek potensek, de nem tekinthetők TRPV3 specifikusnak, viszont az irodalomban általánosan alkalmazzák ezeket az anyagokat a TRPV3 csatornaaktivitás vizsgálataiban (Xu és mtsai, 2006; Vriens és mtsai, 2008). Ugyanez elmondható a szintetikus 2-APB-ről is (Chung és mtsai, 2004; Vriens és mtsai, 2009). Kísérleteinkben az említett agonisták mindegyike jelentős $[Ca^{2+}]_{IC}$ -emelkedést váltott ki, melynek forrása főleg az extracelluláris tér volt, abban az esetben, ha az anyagokat 1mM koncentráció alatt alkalmaztuk (25. ábra), de csak a 2-APB hatása szaturálódott, és mutatott szigmoid dózis-hatás összefüggést (26. ábra). Kísérleteinkben a 2-APB EC_{50} értéke (~500 μ M) magasabb volt, mint a korábbi elektrofiziológiai vizsgálatokban meghatározott érték (~42 μ M; Chung és mtsai, 2004). Emellett az általános TRP gátló ruténium vörös (Alexander és mtsai, 2015) csak részben gátolta az agonisták hatását, illetve az endogén TRPV3 inhibitor IPP (Bang és mtsai, 2011) csak a 2-APB hatását gátolta, és azt is csak részlegesen (26. ábra). Ezzel ellentétben a TRPV3 géncsendesítése nem befolyásolta az agonisták hatását (27. ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a TRPV3 agonistaként általunk alkalmazott anyagoknak feltehetően jelentős off-target hatása van, melyek részben más TRP csatornákat is magukba foglalhatnak, és egyéb folyamatok is részt vehetnek a sejtek Ca^{2+} -szintjének emelésében, mint például IP_3 -receptorok, ryanodin receptorok, a szarkoplazmatikus reticulum Ca^{2+} -ATPáza, vagy a raktárak által vezérelt Ca^{2+} -belépésben részt vevő mechanizmusok (Chung és mtsai, 2004; Xu és mtsai, 2006; Sárközi és mtsai, 2007; Vriens és mtsai, 2008, 2009; Hsu és mtsai, 2011; Liang és Lu, 2012). Farmakológiai eredményeink alapján a TRPV3 csatorna funkcionalitása humán podocytyákon kérdéses, tisztázásához további vizsgálatok szükségesek. Ehhez specifikusabb ligandokra lenne szükség, így lehetőség nyílna a TRPV3 pontos szerepének meghatározására a növényi anyagok által kifejtett hatásokban.

A meleg hőmérsékletre érzékeny és mechanoszenzitív TRPV csatornákat korábban már vizsgálták a vesében és az urináris traktus alsó részében (Hayes és mtsai, 2000; Strotmann és mtsai, 2000; Kassmann és mtsai, 2013). Jóllehet a TRPV1 szerepe bizonyított az urináris traktus funkcióinak szabályozásában, az urothelialis sejtekben való expressziója továbbra is vitatott (Franken és mtsai, 2014). A TRPV4 az urináris traktus nem-neuronális sejtjeiben nagy számban expresszálódik. A vesében a TRPV4-et a vízre impermeábilis nephron szegmensekben írták le, a vékony és vastag leszállósárban, a disztális kanyarult csatornában és a gyűjtőcsatornában (Tian és mtsai, 2004). Emellett mind a TRPV1, mind a TRPV4 kifejeződése és aktivitása bizonyított a vese érrendszerének endothel sejtjeiben (Chen és mtsai, 2015).

Annak ellenére, hogy a melegszenzitív TRPV-k jelenléte igazolt a vesében a tubuláris epithel különböző szegmenseiben található sejteken, funkciójukról 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 (Liedtke és mtsai, 2000; Strotmann és mtsai, 2000; Muraki és mtsai, 2003; Liu és mtsai, 2007). Az ozmoszenzoros funkciójukat nemcsak neuronális, hanem nem-neuronális sejteken és az urogenitális traktusban is leírták. Birder és munkatársai (2002) kimutatták, hogy hypotonia hatására a hólyagfal feszülésének érzékeléséhez elengedhetetlen a TRPV1, melynek aktivációja ATP felszabadulást eredményez. A TRPV1-nek azonban nemcsak a hypotonia, hanem a hypertonia esetében is szerepe lehet (Ciura és mtsai, 2011; Prager-Khoutorsky és mtsai, 2014). A vese tubulusrendszerében a tubuláris áramlás és az ozmolaritás érzékelésében nagy jelentősége van a TRPV4 csatornának (Mamenko és mtsai, 2015). Ezek az irodalmi adatok arra engednek következtetni, hogy a TRPV csatornák mediálják az ozmotikus ingereket a podocyták felé, és szerepet játszhatnak a filtrációs barrier ozmotikus inger hatására kialakuló változásaiban.

Az ozmotikus érzékelésen túl a TRPV4 a légutak epithéliumában az L-típusú Ca^{2+} -csatornák aktivációja révén fokozza az epitheliális barrierfunkciókat (Sidhaye és mtsai, 2008). A bőr epidermális keratinocytáiban, a funkcionálisan aktív TRPV4 interakcióban áll adhéziós fehérjékkel és az aktin hálózattal, erősítve a sejt-sejt kapcsolatokat és a barrier funkciókat. Emellett a TRPV4 aktivációja elősegíti a tight junction kapcsolat kialakulását és a barrier felépülését (Sokabe és mtsai, 2010; Kida és mtsai, 2012; Akazawa és mtsai, 2013). A hólyag urotheliumában és a vese gyűjtőcsatornáiban is leírták, hogy a TRPV4 adherens fehérjékkel asszociálódik, mégpedig α -kateninnel, mely az aktin citoskeletonnal kapcsolódik (Janssen és

mtsai, 2016). Ezek az adatok azt sugallják, hogy a TRPV4 részt vehet a podocyták 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.

8 ÖSSZEFOGLALÁS

Jelen munkánk során egyes TRP csatornák kifejeződését, funkcionalitását és szabályozását vizsgáltuk humán podocyteken.

Kimutattuk, hogy humán podocyteken a TRPC6 csatornát a PKC rendszer endogén aktivitása gátolja. Kísérleteinkben a PKC rendszer általános aktivátora, a PMA jelentősen csökkentette a TRPC6 csatorna aktivátor OAG által kiváltható Ca^{2+} -jelet. Hosszú távú PMA kezelés a TRPC6 fehérje down-regulációját eredményezte időfüggő módon. Emellett a PKC rendszer exogén gátlása csoportgátlószerek (GÖ6976, GF109203X, illetve a PKCC δ izoenzimet gátló rottlerin) alkalmazásával növelte a TRPC6 csatorna aktivitását. Kísérleteinkben arra a kérdésre is kerestük a választ, hogy ebben a negatív szabályozásban melyik PKC izoenzim vehet részt. Kimutattuk, hogy a PKC α , - β_1 , - β_2 és - η fehérjék szintje csökken a PMA kezelés hatására, tehát feltehetően ezek az izoformák szabályozhatják a TRPC6-ot.

