

# A zománcképződés és a nyálszekréció epiteliális transzportfolyamatainak jellemzése

Doktori értekezés

**Bori Erzsébet**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Varga Gábor, DSc, egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Kecskeméti Valéria, CSc, professor emeritus  
Dr. Maléth József, PhD, tudományos munkatárs

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fábián Tibor, CSc, professor emeritus  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Darvas Zsuzsanna, PhD, egyetemi docens  
Dr. Pap Ákos, DSc, osztályvezető

Budapest  
2016

# Tartalomjegyzék

<b>1. Rövidítések jegyzéke .....</b>	<b>5</b>
<b>2. Bevezetés (irodalmi háttér).....</b>	<b>10</b>
2.1. A nyálmirigyek szerepe az orális egészség fenntartásában .....	10
2.2. A nyálszekréció két lépcsős mechanizmusa .....	11
2.2.1. A nyálmirigy acinusok elektrolittranszportja .....	12
2.2.2. Folyadékszekréció a nyálmirigy acinusokban .....	14
2.2.3. Reabszorpció a nyálmirigy duktuszokban .....	15
2.2.4. A folyadékszekréció szabályozása .....	17
2.3. A nyálmirigy hipofunkció és kezelésének új lehetőségei.....	18
2.3.1. Fej-nyaki daganatok sugárkezelése és Sjögren-szindróma .....	18
2.3.2. Új kezelési lehetőségek – transzdifferentiáció, őssejtek, génterápia, mesterséges nyálmirigy .....	19
2.4. A fogfejlődés .....	21
2.5. Az amelogenezis.....	24
2.5.1. Pre-szekréciós ameloblaszt formák .....	26
2.5.2. A szekréciós fázis .....	26
2.5.3. Az érési fázis .....	27
2.5.4. A védőfázisú ameloblasztok.....	28
2.6. Az ameloblasztok elektrolittranszport-folyamatai.....	28
2.6.1. Szoros kapcsolatok .....	28
2.6.2. $Ca^{2+}$ transzport.....	30
2.6.3. pH szabályozás az amelogenezis során I. – hipotézis és általános megfigyelések.....	30
2.6.4. pH szabályozás az amelogenezis során II. – az ameloblasztok pH szabályozásért felelős molekulái .....	32
2.7. Az ameloblasztok vizsgálatának korlátai, kísérleti modellek.....	38
<b>3. Célkitűzések .....</b>	<b>40</b>
<b>4. Módszerek.....</b>	<b>41</b>
4.1. Sejtenyésztés .....	41
4.1.1. Primer humán nyálmirigy kultúrák létrehozása és fenntartása.....	41

4.1.2. Par-C10 sejtek tenyésztése .....	43
4.1.3. HAT-7 sejtek tenyésztése .....	43
4.1.4. HEK 293 microbix sejtek tenyésztése .....	43
4.2. Rekombináns adenovírus vektorok készítése és Par-C10 sejtek transzdukciója.	44
4.2.1. A víruskészítés és tisztítás során felhasznált oldatok összetétele.....	46
4.3. Génexpressziós vizsgálatok .....	46
4.3.1. A génexpressziós vizsgálatok során alkalmazott anyagok, készülékek .....	48
4.4. Immuncitokémia .....	50
4.5. Transzepitél ellenállás (TER) mérése .....	51
4.6. Mikrofluorometria .....	51
4.6.1. Kalibráció .....	52
4.6.2. Pufferkapacitás mérése .....	53
4.6.3. Ammónium pulzus technika.....	56
4.6.4. A mikrofluorometriás mérés során felhasznált oldatok összetétele és az alkalmazott farmakológiai ágensek .....	57
4.7. Gravimetria.....	58
4.8. Statisztikai analízis .....	58
<b>5. Eredmények .....</b>	<b>59</b>
5.1. A primer humán nyálmirigy kultúrák által expresszált iontranszporterek .....	59
5.2. Génterápia modellezése Par-C10 sejtekben .....	59
5.3.1. A HAT-7 sejtek morfológiája, ameloblaszt markerek kimutatása .....	62
5.3.2. A szoros kapcsolatok és a transzepitél ellenállás vizsgálata .....	63
5.3.3. A HAT-7 sejtek által expresszált transzporterek.....	64
5.4.4. A bikarbonát transzport funkcionális vizsgálata mikrofluorometriával .....	66
<b>6. Megbeszélés .....</b>	<b>72</b>
6.1. Vegyes acináris-duktális tulajdonságok primer humán nyálmirigy kultúrákban	72
6.2. Transzgén expresszió és folyadékszekréció Par-C10 sejtekben.....	73
6.3. <i>In vitro</i> ameloblaszt transzport modell jellemzése .....	74
6.3.1. Ameloblaszt markerek expressziója .....	74
6.3.2. A vektoriális transzport szükséges feltétele – szoros kapcsolatok .....	76
6.3.3. HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> transzportban és pH szabályozásban résztvevő fehérjék kifejeződése .....	78

6.3.4. Funkcionális polarizáció és mérhető $\text{HCO}_3^-$ szekréció.....	79
6.3.5. A modell korlátai .....	81
<b>7. Következtetések .....</b>	<b>83</b>
<b>8. Összefoglalás .....</b>	<b>84</b>
<b>9. Summary .....</b>	<b>85</b>
<b>10. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>86</b>
<b>11. Saját publikációk jegyzéke .....</b>	<b>115</b>
<b>12. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>116</b>

## 1. Rövidítések jegyzéke

AAV	adeno-asszociált vírus
Ad	adenovírus
AdAQP1	aquaporin-1 fehérjét kódoló adenovírus vektor
AdEYFP	sárga fluoreszcens fehérjét kódoló adenovírus vektor
AE/SLC2A2	az Slc4a családba tartozó anion cserélő-2
ALP	alkalitikus foszfatáz
AmelX	amelogenint kódoló gén az X kromoszómán
AmelY	amelogenint kódoló gén az Y kromoszómán
AMI	amilorid
AMTN	amelotin
ANO1/TMEM16A	anocamin-1, klorid csatorna
ANOVA	analysis of variance, statisztikai módszer: variancia analízis
AP	apikális
AQP	aquaporin, vízcsatorna
ATP	adenozin-trifoszfát
ATZ	acetazolamid
BCECF	2',7'-bisz-(2-karboxietil)-5-(és-6)-karboxifluorescein
BCPb8	cementoblaszt progenitor sejtvonal
BDNF	brain derived neurotrophic factor, idegi növekedési faktor
BL	bazolaterális
BME	basement membrane extract, bazális membrán extraktum
BMP-2	bone morphogenic protein-2, növekedési faktor
bp	bázispár
CaCC	Ca <sup>2+</sup> -aktivált Cl <sup>-</sup> csatorna
CaCo2	humán kolorektális adenokarcinoma eredetű sejtvonal
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
CAR	carbonic-anhydrase/szénsav-anhidráz
cDNS	komplementer DNS
CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor, Cl <sup>-</sup> csatorna

CL	cervical loop/cervikális hurok
CLDN	claudin
CMV	citomegalovírus
CVL	Crude Virus Lizate: tisztítatlan, vírusokat tartalmazó sejtlizátum
DF	dentális folliculus/fogzacskó
Dlx3	Distal-Less Homeobox 3, transzkripció faktor
DM	dentális mezenchima
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle médium
DMEM-F12	Dulbecco által módosított Eagle médium és Ham féle F12 tápoldat keveréke
DNS	dezoxiribonukleinsav
DP	dentális papilla
DPSC	dental pulp derived stem cell/pulpa eredetű őssejt
DRA/SLC26A3	Down-Regulated In Adenoma Protein, az Slc26a családba tartozó anion cserélő
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EK	enamel knot, szignalizációs központ a zománcszervben
ENaC	epiteliális nátrium csatorna
End	endoszómák
ERM	epithelial rest of Malassez, Malassez-féle sejtek
F <sub>440</sub>	440 nm gerjesztő fényt követően 530 nm-en mért fluoreszcencia intenzitás
F <sub>490</sub>	490 nm gerjesztő fényt követően 530 nm-en mért fluoreszcencia intenzitás
FCS	fetal calf serum/fötális borjú szérum
FGF10	fibroblaszt növekedési faktor-10
FORSK	forskolin
G	Golgi apparátus
H <sub>2</sub> DIDS	4,4'-diizotiocianatodihidrostilbén- 2,2'-diszulfonsav
HAT-7	patkány dentális epitélium (cervikális hurok) eredetű sejtvonal
HEK 293	emberi embrionális vese eredetű sejtvonal
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav

HERS	Hertwig's epithelial root sheath/Hertwig-féle hámhüvely
HSG	humán szubmandibuláris mirigy eredetű sejtvonal
huSMG	humán szubmandibuláris mirigy eredetű primer kultúra, mely a kiültetést követő 1. napon még lebegő (főként epitél) sejtekből lett alapítva
IBMX	3-izobutil-1-metilxantin
IEE	inner enamel epithelium/belső zománchám
IgG	immunoglobulin G
J <sub>B</sub>	bázisfluxus
KHE	kálium-proton cserélő
KLK4	kallikrein-4
LLC-PK1	sertés vese proximális tubulus eredetű sejtvonal
LS-8	egér ameloblaszt jellegű sejtvonal
M	mitokondriumok
MaxiK/KCNMA1	nagy vezetőképességű kálium csatorna
MDCK	Madin-Darby canine kidney/kutya vese eredetű sejtvonal
MEM	Minimal Essential Medium
mIK1/KCNN4	közepes vezetőképességű kálium csatorna
MOI	Multiplicity of infection, tényleges fertőző képességgel bíró részecske (plakk formáló egység)/ sejt arány
MMP20	mátrix metalloproteáz-20
MSC	mezenchimal stem cell/mezenchimális őssejt
NBC1/NBCe1/SLC4A4	(elektrogén) nátrium-bikarbonát kotranszporter-1
NCKX4/SLC24A4	kálium-függő nátrium-kalcium cserélő
NCX	nátrium-kalcium cserélő
NGF	nerve growth factor/idegi növekedési faktor
NHE/SLC9A1	nátrium-proton cserélő-1
NKCC1/SLC12A2	nátrium-kálium-2 klorid kotranszporter
NMDG	N-metil-D-glükamin
NT-4	neurotrophin-4, idegi növekedési faktor
OCCL	occludin

OEE	outer enamel epithelium/külső zománchám
P2X, P2Y	purinerg receptorok
pACCMV-pLpA	adenovírus létrehozásához szükséges CMV promótert, klónozó kazettát és poliA szignált tartalmazó plazmid
Par-C10	patkány parotisz eredetű sejtvonal
PAT1/SLC26A6	az Slc26 családba tartozó anion cserélő
PCR	polimeráz láncreakció
pH	$-\log[H^+]$
pJM17	adenovírus létrehozásához szükséges (helper) plazmid
PL	papillary layer/papilláris réteg
PLNDIV	Perlacain domain IV
PT-HSG	primary total human submandibular gland, emberi szubmandibuláris mirigy eredetű primer kultúra, mind gyorsan letapadó, mind 1 nap után még lebegő sejtekből kialakítva
qPCR	kvantitatív (real time) polimeráz láncreakció
RA	ruffle-ended ameloblaszt/fodros felszínű ameloblaszt
RNS	ribonukleinsav
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute medium-1640
RT-PCR	reverz transzkripció polimeráz láncreakció
Runx2	Runt-related transcription factor 2, transzkripció faktor
SA	smooth ended ameloblaszt/sima felszínű ameloblaszt
SEM	standard error of mean/átlag szórása
SI	stratum intermedium
sIgA	immunoglobulin A, szekretált forma
siRNS	small interfering RNS/kis interferáló RNS
SLC	solute carrier
SLC26A4	pendrin, anion cserélő
SMIE	patkány szubmandibuláris mirigy eredetű sejtvonal
SR	stellate reticulum/retikulum stellata
T <sub>a</sub>	annealing temperature/betapadási hőmérséklet
TAE	pufferoldat: Tris bázis (2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propándiol), ecetsav, EDTA



Tc1rg1	T cell immune regulator 1, proton ATP-áz alegység
TER	transepithelial resistance/transzepitél ellenállás
TJ	tight junction/szoros kapcsolat
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil)-1,3-propándiol
TRPV	Vanilloid Transient Receptor Potential Cation Channels, kation csatorna család
ZO	zonula occludens
$\beta$	pufferkapacitás

## 2. Bevezetés (irodalmi háttér)

Az szájüregi egészség megteremtésében és fenntartásában kiemelt szerepe van az epitél transzportfolyamatoknak, ezen belül is a folyadék- és elektrolitszekréciónak. Bár maga a végső szekrétum igen különböző, – gondoljunk a nyálmirigyek által elválasztott hipotóniás összetételű nyálra vagy az ameloblasztok által termelt fogzománkra, mely szervezetünk legkeményebb szövete – bizonyos mechanizmusok ugyanúgy működnek minden epitéliumban. Amíg azonban a nyálelválasztás folyamata és orális egészségre gyakorolt hatása már gazdag szakirodalommal rendelkezik és a kutatások egyre inkább a gyakorlati alkalmazás irányába tolódnak, addig az ameloblasztok transzporfolyamatai alig ismertek. Jelen disszertáció témája a nyálmirigy hipofunkció biológiai kezelési lehetőségeinek tanulmányozása primer humán szubmandibuláris nyálmirigy eredetű sejtkultúrákon és patkány parotisz eredetű sejtvonalon, valamint elsőként mutat be egy olyan *in vitro* modellt, melynek segítségével az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportja vizsgálható.

### 2.1. A nyálmirigyek szerepe az orális egészség fenntartásában

Napi szinten nagyjából 750 ml – 1,5 l nyál termelődik [1, 2]. A nyál termeléséért 90%-ban három pár nagy nyálmirigy: a parotisz (fültömrigy), a szubmandibuláris (állkapocs alatti), valamint a szublinguális (nyelv alatti) mirigyek felelősek. Ezeken kívül a szájban elszórva több száz kis nyálmirigy is található [1-3]. A nyugalmi nyálszekréció elsősorban a szubmandibuláris és kis nyálmirigyekhez köthető, míg a stimulált szekréció során elválasztott nyál döntően a parotiszból származik [1]. Felépítésüket tekintve végkamrákból (acinus) és kivezetőcső (duktusz) rendszerből állnak, melyeket epitél sejtek alkotnak [4, 5]. Az emberi nyálmirigyben jellemzően az acinusok az elektrolit-, folyadék- és fehérjeszekréció elsődleges forrásai, míg a duktuszoknak főként reabszorptív szerepe van [2, 4, 6].

Maga a nyál elektrolitokat és fehérjéket tartalmazó hipotóniás folyadék, mely meghatározó szerepet tölt be a szájüreg mechanikai, kémiai és mikrobiológiai védelmében [3, 7-9]. A lágy szövetek védelmét a nyálmirigyek által termelt mucinokból álló védőréteg biztosítja, mely egyben segíti ezeknek a szöveteknek a nedvesen tartását is [10]. A nyál  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{PO}_4^{3-}$  tartalma révén segíti a fogzománc legfőbb alkotójának, a

hidroxi-apatitnak, a megtartását. Normál körülmények között, pH 6 érték mellett az említett ionok koncentrációja az apatit kristályok oldhatósági egyensúlyát a remineralizáció irányába tolja el [8, 11]. A  $\text{HCO}_3^-$  jelenlétének következtében nyálunk jelentős pufferkapacitással is rendelkezik, így mérsékli a szájüreg savasodását például az étkezések folyamán és semlegesíti a fogszuvasodásért felelős (kariogén) baktériumok által termelt savakat is. Pufferelő hatása nemcsak a fogak, hanem a nyelőcső védelmét is szolgálja [7-9, 11]. Számos antimikrobiális hatású fehérje megtalálható alkotói között, így a lizozim, a sIgA, a laktoferrin vagy a hisztatinok [7, 11]. A nyál védelmi funkciói mellett részt vesz az emésztés megkezdésében is, az amiláz termelése és kibocsátása révén szerepet játszik a keményítő bontásában [9].

A nyál fontosságát mi sem bizonyítja jobban, minthogy évente nagyjából 500 000 új beteg szenved a nyálmirigy hipofunkció következményeitől világszerte. A szájszárazság érzés (xerostomia) mellett a betegek panaszai között szerepel a nehezített rágás, nyelés, esetenként a beszéd is gondot okozhat számukra, növekszik náluk a fogszuvasodás és a szájüregi fertőzések gyakorisága és a parodontitisz rizikója. Súlyos esetekben szájüregi és nyelőcsövi fekélyek is kialakulhatnak [8, 12, 13].

## **2.2. A nyálszekréció két lépcsős mechanizmusa**

Elsőként Thaysen és munkatársai írták le a nyáltermelés két lépcsős hipotézisét. Ez alapján acinusok elektrolitokat transzportálnak a mirigy lumenébe, mely ozmotikus hajtóerőt biztosít a vízmozgás számára. Az így keletkezett primer szekréció még izoozmotikus. A duktuszokon való áthaladás során a nyál összetétele módosul, az ionok egy része visszavételre kerül, mivel azonban a duktuszok vízre nézve átjárhatatlanok a végső szekréció hipoozmotikus [14].

Az irányított elektrolittranszport feltétele, hogy a paracelluláris ionáramlást limitáló és a sejtmembrán felületét két funkcionálisan elkülönülő részre bontó szoros kapcsolatok alakuljanak ki a mirigyet alkotó sejtek között [15-17]. Az elektrolitok felvétele a sejtek bazolaterális membránján keresztül, míg azok leadása a lumen felé az apikális felszínen történik. A acináris szekréció során az anionok a sejteken keresztül, aktív transzportfolyamatok révén jutnak a nyálmirigyek lumenébe. Az apikális felszín negatív töltése maga után vonja a kationok passzív paracelluláris áramlását [16, 17]. A

nyálmirigy acinusok ennek megfelelően ún. „leaky”, tehát relatíve átteresztő epitéliumnak számítanak, mivel a paracelluláris transzport is fontos szerepet kap a szekréciós mechanizmusban. Ezzel szemben a reabszorptív funkciót betöltő dukтусsejtek jóval zártabb, ún. „tight” epitéliumot hoznak létre, az ionok visszavétele a transzcellulárisan valósulhat meg, míg folyadékviassaáramlás a lumenből a bazolaterális oldal irányába gyakorlatilag nincs [5, 16, 18].

### 2.2.1. A nyálmirigy acinusok elektrolittranszportja

Az acinusok anionszekréciójának több mechanizmusa ismert. Elsősorban  $\text{Cl}^-$  ionok, jóval kisebb részben  $\text{HCO}_3^-$  ionok bazolaterális-apikális irányú mozgása teremti meg a folyadéktranszporthoz szükséges feltételeket. Ezek a mechanizmusok egymás mellett vannak jelen egy-egy mirigyben, illetve akár egy-egy sejtben. Fontosságuk különbözhet fajok között, mirigy fajták vagy fiziológiai állapot szerint [18, 19].

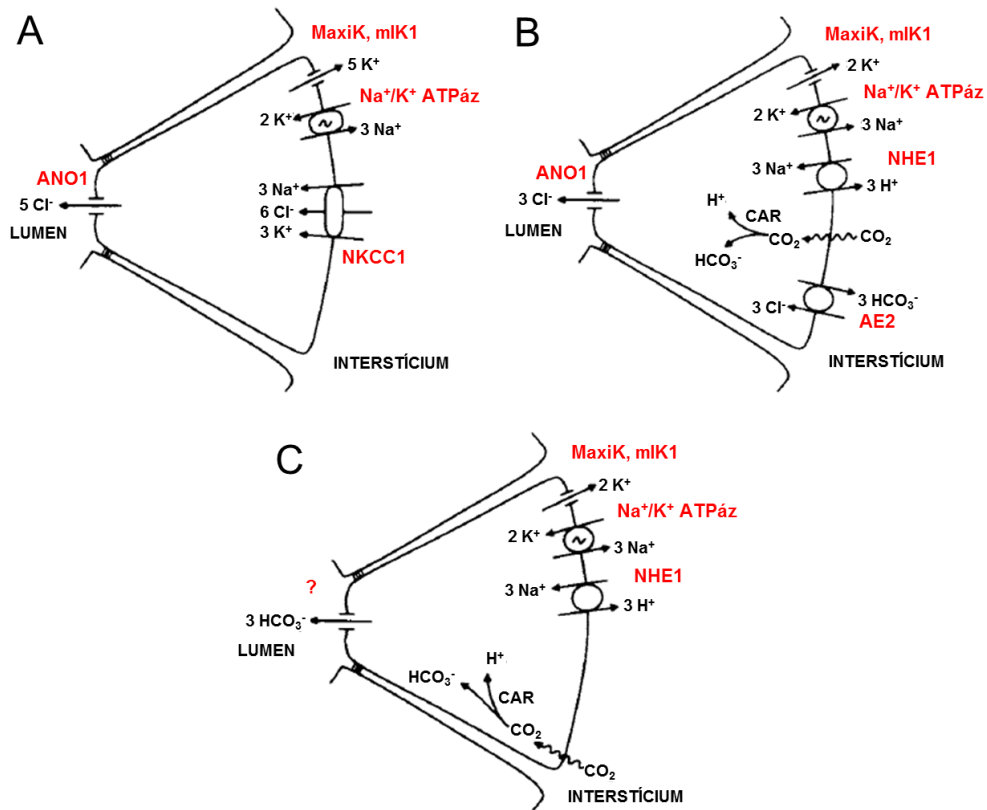
Általánosságban elmondható, hogy nyugalmi állapotban az acinus sejtek intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentrációja hozzávetőlegesen ötször magasabb, mint azt elektrokémiai egyensúlya esetén várhatnánk, ezért a  $\text{Cl}^-$  felvétele a sejtekbe energiaigényes folyamatot feltételez [19, 20]. A  $\text{Cl}^-$  ionok emelkedett koncentrációja másodlagos aktív transzport folyamatok eredménye. Az acinus sejtek bazolaterális membránjában megtalálható  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ -ATPáz a sejt belseje felé irányuló  $\text{Na}^+$  gradienst hoz létre, melyet azután több bazolaterálisan elhelyezkedő transzporter is felhasznál, hogy emelje az intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentrációt [4, 18, 21]. Ilyen az acinusok egyik karakterisztikus transzportere  $\text{Na}^+/\text{K}^+/2 \text{Cl}^-$  kotranszporter 1 (nátrium-kálium-2 klorid kotranszporter 1 vagy NKCC1), amely nevének megfelelően neutrogén, 1:1:2 arányban szállítja az ionokat a sejtbe (1. A ábra) [19]. Működését nyúl szubmandibuláris mirigyében inhibitora, a bumetanid segítségével mutatták ki [22]. Központi szerepét pedig direkt módon Evans és munkatársai bizonyították egerek parotiszát vizsgálva. Eredményeik alapján az *Nkcc1* gén deléciója a nyálszekréció több mint 60%-os csökkenését okozta [23]. Ez a kísérlet azonban annak bizonyítékaként is szolgált, hogy az acinusok elektrolitszekréciójában alternatív útvonalak is szerepet kapnak. A nyálmirigyekben a bazolaterális  $\text{Cl}^-$  felvétel másik lehetséges mechanizmusa a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők (nátrium-proton cserélő vagy NHE) és az *SLC4A* géncsalád által kódolt  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  cserélők (anion cserélő vagy AE)

együttes működésének köszönhetően valósul meg. Ennek bizonyítéka, hogy a nyáltermelés részlegesen gátolható az NHE inhibitor amilorid és az AE gátló DIDS egyidejű alkalmazásával mind nyúl, mind patkány szubmandibuláris mirigyben [22, 24, 25]. *Nkcc1* génkiütött egerek parotiszából izolált acinussejtekben is az anion cserélő aktivitás növekedését írták le [23]. Az anion cserélők  $\text{HCO}_3^-$  ionok leadása mellett  $\text{Cl}^-$  ionokat vesznek fel, a  $\text{HCO}_3^-$  leadásával fellépő savasodást pedig  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők kompenzálják, kihasználva a sejt belseje felé irányuló  $\text{Na}^+$  gradienst. Ezek az ioncserélők tehát a  $\text{Cl}^-$  ionok transzportja mellett az intracelluláris pH szabályozásában is fontos szerepet töltenek be. Nyálmirigyekben a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők közül az NHE1 izoformát, míg az anioncserélők családjából az AE2 izoformát azonosították. Mindkettő érzékeny az intracelluláris pH kismértékű változásaira (1.B ábra) [26].

