

ZÁRÓJELENTÉS

TRPC6 a humán podocytákban: Biológiai funkciók, szabályozás, lehetséges szerep a proteinúriával járó krónikus vesebetegségekben

Kísérleteink során a tranziens receptor potenciál canonical-6 (TRPC6) ioncsatorna szerepét vizsgáltuk vese eredetű tenyésztett podocytákban, az alábbi célkitűzések megvalósítása mentén:

1. A TRPC6 kifejeződésének és funkcionális jellemzőinek leírása tenyésztett humán (és egér) podocytákon;
2. A TRPC6 szabályozása a podocytákon leírt receptor-kapcsolt intracelluláris jelátviteli mechanizmusok által;
3. A TRPC6 szerepe a podocyták biológiai folyamatainak (pl. celluláris integritás, proliferáció, apoptózis) szabályozásában;
4. A TRPC6 kifejeződésében bekövetkező esetleges módosulások különféle proteinúriával és podocytopathiával járó vesebetegségekben.

1. A TRPC6 funkcionális kifejeződése tenyésztett podocytákon

Kísérleteink során először kollaborációs partnereinktől kapott immortalizált humán podocyták tenyésztését állítottuk be. Emellett (habár az eredeti pályázati tervben nem szerepelt), lehetőségünk nyílt egér vese-eredetű podocyták vizsgálatára is, így alábbi kísérleteinket ezeken a sejteken is elvégeztük.

A tenyésztési körülmények (hőmérséklet, oldatösszetétel) optimalizálásával kimutattuk (Western blot és immuncitokémia technikák), hogy a podocyták kifejezik a sejtekre jellemző specifikus markereket, azaz a podocint, az α -aktinint és a szinaptopodint. A podocytákat tovább vizsgálva megállapítottuk azt is, hogy a TRPC6 mind mRNS (RT-PCR és kvantitatív „real-time” Q-PCR technikák), mind fehérje szinten (Western blot és immuncitokémia technikák) kifejeződik a humán és egér podocytákban. Immuncitokémiai jelölést követően konfokális mikroszkópia alkalmazásával bebizonyosodott továbbá, hogy a TRPC6 fehérje leginkább a sejtek felszíni membránjában, míg kismértékben a citoplazmában expresszálódik. A csatorna szubcelluláris lokalizációját tovább vizsgálva (kettős immunjelölést alkalmazva)

megállapítottuk emellett, hogy TRPC6 igen jelentős ko-lokalizációt mutat a sejtekben megtalálható podocin (felszíni membrán) és actin (citoszkeleton) fehérjékkel.

Ezt követően a Ca-permeabilis TRPC6 csatorna funkcionális jelenlétét tanulmányoztuk a sejteken. Fluorescence Imaging Plate Reader (FLIPR) alapú Ca-imaging módszer (fluo-4 fluoreszcens Ca-szenzitív festék) alkalmazása során megállapítottuk, hogy a TRPC6 endogén aktivátorai (különbéle diacil-glicerol analógok: 1-oleoyl-2-acetyl-glycerol [OAG], 1,2-dioctanoyl-glycerol [DOG]), valamint exogén agonistája (Hyperforin) dózis-függő módon megnövelték a tenyésztett humán és eger podocyták intracelluláris Ca-szintjét. Mivel ezen hatás szinte teljes mértékben kivédhetőnek bizonyult az extracelluláris Ca-koncentráció lecsökkentésével, valamint az általános TRP csatorna gátlószer, ruténium vörös alkalmazásával, ezért minden valószínűség szerint a TRPC6 ioncsatornán keresztül beáramló Ca-ionoknak volt köszönhető.

A patch-clamp technika egész sejt konfigurációját alkalmazva elvégeztük továbbá a TRPC6 ioncsatorna elektrofiziológiai vizsgálatát is. A fenti eredményekkel jó összhangban kimutattuk, hogy az endogén (OAG, DOG) és exogén (Hyperforin) agonisták jelentős ionáramokat indukáltak a sejteken, mely hatások kivédhetőek voltak az extracelluláris Ca-koncentráció lecsökkentésével és ruténium vörös adagolásával. Mindezen eredményeink a TRPC6 funkcionális és molekuláris jelenlétére utalnak a humán és eger podocytákban.