Munkánk második felében igazoltuk, hogy differenciáltotott humán podocyteken mind mRNS, mind fehérje szinten kifejeződnek a melegérzékeny TRPV1-V4 csatornák. Molekuláris szintű kimutatásaink eredményei szerint a TRPV1 és TRPV4 dominánsan, míg a TRPV2 és TRPV3 alacsonyabb szinteken expresszálódnak podocyteken. Vizsgálva a TRPV csatornák funkcionalitását, megállapítottuk, hogy a TRPV1 csatorna a magas szintű mRNS jelenlét ellenére a specifikus agonista kapszaicin és reziniferatoxin (RTX) kezelés hatására sem funkcionál. Ezzel szemben a CBD kezelés hatására a podocytek mérsékelt Ca^{2+} -válaszokat mutattak, mely a TRPV2 antagonistá trilasztal és a TRPV4 inhibitor HC067047-tel is gátolhatóan bizonyult. A TRPV4 agonisták, mind a GSK1016790A, mind a 4 α -PDD, gyors és robosztus Ca^{2+} -választ generáltak. A molekuláris szintű kimutatások és a funkcionális mérések arra utalnak, hogy a TRPV4 lehet a domináns termoszenzitív TRPV csatorna humán podocyteken. A TRPV3 esetében, specifikus aktivátorok és gátlószerek hiányában, növényi eredetű agonisták és a szintetikus 2-APB alkalmazásával kimutattuk, hogy a TRPV3 csatorna aktivátorai 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 által kiváltott Ca^{2+} -válaszokat, 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 podocyták működésének szabályozásában, melyek egyúttal új potenciális farmakológiai célpontok lehetnek egyes podocytopathiák kezelésében.

A dolgozatban bemutatott új tudományos eredmények:

- a humán podocytákon expresszáldó TRPC6 ioncsatornát negatívan szabályozza a PKC rendszer
- a PKC α , - β_1 , - β_2 és - η 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

9 SUMMARY

In our study, we investigated the expression, functionality and regulation of some TRP channels on human podocytes. We demonstrated that the endogenous activity of the PKC system blocked TRPC6. In our experiments, the PKC agonist PMA markedly suppressed the Ca^{2+} -elevation which was induced by the TRPC6 activator OAG. Long-term treatment with PMA also decreased the expression of TRPC6. In addition, exogenous inhibition of the PKC system with blockers of PKC subfamilies enhanced TRPC6 activity. We also showed that expression level of PKC α , - β_1 , - β_2 and - η proteins were down-regulated by PMA treatment, so presumably, these isoforms can regulate TRPC6.

In the second part of our study, we provided the first evidence for the functional expression of the heat-sensitive TRPV1-4 on human podocytes. TRPV1 and TRPV4 are the dominantly expressed TRPV channels but TRPV2 and TRPV3 were also detected at lower levels. TRPV1 did not show activity after treatment with the specific TRPV1 activators capsaicin or RTX. In contrast, CBD induced moderate calcium influx which was inhibited by the TRPV2 antagonist tranilast, and the TRPV4 antagonist HC067047. Furthermore, investigating TRPV4, the classical agonist 4 α -PDD and the hyperpotent activator GSK1016790A generated rapid and robust Ca^{2+} -response. TRPV4 channels are the dominantly expressed thermosensitive TRPV channels in human podocytes. Therefore, TRPV4 can be the dominantly expressed thermosensitive TRPV in human podocytes. In case of TRPV3, the botanical compounds and also 2-APB induced marked Ca^{2+} -elevation. This effect with was blocked by the TRPV3 antagonist IPP or only partially blocked by the general PKC blocker ruthenium red. In contrast, RNAi mediated silencing of TRPV3 did not influence the effect of the agonists. These results suggest that the TRPV3 agonist may have several off-target effects.

Our findings confirmed that TRP channels and its regulatory systems play a crucial role in the regulation of human podocytes functions.

10 IRODALOMJEGYZÉK

- Abrahamson DR, Hudson BG, Stroganova L, Borza DB, John PL. (2009): Cellular Origins of Type IV Collagen Networks in Developing Glomeruli. *J Am Soc Nephrol.* 20(7), 1471-9.
- Akazawa Y, Yuki T, Yoshida H, Sugiyama Y, Inoue S. (2013): Activation of TRPV4 strengthens the tight-junction barrier in human epidermal keratinocytes. *Skin Pharmacol Physiol.* 26(1), 15-21.
- Alessi DR. (1997): The protein kinase C inhibitors Ro 318220 and GF 109203X are equally potent inhibitors of MAPKAP kinase-1beta (Rsk-2) and p70 S6 kinase. *FEBS Lett.* 402(2-3), 121-3.
- Alexander SP, Catterall WA, Kelly E, Marrion N, Peters JA, Benson HE, Faccenda E, Pawson AJ, Sharman JL, Southan C, Davies JA. (2015): The Concise Guide to PHARMACOLOGY 2015/16: Voltage-gated ion channels. *Br J Pharmacol.* 172(24), 5904-41.
- Azumaya CM, Sierra-Valdez F, Cordero-Morales JF, Nakagawa T. (2018): Cryo-EM structure of the cytoplasmic domain of murine transient receptor potential cationchannel subfamily C member 6 (TRPC6). *J Biol Chem.* 293(26), 10381-10391.
- Bang S, Yoo S, Yang TJ, Cho H, Hwang SW. (2011): Isopentenyl pyrophosphate is a novel antinociceptive substance that inhibits TRPV3 and TRPA1 ion channels. *Pain.* 152(5), 1156-64.
- Barisoni L, Kriz W, Mundel P, D'Agati V. (1999): The dysregulated podocyte phenotype: a novel concept in the pathogenesis of collapsing idiopathic focal segmental glomerulosclerosis and HIV-associated nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 10(1), 51-61.
- Beech DJ, Muraki K, Flemming R. (2004): Non-selective cationic channels of smooth muscle and the mammalian homologues of Drosophila TRP. *J Physiol.* 559(Pt 3), 685-706.
- Benoit G, Machuca E, Nevo F, Gribouval O, Lepage D, Antignac C. (2010): Analysis of recessive CD2AP and ACTN4 mutations in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 25(3), 445-51.
- Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, Wang E, Ruiz G, De Groat WC, Apodaca G, Watkins S, Caterina MJ. (2002): Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci.* 5(9), 856-60.
- Boerries M, Grahammer F, Eiselein S, Buck M, Meyer C, Goedel M, Bechtel W, Zschiedrich S, Pfeifer D, Laloë D, Arrondel C, Gonçalves S, Krüger M, Harvey SJ, Busch H, Dengjel J, Huber TB. (2013): Molecular fingerprinting of the podocyte reveals novel gene and protein regulatory networks. *Kidney Int.* 83(6), 1052-64.
- Bousquet SM, Monet M, Boulay G. (2010): Protein kinase C-dependent phosphorylation of transient receptor potential canonical 6 (TRPC6) on serine 448 causes channel inhibition. *J Biol Chem.* 285(52), 40534-43.