A nyálmirigy acinus sejtek  $\text{HCO}_3^-$  szekréciója jóval kisebb jelentőségű. A  $\text{HCO}_3^-$  ionok forrása a sejtmembránon keresztül szabadon átjutó  $\text{CO}_2$ , mely vízzel reakcióba lépve szénsavvá alakul, ennek átalakulását  $\text{H}^+$  és  $\text{HCO}_3^-$  ionokká pedig szénsav-anhidrázok (CAR) katalizálják (1. C ábra) [19, 27].

A felhalmozott anionok kilépése a lumenbe  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta  $\text{Cl}^-$  csatornákon (CaCC) keresztül valósul meg. A  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta  $\text{Cl}^-$  csatornák molekuláris identitása sokáig kérdéses volt, azonban úgy tűnik, hogy a nyálmirigyekben ezt a szerepet a TMEM16a/Anoctamin 1 (ANO1) tölti be, mely nagy mennyiségben megtalálható az apikális membránban [28, 29]. *Tmem16a*<sup>-/-</sup> génkiütött egerekben kimutatható volt a  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta  $\text{Cl}^-$  áramok hiánya a nyálmirigy acinusokban [30], siRNS interferenciával pedig bizonyították, hogy a csatorna hiányában a nyálmirigy szekréció csökken [29]. A stimuláció hatására lumenbe áramló  $\text{Cl}^-$  ionok az apikális membrán negatív töltését eredményezik, ellenben a sejteken belül a csökkenő  $\text{Cl}^-$  koncentráció miatt a citoplazma pozitívabb töltésű lesz, így a  $\text{Cl}^-$  kiáramlás önmagában gyorsan leállna. Ezért a  $\text{Cl}^-$  ionok apikális távozása mellett, azzal egy időben,  $\text{K}^+$  ionok áramlanak ki, így fenntartják a  $\text{Cl}^-$  efflux elektrokémiai hajtóerejét (1. A és B ábra) [18-20, 27, 31-33]. Patch clamp vizsgálatok alapján az acinussejtekben két meghatározó  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta  $\text{K}^+$  csatorna van jelen, ezek egyike a *Kcnma1* gén által kódolt,  $\text{Ca}^{2+}$  és feszültség függő nagy konduktivitással jellemezhető MaxiK, míg a másik a *Kcnn4* gén által kódolt idő- és feszültség-független, közepes vezetőképességű mIK1 [34-39]. Géndelációs kísérletek alapján a nyálmirigy acinusok a  $\text{K}^+$  csatornák tekintetében meglehetősen plasztikusak,

csak a két csatorna együttes kiütése eredményezett jelentős zavart a szekrécióban (1. A, B és C ábra) [32, 37, 38, 40].



**1. ábra: A nyálmirigy acinusok elektrolittranszport mechanizmusai.** A) A  $\text{Cl}^-$  felvétel legfontosabb útvonala  $\text{Na}^+/\text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$  kotranszporteren (NKCC1-en) keresztül, B) Alternatív  $\text{Cl}^-$  transzport  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélő (NHE1) és anion cserélő (AE2) együttműködésével, C) A  $\text{HCO}_3^-$  szekréció lehetséges mechanizmusa. A sejtbbe diffundált  $\text{CO}_2$  átalakulását szénsav-anhidráz (CAR) katalizálja. A folyamat energiaigényét minden esetben a  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPáz}$  fedezi, az általa létrehozott  $\text{Na}^+$  gradienst használják fel a bazolaterális oldal transzporterei. Az apikális oldalon a  $\text{Cl}^-$  ionok  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta  $\text{Cl}^-$  csatornán (ANO1) távoznak, míg a bazolaterális oldalon megnyíló  $\text{K}^+$  csatornák (MaxiK, mlK1) biztosítják a  $\text{Cl}^-$  ionok távozásához szükséges elektrokémiai gradiens fenntartását. Átdolgozott ábra, melynek eredetije R. James Turner és munkatársai közleményéből származik [19].

## 2.2.2. Folyadékszékrció a nyálmirigy acinusokban

Az acinus sejtek aktív iontranszportja révén a lumenben megnő a NaCl koncentrációja, mely ozmotikus hajtóerőt biztosít a folyadéktranszport számára. Vízmozgás a ductuszokban gyakorlatilag nincs. A korai epiteliális transzport modellek paracelluláris

vízmozgást feltételeztek, azonban az aquaporin (AQP) vízcsatornák felfedezésével világossá vált, hogy a helyzet korántsem ennyire egyszerű. Úgy tűnik, hogy bár a nyálmirigyekben a folyadék jelentős része a paracelluláris útvonalon keresztül éri el a lument [41, 42], mégsem ez a mechanizmus felelős a nyálszekréció legnagyobb részéért. A humán nyálmirigyek epitél sejtjei számos AQP csatornát expresszálnak (AQP3, 4, 5, 6 és 7). AQP3-at találtak az acinusok bazolaterális membránjában, AQP4 detektálható mRNS szinten, azonban a fehérje jelenlétét nem igazolták, AQP6 és 7 pedig szintén mRNS szinten volt kimutatható a szubmandibuláris nyálmirigyben [43-45]. A legnagyobb jelentősége azonban egyértelműen az apikális lokalizációjú AQP5-nek van [46]. *Aqp5*<sup>-/-</sup> géntípusú egerekben több mint 60%-kal csökkent a nyálszekréció, mely arra utal, hogy a vízmozgás jórészt transzcelluláris, regulált útvonalon történik [46-50]. Stimuláció hatására az AQP5 kihelyeződése az apikális membránfelszínre fokozódik, ennek a mechanizmusnak a sérülését írták le a szájszárazsággal párosuló autoimmun Sjögren-szindrómában [51, 52]. Mindezek mellett úgy tűnik, az AQP5 szerepet játszik a paracelluláris permeabilitás szabályozásában is. Deléciója következtében a szoros kapcsolatok integritása sérül, ami csökkent vízpermeabilitással jár [53]. A para- és transzcelluláris útvonal hozzájárulása a folyadékszekrécióhoz tehát továbbra sem tisztázott.

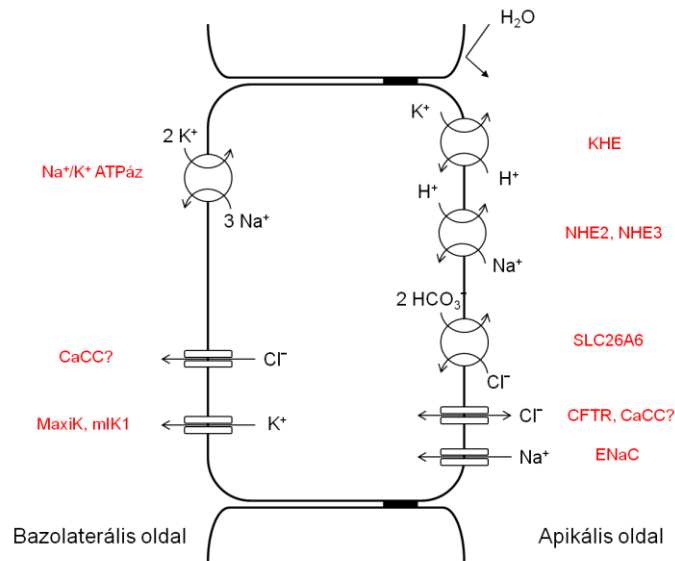
### 2.2.3. Reabszorpció a nyálmirigy duktuszokban

A duktuszok elsődleges feladata a Na<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> reabszorpció, ezek működéséről jóval kevesebbet tudunk [20]. A Na<sup>+</sup> ionok visszavételében apikális csatornák (ENaC: epithelial sodium channel) játszanak kulcsszerepet. Bár a lumenális membránban a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> cserélők 2-es és 3-as formája (NHE2 és NHE3) is megtalálható, ezek együttes deléciója sem befolyásolja a duktális Na<sup>+</sup> reabszorpciót. Ezzel szemben az ENaC inhibitorával, amiloriddal a Na<sup>+</sup> és Cl<sup>-</sup> reabszorpció gátolható. A sejtek alacsony intracelluláris Na<sup>+</sup> koncentrációját a bazolaterálisan elhelyezkedő Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPáz működése biztosítja, az apikális Na<sup>+</sup> csatornák megnyílása esetén így adottak a feltételek a Na<sup>+</sup> ionok beáramlásához, ezen kívül a bejutott Na<sup>+</sup> kipumpálásáról gondoskodik [20, 54-57].

Az apikális Na<sup>+</sup> csatornák megnyílása a membrán depolarizálódását eredményezi, így megkönnyítve a negatív ionok belépését a sejtbe. Az acinusoktól eltérően a duktuszok

bazolaterális membránja nem tartalmaz olyan transzportereket, melyek képesek lennének növelni az intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentrációt, így itt a  $\text{Cl}^-$  ionok az apikálistól a bazolaterális membrán irányába átáramolhatnak a sejteken [20]. A folyamatban résztvevő  $\text{Cl}^-$  csatornákról azonban kevés információval rendelkezünk. Immunhisztokémiával a cisztikus fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) apikális lokalizációja mutatható ki nyálmirigy duktuszban [55, 58, 59]. Funkcionális vizsgálatok alapján is az feltételezhető, hogy a CFTR nagyban hozzájárul a  $\text{Cl}^-$  felvételéhez az apikális oldalon [59-61]. Ezzel szemben még mindig ismeretlen a bazolaterális oldali  $\text{Cl}^-$  leadásért felelős csatorna. Elektrofiziológiai vizsgálatok alapján a cAMP aktivált CFTR-re jellemző áramok mellett  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta ionáramok is mérhetőek nyálmirigy duktuszokban, így valószínűsíthető, hogy  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta  $\text{Cl}^-$  csatornák is részt vesznek a folyamatban [20, 59, 61, 62]. A  $\text{Cl}^-$  ionok kiáramlását MaxiK és mIK1  $\text{K}^+$  csatornák megnyílása segíti, akár csak az acinus sejtek esetén. Mindezek alapján a duktuszok membrán potenciáljának oszcillálnia kell (néhány millivoltnyi eltérés már elegendő) annak megfelelően, hogy a  $\text{Cl}^-$  felvételéhez az apikális vagy leadásához a bazolaterális oldalon kell-e kedvező feltételt teremtenie [20]. A duktuszok a NaCl reabszorpció mellett módosítják is a nyál összetételét, főként  $\text{K}^+$  és  $\text{HCO}_3^-$  tartalmát növelve. Ennek megfelelően  $\text{K}^+/\text{H}^+$  cserélők (kálium-proton cserélő vagy KHE), valamint az *SLC26A* géncsalád által kódolt anioncserélők is megtalálhatóak az apikális membránon [20]. Az *SLC26A6* a nyálmirigy duktuszok legfontosabb anioncserélője [63-65], elektrogén ioncserélő, mely  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  2:1 arányú cseréjéért felelős [66, 67]. A duktuszok elektrolittranszportját mutatja be a 2. ábra.





**2. ábra: A nyálmirigy duktusok fontosabb csatornáit és transzportereit.** A reabszorpcióban kulcsszerepet betöltő epiteliális Na<sup>+</sup> csatorna (ENaC) és Cl<sup>-</sup> csatorna (CFTR) mellett, a duktusokban megtalálhatóak a K<sup>+</sup> és HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióban résztvevő ioncserélők is (KHE, SLC26A6). A duktusok vízre nézve gyakorlatilag átjárhatatlanok. Saját ábra.

#### 2.2.4. A folyadékszekeráció szabályozása

A nyálmirigyek folyadék- és elektrolitszekréciójáért elsősorban a Ca<sup>2+</sup> mediált jelátviteli út felelős, míg a fehérjeszekréció esetén a cAMP mediált út dominál. A folyadékszekeráció különböző receptorokon keresztül aktiválható, ezek közül a legfontosabb az M3 muszkarinos acetil-kolin receptor, melynek hiányában a szekréció drámaian lecsökken [68, 69]. Ezzel szemben más muszkarinos acetil-kolin receptorok (M1, M2, M4, M5) deléciója csekély hatással bír [68]. A szájszárazság kezelésére jelenleg elérhető pilocarpine is muszkarinos acetil-kolin receptoron keresztül hat. Az acetil-kolin receptorok mellett  $\alpha$ -adrenerg, P anyag (substance P), valamint P2Y és P2X nukleotid receptorok is szerepet kapnak a Ca<sup>2+</sup> mobilizációban. Mint számos más epithélium esetén, nyálmirigy acinusokban is kimutatták a Ca<sup>2+</sup> és cAMP mediált jelátviteli utak szinergizmusát, melyek együttes aktivációjának hatására a szekréció jelentősen növelhető [6, 70, 71].

## **2.3. A nyálmirigy hipofunkció és kezelésének új lehetőségei**

### **2.3.1. Fej-nyaki daganatok sugárkezelése és Sjögren-szindróma**

A nyálmirigy hipofunkció felléphet bizonyos gyógyszerek vagy szisztémás betegségek hatására is azonban leggyakrabban az autoimmun Sjögren-szindróma, valamint a fej-nyaki daganatok sugárkezelése következtében alakul ki [13]. A Sjögren-szindróma olyan krónikus autoimmun betegség, mely elsősorban a nőket érinti, incidenciája 9:1 arányú nők és férfiak körében. A kórképre jellemző, hogy az exokrin mirigyekben, elsősorban nyál- és könnymirigyekben limfocita beszűrődés látható [72]. Megkülönböztetünk primer és szekunder Sjögren-szindrómát. Míg az előbbinél a betegség önmagában van jelen, utóbbinál valamely más autoimmun betegséghez, például sokizületi gyulladáshoz (rheumatoid arthritis) vagy szisztémás lupusz eritematózusshoz társul. Kiváltó oka ismeretlen, multifaktoriális betegségnek tartják, azonban úgy tűnik az epitél sejtek aktivációja kulcs szerepet tölt be a patogenezisben [1, 73-75]. Jellemző rá az AQP5 abnormális lokalizációja nyálmirigyekben, mely jelenléte Sjögren-szindrómában elsősorban a bazolaterális membránban kimutatható az apikális oldal helyett, emellett változhat a csatorna expressziója és sejten belüli elosztása, membránfelszínre való kihelyeződése is [52, 54, 76-78].

A fej-nyaki daganatok a hatodik leggyakoribb ráktípusnak számítanak, 95%-ban laphám sejtekből indulnak ki és közéjük tartoznak az orrüreg, a szinuszok, szájüreg, a gége, a garat és a nyelőcső tumorai [79]. Évente közel 500 000 új beteget diagnosztizálnak világszerte [79]. Kezelésükben a műtét mellett fontos szerepe van a besugárzásnak is, mivel azonban a nyálmirigyek acinus sejtjei a sugármezőben helyezkednek el, súlyosan károsodnak a sugárterápia során [80]. Ennek köszönhető, hogy a betegség kezelésének leggyakoribb szövődménye a szájszárazság, mely kérdőíves felmérések alapján az esetek 90%-ában jelentkezik [81]. Az acinusok pusztulásával járó mechanizmus jelenleg nem tisztázott [3].

Bár a kiváltó okok eltérőek, a nyálmirigy hipofunkció és a következményes szájszárazság kialakulásának hátterében a nyálmirigy acinusok funkcióvesztése áll, míg a kevésbé érzékeny duktális rendszer intakt marad [12, 13, 82-84]. Jelenleg hatékony terápia nem áll rendelkezésre. A megelőzésben szerepet játszhat az intenzitás modulált

sugárkezelés, tüneti kezelést jelentenek a műnyálak, valamint a pilocarpine alkalmazása, mely utóbbi azonban túlélő acináris sejteket feltételez [85-92].

### **2.3.2. Új kezelési lehetőségek – transzdifferenciáció, őssejtek, génterápia, mesterséges nyálmirigy**

Új lehetőséget kínálnak a nyálmirigy hipofunkció kezelésére a biológiai terápiák. Ezek kulcseleme, hogy olyan funkcionális szekretoros egységet hozzanak létre, mely szükség esetén képes további gyógyszeres kezelésre reagálni vagy génterápiával működése befolyásolható. A legfontosabb irányvonalakat a dukális-acináris transzdifferenciáció, az őssejtek, valamint a génterápia kutatása jelentik. Ezek kombinációja pedig elvezethet akár egy mesterséges nyálmirigy megalkotásához is, mely felhasználja a beteg saját sejtjeit, melyeket a besugárzás előtt eltávolítanak, majd megfelelő hordozóra ültetve, a szükséges növekedési faktorokkal kezelve, esetleg génterápiával módosítva visszaültetés után nyálszekrécióra alkalmas eszközként funkcionál [13, 93-99].

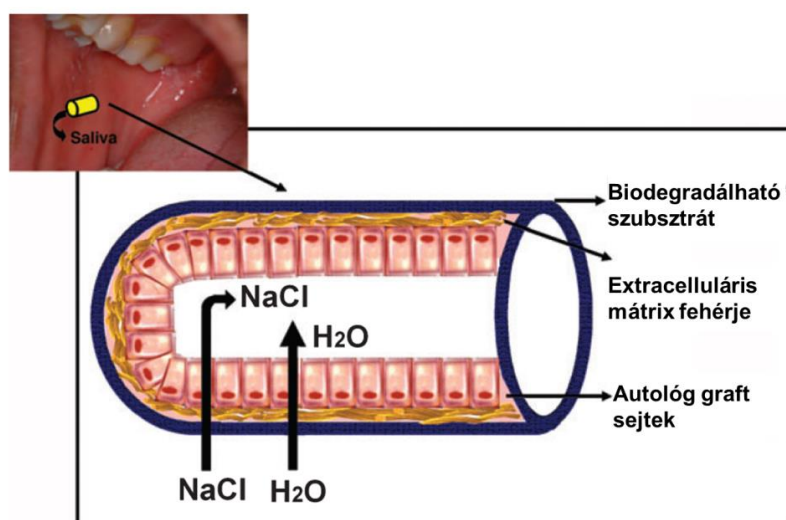
Izolálást követően a nyálmirigy sejtek gyorsan dedifferenciálódnak, ami az extra- és intracelluláris kommunikáció, úgymint növekedési faktorok és az idegi stimuláció hiányából fakad. *In vitro* a sejtek leginkább dukális tulajdonságokat mutatnak [100, 101]. A nyálmirigyek fejlődésében, elágazódási folyamataiban fontos szerepet tölt be a mesenchima által termelt extracelluláris mátrix, valamint annak szelektív degradációja. A differenciálódási kísérletekhez ezért gyakran használnak magas extracelluláris fehérje tartalmú ún. bazális membrán extraktumokat (pl. BME, Matrigel). Ezek egyik legfontosabb bioaktív komponense a laminin, emellett pedig nagy mennyiségben tartalmaznak kollagén IV-et és heparán-szulfátot, valamint változó mennyiségben növekedési faktorokat [102, 103]. Bazális membrán extraktumok felhasználásával számos sejtvonal (HSG, Par-C10), valamint primer humán nyálmirigy kultúrák esetén is acinus-szerű struktúrák kialakulását és acináris irányú differenciálódást írták le [102, 104-108]. Mivel azonban a bazális membrán extraktumok tumoros sejtvonalak termékei, klinikai alkalmazásuk nem biztonságos [102, 103, 108]. Éppen ezért egyéb differenciálódást elősegítő hordozók (scaffold) kutatása zajlik, ilyen potenciális hordozók lehetnek a fibrin hidrogélek [109, 110] vagy a humán extracelluláris peptid fragmentum, a perlacan domian IV (PLNDIV) [111].