Vizsgálatainkban kulcsfontosságú elem volt, hogy a TRPC6-ot rekombináns módon overexpresszáló sejtekben is megerősítsük a fenti, a podocyták „endogén” TRPC6 ioncsatornáinak elemzésekor kapott eredményeinket. Korábbi kísérleteinkben (kollaborációs partnereinkkel együttműködve) rekombináns humán TRPC6-ot stabilan expresszáló HEK sejteket (HEK-TRPC6 sejtek) állítottunk elő. Ezen sejteken elkezdtük a vizsgálatokat és kimutattuk, hogy a TRPC6 (hasonlóan a podocytákon kapott eredményeinkhez) a sejt felszíni membrán Ca-permeabilis ioncsatornájaként funkcionál.

Sajnálatos módon ezek a sejtek, egyelőre fel nem tárt okokból kifolyólag, a projekt 1. évének végére „elvesztették” TRPC6 expressziójukat. Így az elmúlt időszakban 3 db új, a TRPC6-ot stabilan overexpresszáló sejt vonalat készítettünk, 3 különféle gazdasejtet (HEK, CHO, COS-7) alkalmazva. Több sikertelen próbálkozás és, sajnálatos módon, igen jelentős idővesztés árán sikerült azonosítanunk a TRPC6-ot funkcionális formában kifejező klónokat. Ezen

sejteken megkezdjük a vizsgálatokat, melyek, reményeink szerint, a 2012. év első felében befejeződnek.

2. A jelátviteli folyamatok differenciált módon szabályozzák a TRPC6-ot – A PKC izoenzimek kitüntetett szerepe

Vizsgálatainkban különféle jelátviteli rendszerek szerepét is elemeztük. Először a tenyésztett egér és humán podocytaikat különféle sejtfelszíni metabotróp receptorok agonistáival, valamint intracelluláris kinázok és foszfatázok modulátoraival stimuláltuk, majd a TRPC6-mediált Ca-influxban, valamint a TRPC6 kifejeződésében bekövetkező módosulásokat elemeztük.

Fluorimetriás FLIPR Ca-imaging technikával kimutattuk, hogy a sejteken kifejeződő 7-TM metabotróp receptorok agonistái (30 percig adagolva) közül a Bradykinin és az ATP mindkét sejttípuson jelentősen lecsökkentette a diacil-glicerol származékokkal (OAG, DOG) kiváltott TRPC6 aktivációt. Ezzel jó összhangban valós-idejű Q-PCR kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a Bradykinin és az ATP (6-24 óráig adagolva) lecsökkentette a TRPC6 mRNA és fehérje szintű kifejeződését. Ezzel szemben az 1-TM receptor aktivátor inzulin előkezelés egér podocytaikon kismértékben szenzitizálta a TRPC6-mediált Ca-beáramlás mértékét, míg a humán sejteken kismértékben csökkentette azt. Végezetül kimutattuk, hogy a hisztamin adagolása nem befolyásolta a TRPC6-mediált Ca-válaszok jellegzetességeit.

A TRPC6 expresszióját és funkcióját vizsgáltuk továbbá olyan “akut” és “krónikus” kísérletekben is, amikor az *in vivo* proteinúriát okozó ágensek hatását *in vitro* kezelési protokollokkal modellezzük. A fent bemutatott Bradykinin és ATP (mint potenciális gyulladáshoz vezető mediátorok) mellett további pro-inflammatorikus vegyületek hatását (“nephritis model”) elemezve kimutattuk, hogy az arachidonsav, valamint a prosztaglandin E2 jelentős mértékben fokozta a TRPC6 OAG és DOG agonisták által kiváltott aktivációját, valamint a csatorna expresszióját egér podocytaiban. Érdekes megfigyelésünk volt ugyanakkor, hogy ezen vegyületek hatástalannak bizonyultak humán podocytaikon. Végezetül kimutattuk, hogy a komplementrendszer egyik fő aktivátora (C5b-9, mint membranosus glomerulonephritis modell), valamint a puromycin aminonucleoside (mint nephritis model) nem volt hatással TRPC6-mediált Ca-válaszokra. Érdekes módon emellett azt tapasztaltuk, hogy a vesetranszplantációt követően újabban alkalmazott mTOR inhibitor Rapamycin ugyancsak fokozta a TRPC6 aktivitását. Mindezen eredmények azt sugallják, hogy számos, a

jelátvitelben szerepet játszó molekula képes direkt vagy indirekt módon változtatni a TRPC6 expresszióját és/vagy funkcionalitását.