- Boute N, Gribouval O, Roselli S, Benessy F, Lee H, Fuchshuber A, Dahan K, Gubler MC, Niaudet P, Antignac C. (2000): NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome. *Nat Genet.* 24(4), 349-54.
- Byron A, Randles MJ, Humphries JD, Mironov A, Hamidi H, Harris S, Mathieson PW, Saleem MA, Satchell SC, Zent R, Humphries MJ, Lennon R. (2014): Glomerular cell cross-talk influences composition and assembly of extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol.* 25(5), 953-66.
- Cantero-Recasens G, Gonzalez JR, Fandos C, Duran-Tauleria E, Smit LA, Kauffmann F, Antó JM, Valverde MA. (2010): Loss of function of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) genetic variant is associated with lower risk of active childhood asthma. *J Biol Chem.* 285(36), 27532-5.
- Caterina MJ, Leffler A, Malmberg AB, Martin WJ, Trafton J, Petersen-Zeitz KR, Koltzenburg M, Basbaum AI, Julius D. (2000): Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science.* 288(5464), 306-13.
- Charrua A, Reguenga C, Paule CC, Nagy I, Cruz F, Avelino A. (2008): Cystitis is associated with TRPV1b-downregulation in rat dorsal root ganglia. *Neuroreport.* 19(15), 1469-72.
- Chen S, He FF, Wang H, Fang Z, Shao N, Tian XJ, Liu JS, Zhu ZH, Wang YM, Wang S, Huang K, Zhang C. (2011): Calcium entry via TRPC6 mediates albumin overload-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in podocytes. *Cell Calcium.* 50(6), 523-9.
- Chen L, Kaßmann M, Sendeski M, Tsvetkov D, Marko L, Michalick L, Riehle M, Liedtke WB, Kuebler WM, Harteneck C, Tepel M, Patzak A, Gollasch M. (2015): Functional transient receptor potential vanilloid 1 and transient receptor potential vanilloid 4 channels along different segments of the renal vasculature. *Acta Physiol (Oxf).* 213(2), 481-91.
- Ciura S, Liedtke W, Bourque CW. (2011): Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: a mechanical process involving TRPV1 but not TRPV4. *J Neurosci.* 31(41), 14669-76.
- Chung MK, Lee H, Mizuno A, Suzuki M, Caterina MJ. (2004): 2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3. *J Neurosci.* 24(22), 5177-82.
- Clapham DE, Runnels LW, Strübing C. (2001): The TRP ion channel family. *Nat Rev Neurosci.* 2(6), 387-96.
- Clapham DE. (2003): TRP channels as cellular sensors. *Nature.* 426(6966), 517-24.
- Cohen DM. (2005): TRPV4 and the mammalian kidney. *Pflugers Arch.* 451(1), 168-75.
- Cosens DJ, Manning A. (1969): Abnormal electroretinogram from a Drosophila mutant. *Nature.* 224(5216), 285-7.

- D'Agati VD, Fogo AB, Bruijn JA, Jennette JC. (2004): Pathologic classification of focal segmental glomerulosclerosis: a working proposal. *Am J Kidney Dis.* 43(2), 368-82.
- D'Agati VD. (2008): The spectrum of focal segmental glomerulosclerosis: new insights. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 17(3), 271-81.
- D'Agati VD, Kaskel FJ, Falk RJ. (2011): Focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med.* 365(25), 2398-411.
- Dane MJ, van den Berg BM, Avramut MC, Faas FG, van der Vlag J, Rops AL, Ravelli RB, Koster BJ, van Zonneveld AJ, Vink H, Rabelink TJ. (2013): Glomerular endothelial surface layer acts as a barrier against albumin filtration. *Am J Pathol.* 182(5), 1532-40.
- Da Sacco S, Lemley KV, Sedrakyan S, Zanusso I, Petrosyan A, Peti-Peterdi J, Burford J, De Filippo RE, Perin L. (2013): A novel source of cultured podocytes. *PLoS One.* 8(12), e81812.
- Daskalakis N, Winn MP. (2006): Focal and segmental glomerulosclerosis. *Cell Mol Life Sci.* 63(21), 2506-11.
- De Petrocellis L, Orlando P, Moriello AS, Aviello G, Stott C, Izzo AA, Di Marzo V. (2012): Cannabinoid actions at TRPV channels: effects on TRPV3 and TRPV4 and their potential relevance to gastrointestinal inflammation. *Acta Physiol (Oxf).* 204(2), 255-66.
- Dietrich A, Mederos y Schnitzler M, Emmel J, Kalwa H, Hofmann T, Gudermann T. (2003): N-linked protein glycosylation is a major determinant for basal TRPC3 and TRPC6 channel activity. *J Biol Chem.* 278(48), 47842-52.
- Dietrich A, Chubanov V, Gudermann T. (2010): Renal TRP channels. *J Am Soc Nephrol.* 21(5), 736-44.
- Dimke H, Hoenderop JG, Bindels RJ. (2011): Molecular basis of epithelial Ca²⁺ and Mg²⁺ transport: insights from the TRP channel family. *J Physiol.* 589(Pt 7), 1535-42.
- Dryer SE, Reiser J. (2010): TRPC6 channels and their binding partners in podocytes: role in glomerular filtration and pathophysiology. *Am J Physiol Renal Physiol.* 299(4), F689-701.
- Du J, Sours-Brothers S, Coleman R, Ding M, Graham S, Kong DH, Ma R. (2007): Canonical transient receptor potential 1 channel is involved in contractile function of glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 18(5), 1437-45.
- Durvasula RV, Shankland SJ. (2008): Activation of a local renin angiotensin system in podocytes by glucose. *Am J Physiol Renal Physiol.* 294(4), F830-9.
- Eckel J, Lavin PJ, Finch EA, Mukerji N, Burch J, Gbadegesin R, Wu G, Bowling B, Byrd A, Hall G, Sparks M, Zhang ZS, Homstad A, Barisoni L, Birbaumer L, Rosenberg P, Winn MP. (2011): TRPC6 enhances angiotensin II-induced albuminuria. *J Am Soc Nephrol.* 22(3), :526-35.

- Fan C, Choi W, Sun W, Du J, Lu W. (2018): Structure of the human lipid-gated cation channel TRPC3. *Elife*. 7. pii: e36852.
- Farquhar MG. (1975): Editorial: The primary glomerular filtration barrier--basement membrane or epithelial slits? *Kidney Int*. 8(4), 197-211.
- Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, Kim K, Mundel P. (2007): Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol*. 17(9), 428-37.
- Faul C, Donnelly M, Merscher-Gomez S, Chang YH, Franz S, Delfgaauw J, Chang JM, Choi HY, Campbell KN, Kim K, Reiser J, Mundel P. (2008): The actin cytoskeleton of kidney podocytes is a direct target of the antiproteinuric effect of cyclosporine A. *Nat Med*. 14(9), 931-8.
- Franken J, Uvin P, De Ridder D, Voets T. (2014): TRP channels in lower urinary tract dysfunction. *Br J Pharmacol*. 171(10), 2537-51.
- Ganz MB, Abu-Nader R, Saxena R, Grond J. (1997): Protein kinase C beta II isoform is up-regulated in human proliferative glomerulonephritis. *Exp Nephrol*. 5(3), 225-32.
- Gavva NR, Klionsky L, Qu Y, Shi L, Tamir R, Edenson S, Zhang TJ, Viswanadhan VN, Toth A, Pearce LV, Vanderah TW, Porreca F, Blumberg PM, Lile J, Sun Y, Wild K, Louis JC, Treanor JJ. (2004): Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem*. 279(19), 20283-95.
- Gees M, Colsoul B, Nilius B. (2010): The Role of Transient Receptor Potential Cation Channels in Ca²⁺ Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2(10), a003962.
- Géczy T, Oláh A, Tóth BI, Czifra G, Szöllösi AG, Szabó T, Zouboulis CC, Paus R, Bíró T. (2012): Protein kinase C isoforms have differential roles in the regulation of human sebocyte biology. *J Invest Dermatol*. 132(8), 1988-97.
- Goel M, Sinkins WG, Zuo CD, Hopfer U, Schilling WP. (2007): Vasopressin-induced membrane trafficking of TRPC3 and AQP2 channels in cells of the rat renal collecting duct. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293(5), F1476-88.
- Graham S, Gorin Y, Abboud HE, Ding M, Lee DY, Shi H, Ding Y, Ma R. (2011): Abundance of TRPC6 protein in glomerular mesangial cells is decreased by ROS and PKC in diabetes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 301(2), C304-15.
- Grantham JJ. (2008): Clinical practice. Autosomal dominant polycystic kidney disease. *N Engl J Med*. 359(14), 1477-85.
- Grimm C, Kraft R, Sauerbruch S, Schultz G, Harteneck C. (2003): Molecular and functional characterization of the melastatin-related cation channel TRPM3. *J Biol Chem*. 278(24), 21493-501.