Transzplantált nyálmirigy epitél sejtek és csontvelői eredetű őssejtek szintén fokozhatják a besugárzás által károsodott mirigyek szekrécióját [112, 113]. A transzplantált nyálmirigy sejtek acináris irányba differenciálódhatnak [112, 114], bár úgy tűnik nem a direkt acináris differenciáció vagy duktális-acináris transzdifferenciáció a funkcionális regeneráció fő mechanizmusa. Hasonló eredmény érhető el nem nyálmirigy eredetű sejtek, úgymint mezenchimális eredetű őssejtek (MSC) alkalmazásával is [113], sőt sejt lizátumokkal is [115]. Ezek alapján elmondható, hogy a sejtekből származó szolubilis faktoroknak fontos szerepe van az acinussejtek regenerációjában és/vagy az apoptózis gátlásában [115].

A génterápiás kísérletek alapvetően abból indulnak ki, hogy az acináris szekréció hiányában a ductuszok képesek lehetnek ozmotikus gradiens létrehozására a vízmozgás számára. Mivel az acinusokból nem kerülnek elektrolitok a ductusz rendszerbe, a reabszorpció leáll és a ductuszok  $K^+$ , illetve  $HCO_3^-$  szekréciós mechanizmusa jut elsődleges szerephez. Ilyen körülmények között vízcsatornák beépítése - a máskülönben folyadék tekintetében impermeábilis - ductuszsejtekbe megteremtheti a folyadéktranszport lehetőségét [95, 116]. Mivel a nyálmirigyek jellemző vízcsatornája, az AQP5 polarizált eloszlást mutat, ezért a génterápiás kutatások során az AQP1-et részesítették előnyben, mely transzdukciót követően a sejtek bazolaterális és apikális membránjában egyaránt megjelenik, így biztosítva a transzcelluláris vízpermeabilitást. Először patkányok, majd mini malacok besugárzott nyálmirigyét kezelték humán AQP1-et kódoló 5-ös szerotípusú adenovírusokkal. Mindkét állatmodell esetében a besugárzást követően jelentősen csökkent a nyálszekréció, azonban a génterápiát követően, igaz tranziens, de közel normál mennyiségű szekréciót figyeltek meg, miközben a kontrol vírusnak nem volt hatása [116, 117]. Később 2006-ban, indult el az első humán fázis I klinikai vizsgálat, mely szintén humán AQP1-et kódoló adenovírust alkalmazott [118].

A mesterséges nyálmirigy az előbbieken ismertetett stratégiák ötvözésével kialakított, szájnyálkahártya alá beültetett eszköz lehet. Fő alkotóelemei egy biodegradábilis hordozó, az erre rávitt extracelluláris mátrix, végül a beteg saját nyálmirigyéből nyert sejtek/progenitorok. A megfelelő sejtpopuláció és extracelluláris mátrix komponensek megtalálásával a sejtek differenciált állapota elérhető, míg génterápiás beavatkozással például folyadékszekréciós képességük fokozható lehet (3. ábra) [94]. A HSG volt az

első ilyen célból tanulmányozott sejtvonal, mely azonban képtelen volt szoros kapcsolatok és kontrollált folyadéktranszport létrehozására [119]. Azóta számos módszer látott napvilágot, mely primer nyálmirigy sejtkultúrák létrehozására használható. Az izolálást követő napon a nyálmirigyek mezenchimájából származó fibroblasztok már letapadnak, míg a lassabban letapadó epitél sejtek még lebegnek a tenyésztőedényben. Ilyen lebegő epitél sejtekből alakították ki a huSMG (human submandibular gland) és a huSG (human submandibular or parotid gland) tenyészeteket, míg a PT-HSG (primary total human salivary gland) tenyészet mind a letapadó, mind a lebegő sejteket felhasználva vegyes epiteliális-mezenchimális tenyészetként jellemezhető [96, 107, 120]. Ezek a sejtek már képesek szoros kapcsolatok, funkcionális epitél barrier kialakítására, azonban felhasználhatóságukat korlátozza, hogy elsősorban duktális tulajdonságokat mutatnak [96, 104, 107, 108].

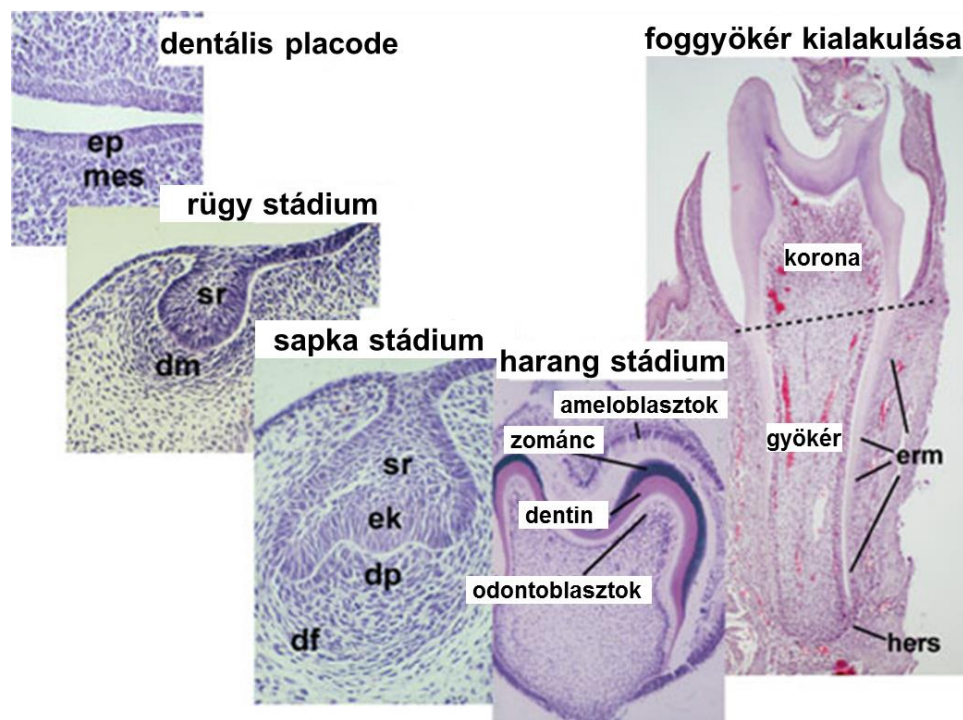


**3. ábra: A mesterséges nyálmirigy koncepciója.** A mesterséges nyálmirigyet az egyik végén zárt csőként képzelhetjük el. Három fő komponense a biodegradábilis hordozó, melyet a lumen felől extracelluláris mátrix fehérjék borítanak. Ezen helyezkednek el a betegtől származó sejtek, melyek polarizáltak és képesek a lumen felé irányuló ozmotikus gradienst kialakítani. A víztranszportot elősegítendő, a sejtek apikális felszíne vízcsatornákat tartalmaz. Az eszköz sebészetileg kerülne beültetésre a száj nyálkahártyájában kialakított üregbe. Forrás: Bruce J. Baum és Simon D. Tran [94].

## 2.4. A fogfejlődés

Fogaink ektodermális eredetű epitél sejtekből, valamint ideglemez (crista neuralis) eredetű, transzdifferenciálódáson átesett mezenchimális sejtekből fejlődnek. Sok más szervhez hasonlóan a differenciációt az epitélium és a mezenchima kölcsönhatásai

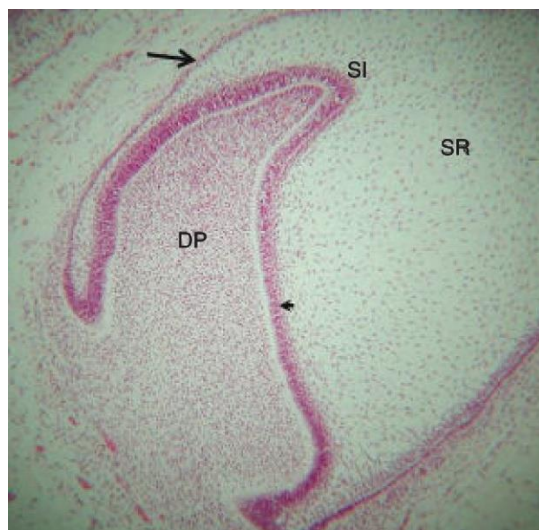
vezetik [121, 122]. A fogfejlődés első jeleként az epitél sejtekből kialakult foglemez megvastagszik a későbbi fogaknak megfelelő helyeken [123, 124]. Ezt követően az epitélium benyomul az alatta fekvő mezenchimába rügy, majd később sapka, illetve harang alakot felvéve, erről kapták nevüket a fogfejlődés egyes stádiumai is [125]. A harang fázis végére alakul ki a korona, ebben a stádiumban jelennek meg az ameloblasztok, melyek a zománc, valamint az odontoblasztok, melyek a dentin képzéséért felelősek. A foggyökér csak a korona kialakulását követően indul fejlődésnek [126] (4. ábra).



**4. ábra:** A fogfejlődés fontosabb stádiumainak szövettani képe. A foglemez megvastagodása (dentális placode) jelzi a fogfejlődés megindulását. Ezt követően az epitélium benyomul a mezenchimába, kialakítva a fog rügyet vagy fog bimbót. A sapka stádiumban alakul ki a fogcsíra, valamint funkcionálisan kezdenek elkülönülni a zománcszervet és dentális mezenchimát alkotó sejtípusok. A harang fázisban indul meg a korona kemény szöveteinek mineralizációja a dentális papillából differenciálódott odontoblasztok és a belső zománchából differenciálódott ameloblasztok által. A korona formálódását követően alakul ki a foggyökér. Jelölések: ep: epitélium, mes: mezenchima, sr: reticulum stellatum, dm: dentális mezenchima, dp: dentális papilla, df: dentális folliculus, ek: enamel knot, szignalizációs központként szolgáló, megvastagodott területek a zománcszervben, erm: Malassez-féle sejtek, hers: Hertwig-féle hámhüvely, ezekről a következőekben esik majd szó. Forrás: Irma Thesleff és Mark Tummers [125].

Az epitél és mezenchimális sejtek differenciálódása már a fogfejlődés igen korai szakaszában megindul. A mezenchimába betüremkedő epitélium belsejében kialakul egy

csillag alakú sejtekből álló réteg, a reticulum stellata, melynek elsődleges funkciója az epitélium széli részein elhelyezkedő sejtek tápanyagellátása. A rügy körül a mezenchima kondenzálódik, így elkülönülve a környezetétől, létrehozva a dentális mezenchimát [125]. A sapka stádiumban már fogcsírákról beszélhetünk, az epitéliumból létrejött sapka alakú képződményt pedig zománcszervnek nevezzük. A zománcszerv egyes részeken megvastagszik (enamel knot), ezek a területek szignalizációs központokként szolgálnak [127]. Elkülönülnek továbbá a mezenchima egyes területei, az epitélium által körülvevett sejteket dentális papillának nevezzünk és a későbbiekben a pulpa, valamint a dentin kialakulásában lesz szerepük. A széli részeken elhelyezkedő sejtek alkotják a dentális folliculust (fogzacskót), dentális folliculus eredetű a fogak cement rétege és a parodontális ligamentum is [125]. A harang stádium elejére a zománcszerv már négy rétegből áll: belsejét még mindig a retikulum stellata sejtek alkotják, a dentális papilla és a zománcszerv határán található a belső zománchám, a belső zománchám és a retikulum stellata között egy átmeneti sejtréteg a stratum intermedium figyelhető meg, míg a zománcszerv legkülső rétege a külső zománchám (5. ábra) [128].



**5. ábra:** *A zománcszerv négy rétege a harang fázis kezdetén. Nyíl mutatja a külső, míg nyílhegy a belső zománchámot. SR: retikulum stellata sejtek, SI: stratum intermedium, DP: dentális papilla. Forrás: Alastair J. Sloan [129].*

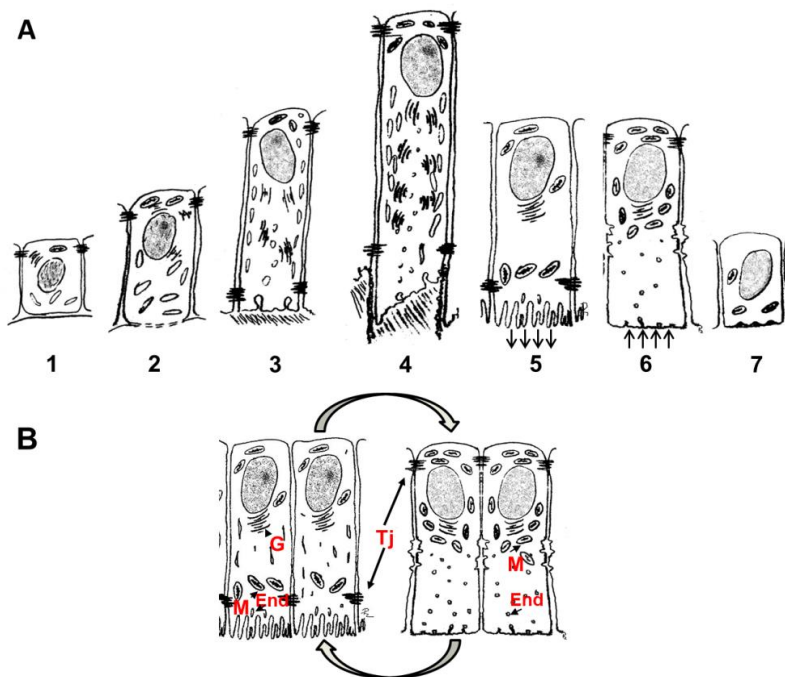
A harang fázis során a belső zománchám sejtjei ameloblasztokká, míg a velük szemközt elhelyezkedő mezenchimális sejtek odontoblasztokká differenciálódnak és megkezdik a fogkorona keményszöveteinek mineralizációját [126]. A sapka és harang stádiumokban

jelenik meg a cervikális hurok (cervical loop) is zománcszerv csúcsi részén, a külső és belső (dentális papilla felé néző) zománchám találkozásánál, melyet egyfajta összejt niche-nek tekintenek, és mely folyamatosan növekvő fogak, például rágcsálók metszőfogai esetében aktív marad [130-132]. Nem folyamatosan növekvő fogak esetében a gyökér növekedés megindulásakor a cervikális hurok átalakuláson megy keresztül. Az epitélium közepén elhelyezkedő retikulum stellata sejtek eltűnnek, a külső és belső zománchám összesimul, ezt nevezzük Hertwig-féle hámhüvelynek (HERS), ez fogja vezetni a gyökér növekedését [126] (4.ábra). A HERS belső sejtjei nem differenciálódnak ameloblasztokká, de képesek indukálni a mellettük fekvő dentális papilla sejtjeit, melyek odontoblasztokká differenciálódnak és kialakítják a gyökér dentint. Amint a dentin szekréciója megindul, a HERS fragmentálódik, így a gyökérfelszín érintkezik a dentális folliculus sejtjeivel, melyek cementoblasztokká differenciálódnak és nevének megfelelően a cementréteg kialakításáért felelősek. A fennmaradó HERS fragmentumokból alakulnak ki a gyökeret fedő, hálózatosan elhelyezkedő Malassez-féle sejtek [126, 129].

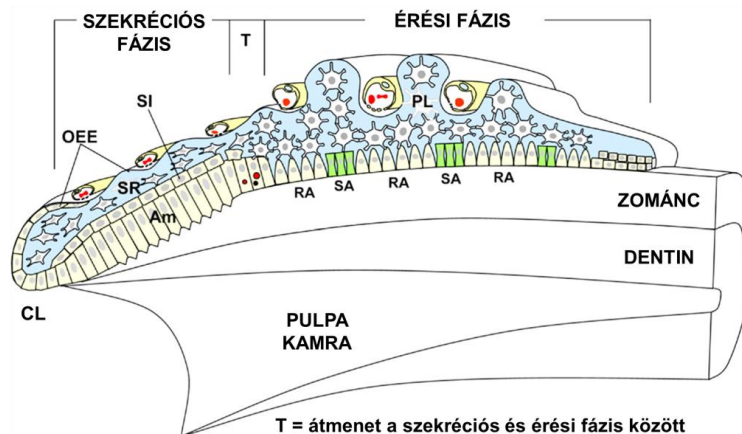
## **2.5. Az amelogenezis**

Hasonlóan más epitel szekrétrumokhoz a zománc keletkezése is kétlépcsős folyamat eredménye. Az első lépésben egy kevésbé mineralizált mátrix struktúra alakul ki (szekréciós fázis), míg a második lépcsőben ez a szerkezet alakul át, a mátrix fehérjék eltűnnek, míg az ásványi anyag tartalom rendkívüli mértékben megnő (érés fázis) [133]. A harang stádium elején a belső zománchámából differenciálódó ameloblasztok ennek megfelelően számos funkcionálisan és morfológiailag különböző alakot vesznek fel életciklusuk során [134-136]. Megkülönböztetünk morfogénikus, induktív, korai szekréciós, késői szekréciós, fodros felszínű érési, sima felszínű érési, valamint protektív ameloblasztokat. A sejtek átalakulása szigorú időrend szerint történik, mivel minden ameloblaszt formának fontos szerepe van az amelogenezis meghatározott fázisában [137] (6.ábra). A rágcsálók folyamatosan növésben lévő metszőfogain ezek az átalakulások térben vizsgálhatók, a fogfelszín mentén (7. ábra) [136, 138].





**6.ábra:** Az ameloblasztok morfológiai és funkcionális változásai az amelogenezis során. A) Az ameloblasztok életciklusuk során folytonos strukturális átalakuláson mennek keresztül aktuális feladatuknak megfelelően, szigorú időrendet követve. 1. morfogenetikus, 2. induktív, 3. korai szekréciós, 4. Szekréciós, 5. fodros felszínű érési fázisú, 6. sima felszínű érési fázisú, 7. protektív ameloblaszt. B) Az érési fázisban az ameloblasztok oda-vissza alakulása figyelhető meg a fodros és sima felszínű forma között, miközben citoplazmájuk és szoros kapcsolataik is átrendeződnek. (G) Golgi apparátus, (Tj) szoros kapcsolatok, (M) mitokondriumok (End) endoszómák [139].



T = átmenet a szekréciós és érési fázis között

**7. ábra:** Ameloblasztok patkány metszőfog mentén. Az ameloblasztok a rágcsálók folyamatosan növekvő metszőfogaiban nem tűnnek el, az egyes alakok a fog mentén haladva térben elkülöníthetők. (CL): cervikális hurok, (OEE): külső zománchám, (SR): retikulum stellata, (SI): stratum intermedium, (Am): szekréciós ameloblaszt, (RA): fodros felszínű ameloblaszt, (SA): sima felszínű ameloblaszt, (PL): papilláris réteg. Az ábrán bemutatott ameloblaszt formák részletes leírása a következő fejezetekben olvasható. Forrás: Kaj Josephsen és munkatársai [140].

### 2.5.1. Pre-szekréción ameloblaszt formák

A szekréción megindulása előtt a morfogénikus fázisban kezdődik meg a belső zománchám sejtjeinek differenciálódása, szövettani képen köbös sejtek láthatóak, melyeket bazális membrán választ el a mezenchimától. Ezek a pre-ameloblasztok fogják indukálni a velük szemközt elhelyezkedő dentális papilla sejtjeit, hogy azok odontoblasztokká differenciálódjanak. A következő fázisban a sejtek megnyúlnak, felkészülnek a fehérjeszintézisre, sejtalkotóik átrendeződnek. Az bazális membrán fragmentálódik, majd teljesen eltűnik a dentin első rétegének (mantle dentin) lerakása alatt. Az ameloblasztok között juncionális komplexek alakulnak ki mind a proximális (a stratum intermedium felé néző), mind a disztális (a zománc felé néző) oldalon (6. ábra) [126].

### 2.5.2. A szekréción fázis

A szekréción fázisban az ameloblasztok hosszú, oszlopos sejtek, aktív szintézist folytatnak, így mitokondriumokban gazdagok, kiterjedt endoplazmás retikulummal és Golgi apparátussal rendelkeznek [136]. A szomszédos sejtek mind disztális, mind proximális végükön egymáshoz kapcsolódnak [141], disztális (a szekréción szempontjából elnevezése apikális) végükön Tomes nyúlvány látható, mely az intenzív transzportfolyamatok számára biztosít felületet (6. ábra) [126]. Az szekréción fázisú ameloblaszt sejtek a kristályosodáshoz szükséges  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{PO}_4^{3-}$  ionokat szekretálnak a mineralizációs térbe, ennek molekuláris mechanizmusa azonban csak részben ismert [137, 140]. A kristályképződés mátrix fehérjéken indul meg, melyeket szintén a szekréción fázisú ameloblasztok termelnek. A legfontosabb mátrix fehérjék az amelogenin, az ameloblasztin és az enamelin, melyek közül az amelogenin van jelen a legnagyobb mennyiségben [142-144]. Az amelogenint két gén, az *AMELX* és *AMELY* kódolja, melyek közül az *AMELX*-ről szignifikánsan több fehérje keletkezik. Az amelogenin kis globuláris fehérje formájában szintetizálódik, az egyes fehérjék ezt követően nanoszférákká állnak össze [145], melyek egymással interakcióba lépve rácsszerkezetet formálnak és távtartóként funkcionálnak a keletkező kristálykötegek között [144, 146-149]. A szekréción fázis végére a zománc teljes szélessége kialakul,

azonban csak mintegy 30%-ban mineralizált, hosszú, keskeny párhuzamos hidroxipapatit kristályok alkotják [150, 151], melyek közt a teret mátrix fehérjék, főként amelogeninek töltik ki.