A fenti receptor-mediált jelátviteli útvonalak igen komplex kináz és foszfatáz rendszerek aktivitását módosíthatják, így vizsgáltuk ezen enzimek szerepét is. Megállapítottuk, hogy protein foszfatáz 2B calcineurin inhibitorok (tacrolimus, pimecrolimus) nem módosították a csatorna működését. Ezzel ellentétben kimutattuk, hogy a phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), mely a protein kináz C (PKC) rendszer általános aktivátora, drámai módon lecsökkentette a TRPC6 aktivitását. Mivel (i) irodalmi adatok és saját korábbi kutatásaink alapján ismert, hogy a Bradykinin és az ATP képes a PKC rendszer aktivitásának módosítására; (ii) a PMA TRPC6 aktivitást gátló hatása teljes mértékben megegyezett a Bradykinin és az ATP hatásaival; (iii) a PKC rendszer jelenlétét a podocytákban több korábbi publikáció is felvetette; ezért (habár nem szerepelt az eredeti projekt munkatervben) kísérleteinkben a PKC rendszer részletes vizsgálatát is végrehajtottuk humán podocytákon.

Először kimutattuk (kvantitatív „real-time” Q-PCR és Western blot technikák), hogy humán podocyták számos PKC izoformát expresszálnak, melyek közül a Ca-függő „klasszikus” cPKC α -t, a Ca-független „novel” nPKC δ -t, valamint az „atípusos” aPKC ζ -t fejezik ki legnagyobb mennyiségben. Ca-imaging segítségével megállapítottuk továbbá, hogy a PMA fenti hatását teljes mértékben képes volt kivédeni a cPKC és nPKC izoformákat gátló GF109203X, a cPKC izoformák inhibitora a Gö6976, valamint az nPKC δ -t gátló Rottlerin. Bebizonyosodott az is, hogy a PMA kezelés szelektív módon aktiválta, majd down-regulálta a cPKC α és nPKC δ izoenzimeket (míg nem befolyásolt a többi izoforma szintjét). Végezetül megállapítottuk, hogy a fenti gátlószerekkel előkezelt sejtekben, valamint olyan podocytákban, ahol az endogén cPKC α és nPKC δ kifejeződését siRNS technikával lecsökkentettük, a TRPC6-mediált Ca-válaszok amplitúdója jelentős mértékben megnőtt. Mindezen adatok arra utalnak, hogy cPKC α és nPKC δ izoenzimek gátló hatással bírnak a TRPC6 ioncsatorna működésének szabályozásában.

3. A TRPC6 aktivitásának módosítása eltérő módon befolyásolja egér és humán podocyták biológiai folyamatait

Vizsgáltuk továbbá a TRPC6 aktivátorok különféle sejtfolymatokra gyakorolt hatásait is. Megállapítottuk, hogy 48 órás kezelést követően az OAG és DOG (2-300 μ M koncentrációig) nem befolyásolta a tenyésztett podocyták életképességét (MTT alapú kolorimetriás és

CyQuant fluorimetriás assay-k). Kimutattuk ugyanakkor, hogy a fenti anyagok legnagyobb dózisa (300-500 μM , melyek a funkcionális FLIPR assay-k során már igen jelentős mértékben megnövelték az intracelluláris Ca-koncentrációt) 72 órás kezelés után az egér podocyták apoptózisát indukálták (DiI_{C15} jelölés, phosphatidyl-serine transzlokáció elemzése Annexin-V immunfestéssel), míg nem befolyásolták humán podocyták életképességét. Megállapítottuk azt is (konfokális mikroszkópia), hogy egyetlen beavatkozás sem módosította a sejtek integritását. Végezetül bebizonyosodott, hogy a TRPC6 siRNS-mediált „lecsendesítése” humán podocytákban nem változtatta meg a sejtek növekedési ütemét (az egér podocytákban az TRPC6-siRN-k kísérletek jelenleg zajlanak). Mindezen adatok egyrészt a TRPC6 funkcionális szerepére utalnak az egér podocyták túlélésének szabályozásában; másrészt tovább erősítik azt a korábbi megfigyelésünket, hogy az egér és humán podocyták „TRPC6-kapcsolt rendszerei” számos ponton különböz(het)nek egymástól