- Grynkiewicz, G., Poenie, M. and Tsien, R. Y. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6): 3440-3450.
- Guo A, Vulchanova L, Wang J, Li X, Elde R. (1999): Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites. *Eur J Neurosci.* 11(3), 946-58.
- Haas M, Spargo BH, Coventry S. (1995): Increasing incidence of focal-segmental glomerulosclerosis among adult nephropathies: a 20-year renal biopsy study. *Am J Kidney Dis.* 26(5), 740-50.
- Harvey SJ, Zheng K, Sado Y, Naito I, Ninomiya Y, Jacobs RM, Hudson BG, Thorner PS. (1998): Role of distinct type IV collagen networks in glomerular development and function. *Kidney Int.* 54(6), 1857-66.
- Harvey SJ, Jarad G, Cunningham J, Rops AL, van der Vlag J, Berden JH, Moeller MJ, Holzman LB, Burgess RW, Miner JH. (2007): Disruption of glomerular basement membrane charge through podocyte-specific mutation of agrin does not alter glomerular permselectivity. *Am J Pathol.* 171(1), 139-52.
- Hauser PV, Pippin JW, Kaiser C, Krofft RD, Brinkkoetter PT, Hudkins KL, Kerjaschki D, Reiser J, Alpers CE, Shankland SJ. (2010): Novel siRNA delivery system to target podocytes in vivo. *PLoS One.* 5(3), e9463.
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terrett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB. (2000): Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain.* 88(2), 205-15.
- Heeringa SF, Möller CC, Du J, Yue L, Hinkes B, Chernin G, Vlangos CN, Hoyer PF, Reiser J, Hildebrandt F. (2009): A novel TRPC6 mutation that causes childhood FSGS. *PLoS One.* 4(11), e7771.
- Hironaka K, Makino H, Yamasaki Y, Ota Z. (1993): Pores in the glomerular basement membrane revealed by ultrahigh-resolution scanning electron microscopy. *Nephron.* 64(4), 647-9.
- Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ. (2005): Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev.* 85(1), 373-422.
- Hoffmann S, Podlich D, Hähnel B, Kriz W, Gretz N. (2004): Angiotensin II type 1 receptor overexpression in podocytes induces glomerulosclerosis in transgenic rats. *J Am Soc Nephrol.* 15(6), 1475-87.
- Hofmann T, Obukhov AG, Schaefer M, Harteneck C, Gudermann T, Schultz G. (1999): Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature.* 397(6716), 259-63.
- Hofstra JM, Lainez S, van Kuijk WH, Schoots J, Baltissen MP, Hoefsloot LH, Knoers NV, Berden JH, Bindels RJ, van der Vlag J, Hoenderop JG, Wetzels JF, Nijenhuis T. (2013): New TRPC6 gain-of-function mutation in a non-consanguineous Dutch family with late-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Nephrol Dial Transplant.* 28(7), 1830-8.

- Hsu YJ, Hoenderop JG, Bindels RJ. (2007): TRP channels in kidney disease. *Biochim Biophys Acta.* 1772(8), 928-36.
- Hsu SS, Lin KL, Chou CT, Chiang AJ, Liang WZ, Chang HT, Tsai JY, Liao WC, Huang FD, Huang JK, Chen IS, Liu SI, Kuo CC, Jan CR. (2011): Effect of thymol on Ca²⁺ homeostasis and viability in human glioblastoma cells. *Eur J Pharmacol.* 670(1), 85-91.
- Huber TB, Schermer B, Benzing T. (2007): Podocin organizes ion channel-lipid supercomplexes: implications for mechanosensation at the slit diaphragm. *Nephron Exp Nephrol.* 106(2), e27-31.
- Ilatovskaya DV, Staruschenko A. (2015): TRPC6 channel as an emerging determinant of the podocyte injury susceptibility in kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* 309(5), F393-7.
- Janssen DA, Jansen CJ, Hafmans TG, Verhaegh GW, Hoenderop JG, Heesakkers JP, Schalken JA. (2016): TRPV4 channels in the human urogenital tract play a role in cell junction formation and epithelial barrier. *Acta Physiol (Oxf).* 218(1), 38-48.
- Jarad G, Miner JH. (2009): Update on the glomerular filtration barrier. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 18(3), 226-32.
- Jauregui A, Mintz DH, Mundel P, Fornoni A. (2009): Role of altered insulin signaling pathways in the pathogenesis of podocyte malfunction and microalbuminuria. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 18(6), 539-45.
- Jeansson M, Haraldsson B. (2006): Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol.* 290(1), F111-6.
- Jeansson M, Björck K, Tenstad O, Haraldsson B. (2009): Adriamycin alters glomerular endothelium to induce proteinuria. *J Am Soc Nephrol.* 20(1), 114-22.
- Jiang L, Ding J, Tsai H, Li L, Feng Q, Miao J, Fan Q. (2011): Over-expressing transient receptor potential cation channel 6 in podocytes induces cytoskeleton rearrangement through increases of intracellular Ca²⁺ and RhoA activation. *Exp Biol Med (Maywood).* 236(2), 184-93.
- Jordt SE, Julius D. (2002): Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell.* 108(3), 421-30.
- Kalluri R. (2006): Proteinuria with and without renal glomerular podocyte effacement. *J Am Soc Nephrol.* 17(9), 2383-9.
- Kanda S, Harita Y, Shibagaki Y, Sekine T, Igarashi T, Inoue T, Hattori S. (2011): Tyrosine phosphorylation-dependent activation of TRPC6 regulated by PLC- γ 1 and nephrin: effect of mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis. *Mol Biol Cell.* 22(11), 1824-1835.