### 2.5.3. Az érési fázis

A zománc teljes szélességének kialakulása után kezdődik meg annak átépülése, nagyfokú mineralizációja, melyet érési fázisnak nevezünk. Az ameloblasztok ebben a fázisban kétféle morfológiát vesznek fel, melyek ciklikusan alakulnak át egymásba: ezek a fodros felszínű és sima felszínű ameloblaszt formák [152-154]. Patkányokban a ciklus hossza nyolc óra, a sejtek körülbelül négy órán át fodros felszínű alakot vesznek fel, majd két órára átalakulnak sima felszínűvé, a maradék két órában pedig a fodros felszín fokozatos visszaépítése történik [155]. A kétféle sejtípus szoros kapcsolatai is átrendeződést mutatnak, míg a fodros felszínű ameloblasztok szoros kapcsolatai a zománc felé eső (apikális) oldalon, addig a sima felszínű ameloblasztok szoros kapcsolatai a bazális oldalon találhatóak (6. ábra) [133, 140]. A ciklikus átalakulásnak funkcionális oka van, az ameloblasztoknak ugyanis két fontos feladata van ebben a szakaszban. Egyfelől  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{PO}_4^{3-}$  ionokat kell szekretálniuk a mineralizációs térbe, valamint semlegesíteniük kell a nagymértékű kristályosodás során felszabaduló  $\text{H}^+$ -okat (lásd részletesen később), másfelől reabszorpciós funkciójuk is van, ekkor történik ugyanis a mátrix fehérjék degradációja és eltávolítása a zománcból [156]. Az érési fázis egyik markere az amelotin, ennek funkcióját nem teljesen értjük, a szekréción-érési fázis átmenetkor jelenik meg expressziója, amely fennmarad az érési fázis végéig, sőt azt követően a redukált zománchámban is [143]. Túltermelése elvékonyodott zománcot eredményez, a zománc prizmás szerkezete meg bomlik [157], míg hiánya elsősorban a zománc külső rétegének keménységére volt hatással [158]. A mátrix fehérjék hasításáért felelős két legfontosabb proteáz a mátrix metalloproteáz-20 (MMP20) [159], mely már a szekréción fázisban is megjelenik, valamint a kallikrein-4 (KLK4) [160], mely az érés során jelenik meg és jóval agresszívabb degradációt tesz lehetővé, mint az MMP20 [161, 162]. A szekréción fázisban kiválasztott amelogenin lebontása utat nyit a hidroxipapatit kristályok oldalirányú növekedésének, mely egészen addig folytatódik, míg gyakorlatilag a teljes mátrix struktúra lebomlik és helyét szorosan elhelyezkedő,

gyakorlatilag átjárhatatlan kristályszerkezet tölti ki. Az érési fázis végére a zománc mintegy 95-98%-ban mineralizált. Az érés folyamatában az ameloblasztok mellett, a felettük elhelyezkedő papilláris réteg sejtjeinek is fontos szerepet tulajdonítanak [137, 161]. A papilláris réteg a retikulum stellata és stratum intermedium helyén alakul ki az érési fázis során [140, 163, 164], sejtjei az ameloblasztokkal gap junction típusú kapcsolatokon keresztül kommunikálnak [140, 165].

#### **2.5.4. A védőfázisú ameloblasztok**

A zománcérés befejeztével az ameloblasztok ciklikus átalakulása abbamarad, a sejtek összehúzódnak és a papilláris réteggel együttesen egy redukált zománchámot alakítanak ki, mely megvédi a zománcot, attól, hogy cementréteg rakódjon rá (6. ábra). A zománc összetétele kis mértékben módosulhat ebben a szakaszban, például  $F^-$  épülhet be. Megfigyelések alapján azok a fogak rendelkeznek a legmagasabb  $F^-$  tartalommal, melyek a zománc teljes kialakulását követően a legkésőbb törnek elő. A fogelőtörésekor az ameloblasztok eltűnnek [126].

### **2.6. Az ameloblasztok elektrolittranszport-folyamatai**

Annak ellenére, hogy az ameloblasztok legfontosabb feladata az ásványi anyagok transzportja a mineralizációs térbe, ezekről a folyamatokról keveset tudunk és jelenlegi tudásunk is leginkább a expressziós vizsgálatokból származik, funkcionális vizsgálatokat (pl. patch clamp) az irodalomban csak elvétve találunk [166].

#### **2.6.1. Szoros kapcsolatok**

A vektoriális elektrolitszekréció feltétele a szoros kapcsolatok kialakulása, melyek korlátozzák a sejtek közötti szabad ionáramlást [15]. A szoros kapcsolatok ameloblaszt sejtek között is kialakulnak és ismert az is, hogy az egyes ameloblasztok típusok szoros kapcsolatai a sejtek más-más oldalán helyezkednek el. A szoros kapcsolatokat alkotó fehérjék molekuláris identitásáról azonban csak néhány tanulmány látott napvilágot [136].

Az occludin megjelenésének időpontja és lokalizációja változhat fog típusok, ameloblaszt formák és fajok között. Az amelogenezis korai fázisában occludin expresszióját mutatták ki a sejtek mindkét oldalán harang fázisban lévő egér és patkány őrlőfogcsírákban, differenciálódó ameloblasztokban [167, 168] és egér metszőfog szekrécios ameloblasztjainak disztális felszínén [169], ezzel szemben Inai és munkatársai patkány metszőfog szekrécios ameloblasztjaiban nem tudták detektálni [170]. A zománcképződés előrehaladottabb stádiumában proximális occludin immunpozitivitást mutattak ki patkány őrlőfogcsíra fejlettebb ameloblasztjaiban [167], illetve patkány metszőfog érett ameloblasztjaiban [168], Inai és munkatársai eredményei alapján pedig kifejezetten sima felszínű érési ameloblasztokban [170]. Más tanulmányok alapján az occludin megjelent a sejtek mindkét oldalán egér metszőfog érett ameloblasztjaiban [169], míg patkány metszőfog fodros felszínű ameloblasztjaiban változó, hol erősebb, hol gyengébb, néhol proximális, néhol disztális, összességében inkább disztális occludin immunreakciót mutattak ki [170].

A Zonula occludens-1 (ZO-1) már differenciálódó ameloblasztokban is megjelenik a sejtek mindkét oldalán és folyamatosan expresszálódik a különböző ameloblaszt alakokban egérben és patkányban, metsző és őrlőfogban egyaránt [167, 168, 170, 171], az expresszió mindkét oldalon megmarad az érettebb alakokban is, kivéve patkány metszőfog sima felszínű ameloblasztjaiban, melyeknek csak proximális vége mutatott immunpozitivitást [170]. A ZO-1 mellett ZO-2 is kifejeződik a preameloblasztok és ameloblasztok mindkét pólusán, ellenben a ZO-3 nem detektálható egér őrlőfogcsírában [168].

A claudinok közül is számos típust kimutattak. Többen publikálták a CLDN1 megjelenését rágcsálók metszőfogában, jellemzően a szekrécios [169, 170], valamint fodros felszínű érési ameloblasztok disztális végén [170, 172]. Ezen kívül emberi fogcsírában is kimutatták expresszióját [173]. A CLDN4 patkány metszőfogban szintén a fodros felszínű érési ameloblasztok disztális membránjában jelent meg elsősorban, a sima felszínű ameloblasztok csak gyenge pozitivitást mutattak [170], emberben az ameloblasztok szintén gyengén expresszálták [173], ezzel szemben egér harang fázisú őrlőfogcsírában a stratum intermediumban fejeződött ki [174]. A CLDN7 jelenlétét egér metszőfogának érési fázisú ameloblasztjaiban írták le, a sejtek mindkét oldalán megjelent, expressziójában nem volt különbség sima és fodros felszínű ameloblasztok

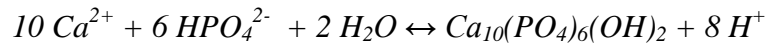
között [169], humán fogcsírában az ameloblasztok szintén erős CLDN7 festődést mutattak [173]. További claudinok expresszióját mutatták ki egerekben, a CLDN8 és CLDN9 mind szekréción, mind érési fázisú ameloblasztokban jelen volt, míg CLDN6 és CLDN10-et csak az érési fázisban találtak metszőfogban [169], őrlőfogcsírában pedig kizárólag CLDN2 expresszióját tudták kimutatni ameloblasztokban a korai harang fázis folyamán [174].

### 2.6.2. $\text{Ca}^{2+}$ transzport

A hidroxipapatit kristályok formálódásához szükséges  $\text{Ca}^{2+}$  jelenlétét az ameloblasztok aktív transzportfolyamatainak tulajdonítják, azonban még ennek a kulcsfontosságú lépésnek a molekuláris mechanizmus is igen kevésbé ismert. Még azt sem tudjuk, hogy ugyanazok a transzport folyamatok működnek-e a szekréción és érési fázis során. A  $\text{Ca}^{2+}$  transzportban feltehetően szerepe van az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  és extracelluláris  $\text{Na}^+$  cseréjének [166, 175, 176]. NCX  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cserélőket azonosítottak ameloblasztokon expressziós vizsgálatok mellett patch clamp segítségével is [166]. Hisztológiai bizonyítékok alapján érési fázisú ameloblasztokban megtalálható az újabban felfedezett  $\text{K}^+$ -függő  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  cserélő, az *SLC24A4* gén által kódolt NCKX4 fehérje is [176]. Ennek mutációi mind patkányokban [177], mind emberben [178, 179] a zománcfejlődés rendellenességeit eredményezik. Jelenleg a bazolaterális  $\text{Ca}^{2+}$  felvétel mechanizmusáról azt feltételezik, hogy más epitéliumokhoz hasonlóan a TRPV családba tartozó csatornák felelősek érte [175, 180].

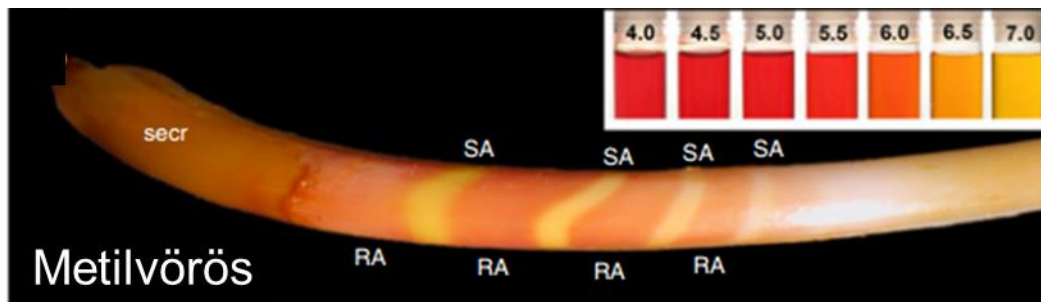
### 2.6.3. pH szabályozás az amelogenezis során I. – hipotézis és általános megfigyelések

A hidroxipapatit kristályok képződése során nagy mennyiségű proton szabadul fel, mivel a reakcióban részt vevő prekursorai – így a  $\text{HPO}_4^{2-}$  és a  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  fiziológiás körülmények között protonáltak [156, 181]. A folyamat az érési fázis során csúcsosodik ki, mivel ekkor a legnagyobb mértékű a kristályosodás. Ez jelentős mértékű savasodáshoz vezet az ameloblasztok mikrokörnyezetében. Egy mol hidroxipapatit keletkezésekor maximálisan 14 mol proton is felszabadulhat, azonban a folyamat tipikusan az alábbi reakcióegyenlettel írható le [156]



Egyensúlyi folyamatról lévén szó, pufferelés hiányában a pH emelkedése a hidroxipapatit oldódásához vezethet, ami hipomineralizált, törékeny szerkezetű zománcot eredményezne [133]. A felhalmozódott protonok távozására több elméleti lehetőség van. Ennek legegyszerűbb módja, a  $\text{H}^+$  ionok szabad diffúziója lehetne, azonban mint láthattuk, az ameloblasztok zárt réteget képeznek, közöttük szoros kapcsolatok alakulnak ki, ezzel elősegítve az irányított transzportfolyamatokat, mely a sejtek közötti ionmozgást korlátozza [133, 182]. A képződő zománc érmentes képlet, a dentin, valamint az ameloblasztok zárt rétege között helyezkedik el, így ebben a térben vér pufferkapacitása sem érvényesülhet, ezek csak a papilláris rétegben találhatóak [163, 164]. A mátrix fehérjék bázikus karakterű aminosavai is megköthetnek protonokat [181, 183], azonban ezek mennyisége az amelogenezis érési fázisa során csökken, míg végül teljesen eltűnnek a zománcból. A kristályosodás szintén ebben a fázisban gyorsul fel, így a  $\text{H}^+$  ionok felszabadulása is ekkor a legnagyobb mértékű [156]. Ezek az elméleti megfontolások vezettek ahhoz a hipotézishez, mely szerint az ameloblasztok aktív  $\text{HCO}_3^-$  transzport folyamatai felelősek a mineralizációs tér pH-jának szabályozásáért [133, 156].

Megfigyelték azt is, hogy az érési fázisban a rágcsálók metszőfogának zománca széles savas, valamint keskenyebb neutrális sávokat tartalmaz [155, 184], melyek pH indikátor festékekkel tehetővé láthatóvá (8. ábra) [140, 185]. Ezek a sávok ráadásul társulnak a különböző érési fázisú ameloblaszt formákkal, míg a fodros felszínű ameloblasztok a savas zománc szakaszok felett helyezkednek el, addig a sima felszínűek a neutrális sávokat takarják [140, 154, 155, 184]. Ennek a ciklikus pH változásnak szerepe lehet abban, hogy a kristálykötegek közötti terek idő előtt ne záródhassanak le, még mielőtt a teljes mineralizáció végbemenne [140, 185].



**8. ábra: pH indikátorral láthatóvá tett savas és neutrális sávok patkány metszőfogon.** A kép jobb felső sarkában lévő skála mutatja az egyes pH értékekhez tartozó szint. SA: sima felszínű ameloblasztok, RA: fodros felszínű ameloblasztok, secr: szekrécións zóna. Forrás: Helle H. Damkier és munkatársai [185].

#### 2.6.4. pH szabályozás az amelogenezis során II. – az ameloblasztok pH szabályozásért felelős molekulái

Vizsgálatok azt mutatják, hogy az ameloblasztok valóban rendelkeznek a  $\text{HCO}_3^-$  szekrécións szükséges molekuláris háttérrel, ezem felül számos fontos pH regulátorként ismert molekula hiányáról ismert, hogy zománcfejlődési rendellenességet okoz. Az alábbiakban ezeket mutatom be részletesen.

**CAR:** A legkorábbi publikáció a fogszövetek szénsav-anhidráz aktivitásáról Kondo és Kuriaki nevéhez fűződik, akik felnőtt patkány metszőfog homogenizátumot vizsgáltak [186]. Fejlődő hörcsög és patkány metszőfogban hisztokémiával igazolták a szénsav-anhidrázok jelenlétét, elsősorban a korona csúcsi részein, érettebb ameloblasztokban [187, 188]. A zománcszerv epitél sejtjei számos szénsav-anhidráz izoformát expresszálnak [189]. Az ameloblasztokban kimutatott CAR enzimek közül a széles körben kifejeződő intracelluláris CAR2 a leginkább tanulmányozott izoforma. Egyesek szerint a szekrécións fázisban nem fejeződik ki [140, 190, 191], míg mások szerint jelen van a szekrécións fázis során is, azonban expressziója jelentős mértékben megnő az érési fázisban [192-194]. Wang és munkatársai feltételezték, hogy a CAR2 az ameloblasztok differenciálódásának szabályozásában vesz részt [194], emellett ismert az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  és/vagy  $\text{H}^+$  szekréciónsában betöltött szerepe [140, 195-197]. Ismert az is, hogy CAR2 deficiens betegeknél a betegségre jellemző csontritkulás mellett megjelenhet fogszuvasodás, hipoplázia, valamint megváltozhat a fog alakja vagy



akár egyes fogak hiánya is kialakulhat [198-201]. A szénsav-anhidrázok más típusainak kifejeződése is megemelkedik az érési fázisú ameloblasztokban, a legnagyobb mértékű expresszió növekedés az intracelluláris CAR2 mellett a szekretált CAR6, ezt követően a szintén intracelluláris CAR3 és a membrán kötött CAR12 izoformáknál figyelhető meg [192]. Utóbbiak közül a CAR6 csak a korai érési fázisban jelenik meg [192].

**NHE1:** A  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők közül az NHE1 expresszálódik ameloblasztokban, mind a szekréción, mind az érési fázis során erős immunpozitivitást mutat a laterális membránban [140], expressziós szintje nem változik a két fázis között [192]. Jelenléte azonban nem meglepő, az NHE1 ugyanis elsősorban az intracelluláris pH fenntartásáért felelős, a szervezetben mindenütt jelen van [202].

**AE2:** Az anioncserélők szintén fontos szerepet töltenek be az intracelluláris pH szabályozásában. Az AE2 a leginkább elterjedt  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  cserélő, a legtöbb epitél sejtbazolaterális membránjában megtalálható [203].  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélővel együttműködve szerepe lehet a NaCl felvételében [203], ahogyan azt a nyálmirigy acinusok szekréción működésénél is láthattuk [18, 19]. Hasonlóan itt is az intracelluláris  $\text{Cl}^-$  koncentráció növelésében látják szerepét Lyaruu és munkatársai [196]. Ők immunhisztokémiával kimutatták egérben, hogy legnagyobb mennyiségben az AE2 az érési fázisú ameloblasztok bazolaterális membránjában expresszálódik, bár a festődés nem volt egyenletes, egyes folytonosan elhelyezkedő sejtekben intenzitása igen alacsony volt [196]. A szekréción ameloblasztok nem vagy igen kis mértékben festődtek, ekkor is inkább a Golgi régióban [196]. Hasonló eredményre vezetett egy másik vizsgálat, felnőtt egerek metszőfogát vizsgálva a preszekréción- és szekréción ameloblasztok nem mutattak AE2 expressziót, gyenge immunreakciót adtak viszont a stratum intermedium és a külső zománchám sejtjei [204]. Az AE2 a késői szekréción ameloblasztokban, illetve a szekréción-érési fázis átmeneténél jelent meg és egyre intenzívebbé vált az érési fázis előrehaladtával. A sejtek bazolaterális oldala mutatott immunpozitivitást, de a festődés ebben az esetben sem volt egyenletes, felnőtt egerek metszőfogában három kevésbé festődő sáv látszott, míg egy-két hetes hörcsögök és egerek esetén csupán egy ilyen sáv volt megfigyelhető, ezt sima felszínű ameloblasztok jelenlétének tulajdonították [204]. Egérben és patkányban nem, de hörcsög őrlőfogak szekréción fázisú ameloblasztjaiban gyenge AE2 pozitivitást mutattak ki a Golgi környékén. Az érési fázisban mindhárom faj esetén intenzív bazolaterális festődés volt megfigyelhető

az őrlőkben, emellett jóval kevésbé intenzív expresszió jellemezte a zománcszerv többi sejttypusát [204]. Josephsen és munkatársai szintén arra jutottak, hogy az AE2 szekréción fázisú ameloblasztokban nem fejeződik ki, jelenléte a zománcszerv külső sejttrétegeiben detektálható, ezzel szemben megtalálható az érési fázisú ameloblasztokban a laterális membránon [140]. Elméletük szerint a  $\text{HCO}_3^-$  ionok intercelluláris feldúsításáért az AE2 felelős, a  $\text{HCO}_3^-$  ionok a sima felszínű ameloblasztok kialakulásakor áramlanak ki a mineralizációs térbe a szoros kapcsolatok áthelyeződése révén [140]. A fentiekkel ellentétben Paine és munkatársai egér metsző- és őrlőfogakban az AE2 jelenlétét az apikális membránban mutatták ki, szekréción fázisú ameloblasztokban [197], az ő hipotézisük szerint az AE2 és a CFTR kapcsolt működése felelős az apikális  $\text{HCO}_3^-$  szekréciónért [197]

Az AE2 szerepét génkiütött egerekben vizsgálták. Egérben és emberben az AE2-nek három alternatív promótere van (a, b és c), melyekről egérben összesen öt splice variáns keletkezhet (a, b1, b2, c1, c2), melyek N-terminális régiójukban különböznek [203]. Ez alapján kétféle egér modell is rendelkezésre áll, az egyik az  $Ae2^{-/-}$ , melyben az összes  $Ae2$  variáns deléciónja megtörtént [205], míg a másik az  $Ae2_{a,b}^{-/-}$ , melyben nevének megfelelően az a és b splice variánsok kerültek kiütésre [206]. Míg az AE2 teljes hiánya a fogelötörés zavarához vezetett, a kisméretű fogak az állcsontban maradtak, gyökerük kevésbé fejlődött ki és eltorzult, valamint szoros kapcsolatban maradt az öt körülvevő csonttal [204], addig az  $Ae2a$  és  $Ae2b$  izoformák deléciónja kevésbé súlyos fenotípust eredményezett, ezekben az állatokban a deléción a fogelötörést nem befolyásolta. Ebben a modellben a legszembetűnőbb a zománc mennyiségének csökkenése volt, a metszőfogakon teljesen mértékben hiányzott vagy igen kis mennyiségben jelent meg. Mikro-CT felvételek igazolták, hogy a fogelötörést követően a zománc szinte azonnal eltűnt a metszők felszínéről, míg az őrlőkön jelentősen elvékonyodott. Mind a metszők, mind az őrlők esetében jelentősen csökkent a zománc  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{PO}_4^{3-}$  tartalma, a zománc jellegzetes prizmás szerkezete teljesen eltűnt génkiütött állatok esetén, ehelyett amorf struktúra alakult ki [196]. A génkiütés jelentősen befolyásolta az érési fázisú ameloblasztokat, valamint a mellettük elhelyezkedő stratum intermedium és papilláris réteget is, a sejtek rendezettsége megbomlott, a fejlődő zománcban szerves mátrix és sejtfragmentumok maradtak vissza [196, 204]. Ezzel szemben a preszekréción- és

szekréción ameloblasztokat látszólag nem befolyásolta az *Ae2a* és *Ae2b* izoformák kiütése [196].