4. A TRPC6 kifejeződése nephrológiai kórképekben

A TRPC6 *in situ* expressziójának vizsgálatához egyrészt a DE OEC Patológiai Intézetében fellelhető szövetbankból metszeteket kaptunk, másrészt szövetmintákat gyűjtöttünk, majd elemeztük a TRPC6 kifejeződésében bekövetkező változásokat. Sajnálatos módon a TRPC6-specifikus fluoreszcencia *in situ* hibridizáció (FISH) technika optimalizálása nem járt sikerrel, így az alábbiakban az immunhisztokémiai kísérleteink eredményét foglaljuk össze.

Egészséges vese szöveten immunhisztokémia technikával kimutattuk, hogy a TRPC6 leginkább a glomerulusok bazálmembránjában (feltehetően a podocytákban) fejeződik ki; emellett kisfokú TRPC6 expressziót láttunk a tubulusok epiteliális sejtjeiben is. Gyulladásos veséből származó mintákat megállapítottuk, hogy a TRPC6 expressziója jelentősen fokozódott a podocytákban. Emellett érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy a tubuláris epithelsejtben is jelentősen megnőtt a TRPC6 protein szintje. Bebizonyosodott az is, hogy a TRPC6 kifejeződése egyéb, proteinúriával járó vesebetegségben szenvedőktől származó mintákon (polycystás vese, súlyos fokú proteinúria, valamint szteroid-dependens proteinúria szindróma) nem változott meg jelentősen. Jelenleg folyó kutatásainkban további vesebetegségek (pl. diabeteses nephropathia) analízise zajlik.

5. Összefoglalás, Perspektívák

Mindezen eredményeink rámutatnak arra, hogy számos, a proteinúriával járó vesebetegség kialakulásában meghatározó szerepet játszó mediátor, valamint az általuk beindított jelátviteli

folyamatok jelentős mértékben képesek a TRPC6 aktivitásának és kifejeződésének módosítására. Mivel ezen rendszerek egyes elemei terápiás célpontként is alkalmazhatók, eredményeink további kísérleteket inspirálhatnak annak kiderítésére, hogy a TRPC6 (mint új célmolekula) szerepet kaphat-e egyes vesebetegségek kezelésében. Végezetül adataink felhívják a figyelmet a modellként alkalmazott egér és humán podocyta sejttípusok közötti egyes eltérésekre, valamint az adatok óvatos interpretációjának szükségességére is.

6. Az eredmények disszeminációja

A pályázat Munkatervében leírtaknak megfelelően tudományos eredményeinkről számos formában közöltük. A számos hazai és nemzetközi konferencia részvételen túl a jelentésben bemutatott eredményekről 3 *in extenso* publikáció készül(t). Ezek közül az elsőt, sajnálatos módon, 2 folyóirat elutasította; jelenleg egy 3. folyóiratban a peer-review procedúra zajlik. A másik két publikációt (a jelenleg zajló kísérletek függvényében) az elkövetkező 3-6 hónapban tervezzük közlésre benyújtani. Végezetül megemlítendő, hogy a pályázat témavezetője 3 más publikációban is társszerző, melyek közül egyben ő a levelező szerző.

In extenso publikációk a pályázat eredményeiről

1. Ambrus L., Bíró T., Oláh A., Czifra G., Kedei N., Blumberg P.M., Balla G., Szabó T. (2012): Protein kinase C (PKC) alpha and delta isoforms inhibit transient receptor potential canonical-6 in human podocytes. *Cell. Mol. Life Sci.* (közlésre beküldve) IF: 7,047
2. Szabó T., Ambrus L., Oláh A., Balla G., Bíró T. (2012): Differential regulation of transient receptor potential canonical-6 by receptor-coupled signaling pathways in human and mouse podocytes. *Cell Calcium* (előkészületben) IF: 3,553
3. Ambrus L., Zákány N., Oláh A., Balla J., Balla G., Szabó T., Bíró T. (2012): Expression of transient receptor potential canonical-6 in proteinuric kidney diseases. *Pediatr. Nephrol.* (előkészületben) IF: 2,183