- Kanwar YS, Linker A, Farquhar MG. (1980): Increased permeability of the glomerular basement membrane to ferritin after removal of glycosaminoglycans (heparan sulfate) by enzyme digestion. *J Cell Biol.* 86(2), 688-93.
- Kaplan JM, Kim SH, North KN, Rennke H, Correia LA, Tong HQ, Mathis BJ, Rodríguez-Pérez JC, Allen PG, Beggs AH, Pollak MR. (2000): Mutations in ACTN4, encoding alpha-actinin-4, cause familial focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Genet.* 24(3), 251-6.
- Kassmann M, Harteneck C, Zhu Z, Nürnberg B, Tepel M, Gollasch M. (2013): Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), TRPV4, and the kidney. *Acta Physiol (Oxf).* 207(3), 546-64.
- Kerti A, Csohány R, Szabó A, Arkossy O, Sallay P, Morinière V, Vega-Warner V, Nyíró G, Lakatos O, Szabó T, Lipska BS, Schaefer F, Antignac C, Reusz G, Tulassay T, Tory K. (2013): NPHS2 p.V290M mutation in late-onset steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 28(5), 751-7.
- Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, Lamerdin J, McCready P, Putaala H, Ruotsalainen V, Morita T, Nissinen M, Herva R, Kashtan CE, Peltonen L, Holmberg C, Olsen A, Tryggvason K. (1998): Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell.* 1(4), 575-82.
- Kida N, Sokabe T, Kashio M, Haruna K, Mizuno Y, Suga Y, Nishikawa K, Kanamaru A, Hongo M, Oba A, Tominaga M. (2012): Importance of transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) in epidermal barrier function in human skin keratinocytes. *Pflugers Arch.* 463(5), 715-25.
- Kriz W, Hosser H, Hähnel B, Simons JL, Provoost AP. (1998): Development of vascular pole-associated glomerulosclerosis in the Fawn-hooded rat. *J Am Soc Nephrol.* 9(3), 381-96.
- Kriz W, Hartmann I, Hosser H, Hähnel B, Kränzlin B, Provoost A, Gretz N. (2001): Tracer studies in the rat demonstrate misdirected filtration and peritubular filtrate spreading in nephrons with segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 12(3), 496-506.
- Kriz W, LeHir M. (2005): Pathways to nephron loss starting from glomerular diseases-insights from animal models. *Kidney Int.* 67(2), 404-19.
- Kubosawa H, Kondo Y. (1985): Ultrastructural organization of the glomerular basement membrane as revealed by a deep-etch replica method. *Cell Tissue Res.* 242(1), 33-9.
- Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. (2013): The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat Rev Immunol.* 13(10), 738-53.
- Le Hir M, Keller C, Eschmann V, Hähnel B, Hosser H, Kriz W. (2001): Podocyte bridges between the tuft and Bowman's capsule: an early event in experimental crescentic glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol.* 12(10), 2060-71.

- Lennon R, Byron A, Humphries JD, Randles MJ, Carisey A, Murphy S, Knight D, Brechley PE, Zent R, Humphries MJ. (2014): Global analysis reveals the complexity of the human glomerular extracellular matrix. *J Am Soc Nephrol.* 25(5), 939-51.
- Levick JR, Smaje LH. (1987): An analysis of the permeability of a fenestra. *Microvasc Res.* 33(2), 233-56.
- Li J, Gobe G. (2006): Protein kinase C activation and its role in kidney disease. *Nephrology (Carlton).* 11(5), 428-34.
- Li J, Zhang X, Song X, Liu R, Zhang J, Li Z. (2019): The structure of TRPC ion channels. *Cell Calcium.* 80, 25-28.
- Liang WZ, Lu CH. (2012): Carvacrol-induced [Ca²⁺]_i rise and apoptosis in human glioblastoma cells. *Life Sci.* 90(17-18), 703-11.
- Liedtke W, Choe Y, Martí-Renom MA, Bell AM, Denis CS, Sali A, Hudspeth AJ, Friedman JM, Heller S. (2000): Vanilloid receptor-related osmotically activated channel (VR-OAC), a candidate vertebrate osmoreceptor. *Cell.* 103(3), 525-35.
- Liedtke W, Friedman JM. (2003): Abnormal osmotic regulation in *trpv4*^{-/-} mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(23), 13698-703.
- Lipp P, Reither G. (2011): Protein Kinase C: The “Masters” of Calcium and Lipid. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(7), a004556.
- Liu L, Chen L, Liedtke W, Simon SA. (2007): Changes in osmolality sensitize the response to capsaicin in trigeminal sensory neurons. *J Neurophysiol.* 97(3), 2001-15.
- Lu G, Henderson D, Liu L, Reinhart PH, Simon SA. (2005): TRPV1b, a functional human vanilloid receptor splice variant. *Mol Pharmacol.* 67(4), 1119-27.
- Mamenko M, Zaika O, Boukelmoune N, O'Neil RG, Pochynyuk O. (2014): Deciphering physiological role of the mechanosensitive TRPV4 channel in the distal nephron. *Am J Physiol Renal Physiol.* 308(4), F275-86.
- Matejas V, Hinkes B, Alkandari F, Al-Gazali L, Annexstad E, Aytac MB, Barrow M, Bláhová K, Bockenhauer D, Cheong HI, Maruniak-Chudek I, Cochat P, Dötsch J, Gajjar P, Hennekam RC, Janssen F, Kagan M, Kariminejad A, Kemper MJ, Koenig J, Kogan J, Kroes HY, Kuwertz-Bröking E, Lewanda AF, Medeira A, Muscheites J, Niaudet P, Pierson M, Saggar A, Seaver L, Suri M, Tsygin A, Wühl E, Zurowska A, Uebe S, Hildebrandt F, Antignac C, Zenker M. (2010): Mutations in the human laminin beta2 (LAMB2) gene and the associated phenotypic spectrum. *Hum Mutat.* 31(9), 992-1002.
- Matovinović MS. (2009): 3. Podocyte Injury in Glomerular Diseases. *EJIFCC.* 20(1), 21-7.

- Meier M, Menne J, Park JK, Holtz M, Gueler F, Kirsch T, Schiffer M, Mengel M, Lindschau C, Leitges M, Haller H. (2007): *J Am Soc Nephrol.* 18(4), 1190-8.
- Min MY, Shih PY, Wu YW, Lu HW, Lee ML, Yang HW. (2009): Neurokinin 1 receptor activates transient receptor potential-like currents in noradrenergic A7 neurons in rats. *Mol Cell Neurosci.* 42(1), 56-65.
- Miner JH, Sanes JR. (1994): Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches. *J Cell Biol.* 127(3), 879-91.
- Minke B. (2006): TRP channels and Ca²⁺ signaling. *Cell Calcium.* 40(3), 261-75.
- Mistry S, Paule CC, Varga A, Photiou A, Jenes A, Avelino A, Buluwela L, Nagy I. (2014): Prolonged exposure to bradykinin and prostaglandin E2 increases TRPV1 mRNA but does not alter TRPV1 and TRPV1b protein expression in cultured rat primary sensory neurons. *Neurosci Lett.* 564, 89-93.
- Montell C, Rubin GM. (1989): Molecular characterization of the *Drosophila* trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron.* 2(4), 1313-23.
- Montell C. (2005): The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE.* 2005(272), re3.
- Mottl AK, Lu M, Fine CA, Weck KE. (2013): A novel TRPC6 mutation in a family with podocytopathy and clinical variability. *BMC Nephrol.* 14, 104.
- Möller CC, Wei C, Altintas MM, Li J, Greka A, Ohse T, Pippin JW, Rastaldi MP, Wawersik S, Schiavi S, Henger A, Kretzler M, Shankland SJ, Reiser J. (2007): Induction of TRPC6 channel in acquired forms of proteinuric kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 18(1), 29-36.
- Mukerji N, Damodaran TV, Winn MP. (2007): TRPC6 and FSGS: the latest TRP channelopathy. *Biochim Biophys Acta.* 1772(8), 859-68.
- Mundel P, Reiser J, Kriz W. (1997): Induction of differentiation in cultured rat and human podocytes. *J Am Soc Nephrol.* 8(5), 697-705.
- Mundel P, Shankland SJ. (2002): Podocyte biology and response to injury. *J Am Soc Nephrol.* 13(12), 3005-15.
- Muraki K, Iwata Y, Katanosaka Y, Ito T, Ohya S, Shigekawa M, Imaizumi Y. (2003): TRPV2 is a component of osmotically sensitive cation channels in murine aortic myocytes. *Circ Res.* 93(9), 829-38.
- Mutai H, Heller S. (2003): Vertebrate and invertebrate TRPV-like mechanoreceptors. *Cell Calcium.* 33(5-6), 471-8.
- Müller D, Hoenderop JG, Vennekens R, Eggert P, Harangi F, Méhes K, Garcia-Nieto V, Claverie-Martin F, Os CH, Nilius B, J M Bindels R. (2002): Epithelial Ca(2+) channel (ECAC1) in autosomal dominant idiopathic hypercalciuria. *Nephrol Dial Transplant.* 17(9), 1614-20.