**NBCe1:** Az NBCe1 számos epitélium  $\text{HCO}_3^-$  transzportjának fontos szereplője, megjelenik többek között hasnyálmirigy duktuszokban és a parotisz acinusokban is [4, 207, 208], expresszióját ameloblasztokban is tanulmányozták, mely ezidáig ellentmondásos eredményeket hozott. Abban egyetértés van, hogy az NBCe1 hiánya drasztikus változásokat idéz elő a zománc szerkezetében [209, 210]. Egy tanulmány szerint az NBCe1 ameloblasztokban nem, csupán a zománcszerv többi sejt típusában expresszálódott, a papilláris réteg sejtjei az érési fázis során intenzív festődést mutattak [140]. Paine és munkatársai eredményei azt mutatták, hogy NBCe1 detektálható az egerek metsző- és őrlőfogaiban, szekréción fázisú ameloblasztok bazolaterális membránjában. LS-8 ameloblaszt sejt vonalban a kotranszporter expressziója pH függést mutatott, savasabb pH értékek upregulációt idéztek elő [197]. Feltételezésük szerint az ameloblasztok bazolaterális  $\text{HCO}_3^-$  felvételért az NBCe1 felelős, ezzel később mások is egyetértettek [175, 197]. Szintén preszekréción és szekréción ameloblasztok bazolaterális membránjában mutatták ki az *Nbce1* gén expresszióját *in situ* hibridizációval és magát a fehérjét immunhisztokémiával Zheng és munkatársai 18-22 hetes abortált embriók fejlődő őrlőfogaiban [211]. Egerek metszőfogában pedig már a cervikális hurok epitéliuma is pozitívnak bizonyult, és az *Nbce1* kifejeződése az ameloblaszt differenciáció összes fázisában megmaradt, sőt qPCR eredmények alapján az érési fázisú sejtekben az expresszió növekedett [211]. A legújabb vizsgálatok azt mutatták, hogy az NBCe1 jelenléte függ az amelogenezis fázisától mind egérben, hörcsögben és patkányban, szekréción ameloblasztokban intracellulárisan, gyakran a Tomes nyúlvány tövéénél egy diszkrét sávban festhető, majd az érési fázisba történő átmenet során eltűnik [209]. A korai érési fázisban a papilláris réteg sejtjei mutatnak immunpozitivitást, míg az ameloblasztok szinte teljesen negatívak [209]. Az érési fázis közepétől ismét megjelenik az NBCe1 expressziója az ameloblasztokban intracellulárisan és a bazolaterális plazma membránban és egyre intenzívebbé válik az érés előrehaladtával, bár egyes sejt csoportok nem vagy csak kevésbé jelölődnek [209]. A papilláris réteg az érési fázis során is pozitív marad NBCe1-re, de a festődés intenzitása csökken [209].

Úgy tűnik, hogy az AE2 hiánya súlyosabb fenotípusos változást idéz elő egerekben, mint az NBCe1 hiánya. Az *Nbce1*<sup>-/-</sup> egerek metszőfogának zománca krétafehér, vékony és törékeny, szerkezete jelentősen veszít rendezettségéből [209, 212-214]. Az *Nbce1*<sup>-/-</sup> állatok zománcának relatív ásványi anyag tartalma jóval kisebb, mint a vad típusú egereké, a Ca<sup>2+</sup> tartalma mintegy 46%-kal, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> tartalma 40%-kal, Na<sup>+</sup> tartalma 21%-kal volt alacsonyabb, a Cl<sup>-</sup> tartalom csökkent a legdrámaibb mértékben, nagyjából 90%-kal [192]. Az ameloblasztok elveszítetik polarizált alakjukat és megrövidülnek [209]. Emberben az *NBCe1* mutációja szintén zománc rendellenességekhez vezet, krétafehér foltokat eredményez a fogzománcon [214].

**CFTR:** A HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióban jelentős szerepe lehet a CFTR Cl<sup>-</sup> csatornának is, mely egyfelől anion cserélőkkel együttműködésben a sejtek apikális felszínén utat biztosít a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> távozásához, ezt valószínűsítik azok a tanulmányok is, melyek ameloblasztokban vizsgálták szerepét [192, 197, 215]. Ezt a Cl<sup>-</sup> csatornát megtalálták érési fázisú ameloblasztok apikális membránjában is [215] és szignifikáns upregulációját is megfigyelték a késői érési fázisban a szekréciós fázishoz viszonyítva [192].

A Cl<sup>-</sup> transzport zavara - például cisztás fibrózisban (CF), mely a *CFTR* mutációjának következtében alakul ki - hatással van a fogakra [216, 217], azonban a betegség kezelésére használt tetraciklin szintén befolyásolja a zománc állapotát, így a pontos etiológia vizsgálata nehéz [218, 219]. Beszámoltak azonban ásványi anyag eltérésekről olyan cisztás fibrózisos gyerekek fogaiban is, akik tetraciklint nem kaptak [220]. A CFTR funkciója génkiütött egér modellekben vizsgálható [221, 222]. Ilyen CF egerekben mutatták ki, hogy míg a korai érési fázisú ameloblasztok kinézete normális, a sejtek polarizáltak, addig a késői szekréciós / korai érési fázisú ameloblasztok morfológiája megváltozik, a sejtek inkább köbösök, semmint megnyúltak és ideje korán alakulnak át a késői laphámnak megfelelő alakká [219], a metszőfogak krétafehérek [218, 219]. A zománc ennek ellenére normális vastagságúnak és prizmás szerkezetűnek tűnik, de porózusabb, mint vad típusú egerekben [218, 219]. A CF egerek fogzománcának Cl<sup>-</sup> tartalma alacsonyabb, Ca<sup>2+</sup>/PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> aránya csökkent a vad típusú egerekéhez képest és amelogenin mutatható ki benne [218, 219, 223]. A *Cftr*<sup>-/-</sup> egérben a metszőfogakat pH indikátorral festve az érési fázis jellemző neutrális zónái eltűnnek [224]. *Cftr*-ΔF508 mutáns malacok tejfogának [225] és maradó fogának zománca

szintén hipomineralizációt mutatott, a kristályszerkezet rendezettsége megbomlott [192].

**Slc26a család anion cserélői:** Szintén megtalálták ameloblasztokban az *Slc26a* géncsaládba tartozó anioncserélőket, melyek CFTR-rel együttműködve vehetnek részt a  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióban a sejtek apikális felszínén [4, 195]. Pendrin (SLC26A4) jelenlétét hörcsögben és patkányban már preszekréciós ameloblasztok felszínén is kimutatták, az immunreakció a szekréciós és érési fázisú ameloblasztokban egyre intenzívebbé vált és egyértelmű apikális lokalizációt mutatott [195]. Az *Slc26a4*<sup>-/-</sup> egerek fogzománca nem különbözött a vad típustól [195]. Szintén kimutatható volt az SLC26A3 (DRA), valamint az SLC26A6 (PAT1), elsősorban az érési fázisú ameloblasztokban, a génkiütött egerek fenotípusa azonban ebben az esetben sem tért el a vad típusétól, mely valószínűleg annak eredménye, hogy ezek az anion cserélők egymás hatását kompenzálni tudják [226].

**V-típusú H<sup>+</sup>-ATPáz:** Az ameloblasztok pH szabályozásában a legellentmondásosabb megítélése a H<sup>+</sup>-ATPázok szerepének van. Ezek jelenlétét is több szerző is igazolta ameloblasztokon [140, 190, 227]. Josephsen és munkatársai V-típusú H<sup>+</sup>-ATPáz a1 alegységének ciklikus expresszióját találták az érési fázis alatt, a legerősebb immunreakciót a fodros felszínű ameloblasztok apikális membránja mutatta, azonban a sima felszínű ameloblasztok disztális felszíne is jelölődött [140]. Sarkar és munkatársai több alegység vizsgálatával szintén apikális lokalizációt mutattak ki [227]. Mivel az ameloblasztoknak a mátrix fehérjék degradációjában is fontos szerepük van, ezért gyakran párhuzamot vonnak az oszteoklasztok és ameloblasztok között [140, 185], azonban úgy tűnik, hogy az oszteoklasztok proton pumpáinak nélkülözhetetlen alegysége, a *Tcirg1* mégsem fejeződik ki bennük és *Tcirg1*<sup>-/-</sup> génkiütött állatokban sem találtak zománc rendellenességet [228]. Más H<sup>+</sup>-ATPáz alegységek esetén azonban jelentős expresszió növekedés figyelhető meg az érési fázis során az ameloblasztokban [227]. Egyes elméletek szerint a H<sup>+</sup>-ATPázok jelenléte lizoszómákhoz és endoszómákhoz köthető, ez azonban nem magyarázza immunreaktivitásukat az apikális membránon [227], míg mások szerint a  $\text{HCO}_3^-$  transzport mellett az ameloblasztok időszakosan H<sup>+</sup>-okat is szekretálnak, mely elősegíti a proteolitikus enzimek működését, és gátolja a kristálykötegek közötti terek idő előtti lezáródását, még mielőtt a teljes érés befejeződne [140, 185, 190]. Ez az elmélet ellentmond az általánosan elfogadott

hipotézisnek, mely az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióját valószínűsíti [133, 156], azonban összhangban van a patkány metszőfogon indikátor festékekkel kimutatható pH fluktuációval, mely alapján a fodros felszínű ameloblasztok felett alacsonyabb pH érték mérhető [185]. Josephsen és munkatársai ebből a gondolatmenetből kiindulva javasoltak egy alternatív pH szabályozásról szóló elméletet, mely szerint a savas pH sávok a fogfelszínen a fodros felszínű ameloblasztok  $\text{H}^+$  szekréciójának következtében alakulnak ki, a neutrális sávok kialakulásáért pedig a sima felszínű ameloblasztok kialakulásakor a disztálisról a proximális oldalra áthelyeződő szoros kapcsolatok felelősek [140]. A sima felszínű ameloblasztok esetében ugyanis az intercelluláris tér nincs elzárva a fejlődő zománcról, így a sejtek között az anioncserélők működése következtében felhalmozott  $\text{HCO}_3^-$  ionok a mineralizációs térbe juthatnak, a pH gyors emelkedését eredményezve [140]. A  $\text{HCO}_3^-$  transzport elméletekhez hasonlóan eddig az ameloblasztok  $\text{H}^+$  szekrécióját sem sikerült megerősíteni, mert  $\text{H}^+$ -ATPáz inhibitorral (FR167356) kezelt patkányok metszőfogán a savas sávok nem tűntek el, azokat a gátlószer számottevően nem befolyásolta [185].

Jelenleg az ameloblasztok pH regulációjával kapcsolatos elméletek kizárólag a fent említett immunhisztokémiai, festési, expressziós és génkiütéses vizsgálatokon alapulnak, ezek klasszikus fiziológiai módszerekkel történő megerősítése hiányzik, ezért is lenne igen fontos egy olyan kísérleti modell, melyben ezek a vizsgálatok elvégezhetők.

## **2.7. Az ameloblasztok vizsgálatának korlátai, kísérleti modellek**

Az ameloblasztok tanulmányozásának legfőbb gátja nehéz hozzáférhetőségük. Az exokrin mirigyekkel ellentétben ezek *in vivo* vagy *ex vivo* vizsgálata komoly akadályba ütközik, mivel egyetlen sejtsort alkotnak a fejlődő zománc felszínén [196]. A mineralizációs térből sem lehet mintát venni [185], olyan egyszerűen, mint a nyálmirigyek vagy a hasnyálmirigy által elválasztott szekrétumból. Ráadásul az ameloblasztok a fogak előtörése után a nem folyamatosan növekvő fogak esetén eltűnnek, ami humán vizsgálatoknál embrionális fogcsírák felhasználását teszi szükségessé, mely etikai problémákat vet fel. Mindezekből következik, hogy leginkább hisztológiai, fehérje- és génexpressziós módszerek alkalmazhatóak, ezek is elsősorban

rágcsálók folyamatosan növekvő metszőfogainak tanulmányozására, melyeknél az ameloblasztok egyes alakjai egyidőben megtalálhatóak a fejlődő fog felületének különböző szakaszain. Ezért is fontos olyan *in vitro* modellek megalkotása, melyek bár szintén korlátozott értékűek, de lehetővé teszik funkcionális mérések elvégzését.

Az általunk használt HAT-7 sejtvonalt patkány metszőfog cervikális hurok (cervical loop) régiójából származik, 2002-ben alapították [229]. Erről a régióról úgy tartják, hogy progenitor sejtek forrása a folyamatosan növekvő metszőfogakban [130-132]. A sejtvonalt kezdeti immunokémiai karakterizálása azt mutatta, hogy tenyészetben spontán ameloblaszt irányba differenciálódik, expresszálja az ameloblasztok két jellegzetes fehérjét az amelogenint és az ameloblasztint [229]. Később más markerek, amelotin és kallikrein-4 jelenlétét is leírták HAT-7 sejtekben [230-233], azonban mindezek a vizsgálatok a sejtek expressziós profiljának tanulmányozására fókuszáltak.

### 3. Célkitűzések

A nyálmirigy hipofunkció kezelését célzó biológiai terápiák kutatásának főbb irányvonalai az acinusokra jellemző tulajdonságok megőrzése/helyreállítása, valamint a ductuszsejtek működésének átalakítása génterápia segítségével. Ehhez kapcsolódóan célul tűztük ki, hogy

1. primer humán szubmandibuláris nyálmirigy kultúrákat hozunk létre frakcionált emésztés és kondicionált médium segítségével és ezeken vizsgáljuk a nyálmirigyek iontranszportjában kulcsszerepet betöltő iontranszporterek/csatornák expresszióját, választ keresve arra, hogy megőrizhetőek-e az acináris tulajdonságok *in vitro* körülmények között
2. igazoljuk, hogy a Par-C10 patkány parotisz eredetű sejtvonal alkalmas lehet a nyálmirigy génterápia modellezésére

Az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportjával kapcsolatos ismereteink elsősorban hisztológiai és génexpressziós vizsgálatok eredményein alapulnak, klasszikus sejtfiziológiai mérések elvégzésére a megfelelő modellek hiányában eddig nem volt lehetőség, ezért célul tűztük ki egy olyan *in vitro* modell létrehozását, amelyben az ameloblasztok epiteliális  $\text{HCO}_3^-$  transzportja tanulmányozható. Ennek érdekében vizsgáltuk, hogy

3. expresszálnak-e a HAT-7 patkány dentális epitélium eredetű sejtek ameloblasztokra jellemző markereket Transwell membránokra ültetve, DMEM-F12 alapú kontrol, illetve differenciáló médiumokban vagy HepatoSTIM tápoldatban
4. képesek-e a HAT-7 sejtek a 3. pontban leírt körülmények között a vektoriális transzport alapvető feltételét jelentő szoros kapcsolatok kialakítására
5. expresszálják-e a HAT-7 sejtek a 3. pontban leírt körülmények között, az irodalmi adatok alapján az ameloblasztokban (is) megtalálható pH regulátor molekulákat (pl. CAR2, NHE1, AE2, NBC1, CFTR)
6. képesek-e a HAT-7 sejtek ténylegesen  $\text{HCO}_3^-$  transzportra a 3. pontban leírt körülmények valamelyikében, így alkalmas modelljei lehetnek-e az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  szekréciójának



## **4. Módszerek**

### **4.1. Sejttenyésztés**

Az alább bemutatott sejt kultúrák mindegyikével steril körülmények között dolgoztunk, azokat minden esetben 37 °C-on, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében, párásított környezetben tenyésztettük. A fertőzések megelőzése érdekében a tápoldatok 100 U/mL of penicillint és 10 µg/mL streptomocint (Sigma-Aldrich) tartalmaztak, valamint a primer humán nyálmirigy kultúrákkal való munka során 2.5 mg/ml amfotericin-B-t (Sigma-Aldrich) is használtunk, melyet a sejt vonalak esetében elhagytunk. A passzálásokat 0,25% tripszin-EDTA oldat (Gibco) segítségével végeztük 80-90% konfluencia szint elérésekor. A funkcionális mérésekhez, valamint az immuncitokémiai és génexpressziós vizsgálatok egy részéhez a sejteket (mind a primer kultúrákat, mind a sejt vonalakat) 1,12 cm<sup>2</sup> felületű, 0,4 µm pórusátmérőjű permeábilis Transwell Clear membránokra (Corning Costar) ültettük. Ezek elősegítették, hogy az epitél sejtek apikális és bazolaterális oldala elkülöníthetően vizsgálható legyen az iontranszport és folyadék szekréciós vizsgálatok során. A különböző kultúrák eltérő tenyésztési igényeit az alábbi alfejezetek ismertetik.

#### **4.1.1. Primer humán nyálmirigy kultúrák létrehozása és fenntartása**

Összesen 49 nyálmirigy minta került feldolgozásra, melyeket a Semmelweis Egyetem Arc- Állcsont Szájsebészeti és Fogászati Klinikája bocsátott rendelkezésünkre (az etikai engedélyt a Semmelweis Egyetem Regionális, Intézményi Tudományos és Kutatásetikai Bizottsága adta ki, engedélyszám: 67/2005). A minták 40 és 86 év közötti betegektől származtak, akik korábban besugárzásban nem részesültek és olyan fej-nyaki műtéten estek át, mely során szubmandibuláris nyálmirigyük eltávolításra került és a kimetszett nyálmirigy normál szövettani képet mutatott.

A primer nyálmirigy tenyészetek létrehozása és fenntartása korábban leírt módszertan (PTHSG: [107], HuSMG: [96]) alapján történt kisebb változtatásokkal. Röviden: Az 1-2 g nedves tömegű nyálmirigy mintákat 5% főtális borjúsérummal (Invitrogen) kiegészített RPMI-1640 tápoldatban (Sigma-Aldrich) a lehető legrövidebb idő alatt, jégen szállítottuk a laborba. A szövetet mechanikusan tisztítottuk és aprítottuk, ez alatt

többször mostuk DMEM-F12 (Gibco) oldattal. Annak érdekében, hogy növeljük az életképes sejtek arányát, valamint megelőzzük az érzékenyebb acinus sejtek károsodását, frakcionált emésztést alkalmaztunk. Az aprított szövetet enzimesen (0,04% tripszin (Gibco) és 0,15 mg/ml kollagenáz (Sigma-Aldrich)) emésztettük DMEM-F12 médiumban 37 °C-on és 20 percenként alaposan vortexelve. A már disszociált sejteket tartalmazó felülúszót óránként eltávolítottuk, a reakciót leállítottuk, míg a maradék szövetet friss disszociáló oldattal tovább emésztettük. Az emésztési folyamat így nagyjából 2,5 órát vett igénybe. Az összegyűjtött frakciókat DNáz I (Roche Diagnostic Corporation) enzimmel kezeltük és 2 percig trituráltuk, majd a sejteket háromszor mostuk, centrifugáltuk (230 g, 5 perc) és újraszuszpendáltuk, először DMEM oldatban (Gibco), majd az utolsó centrifugálást követően a szuszpendálást előmelegített, 1% glutamint és 10% FCS-t tartalmazó HepatoSTIM médiumban (BD Biosciences) végeztük, melyet később a tenyésztéshez is használtunk. Az összetapadt sejteket 70 µm-es szűrőn (BD Biosciences) át elválasztva FCS-sel előkezelt 6 darab 6 cm átmérőjű petricsészére ültettük és 37 °C-on egy éjszakán át inkubáltuk.

A következő nap a tenyészetek felülúszójának nagy részét 5 darab 6 cm átmérőjű petricsészébe vittük át. Ez az epitél sejtek dúsítását szolgálta, ugyanis míg a gyorsan letapadó fibroblaszt jellegű sejtek jelentős része az első előkezelt sejttenyésztő edényben maradt, addig az átvitt felülúszó az egy éjszaka után még lebegő epitél sejtekben volt gazdagabb. Így kétféle tenyészet keletkezett: az első edényben egy jóval kevertebb, mezenchimális-epiteliális kultúra, az ún. PTHSG (Primary Total Human Salivary Gland), amely mind a gyorsan letapadó fibroblaszt jellegű, mind a lassabban letapadó epitél sejtekben gazdag, míg a második edényben az egy éjszaka után még lebegő sejtaggregátumokból alakult ki a lassabban letapadó epitél sejtekben dúsabb tenyészet, az ún. huSMG (human Submandibular Gland). A sejtfenntartáshoz a már leírt összetételű HepatoSTIM oldatot használtuk. A médiumot hetente három alkalommal cseréltük, azonban közel egyharmad részét a tenyészeteken hagytuk, ezt hígítottuk friss tápoldattal, hogy kondicionált médiumot nyerjünk, azaz megőrizzük a sejtek által termelt autokrin/parakrin növekedési faktorokat. A kísérletekhez a sejteket az említett Transwell membránokra ültettük, melyeket a kiültetést megelőzően főtális borjúsérummal inkubáltunk 15 percig 37 °C-on. Tápoldatként itt is HepatoSTIM

médiomot használtunk. Kizárólag 1-3 közötti passzázsszámú tenyészetekkel dolgoztunk.

#### **4.1.2. Par-C10 sejtek tenyésztése**

A Par-C10 sejteket Dr. David Quissel (School of Dentistry, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO, USA) ajándékozta az Orálbiológiai Tanszék részére. A sejteket 75 cm<sup>2</sup> felületű standard sejtenyészítő flaskában szaporítottuk és heti 1-2 alkalommal passzáltuk 1:50 arányban. A Transwell Clear membránok felületére 5x10<sup>5</sup> sejszámban ültettünk ki. Mind az alapteryészetet, mind a membránra ültetett kísérleti minták fenntartásához DMEM-F12 (Gibco) tápot használtunk a következő kiegészítőkkal: 10 % FCS (Lonza), 0,1 µM retinsav (Sigma-Aldrich), 2 nM trijód-tironin (Sigma-Aldrich) és 0,4 µg/ml hidrokortizon (Sigma-Aldrich) és 3-15 közötti passzázsszámú tenyészetekkel dolgoztunk [234].

#### **4.1.3. HAT-7 sejtek tenyésztése**

A HAT-7 sejtek Dr. Hidemitsu Harada laboratóriumából származtak. Fenntartásuk 75 cm<sup>2</sup> felületű standard sejtenyészítő flaskában történt 10% HyClone főtális borjúsérummal (Thermo Scientific) kiegészített DMEM-F12 (Sigma-Aldrich) médiumban (továbbiakban: kontrol médium (K)[229]). Passzálásra heti kétszer került sor. A génexpressziós, immuncitokémiai és funkcionális vizsgálatokhoz a sejteket Transwell membránokra ültettük 2,5x10<sup>5</sup> sejszámban, a méréseket 3-5 nappal a kiültetést követően végeztük. A differenciálódás elősegítésére a membránra ültetett sejtek esetében a kontrol médiumot 2,1 mM kalcium végkoncentrációig CaCl<sub>2</sub>-dal, valamint 10<sup>-5</sup> mM végkoncentrációig dexametazonnal (Sigma-Aldrich) egészítettünk ki (továbbiakban: differenciáló médium (D), [235]) vagy a primer humán nyálmirigy kultúráknál felhasznált HepatoSTIM oldatot (H) alkalmaztuk[107].