In extenso publikációk egyéb témákból

1. Szakszon K., Csízy I., Szabó T. (2009): Early introduction of peritoneal dialysis may improve survival in severe sepsis. *Pediatr. Emerg. Care* **25(9)**:599-602. IF: 0.72
2. P. Szabó G., Knegt A.C., Újfalusi A., Balogh E., Szabó T., Oláh É. (2012): Subtelomeric 6.7 Mb trisomy 10p and 5.6 Mb monosomy 21q detected by FISH and array-CGH in three related patients. *Am. J. Med. Genet.* (Közlésre elfogadva) IF: 2.62

3. Géczy T., Oláh A., Tóth I.B., Czifra G., Szöllősi A.G., Szabó T., Zouboulis C.C., Paus R., Bíró T. (2012): Protein kinase C isoforms play differential roles in the regulation of human sebocyte biology. *J. Invest. Dermatol. (Közlésre elfogadva)* IF: 6.27

Idézhető absztraktok

1. Szabó T., Ambrus L., Czifra G., Kedei N., Blumberg P.M. Bíró T. (2010): Modulation of transient receptor potential canonical-6 (TRPC6) ion channel in cultured podocytes. *Pediatr. Nephrol.* **25**:1986

Konferencia előadások és poszterek

1. Szabó T. (2009): Nephrosis syndrome gyermekkorban. Gyermeknephrológiai Egyesület Országos Kongresszusa, Eger.
2. Szabó T. (2009): Veseótló kezelések szerepe sepsissel szövődött sokszervi elégtelenségben. Gyermeknephrológiai Egyesület Országos Kongresszusa, Eger.
3. Szabó T. (2009): Akut veseelégtelenség gyermekkorban. Debreceni Nephrológiai Napok
4. Szabó T. (2009): aHUS vagy glomerulonephritis. Magyar Gyermekgyógyász Társasága, Országos Kongresszus, Eger
5. Szabó T., Bíró T. (2009): TRPC6 in podocytes: expression profile and functional role. TRP Channels from Sensory Signaling to Human disease, Stockholm, Svédország
6. Szabó T., Ambrus L., Czifra G., Kedei N., Blumberg P.M. Bíró T. (2010): Modulation of transient receptor potential canonical-6 (TRPC6) ion channel in cultured podocytes. 15th IPNA Congress, New York, NY, USA
7. Szabó T., Ambrus L., Bíró T. (2010): A TRPC6 potenciális szerepe szerzett proteinuriák pathomechanizmusában. Magyar Gyermekgyógyász Társaság, Országos Kongresszus, Esztergom
8. Szabó T., Körhegyi I., Lakatos E., Szikszay E., Balla Gy. (2010): Sinus sagittalis thrombosis szteroid-szenzitív nephrosis szindrómában. Gyermeknephrológiai Egyesület Országos Kongresszusa, Balatonaliga
9. Szabó T., Ambrus L., Zákány N., Bíró T. (2010): Podocytopathia-proteinuria-végstádiumú vesebetegség: A TRPC6 szerepe a proteinuriák pathomechanizmusában. Gyermeknephrológiai Egyesület Országos Kongresszusa, Balatonaliga

-
10. Ambrus L., Szabó T., Czifra G., Pöstényi Z., Zákány N., Bíró T. (2010): A TRPC6 ioncsatorna modulációja hormonok és egyéb mediátorok által egér podocytá tenyészetben. A Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged
 11. Szabó T., Ambrus L., Zákány N., Bíró T. (2011): TRPC6 szerepe szerzett proteinuriákban. Gyermeknephrológiai Egyesület Országos Kongresszusa, Hajdúszoboszló
 12. Szabó T. (2011): Vesekövesség pathomechanizmusa. Gyermeknephrológiai Egyesület Országos Kongresszusa, Hajdúszoboszló
 13. Szabó T. (2011): Akut veseelégtelenség pathomechanizmusa. Gyermeknephrológiai Egyesület Országos Kongresszusa, Hajdúszoboszló