- Nagata M. (2016): Podocyte injury and its consequences. *Kidney Int.* 89(6), 1221-30.
- Nakagawa T, Segal M, Croker B, Johnson RJ. (2007): A breakthrough in diabetic nephropathy: the role of endothelial dysfunction. *Nephrol Dial Transplant.* 22(10), 2775-7.
- Nauli SM, Alenghat FJ, Luo Y, Williams E, Vassilev P, Li X, Elia AE, Lu W, Brown EM, Quinn SJ, Ingber DE, Zhou J. (2003): Polycystins 1 and 2 mediate mechanosensation in the primary cilium of kidney cells. *Nat Genet.* 33(2), 129-37.
- Newton AC. (1995): Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 270(48), 28495-8.
- Newton AC. (2018): Protein Kinase C: Perfectly Balanced. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 53(2), 208-230.
- Nijenhuis T, Sloan AJ, Hoenderop JG, Flesche J, van Goor H, Kistler AD, Bakker M, Bindels RJ, de Boer RA, Möller CC, Hamming I, Navis G, Wetzels JF, Berden JH, Reiser J, Faul C, van der Vlag J. (2011): Angiotensin II contributes to podocyte injury by increasing TRPC6 expression via an NFAT-mediated positive feedback signaling pathway. *Am J Pathol.* 179(4), 1719-32.
- Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. (2007): Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev.* 87(1), 165-217.
- Oláh A, Tóth BI, Borbíró I, Sugawara K, Szöllösi AG, Czifra G, Pál B, Ambrus L, Kloepper J, Camera E, Ludovici M, Picardo M, Voets T, Zouboulis CC, Paus R, Bíró T. (2014): Cannabidiol exerts sebostatic and antiinflammatory effects on human sebocytes. *J Clin Invest.* 124(9), 3713-24.
- Ovunc B, Ashraf S, Vega-Warner V, Bockenhauer D, Elshakhs NA, Joseph M, Hildebrandt F. (2012): Mutation analysis of NPHS1 in a worldwide cohort of congenital nephrotic syndrome patients. *Nephron Clin Pract.* 120(3), c139-46.
- Papp H, Czifra G, Lázár J, Gönczi M, Csernoch L, Kovács L, Bíró T. (2003): Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 12(6), 811-24.
- Pavenstädt H, Kriz W, Kretzler M. (2003): Cell biology of the glomerular podocyte. *Physiol Rev.* 83(1), 253-307.
- Pecze L, Szabó K, Széll M, Jósavay K, Kaszás K, Kúsz E, Letoha T, Prorok J, Koncz I, Tóth A, Kemény L, Vizler C, Oláh Z. (2008): Human keratinocytes are vanilloid resistant. *PLoS One.* 3(10), e3419.
- Pedersen SF, Owsianik G, Nilius B. (2005): TRP channels: an overview. *Cell Calcium.* 38(3-4):233-252.
- Planells-Cases R, Valente P, Ferrer-Montiel A, Qin F, Szallasi A. (2011): Complex regulation of TRPV1 and related thermo-TRPs: implications for therapeutic intervention. *Adv Exp Med Biol.* 704, :491-515.

- Prager-Khoutorsky M, Khoutorsky A, Bourque CW. (2014): Unique interweaved microtubule scaffold mediates osmosensory transduction via physical interaction with TRPV1. *Neuron*. 83(4), 866-78.
- Qin N, Neepker MP, Liu Y, Hutchinson TL, Lubin ML, Flores CM. (2008): TRPV2 is activated by cannabidiol and mediates CGRP release in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 28(24), 6231-8.
- Rastaldi MP, Candiano G, Musante L, Bruschi M, Armelloni S, Rimoldi L, Tardanico R, Sanna-Cherchi S, Ferrario F, Montinaro V, Haupt R, Parodi S, Carnevali ML, Allegri L, Camussi G, Gesualdo L, Scolari F, Ghiggeri GM. (2006): Glomerular clusterin is associated with PKC-alpha/beta regulation and good outcome of membranous glomerulonephritis in humans. *Kidney Int*. 70(3), 477-85.
- Reiser J, Polu KR, Möller CC, Kenlan P, Altintas MM, Wei C, Faul C, Herbert S, Villegas I, Avila-Casado C, McGee M, Sugimoto H, Brown D, Kalluri R, Mundel P, Smith PL, Clapham DE, Pollak MR. (2005): TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*. 37(7), 739-44.
- Rohacs T. (2015): Phosphoinositide regulation of TRPV1 revisited. *Pflugers Arch*. 467(9), 1851-69.
- Saleem MA, O'Hare MJ, Reiser J, Coward RJ, Inward CD, Farren T, Xing CY, Ni L, Mathieson PW, Mundel P. (2002): A conditionally immortalized human podocyte cell line demonstrating nephrin and podocin expression. *J Am Soc Nephrol*. 13(3), 630-8.
- Saleem MA. (2013): New developments in steroid-resistant nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol*. 28(5), 699-709.
- Salmon AH, Ferguson JK, Burford JL, Gevorgyan H, Nakano D, Harper SJ, Bates DO, Peti-Peterdi J. (2012a): Loss of the endothelial glycocalyx links albuminuria and vascular dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 23(8), 1339-50.
- Salmon AH, Satchell SC. (2012b): Endothelial glycocalyx dysfunction in disease: albuminuria and increased microvascular permeability. *J Pathol*. 226(4), 562-74.
- Santín S, García-Maset R, Ruíz P, Giménez I, Zamora I, Peña A, Madrid A, Camacho JA, Fraga G, Sánchez-Moreno A, Cobo MA, Bernis C, Ortiz A, de Pablos AL, Pintos G, Justa ML, Hidalgo-Barquero E, Fernández-Llama P, Ballarín J, Ars E, Torra R. (2009): Nephrin mutations cause childhood- and adult-onset focal segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 76(12), 1268-76.
- Satoh D, Hirose T, Harita Y, Daimon C, Harada T, Kurihara H, Yamashita A, Ohno S. (2014): aPKC λ maintains the integrity of the glomerular slit diaphragm through trafficking of nephrin to the cell surface. *J Biochem*. 156(2), 115-28.
- Sárközi S, Almássy J, Lukács B, Dobrosi N, Nagy G, Jóna I. (2007): Effect of natural phenol derivatives on skeletal type sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase and ryanodine receptor. *J Muscle Res Cell Motil*. 28(2-3), 167-74.