#### **4.1.4. HEK 293 microbix sejtek tenyésztése**

A HEK 293 microbix (Microbix Biosystems) sejteket a rekombináns vírusok készítéséhez, szaporításához használtuk (a replikáció deficiens adenovírusok csak

ezekben a sejtekben képesek szaporodni, mivel ezek a HEK sejtek a vírusvektorból hiányzó E1 gént hordozzák). 10% főtális borjú szérumot (Gibco) és 2mM glutaminsavat (Sigma-Aldrich) tartalmazó MEM tápoldatban (Sigma-Aldrich) tartottuk fenn őket. Passzálásuk tripszin-EDTA alkalmazása nélkül, erőteljesebb pipettázással történt.

## **4.2. Rekombináns adenovírus vektorok készítése és Par-C10 sejtek transzdukciója**

A Par-C10 sejtek génterápiás célozhatóságát sárga fluoreszcens proteint kódoló rekombináns adenovírusok (AdEYFP) segítségével igazoltuk, míg a sejtek folyadékszekréciós képességének módosításához humán aquaporin 1 vízcsatornát kódoló vírusvektort (AdAQP1) használtunk. Az AdAQP1 vektor Bruce J. Baum ajándéka volt, melyet csak szaporítani kellett, míg az AdEYFP vírust a korábban leírt módszer [236, 237] alapján készítettük.

Részletesen: A fluoreszcens fehérjét kódoló génszakaszt CMV promótert és SV40 poliA szignált tartalmazó pACCMV-pLpA plazmidba klónoztuk EcoRI és XbaI restriktív enzimek felhasználásával (Fermentas), a ligálást Rapid DNA Ligation Kittel (Fermentas) végeztük a gyártó utasításai alapján. Az így létrejött pACCMVEYFP plazmidot kompetens sejtekbe (NovaBlue Singles Competent Cells, Novagen) transzformáltuk, majd a sejteket táptalajon szélesztettük (LB Agar Amp, Fermentas) és egy éjszakán át inkubáltuk 37 C-on. A keletkezett telepek közül 5-10 telepet kiválasztva 1-1 ml starter kultúrát alapítottunk, melyet 5 órán át rázattunk 37°C-on, Terrific Broth (Lonza) tápoldatban. Ezekből a kultúrákból Nucleospin Plazmid Mini kittel (Macherey Nagel) plazmidot izoláltunk és többféle restriktív emésztéssel igazoltuk, hogy a plazmid valóban tartalmazza az EYFP gént. Az ellenőrzés során megfelelt starter kultúrát azután tovább szaporítottuk 100 ml LB Ampicillin táplevesben egy éjszakán át, majd a tenyészetből ismét plazmidot izoláltunk a NucleoBond Xtra Midi kit (Macherey Nagel) segítségével, melyet később a víruskészítés során használtunk fel.

A rekombináns vírusvektorok létrehozásához a transzgént hordozó pACCMVEYFP plazmidot és a pJM17 5-ös szerotípusú adenovírus segédplazmidot 10 centiméter átmérőjű tálkákban tenyésztett 80-90%-ban konfluens HEK 293 microbix sejtekbe kotranszfectáltunk kalcium-foszfátos precipitáció segítségével. Tálkánként 500 µl, 10-

10 µg-nyi pACCMVEYFP-t és pJM17-et tartalmazó 0,25 M CaCl<sub>2</sub> oldatot csepegtettünk 500 µl buborékolatott 2x HEPES pufferbe. Az így létrejött elegyben kalcium-foszfát csapadék keletkezik, amely a DNS-sel komplexet képez. 20 perc után a keletkezett komplexet (tálkánként 1 ml-t) a HEK293 sejtekre mértük. A HEK sejtekben a két plazmid rekombinációjával jöttek létre az AdEYFP replikáció deficiens vírusok, melyek jelenlétére utaló citopatogén hatás mintegy két hét elteltével jelent meg, ezt pedig a sejtek lízise követte.

A vírusokat ezután felszaporítottuk, 10 darab 15 centiméter átmérőjű Petri csészében konfluens HEK 293 sejteket fertőztünk vírustartalmú sejtlyázattal. A vírusok szaporodását fáziskontraszt mikroszkóppal követtük nyomon: az előrehaladott citopatogén hatást mutató, de még nem lizálódó sejteket összesen 7 ml végtérfogatban felvettük, majd a sejteket feltártuk ötször ismételt fagyasztás-felolvasztás segítségével. A fagyasztáshoz folyékony nitrogént, míg a felolvasztáshoz 37 °C-os vízfürdőt vettünk igénybe. Az egyes ciklusok között a szuszpenziót fél percig vortexeltük. A feltárás után nyert CVL-t (tisztítatlan vírustartalmú sejtlyázatum) Falcon 2059 csőben 9000 g-vel centrifugáltuk 4 °C-on, 7 percen át, majd a felülúszóból a vírusokat kétszeri ultracentrifugálással és dialízissel tisztítottuk.

A két lépcsős ultracentrifugálás során CsCl gradienst alkalmaztunk. Ultra-Clear ultracentrifuga-csőben (Beckman) elkészítettük az első CsCl gradienst: 2,5 ml 1,25 g/cm<sup>3</sup> sűrűségű CsCl oldat alá 2,5 ml 1,40 g/cm<sup>3</sup> sűrűségű CsCl oldatot rétegeztünk. A vírusos felülúszót a gradiens tetejére mértük. A mintákat a következő beállításokkal centrifugáltuk: 35 000 rpm, vákuum, 20 °C, 1 óra, leállásnál fék: 800 rpm-ig. Egy óra elteltével az ultracentrifuga csőben a két fázis határán jelent meg a fehér színű vírustartalmú gyűrű, melyet eltávolítottunk 1 ml-es inzulinos fecskendőre erősített 21 G-s tűvel beleszúrva a megtisztogatott cső oldalába. A vírusokat ezután 8 ml 1,33 g/cm<sup>3</sup> sűrűségű CsCl oldatra rétegeztük egy újabb ultracentrifuga csőben, a centrifugálást az előzőekben leírtak szerint megismételtük, ezúttal azonban 18 órán át centrifugáltunk. A megjelenő vírustartalmú gyűrűt ismét leszívtuk, majd glicerint adtunk hozzá 10 v/v% végső koncentrációig és Slide-A-Lyzer dializáló kazettába (Pierce) fecskendeztük. A dialízist 4 °C-on, kevertetve végeztük kétszer fél órán keresztül, fél liter dialízis pufferben, majd háromszor egy órán át, egy liter dialízis pufferben. A dialízis végeztével a vírusokat eltávolítottuk a kazettából, felhasználásig –80 °C-on tároltuk.

A víruspartikulumok számát kvantitatív valósídejű polimeráz láncreakcióval (qPCR) határoztuk meg ABI StepOne készülék (Applied Biosystems) és SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) segítségével a következő reakciókörülmények között: előinkubálás 95 °C-on 10 percig, majd amplifikáció 40 cikluson keresztül 95 °C 15 másodperc és 60 °C 1 perc váltogatásával. Primerként a CMV promóterre specifikus szekvenciákat használtunk: 5'-CAT CTA CGT ATT AGT CAT CGC TAT TAC-3' és 5'-TGG AAA TCC CCG TGA GTC A-3'. A standard hígítási sort pACCMV-pLpA plazmidból készítettük. Minden kísérleti minta és a standard hígítási sor elemeinek kópiaszámát három párhuzamos mérés eredményei adták.

A Par-C10 tenyészetek transzdukcióját előkísérleteink során elvégeztük a sejtszámhoz képest 0, 1, 10 és 100-szoros vírusrészecskével, a sejteket a rekombináns vírusokkal egy éjszakán át inkubáltuk 37 °C-on. Az előkísérletek alapján 3 vírusrészecske/sejt arányt alkalmaztunk a génbevitelhez. A folyadékszekréciós kísérletek során a Transwell Clear membránon konfluens sejtréteg fertőzése 1,5 millió vírusrészecskével történt.

#### **4.2.1. A víruskészítés és tisztítás során felhasznált oldatok összetétele**

Kotranszfekció: A felhasznált 2x HEPES puffer összetétele mM-ban megadva a következő: 280 NaCl, 1,5 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 HEPES. Az oldat pH értéke 7,05 volt.

CsCl gradiens ultracentrifugálás: Az 1,25, az 1,33 és az 1,40 g/cm<sup>3</sup> sűrűségű CsCl oldatokhoz rendre 27 g-ot, 33,33 g-ot, illetve 38,83 g-ot mértünk be a CsCl porból. Ezt 100 g-ra egészítettünk ki 1xTD pufferrel, melyet az alábbi összetételű 10xTD pufferből hígítottunk: 80 g/l NaCl, 3,8 g/l KCl, 30 g/l Tris, 1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>. A kész oldatokat sterilre szűrtük.

Dialízis: A dialízispuffer az alábbi összetevőket tartalmazta: 3,556l steril desztillált víz, 40 ml 1 M Tris (pH 7,4), 4 ml 1 M MgCl<sub>2</sub>, 400 ml glicerin.

### **4.3. Génexpressziós vizsgálatok**

Génexpressziós vizsgálatokat végeztünk a Par-C10 sejtek transzdukciójának ellenőrzésére, valamint a primer humán nyálmirigy kultúrák és a HAT-7 sejtek kulcsfontosságú iontranszportereinek és szoros kapcsolatainak feltérképezésére reverz

transzkripció polimeráz láncreakcióval (RT-PCR). A Par-C10 patkány eredetű sejtekből humán AQP1 expresszióját mutattuk ki, az expressziót kizárólag kvalitatívan értékeltük. Szemikvantitatív vizsgálattal vetettük össze a Hepat-STIMben tenyésztett PT-HSG és huSMG kultúrákban kifejeződő transzportereket, ioncsatornákat (*ENaC*, *NHE1*, *AE2*, *NBC1*, *NKCC1*, referencia gén:  $\beta$ -aktin), valamint a tenyésztési körülmények (plasztik (P) és permeábilis membrán felszín (M)) hatását ezek expressziójára. Szintén szemikvantitatív módszert választottunk a HAT-7 sejtek jellemzésére, ekkor a tenyésztés során alkalmazott felület, valamint az alkalmazott tápoldat génexpresszióra gyakorolt hatását vizsgáltuk (plasztik felszín és kontrol médium (P), permeábilis membrán felszín és kontrol médium (K) vagy differenciáló médium (D) vagy HepatoSTIM médium (H)). A vizsgált gének között szerepeltek a  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióban érintett transzportereket, csatornát, enzimet (*Car2*, *Nhe1*, *Ae2*, *Nbc1*, *Cftr*, *Pendrin*, referencia gén:  $\beta$ -aktin), valamint a szoros kapcsolatok felépítésében résztvevő egyes fehérjéket (*Zo1*, *Zo2*, *Occl*, *Cldn1,4, 7 és 8*, referencia gén:  $\beta$ -aktin) kódoló gének.

Az RT-PCR első lépéseként a sejtekből teljes RNS-t izoláltunk és tisztítottunk anioncserélő oszlopot alkalmazó módszerek segítségével a gyártó utasítása alapján. Az RNS mennyiségét mértük, minőségét gélelektroforézis során 1% TAE gélben ellenőriztük. Pozitív kontrollként humán nyálmirigy szövetet és patkány vesét, valamint belet homogenizáltunk Ultra Turrax homogenizátor segítségével, majd ezekből is RNS-t izoláltunk guanidin-izotiocianát/fenol/kloroformos extrakcióval. Második lépésként reverz transzkripcióval cDNS-t nyertünk, melyet templátként alkalmaztunk a folyamat utolsó lépéseként végrehajtott PCR reakciók során. A primerek tervezése Primer3 programmal, ellenőrzésük pedig az NCBI Blast programjával RefSeq mRNA adatbázis segítségével történt. A primerek szekvenciáit és a PCR reakciók meghatározó paramétereit az 1. táblázat tartalmazza. A HAT-7 sejtek esetén a PCR termékeket szekvenálással is ellenőriztük.

#### **4.3.1. A génexpressziós vizsgálatok során alkalmazott anyagok, készülékek**

RNS izolálás: RNeasy Plus Mini (Quiagen, Par-C10 sejtek), NucleoSpin RNA II kit (Machery-Nagel, PT-HSG, huSMG primer nyálmirigy kultúrák, HAT-7 sejtek), TRI Reagent (Sigma-Aldrich, szövet homogenizátumok)

RNS koncentrációmérés: NanoDrop spektrofotométer (Thermo Scientific, PT-HSG és huSMG primer nyálmirigy kultúrák és HAT-7 sejtek), Qubit fluorométer és Quant-iT RNA Assay kit (Invitrogen, Par-C10 sejtek)

RNS átírása cDNS-sé: High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Par-C10 sejtek), High-Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Life Technologies, PT-HSG, huSMG primer nyálmirigy kultúrák), Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, HAT-7 sejtek)

PCR reakció: Diamond Mix (Bioline, Par-C10 sejtek, PT-HSG, huSMG primer nyálmirigy kultúrák), Maxima Hot Start Green PCR Master Mixet (Thermo Scientific, HAT-7 sejtek)



**1. táblázat: A géneexpressziós vizsgálatokhoz felhasznált primerek**

Név	Jobb (forward) primer	Bal (reverse) primer	termékméret (bp)	T <sub>a</sub> (°C)
<b>Par-C10</b>				
AQP1	5'- GTC TTC ATC AGC ATC GGT TC -3'	5'- GTC GGC ATC CAG GTC ATA CT -3'	701	53
<b>PT-HSG, hUSMG</b>				
ENaC	5'- GTG GAG ACC TCC ATC AGC A -3'	5'- GTT GAC TTT GGC CAC TCC AT -3'	458	55
NKCC1/SLC12A2	5'- TAG GGC CTT TGG ATT CTT TG -3'	5'- GCA AGC AGA TAT GAG GGA TG -3'	266	53
NHE1/SLC9A1	5'- GCT GTA TCC TCT GGG AGC TG -3'	5'- GGA CTC ACC CAC CAT GTC TC -3'	305	53
AE2/SLC4A2	5'- TTC ATG AGG TCT AGG TCG GC -3'	5'- CCT CGG TGC AGT TCT TTC TC -3'	373	55
NBC1/SLC4A4	5'- ACC TCG GTT TGG ACT TGT TG -3'	5'- ACA CCT CTT CCA TGG CTC TG -3'	191	53
β-Actin (humán)	5'- AGC ACT GTG TTG GCG TAC AG -3'	5'- GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG -3'	234	55
<b>HAT-7</b>				
β-Actin (patkány)	5'- CCC TGA AGT ACC CCA TTG AA-3'	5'- CCC TCA TAG ATG GGC ACA GT -3'	307	55
Zo-1/Tjp1	5'- CAA AGA GAT GAG CGG GCT AC -3'	5'- AAA TCC ACA TCT GGC TGT CC -3'	416	50
Cldn1	5'- AGG TCT GGC GAC ATT AGT GG -3'	5'- CGT GGT GTT GGG TAA GAG GT -3'	204	55
Cldn4	5'- TGT GGG CTA CTG ACT GCT TG -3'	5'- GTA ACG TGG AGG CGA GAG AG -3'	325	50
Cldn8	5'- TAT GAC TCC CTG CTG GCT CT -3'	5'- AAG ATG ATT CCA GCC GTC AG -3'	179	50
Nhe1/Slc9a1	5'- GCA ACT GGA GCA GAA GAT CAC -3'	5'- CTG AGG CAG CGT TGT ATT CTC -3'	369	55
Ae2/Slc4a2	5'- AAC TCT GGT GGA GGA GAT GGT -3'	5'- CTG TCC TCT GCT TTG ATC TGG -3'	657	55
Nbc1/Slc4a4	5'- ACT CCC TTC ATT GCC TTT GTT -3'	5'- CGT CGC CAG ATA GAT GAA GAG -3'	552	55
Pendin/Slc26a4	5'- TGT TCC TCG TCT GTG GAA GC -3'	5'- AGT CTA CGC ATG GCC TCA TC -3'	933	51
Cfr	5'- TTA TGA CAT TCA CAC CCA GCT C -3'	5'- TGT TAA GAA TCC CAC CTG CTT T -3'	609	55
Car2	5'- GAG CAA CGG ACC AGA GAA CT -3'	5'- CCA CCA TGC TAC CAC CAC AT -3'	950	51

#### 4.4. Immuncitokémia

A HAT-7 sejtek jellemzése során a bikarbonát transzportban érintett transzporterek és a szoros kapcsolatok alkotóelemeinek génexpressziós vizsgálata mellett a fehérjék jelenlétét is kimutattuk. Az ameloblaszt markerek esetében elsősorban a fehérjék jelenlétének bizonyítása volt a cél. A sejtek előkészítése Budapesten, míg maga az immuncitokémiai kimutatás Amszterdamban, holland együttműködő partnerünk laboratóriumában történt. Elsősorban differenciáló tápoldatban tenyésztett sejteket használtunk fel, a mikrofluorometriás mérések tapasztalataival összhangban (lásd később). A Transwell membránon tenyésztett sejteket 4% pufferelt paraformaldehid oldattal fixáltuk. A mintákat ezután Amszterdamba küldtük, ahol a membránt eltávolították a műanyag tartószerkezetéből, majd csíkokra vágták. Ezek egy részéről keresztmetszeti képek készültek, melyhez a membráncsíkot paraffinba ágyazták, majd metszették, a deparaffinálást követően pedig előbb nyúlban termeltetett elsődleges antitestekkel, majd kecskében termeltetett peroxidáz-konjugált anti-nyúl másodlagos antitesttel inkubálták (Envision kit, Dakopatt). A peroxidáz előhívása DAB-bal történt, emellett a metszeteket hematoxilinnel festették. A minták másik részéről felülnézeti képek készültek. Ezeket a membráncsíkokat 48-lyukú lemezen, 2% Triton X-100 tartalmú foszfát pufferelt sóoldattal mosták, majd először nyúlban termeltetett elsődleges antitestekkel, végül vagy Alexa-488 festékekkel fluoreszcensen jelölt (1:200, Invitrogen), vagy peroxidáz-konjugált kecskében termeltetett anti-nyúl (1:500, Thermo Scientific) másodlagos antitestekkel reagáltatták. Az Alexa-488 jelölésű mintáknál 1 µg/ml propidium jodid magfestést is alkalmaztak, majd üveglemezen Vectashield (Vector Laboratories) médiummal és fedőlemezzel fedték. A képek Leica mikroszkóppal átvilágítva készültek.

A következő nyúlban termeltetett elsődleges antitestek kerültek felhasználásra: anti-zonula occludens 1 (1:200, Zymed Laboratories), anti-KLK4 (1:200, Dr. J. Simmer ajándéka, Protein G mini oszlopon tisztítva), anti-amelotin (1:100-1:200; Dr. B. Ganss ajándéka, affinitás kromatográfiával tisztítva), anti-szénsav anhidráz 2 (1:800-1:1000; Santa Cruz Biotechnology, [238]), anti-NBCe1 szérum (1:600, Dr. W. Boron ajándéka, protein G mini oszlopon tisztítva, [209]), anti-AE2 (1:50-1:100, Dr S. Kellokumpu ajándéka, affinitás kromatográfiával tisztítva, [204]), anti-pendrin (1:100, Santa Cruz

Biotechnology, [195]), anti-CFTR (1:200, Alomone Labs), valamint negatív kontrollként normál, nem immunizált nyúl IgG (DakoPatt)

#### **4.5. Transzepitél ellenállás (TER) mérése**

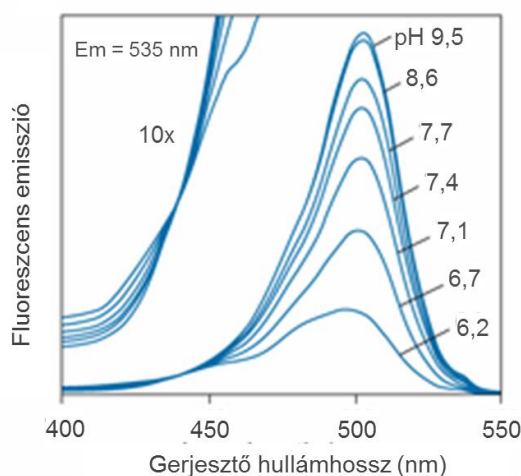
Az epitél sejtek egyik fő feladata a szabályozott, irányított szekréció. Ennek megfelelően *in vitro* a funkcionális epitél monolayerek egyik fontos tulajdonsága, hogy a sejtek között szoros kapcsolatok (tight junction) alakulnak ki, melyek limitálják a sejtek közötti ion- és vízáramlást. E tulajdonság jellemzésére használják a transzepitél ellenállást (TER). A konfluencia kialakulásáig a TER érték nő, ezt követően elsősorban a sejtek paracelluláris permeabilitását jellemző plató fázist ér el, mely kis mértékben eltérhet a legmagasabb mért értéktől.

Először a Transwell Clear membránokon három különböző médiumban (K, D, H) kialakuló HAT-7 monolayerek transzepitél ellenállását mértük hét egymást követő napon EVOM (epithelial volt-ohm meter, World Precision Instruments) készülékkel, hogy a konfluencia és a szoros kapcsolatok kialakulásának idejét nyomon kövessük és meghatározzuk a további vizsgálatok optimális időpontját és a különböző médiumok hatását. Később a TER értékét minden mikrofluorometriás mérést és immuncitokémiai fixálást megelőzően rögzítettük. Ugyanígy mértük a TER értéket minden humán nyálmirigy kultúrával vagy Par-C10 tenyésztéssel végzett vizsgálat előtt is. Maga a készülék STX2 elektródja két elektródpárral rendelkezik, melyek közül az egyik fix nagyságú áramot bocsát át a membránon, illetve a rajta lévő monolayeren, míg a másik pár méri a sejtréteg két oldala közötti feszültség különbséget.