- Schaldecker T, Kim S, Tarabanis C, Tian D, Hakrrouch S, Castonguay P, Ahn W, Wallentin H, Heid H, Hopkins CR, Lindsley CW, Riccio A, Buvall L, Weins A, Greka A. (2013): Inhibition of the TRPC5 ion channel protects the kidney filter. *J Clin Invest.* 123(12), 5298-309.
- Schlingmann KP, Weber S, Peters M, Niemann Nejsum L, Vitzthum H, Klingel K, Kratz M, Haddad E, Ristoff E, Dinour D, Syrrou M, Nielsen S, Sassen M, Waldegger S, Seyberth HW, Konrad M. (2002): Hypomagnesemia with secondary hypocalcemia is caused by mutations in TRPM6, a new member of the TRPM gene family. *Nat Genet.* 31(2), 166-70.
- Schlöndorff J, Del Camino D, Carrasquillo R, Lacey V, Pollak MR. (2009): TRPC6 mutations associated with focal segmental glomerulosclerosis cause constitutive activation of NFAT-dependent transcription. *Am J Physiol Cell Physiol.* 296(3), C558-69.
- Sethi S, Zand L, Nasr SH, Glassock RJ, Fervenza FC. (2014): Focal and segmental glomerulosclerosis: clinical and kidney biopsy correlations. *Clin Kidney J.* 7(6), 531-7.
- Shankland SJ. (2006): The podocyte's response to injury: role in proteinuria and glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 69(12), 2131-47.
- Shi J, Mori E, Mori Y, Mori M, Li J, Ito Y, Inoue R. (2004): Multiple regulation by calcium of murine homologues of transient receptor potential proteins TRPC6 and TRPC7 expressed in HEK293 cells. *J Physiol.* 561(Pt 2), 415-32.
- Sidhaye VK, Schweitzer KS, Caterina MJ, Shimoda L, King LS. (2008): Shear stress regulates aquaporin-5 and airway epithelial barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(9), 3345-50.
- Silva GB, Garvin JL. (2008): TRPV4 mediates hypotonicity-induced ATP release by the thick ascending limb. *Am J Physiol Renal Physiol.* 295(4), F1090-5.
- Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tominaga M. (2010): The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J Biol Chem.* 285(24), 18749-58.
- Sugimoto H, Hamano Y, Charytan D, Cosgrove D, Kieran M, Sudhakar A, Kalluri R. (2003): Neutralization of circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) by anti-VEGF antibodies and soluble VEGF receptor 1 (sFlt-1) induces proteinuria. *J Biol Chem.* 278(15), 12605-8.
- Suzuki M, Mizuno A, Kodaira K, Imai M. (2003): Impaired pressure sensation in mice lacking TRPV4. *J Biol Chem.* 278(25), 22664-8.
- Steinberg SF. (2008): Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev.* 88(4), 1341-78.
- Strotmann R, Harteneck C, Nunnenmacher K, Schultz G, Plant TD. (2000): OTRPC4, a nonselective cation channel that confers sensitivity to extracellular osmolarity. *Nat Cell Biol.* 2(10), 695-702.

- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. (2001): TRPC1 and TRPC5 form a novel cation channel in mammalian brain. *Neuron*. 29(3), 645-55.
- Strübing C, Krapivinsky G, Krapivinsky L, Clapham DE. (2003): Formation of novel TRPC channels by complex subunit interactions in embryonic brain. *J Biol Chem*. 278(40), 39014-9.
- Szabó T, Ambrus L, Zákány N, Balla G, Bíró T. (2015): Regulation of TRPC6 ion channels in podocytes - Implications for focal segmental glomerulosclerosis and acquired forms of proteinuric diseases. *Acta Physiol Hung*. 102(3), 241-51.
- Tang Q, Guo W, Zheng L, Wu JX, Liu M, Zhou X, Zhang X, Chen L. (2018): Structure of the receptor-activated human TRPC6 and TRPC3 ion channels. *Cell Res*. 28(7), 746-755.
- Tassin MT, Beziau A, Gubler MC, Boyer B. (1994): Spatiotemporal expression of molecules associated with junctional complexes during the in vivo maturation of renal podocytes. *Int J Dev Biol*. 38(1), 45-54.
- Teng B, Duong M, Tossidou I, Yu X, Schiffer M. (2014): Role of Protein Kinase C in Podocytes and Development of Glomerular Damage in Diabetic Nephropathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 5, 179.
- Tian W, Salanova M, Xu H, Lindsley JN, Oyama TT, Anderson S, Bachmann S, Cohen DM. (2004): Renal expression of osmotically responsive cation channel TRPV4 is restricted to water-impermeant nephron segments. *Am J Physiol Renal Physiol*. 287(1), F17-24.
- Tian D, Jacobo SM, Billing D, Rozkalne A, Gage SD, Anagnostou T, Pavenstädt H, Hsu HH, Schlondorff J, Ramos A, Greka A. (2010): Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci Signal*. 3(145), ra77.
- Tian X, Ishibe S. (2016): Targeting the podocyte cytoskeleton: from pathogenesis to therapy in proteinuric kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 31(10), 1577-83.
- Timpl R. (1989): Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur J Biochem*. 180(3), 487-502.
- Trebak M, Vazquez G, Bird GS, Putney JW Jr. (2003): The TRPC3/6/7 subfamily of cation channels. *Cell Calcium*. 33(5-6), 451-61.
- Yang F, Xiao X, Cheng W, Yang W, Yu P, Song Z, Yarov-Yarovoy V, Zheng J. (2015): Structural mechanism underlying capsaicin binding and activation of the TRPV1 ion channel. *Nat Chem Biol*. 11(7), 518-524.
- Venkatachalam MA, Rennke HG. (1978): The structural and molecular basis of glomerular filtration. *Circ Res*. 43(3), 337-47.
- Venkatachalam K, Zheng F, Gill DL. (2003): Regulation of canonical transient receptor potential (TRPC) channel function by diacylglycerol and protein kinase C. *J Biol Chem*. 278(31), 29031-40.