#### **4.6. Mikrofluorometria**

A HAT-7 sejtek bikarbonát transzportját fluoreszcens spektroszkópián alapuló módszerrel, ú.n. mikrofluorometriával mértük a korábban leírtaknak megfelelően [239]. Röviden: Az élő sejteket BCECF fluoreszcens festékkel töltöttük fel, mely érzékeny az intracelluláris pH változásaira, ezáltal segítségével indirekt módon mérhető a  $H^+$  és  $HCO_3^-$  ionok membránon keresztüli áramlása. A külső környezet változtatásával – pl. bizonyos ionok megvonása, transzporter inhibitorok, savterhelés – a bikarbonát transzport egyes elemei elkülöníthetők.

A mérésekhez Transwell membránon tenyésztett sejteket használtunk, kezdetben mindhárom médiumban tenyésztett sejteken (K, D, H) elvégeztük a vizsgálatokat, majd az eredmények alapján a D mintákkal folytattuk a részletes méréseket. A membránokat Nikon Eclipse TE200 inverz fluoreszcens mikroszkóp tárgyasztalára, egy a célnak megfelelően kialakított kamrába helyeztük és 3 ml/perc sebességgel folyamatosan mindkét oldalról perfundáltuk. Kétféle gerjesztő hullámhosszt alkalmaztunk: 490 és 440 nm-t egy-egy másodpercig, a gerjesztés alatt az emissziót 530 nm-en mértük ( $F_{490}$  és  $F_{440}$  emissziós értékek). A ciklust öt másodpercenként ismételtük. A detektálás fotoelektronsokszorozó és erősítő (Cairn Research), az adatgyűjtés DASyLab szoftver (Measurement Computing) segítségével történt. A mérések végén az autofluoreszcencia meghatározása érdekében a sejteket 0,5% Triton X tartalmú oldattal mostuk, hogy a sejtmembránt megbontva a BCECF eltávozhasson. Az adatfeldolgozás során az  $F_{490}$  és  $F_{440}$  emissziós értékeket az autofluoreszcenciával korrigáltuk, majd a kétféle emissziós értékből hányadost képeztünk, így a bejutott festék koncentrációjától független, ellenben az intracelluláris pH-tól függő változót nyertünk (9. és 11. ábra).

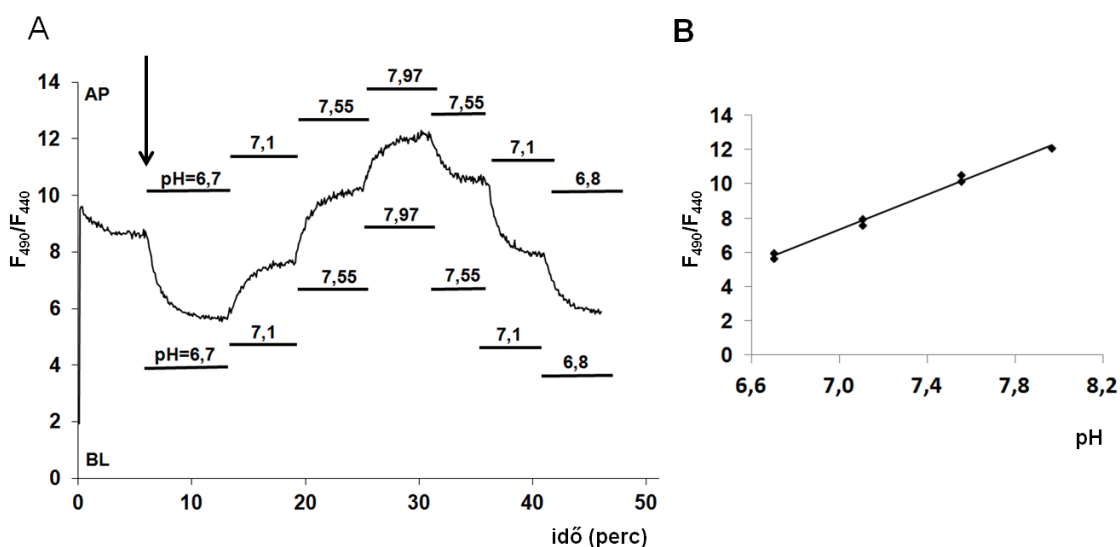


**9. ábra:** A BCECF fluoreszcens emissziója 535 nm-en mérve a pH és gerjesztő hullámhossz függvényében. A festéknek 440 nm gerjesztő hullámhossznál izobesztikus pontja van, az emissziója ekkor pH független (lásd 10x nagyítást is). *Invitrogen Manuals and Protocols/BCECF.*

#### 4.6.1. Kalibráció

A kalibrációhoz nigericint (Sigma-Aldrich) alkalmaztuk, a korábban leírt módszertan szerint [240]. A technika lényege, hogy a sejten belüli és a sejten kívüli pH

kiegyenlíthető a  $H^+/K^+$  antiporterként viselkedő nigericin és a külső  $K^+$  szint beállításának segítségével. Mivel az antiporterek mindig a transzportált ionok gradiensének megfelelően működnek, ezért a sejten belüli és kívüli  $K^+$  koncentráció egyezése esetén a  $H^+$  gradiens szabja meg a transzport irányát, mely az intra- és extracelluláris pH kiegyenlítődéskor áll le. Különböző pH-jú mérőoldatokat használva az egyes pH értékekhez  $F_{490}/F_{440}$  fluoreszcencia intenzitásokból képzett hányados rendelhető. Az 10. ábra egy jellemző kalibrációs görbét, valamint a kalibrációs egyenest mutatja.

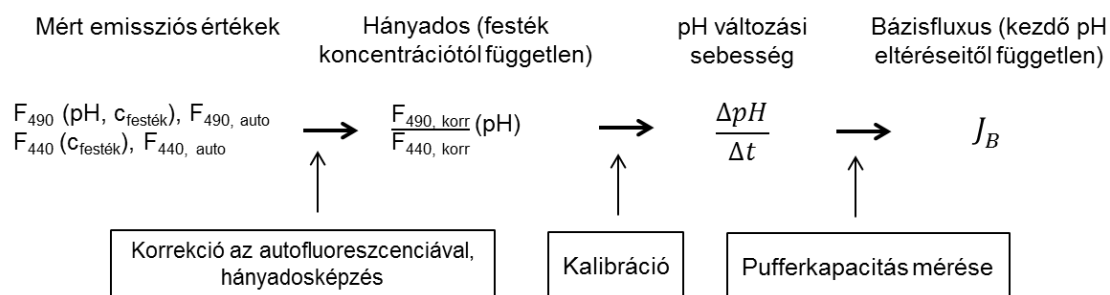


**10. ábra: Kalibráció.** A) Egy jellemző mérési görbe. Az ábrán nyíl jelöli a nigericin adagolás kezdetét. Az alkalmazott kalibráló oldatok tényleges (mért) pH értékeit a mérési görbe alatt és felett tüntettük fel. B) Az A) méréshez tartozó kalibrációs egyenes. Saját ábra.

#### 4.6.2. Pufferkapacitás mérése

Ahhoz, hogy a mért pH változási sebességet átszámolhassuk ionfluxussá, mérnünk kellett a HAT-7 sejtek pufferkapacitását is a korábban leírtaknak megfelelően [239]. Az intracelluláris pH kiindulási értéke (nyugalmi pH vagy valamilyen kezelés indítását megelőző érték) kis mértékben változhat a sejtek metabolikus állapotától és egyéb aktuális vagy előkezelési feltételektől függően. Ilyen változásokat idézhetnek elő például kisebb eltérések a tápoldat pH-jában vagy hőmérsékletében. Ezek a kis különbségek azonban a pH logaritmikus skálája miatt exponenciális hibát okoznak a tényleges iontranszport értékének megállapításában. Például a pH csökkenése 7-ről 6,9-

re tízszer több proton mozgásával jár, mint a pH változása 8-ról 7,9-re. Ezeket a mérési hibákat küszöbölhetjük ki, ha a pH változás sebessége helyett minden esetben a tényleges bázisfluxust (a ténylegesen membránon keresztül mozgó ionmennyiséget) számoljuk ki. Ez különösen fontos nagy pH változások esetén, úgymint a savterhelés kompenzációjának mérésekor. A ténylegesen membránon keresztül mozgó ionok mennyisége azonban nem csak a kiindulási és végső pH-tól függ, hanem a sejtek pufferkapacitásától is az adott kiindulási pH-n. A mikrofluorometriával nyert nyers adatok feldolgozásának folyamatát az 11. ábra mutatja.



**11. ábra: A mikrofluorometriával nyert adatok feldolgozása.** A nyers emissziós értékeket az autofluoreszcenciával korrigáltuk, majd hányadost képeztünk, hogy a festékkel való feltöltődés különbségeit kiküszöböljük. A hányados értékekhez pH értékeket rendeltünk a kalibrációs egyenes segítségével. Meghatároztuk a vizsgált változáshoz tartozó mérési görbeszakasz meredekségét, végül a pH változási sebességet bázisfluxussá konvertáltuk, így a kezdő pH eltéréseinek hatásától is független, a valós iontranszportot jellemző adatokat nyertünk. Saját ábra.

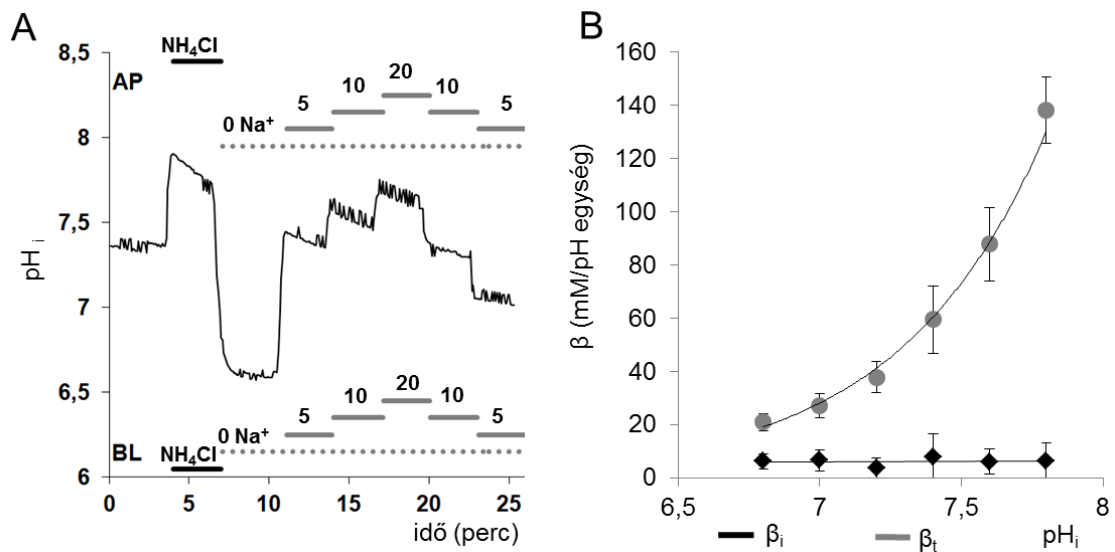
A pufferkapacitás definíció szerint az a sav/bázis mennyiség, ami a pH egy egységnyi változásához szükséges. A teljes pufferkapacitás ( $\beta_t$ ) két komponensből tevődik össze, az egyik a sejten belüli fehérjék és egyéb sejtalkotók pufferelő hatása, ezt belső (intrinsic) pufferkapacitásnak nevezzük ( $\beta_i$ ), míg a másik a  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  puffer rendszer ( $\beta_{\text{CO}_2}$ ) hatása. Mindkét komponens függ az intracelluláris pH aktuális értékétől. Az utóbbi komponens számítása a Henderson-Hasselbach egyenlet, a  $\text{CO}_2$  parciális nyomása és oldhatósága (37°C-on) alapján történik. Míg az első komponens mérhető  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$ -mentes körülmények között (HEPES alapoldatban) a külső  $\text{NH}_4^+$  koncentráció lépcsőzetes változtatásával, miközben a sejt kompenzációs mechanizmusait folyamatos  $\text{Na}^+$  megvonással blokkoljuk ( $\text{Na}^+$  gradiens által irányított másodlagosan aktív transzportfolyamatok gátlása). A belső pufferkapacitás egy tipikus

mérési görbét az 12. ábra mutatja. A mérés alapja, hogy  $\text{NH}_4^+$  ionok  $\text{NH}_3$  gázzal tartanak egyensúlyt, mely a sejtmembránon keresztül szabadon diffundál, ezért feltételezhető, hogy a sejten belüli és sejten kívüli  $\text{NH}_3$  koncentráció megegyezik, míg az  $\text{NH}_4^+$  ionok mozgása a sejtmembránon keresztül elhanyagolható. A sejten belül aztán a bejutott  $\text{NH}_3$  ismét igyekszik egyensúlyt kialakítani, ami egyfelől az intracelluláris pH változásával jár (a bejutó  $\text{NH}_3$  egy része  $\text{H}^+$  felvételével  $\text{NH}_4^+$ -má alakul), másfelől az egyensúly kialakulását követően a pH már nem változik, így a sejten belüli  $\text{NH}_4^+$  mennyisége a Henderson-Hasselbach egyenlet és az egyensúlyi pH figyelembe vételével számolható. A külső  $\text{NH}_4^+$  koncentrációt lépcsőzetesen változtatva minden lépcső kezdeti és végpontjánál BCECF segítségével az intracelluláris pH mérhető, és minden lépcső kezdeti és végpontjához tartozó sejten belüli  $\text{NH}_4^+$  koncentráció számolható az adott ponthoz tartozó külső pH (állandó 7,4), külső  $\text{NH}_4^+$  koncentráció (az alkalmazott mérőoldat  $\text{NH}_4^+$  koncentrációja) és az intracelluláris pH értékének (mért) ismeretében. Mivel minden más sav/bázismozgást blokkoltunk, a belső (intrinsic) pufferkapacitás a lépcső kezdő és végpontja közötti intracelluláris pH változásból és az intracelluláris  $\text{NH}_4^+$  koncentrációváltozásból képzett hányados, melyet az adott lépcső pH középértékéhez rendelünk. A teljes pufferkapacitás adott pH-n a két komponens összege:

$$\beta_t = \beta_i + \beta_{\text{CO}_2}$$

A belső (intrinsic) és teljes pufferkapacitás értékeit a pH függvényében ábrázoltuk (lásd 12. ábra). A belső pufferkapacitás értéke a funkcionális mérések pH tartományában (6,5-7,5) körülbelül 40 mM-nak adódott. A teljes pufferkapacitás értékeire trendvonalat illesztettünk nem lineáris regresszióval, a további funkcionális mérésekhez ennek segítségével határoztuk meg az alkalmazandó pufferkapacitás értéket. A bázisfluxust a pufferkapacitás és a pH változás sebességének szorzata adta:

$$J_B = \Delta\text{pH}/\Delta t \times \beta_t$$



**12. ábra: A HAT-7 sejtek pufferkapacitásának mérése.** A sejteket HEPES oldattal perfundáltuk, majd savterhelést idéztünk elő ammónium pulzus technikával (ld. később), ezt követően pedig megvontuk a Na<sup>+</sup>-ot a mérőoldatból. A belső pufferkapacitást ebben a Na<sup>+</sup> mentes közegben a külső NH<sub>4</sub><sup>+</sup> koncentráció lépcsőzetes változtatásával (5-20 mM) mértük (A). A teljes (β<sub>t</sub>, szürke vonal) és a belső pufferkapacitás (β<sub>i</sub>, szürke vonal) értékeket az intracelluláris pH (pH<sub>i</sub>) függvényében ábráztuk. Az adatokat átlag ± szórás formájában ábráztuk. A teljes pufferkapacitás értékekre nem lineáris regresszióval trendvonalat illesztettünk. AP: apikális oldali perfúzió, BL: bazolaterális oldali perfúzió. Saját ábra [241].

#### 4.6.3. Ammónium pulzus technika

Az ammónium pulzus technikát bázis, majd ezt követő savterhelés létrehozására használtuk. Elve azonos a belső (intrinsic) pufferkapacitás mérésénél leírtakkal, ebben az esetben azonban rövid ideig állandó külső NH<sub>4</sub><sup>+</sup> koncentrációjú oldattal kezeltük a sejteket (ugrás zavarást alkalmaztunk). Kezdetben a bejutó NH<sub>3</sub> gáz bázisterhelést eredményez, melynek hatására az intracelluláris pH nő (ld. 4.6.3. NH<sub>3</sub>-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> egyensúly), melyet egy kismértékű kompenzációval járó szakasz követ, ennek során a sejt igyekszik belső pH-ját csökkenteni. A zavarás megszűntetésével a sejten belül felhalmozott NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ionok NH<sub>3</sub> formájában távoznak hátrahagyva a H<sup>+</sup>-okat, mely savasodást eredményez, ami ráadásul az első kompenzációs szakasz következtében a kiindulásnál alacsonyabb intracelluláris pH-hoz vezet. Ekkor újabb kompenzációs szakasz következik, mely során a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> cserélők és a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporterek szerepe vizsgálható.



#### 4.6.4. A mikroluorometriás mérés során felhasznált oldatok összetétele és az alkalmazott farmakológiai ágensek

A kalibráló oldat összetétele mM-ban megadva a következő volt: 140 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgSO<sub>4</sub>, 20 HEPES. Az elkészített oldatot négy részre osztottuk, ezek pH-ját 6,8-ra, 7,2-re, 7,6-ra és 8-ra állítottuk be KOH segítségével.

A további mérések során két alapoldatot használtunk. Az egyik a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> és CO<sub>2</sub>-mentes HEPES puffereelt oldat (továbbiakban HEPES oldat) mely a következő komponenseket tartalmazta mM-ban megadva: 137 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-glükóz és 10 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinétánesulfonsav (HEPES). Ezt 100% O<sub>2</sub>-nel buborékoltattunk a mérések alatt. A másik alapoldat egy standard HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> puffereelt oldat (továbbiakban BIKARBONÁT oldat) volt a következő összetétellel (szintén mM-ban megadva): 116 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-glükóz and 5 HEPES. Az oldat 5% CO<sub>2</sub> és 95% O<sub>2</sub> tartalmú gáztérrel tartott egyensúlyt a mérések alatt.

A nátrium megvonásos kísérletekben a Na<sup>+</sup>-ot ugyanolyan mennyiségű N-metil-D-glükamin (NMDG<sup>+</sup>) helyettesítette, míg ha NH<sub>4</sub>Cl alkalmazására volt szükség bázis/savterhelés elérése érdekében az izozmolaritás fenntartásához a NaCl mennyiségét csökkentettük az alkalmazott NH<sub>4</sub>Cl mennyiségének megfelelő mértékben. Minden oldat pH-ját 7,4-re állítottuk 37 °C-on. A vegyszerek a Sigma-Aldrich cégtől származtak.

A Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> cserélők gátlására 300 μM amiloridot (Sigma-Aldrich), a Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszport gátlására 500 μM H<sub>2</sub>DIDS-et (Molecular Probes), míg a szénsav-anhidrázok gátlására 100 μM acetazolamidot (Sigma-Aldrich) használtunk. A transzportfolyamatok serkentése során 50 μM ATP-t (Sigma-Aldrich) használtunk az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> szint emeléséhez, valamint 10 μM forskolint (Sigma-Aldrich) és 500 μM IBMX-szel (Sigma-Aldrich) kombinálva a cAMP jelátviteli út aktiválására.

## 4.7. Gravimetria

A Par-C10 sejtek folyadékszekréciójának mérését gravimetriával végeztük. A sejteket 8 napig Transwell membránokon tenyésztettük, majd fertőztük a vírusvektorral (lásd 4.2.). Másnap a membrán felső, apikális oldaláról a médiumot leszívtuk, és 200  $\mu\text{l}$  izo- vagy hiperozmotikus (0,1 M szacharóz tartalmú) médiumot pipettáztuk a helyére. Két óra inkubációs idő elteltével az apikális oldalról a folyadékot maradéktalanul eltávolítottuk, majd 0,1 mg pontossággal, analitikai mérlegen megmértük a tömegét, végül kiszámoltuk, mennyivel több folyadékot tudtunk leszívni, mint amennyit rátettünk a membránra. A számításokhoz a tápfolyadék sűrűségét  $1 \text{ g/cm}^3$ -nek tekintettük. Az így képezett különbség adta a transzportált folyadék mennyiségét, melyet  $\mu\text{l}$  pontossággal adtunk meg.

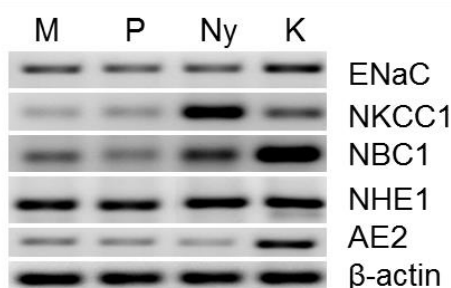
## 4.8. Statisztikai analízis

Az adatok átlag  $\pm$  átlag szórása (SEM) formában kerültek megadásra. Az analízis során egy szempotú vagy ismételt méréses ANOVA-t használtunk, melyet Tukey-Kramer vagy Dunnett post hoc teszt követett. Amikor csupán két csoport összehasonlítása volt szükséges, egyutas t próbát választottunk. A transzepitél ellenállás mérések esetében a különböző csoportokban a SEM értékek jelentős különbséget mutattak, ami kizárta a paraméteres tesztek alkalmazásának lehetőségét. Ekkor nem-paraméteres Kruskal-Wallis tesztet és Dunn post hoc tesztet alkalmaztunk.