- Vincenti F, Ghiggeri GM. (2005): New insights into the pathogenesis and the therapy of recurrent focal glomerulosclerosis. *Am J Transplant.* 5(6), 1179-85.
- Voets T, Prenen J, Fleig A, Vennekens R, Watanabe H, Hoenderop JG, Bindels RJ, Droogmans G, Penner R, Nilius B. (2001): CaT1 and the calcium release-activated calcium channel manifest distinct pore properties. *J Biol Chem.* 276(51), 47767-70.
- Vos MH, Neelands TR, McDonald HA, Choi W, Kroeger PE, Puttfarcken PS, Faltynek CR, Moreland RB, Han P. (2006): TRPV1b overexpression negatively regulates TRPV1 responsiveness to capsaicin, heat and low pH in HEK293 cells. *J Neurochem.* 99(4), 1088-102.
- Vriens J, Nilius B, Vennekens R. (2008): Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr Neuropharmacol.* 6(1), 79-96.
- Vriens J, Appendino G, Nilius B. (2009): Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol.* 75(6), 1262-79.
- Wang Y, Wang DH. (2001): Protective effect of TRPV1 against renal fibrosis via inhibition of TGF- β /Smad signaling in DOCA-salt hypertension. *Mol Med.* 17(11-12), 1204-12.
- Wang Y, Wang DH. (2009): Aggravated renal inflammatory responses in TRPV1 gene knockout mice subjected to DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Renal Physiol.* 297(6), F1550-9.
- Wang Y, Ding M, Chaudhari S, Ding Y, Yuan J, Stankowska D, He S, Krishnamoorthy R, Cunningham JT, Ma R. (2013): Nuclear factor κ B mediates suppression of canonical transient receptor potential 6 expression by reactive oxygen species and protein kinase C in kidney cells. *J Biol Chem.* 288(18), 12852-65.
- Webb BL, Hirst SJ, Giembycz MA. (2000): Protein kinase C isoenzymes: a review of their structure, regulation and role in regulating airway smooth muscle tone and mitogenesis. *Br J Pharmacol.* 130(7), 1433-52.
- Weins A, Kenlan P, Herbert S, Le TC, Villegas I, Kaplan BS, Appel GB, Pollak MR. (2005): Mutational and Biological Analysis of alpha-actinin-4 in focal segmental glomerulosclerosis. *J Am Soc Nephrol.* 16(12), 3694-701.
- Wes PD, Chevesich J, Jeromin A, Rosenberg C, Stetten G, Montell C. (1995): TRPC1, a human homolog of a Drosophila store-operated channel. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(21), 9652-6.
- Wiggins RC. (2007): The spectrum of podocytopathies: a unifying view of glomerular diseases. *Kidney Int.* 71(12), 1205-14.
- Wilson C, Dryer SE. (2014): A mutation in TRPC6 channels abolishes their activation by hypoosmotic stretch but does not affect activation by diacylglycerol or G protein signaling cascades. *Am J Physiol Renal Physiol.* 306(9), F1018-25.

- Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, Farrington MK, Creazzo T, Hawkins AF, Daskalakis N, Kwan SY, Ebersviller S, Burchette JL, Pericak-Vance MA, Howell DN, Vance JM, Rosenberg PB. (2005): A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*. 308(5729), 1801-4.
- Woudenberg-Vrenken TE, Bindels RJ, Hoenderop JG. (2009): The role of transient receptor potential channels in kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 5(8), 441-9.
- Xu H, Delling M, Jun JC, Clapham DE. (2006): Oregano, thyme and clove-derived flavors and skin sensitizers activate specific TRP channels. *Nat Neurosci*. 9(5), 628-35.
- Zhang L, Saffen D. (2001): Muscarinic acetylcholine receptor regulation of TRP6 Ca²⁺ channel isoforms. Molecular structures and functional characterization. *J Biol Chem*. 276(16), 13331-9.
- Zhang H, Ding J, Fan Q, Liu S. (2009): TRPC6 up-regulation in Ang II-induced podocyte apoptosis might result from ERK activation and NF-kappaB translocation. *Exp Biol Med (Maywood)*. 234(9), 1029-36.
- Zhou Y, Greka A. (2016): Calcium-permeable ion channels in the kidney. *Am J Physiol Renal Physiol*. 310(11), F1157-67.
- Zhu X, Jiang M, Peyton M, Boulay G, Hurst R, Stefani E, Birnbaumer L. (1996): Trp, a novel mammalian gene family essential for agonist-activated capacitative Ca²⁺ entry. *Cell*. 85(5), 661-71.
- Zhu Y, Wang DH. (2008): Segmental regulation of sodium and water excretion by TRPV1 activation in the kidney. *J Cardiovasc Pharmacol*. 51(5), 437-42.

11 TÁRGYSZAVAK

humán podocyta

proteinuria

fokális szegmentális glomerulosclerosis (FSGS)

protein kináz C (PKC)

tranziens receptor potenciál klasszikus 6 (TRPC6)

tranziens receptor potenciál vanilloid 1 (TRPV1)

tranziens receptor potenciál vanilloid 2 (TRPV2)

tranziens receptor potenciál vanilloid 3 (TRPV3)

tranziens receptor potenciál vanilloid 4 (TRPV4)

Keywords:

human podocyte

proteinuria

focal segmental glomerulosclerosis (FSGS)

protein kinase C (PKC)

transient receptor potential canonical 6 (TRPC6)

transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1)

transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2)

transient receptor potential vanilloid 3 (TRPV3)

transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)

12 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek **Prof. Dr. Bíró Tamásnak** minden irányú támogatásáért, bizalmáért, illetve az Immunológiai Intézet vezetőjeként lehetőséget biztosított számomra a munkám elvégzésére. Valamint köszönet illeti **Dr. Szabó Tamást**, aki a klinikai területről mentorált, és számos ötlettel, segítséggel hozzájárult a munkám sikeréhez.

Külön köszönöm az DE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának **Prof. Dr. Csernoch Lászlónak**, amiért lehetővé tette számomra, hogy munkámat az Élettani Intézetben végezhessem.

Köszönet illeti a felbecsülhetetlen segítségért **Dr. Tóth István Balázst**, aki mentorként mindig mindenben segítségemre volt, rengeteget tanultam tőle, köszönöm a rám fordított időt és energiát. Továbbá kiemelt segítséget kaptam **Dr. Oláh Attila** kollegámtól, akinek szintén köszönöm áldozatos munkáját.

Nagy örömmel és kellemes emlékekkel gondolok vissza a csapatra, akik bevezettek engem a munka rejtelmeibe, akiktől annyit tanultam, akikkel öröm volt együtt dolgozni, akik miatt jó volt minden nap elindulni otthonról. Hálás vagyok érte, hogy megszerettették velem ezt a szakmát, ebben nagyon nagy szerepük volt, és minden tudást, tapasztalatot, amit megosztottak velem, nagyon köszönök. Köszönöm nektek kedves kollégáim: **Dr. Tóth István Balázs, Dr. Szöllősi Attila Gábor, Dr. Oláh Attila, Dr. Dobrosi Nóra, Dr. Páyer Edit, Dr. Borbíró István, Dr. Géczy Tamás, Dr. Czifra Gabriella, Herczeg-Lisztés Erika, Dr. Zákány Nóra, Dr. Varga Attiláné Ibsike** és köszönöm az Élettani Intézet további munkatársainak **Dr. Papp Pálnak, Dr. Nagy Dénesnek, Dr. Kőszeghy Áronnak** és **Dr. Bakondi Gábornak**.

Külön köszönöm közvetlen kollégáimnak, akikkel sokat dolgoztunk együtt, **Dr. Mihály Johannának** és **Hollósi Erikának** a sok támogatást, illetve **Dr. Oláh Tamásnak** és **Kelemen Balázsnak** nagyon köszönöm a technikai segítséget.

Végezetül köszönöm minden kollégámnak, akikkel az évek során együtt dolgoztam: Angyal Ágnes, Balogh Norbert, Dr. Bodnár Dóra, Bánhalminé Szilágyi Szilvia, Fejesné Furin Lilla, Galicz Anita, Markovics Arnold, Dr. Szabó Imre Lőrinc, Szabó-Papp Judit, Uzonyi Renáta, Dr. Vasas Nikolett; valamint az Élettani Intézet és Immunológiai Intézet valamennyi dolgozójának.

13 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 Lídia
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 tudományos ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2019.06.24.