## 5. Eredmények

### 5.1. A primer humán nyálmirigy kultúrák által expresszált iontranszporterek

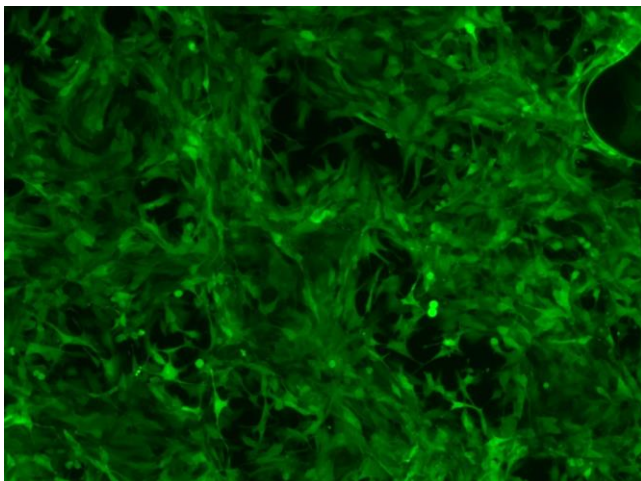
Szemikvantitatív PCR reakció segítségével vizsgáltuk a nyálmirigyek fontos acináris, illetve duktális iontranszportereinek expresszióját az általunk létrehozott primer sejtenyészeteken. Pozitív kontrollként a kiindulási nyálmirigy minták kis darabjából izolált RNS-t, referenciaként humán vese RNS-t használtuk. Az irodalomban leírtaknak megfelelően, a natív nyálmirigy szövetből az összes fontos transzporter (*ENaC*, *NKCC1/SLC12A2*, *NBCe1/SLC4A4*, *NHE1/SLC9A1* és *AE2/SLC4A2*) expressziója kimutatható volt gén szinten. Az 13. ábrán PT-HSG sejtek génexpresszióját hasonlítottuk össze a natív nyálmirigy szövet által mutatott képpel. Nem tapasztaltunk érdemi változást az *ENaC*, *NHE1* és *AE2* szintjében, ellenben jelentős csökkenés mutatkozott az *NKCC1* és *NBCe1* expressziójában mind plaztik, mind membrán felületen. A PT-HSG és huSMG tenyészetek expressziós mintázatában gyakorlatilag nem találtunk különbséget.



**13. ábra: Nyálmirigyek fontosabb iontranszportereinek expressziója PT-HSG sejtekben és natív nyálmirigy szövetben.** Az ábrán Petri csészében (P) és Transwell membránon (M) tenyésztett PT-HSG sejtekből, valamint nyálmirigy szövetből (Ny) kimutatott RT-PCR termékek (*ENaC*, *NKCC1*, *NBC1*, *NHE1*, *AE2*) láthatók. Humán vese *mRNS* (K) szolgált pozitív kontrollként. A referencia gén:  $\beta$ -aktin [242].

### 5.2. Génterápia modellezése Par-C10 sejtekben

A Par-C10 immortalizált patkány parotis eredetű sejtvonal transzdukálhatóságát sárga fluoreszcens fehérjét kódoló rekombináns adenovírussal bizonyítottuk. A 14. ábrán jól látható, hogy már relatív kis (3 víruspartikulum/sejt) vírusedőzist alkalmazva, egy éjszakás inkubációs időt követően a sejtek jelentős része (min. 80%-a) expresszálja az említett fluoreszcens fehérjét.

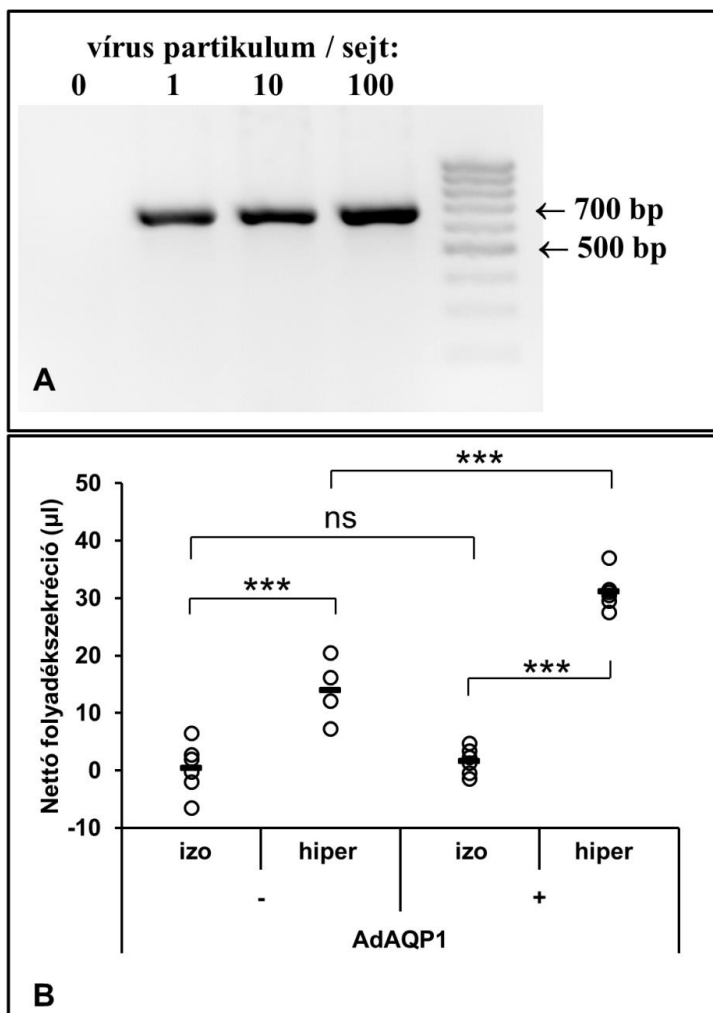


**14. ábra: EYFP-t kifejező Par-C10 sejtek.** A sejteket 3 víruspartikulum/sejt arányban transzdukáltuk, majd egy éjszakán át inkubáltuk AdEYFP rekombináns adenovírus vektorral. A mérce 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl [243].

Célunk annak bizonyítása volt, hogy a nyálmirigy funkció géntranszfer segítségével módosítható az általunk alkalmazott modell sejtekben. Ennek érdekében a patkány eredetű Par-C10 sejtekbe humán aquaporin 1 vízcsatornát építettünk be. A transzdukciónak hatékonyságának ellenőrzése érdekében a sejteket először 0, 1, 10 és 100 vírusrészecske/sejt arányban fertőztük AdAQP1 vektorral és RT-PCR segítségével vizsgáltuk a kialakult AQP1 génextpressziót a következő napon. Azokban a sejtekben, melyek transzdukción nem estek át a humán *AQP1* mRNS nem volt kimutatható. Amennyiben expresszáltak is valamilyen vízcsatornát kis mennyiségben, az nem adott keresztreakciót a humán génre tervezett primerekkel. Az összes többi alkalmazott vírus dózis esetén a génextpresszió kimutatható volt (15. A ábra), a további vizsgálataink során ezért a 3 vírusrészecske/sejt arányt választottunk.

A vízcsatornák funkcionális vizsgálatakor az AdAQP1 vektorral kezelt, illetve nem kezelt Transwell membrán felületen tenyésztett monolayerek apikális oldaláról eltávolítottuk a tápfolyadékot és helyére 200  $\mu\text{l}$  izo- vagy hiperozmotikus folyadékot helyeztünk. A bazolaterális-apikális irányú folyadékmozgást gravimetriával határoztuk meg. A várakozásoknak megfelelően az AQP1 géntranszfer növelte a Par-C10 monolayerek vízpermeabilitását. A transzdukción át nem esett sejtek esetében  $0,4 \pm 4,5$   $\mu\text{l}$  vízmozgás volt mérhető izoozmotikus médiumban 2 óra alatt, míg apikálisan 100 mM szacharózt tartalmazó (így ozmotikus gradienst biztosító) médium esetében a vízmozgás  $14,0 \pm 5,7$   $\mu\text{l}$ -re nőtt. Az AdAQP1 vektorral kezelt sejtek folyadéktranszportja  $1,6 \pm 2,3$   $\mu\text{l}$ -nek adódott izoozmotikus körülmények között, míg  $31,2 \pm 3,2$   $\mu\text{l}$ -nek bizonyult hiperozmotikus hajtóerő biztosítása esetén. Így elmondható, hogy ugyan izoozmotikus körülmények között nem volt statisztikailag jelentős eltérés

az AdAQP1 vektorral kezelt és nem kezelt Par-C10 sejtek víztranszportjában, azonban az AQP1 transzdukción átesett sejtek szignifikánsan több folyadékot mozgattak ozmotikus hajtóerő biztosítása esetén a bazolaterálisról az apikális oldalra, mint az AdAQP1 vektorral nem kezelt sejtek (15. B ábra).



**15. ábra: Par-C10 sejtek transzdukciója AdAQP1 rekombináns adenovírussal.**

A) AQP1 expresszió in vitro adenovirális géntranszfert követően. A Par-C10 sejteket 0, 1, 10 és 100 víruspartikulum/sejt arányban kezeltük AdAQP1 vektorral. A humán AQP1 kimutatása RT-PCR segítségével történt, várt termék hossz: 701 bp. Az expresszió minden olyan minta esetén kimutatható volt, amely AdAQP1 transzdukción ténylegesen átesett. B) Az AdAQP1 transzdukció növelte a Par-C10 sejtek vízpermeabilitását in vitro. A sejteket 3 víruspartikulum/sejt arányan fertőztük (+) vagy nem fertőztük (-) a rekombináns adenovírussal. A következő nap a sejteket apikális oldalról 200 µl izotónus (izo) vagy hipertónus (hiper)

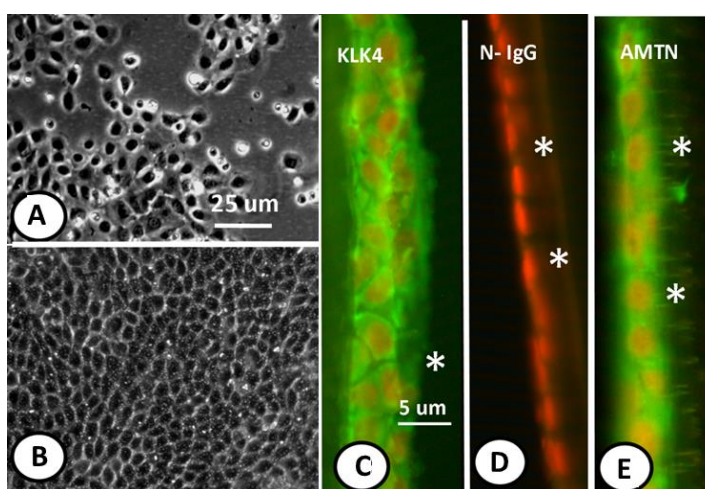
médiumnak tettük ki, majd 2 óra elteltével mértük az apikális oldali folyadék mennyiségének változását. Az egyes körök egyedi Transwell membránokon mért nettó folyadékszekréciót jelölnek. Az átlagot vízszintes vonal mutatja. Statisztikai analízis: egyszempontú ANOVA Tukey-Kramer post hoc teszttel. \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  [244]

### 5.3. A HAT-7 sejtek jellemzése és bikarbonát transzportjának vizsgálata

Célunk volt egy olyan *in vitro* modell létrehozása, amely alkalmas az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportjának vizsgálatára. A modell megalkotása során négy fő kérdésre kerestük a választ. Expresszálnak-e valamilyen jellemző ameloblaszt markert a HAT-7 sejtek az általunk beállított tenyésztési körülmények között? Képesek-e funkcionális epitéliumot létrehozni Transwell membránokon, kialakulnak-e közöttük szoros kapcsolatok? Gén, illetve fehérje szinten kifejeződnek-e bennük a korábban immunhisztokémiával és/vagy PCR segítségével fogcsírákból kimutatott iontranszporterek? Mérhető-e  $\text{HCO}_3^-$  transzportjuk mikrofluorometriával?

#### 5.3.1. A HAT-7 sejtek morfológiája, ameloblaszt markerek kimutatása

A HAT-7 sejtek 2-3 nap alatt elérték a konfluenciát a Transwell membrán felületén függetlenül az alkalmazott médiumtól. Fáziskontraszt mikroszkópos kép alapján mindegyik minta tipikus „kockakő” epitel morfológiával jellemezhető (16. A és B ábra). Az immunhisztokémiai metszetek alapján jellemzően egy réteget hoztak létre, nyomokban két vagy több sejt sor is felfedezhető volt, megjelenésük laphám, illetve köbhám jellegű volt, mintáról mintára változott (16. és 18. ábra). A HAT-7 sejtekben megjelentek az érési fázis jellemző fehérjei, expresszálták mind a mátrix proteáz KLK4-et (16. C ábra), mind az újabban felfedezett érési markert, az amelotint (AMTN, 16. E ábra). Az alkalmazott tápoldat nem befolyásolta jelentősen a kapott eredményeket.



**16. ábra: HAT-7 sejtek fáziskontraszt mikroszkópos képe és az általuk expresszált ameloblaszt markerek.**

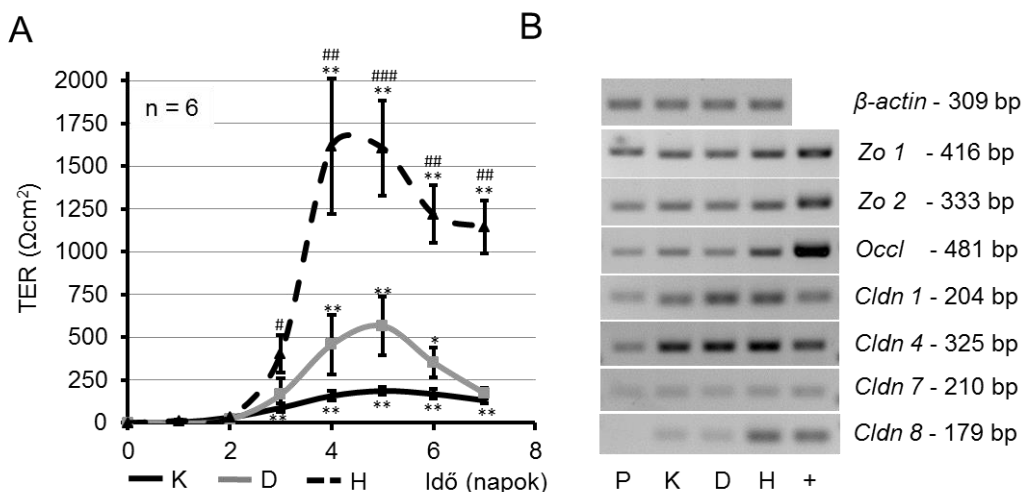
A) HAT-7 sejtek morfológiája standard sejtenyésztő flaskában és B) Transwell membrán felületen Hepato-STIM médiumban.

Differenciáló tápoldatban tenyésztett sejtek által expresszált ameloblaszt markerek: C) KLK4 és E) amelotin (AMTN) immunhisztokémiával kimutatva D) normál IgG kontrollal szemben. A csillag a Transwell membrán elhelyezkedését mutatja. Eredeti nagyság: A) és B) 100x, C)-E) 400x [241].

### 5.3.2. A szoros kapcsolatok és a transzepitél ellenállás vizsgálata

A szelektív barrier funkció kialakulása kulcsfontosságú az irányított iontranszport működéséhez. Ennek egy jelzőszáma a transzepitél ellenállás (TER). A különböző médiumokban tenyésztett HAT-7 minták TER értékei között igen jelentős különbségek mutatkoztak (17. A ábra). A TER érték a kontroll médiumban tenyésztett sejtek esetén volt a legalacsonyabb, míg a HepatoSTIM oldatban tenyésztett sejtek esetén a legmagasabb. Az ellenállás görbék tipikusan az ötödik napon maximumot értek el, ekkor a TER értékek kontrol, differenciáló és HepatoSTIM tápoldatok alkalmazása esetén rendre a következők voltak:  $187 \pm 23 \Omega \text{cm}^2$ ,  $567 \pm 170 \Omega \text{cm}^2$ ,  $1606 \pm 277 \Omega \text{cm}^2$ , majd egy alacsonyabb platófázisba mentek át a hetedik napra (17. A ábra). A maximum érték a szoros kapcsolatok formálódásának végét mutatja, míg a platófázis az egységnyi felületre eső szoros kapcsolatok számának növekedésével függ össze, ahogyan a korábban elterülő sejtek a sejtszám növekedésével összehúzódnak/megnyúlnak.

A szoros kapcsolatok molekuláris vizsgálata számos szoroskapcsolati fehérje génszintű expresszióját mutatta. RT-PCR segítségével zonula occludens 1 (*Zo1/Tjp1*) és 2 (*Zo2/Tjp2*), occludin (*Occl*), valamint számos claudin (*Cldn 1, 4, 7 és 8*) mRNS-ét mutattuk ki (17. B ábra). Az expresszió szintjét normalizáltuk a  $\beta$ -aktin kifejeződését véve referenciaként, a szemikvantitatív eredmények alapján a *Cldn 1, 4 és 8* szintjében találtunk jelentősebb különbséget a minták között. Mindhárom claudin esetén elmondható, hogy a membránon tenyésztett sejtek nagyobb mennyiségben expresszálták, mint a standard tenyésztőflaskában fenntartottak. Ezen kívül az expresszió szintje a membrán minták között is eltért kisebb-nagyobb mértékben. A legszembetűnőbb különbség a *Cldn 8* kifejeződésében mutatkozott, a kontroll médiumban tenyésztett sejtek esetén volt a legalacsonyabb, míg a Hepato-STIM minták esetében a legmagasabb összhangban a transzepitél ellenállás mérések eredményeivel (17. B ábra). A zonula occludens 1 expresszióját fehérje szinten is kimutattuk immuncitokémiával (ábrán nem mutatom).

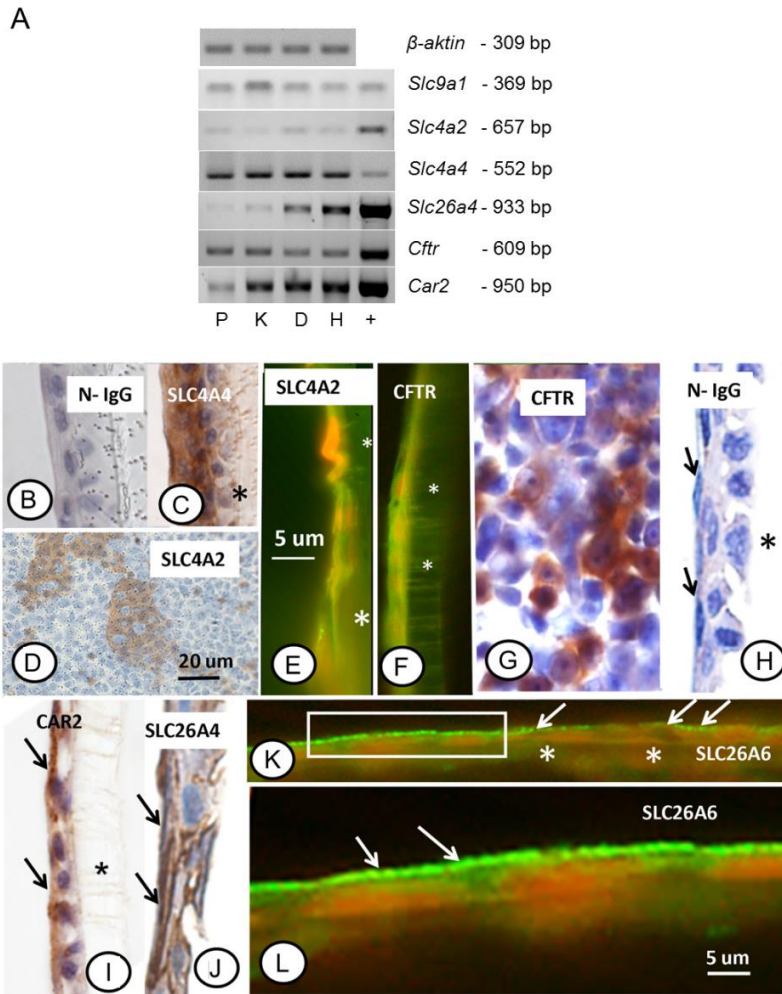


**17.ábra: Szoros kapcsolatok kialakulása HAT-7 sejtekben.** A) Transwell membránon tenyésztett sejtek transzepitél ellenállása (TER) hét egymást követő napon mérve. A sejteket kontrol (K), differenciáló (D) vagy HepatoSTIM (H) médiumban tenyésztettük. Az elemszám minden csoportban  $n = 6$ . Statisztika: Kruskal-Wallis analízis Dunn post hoc teszttel. A szignifikáns változásokat adott csoporton belül a nulladik naphoz (kiültetés) viszonyítva csillaggal jelöltük: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . A különböző minták ugyanazon a napon mért TER értékei közötti szignifikáns különbségeket pedig kettőskereszt mutatja: # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$ ; ### $p < 0.005$ . B) Konvencionális RT-PCR eredmények, melyek szoros kapcsolati fehérjék, Zo1, Zo2, Occl, Cldn 1, 4, 7 és 8 mRNS szintű expresszióját mutatják standard tenyésztőflaskában, kontrol médiumban fenntartott (P: plasztik), valamint Transwell membránokon kontrol (K), differenciáló (D) és HepatoSTIM tápoldatban tenyésztett HAT-7 mintákban. Pozitív kontrollként (+) patkány vesét használtunk fel [241].

### 5.3.3. A HAT-7 sejtek által expresszált transzporterek

A  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióban érintett összes kulcsfontosságú elektroli transzporter, valamint csatorna, úgymint *Nhe1/Slc9a1*, *Ae2/Slc4a2*, *Nbce1/Slc4a4*, *Pendrin/Slc26a4* és *Cftr* mRNS szintű expressziója kimutatható a HAT-7 sejtekben függetlenül a tenyésztési körülményektől (18. A ábra), különbség ezek mennyiségében mutatható ki az egyes minták között. Szintén kimutatható az érési fázisú ameloblasztokra jellemző, citoplazmában előforduló szénsav-anhidráz izoforma, a *Car2* jelenléte (18. A ábra). Differenciáló és HepatoSTIM médiumban, Transwell membránon tenyésztett sejtek felhasználásával fehérje szintű kimutatást is végeztünk, mely során az NBCe1/SLC4A4, AE2/SLC4A2, Pendrin/SLC26A4, PAT1/SLC26A6, CFTR és CAR2 pozitívan festődött (18. B ábra). Mennyiségi és expressziós mintázatbeli különbséget nem tapasztaltunk a differenciáló és HepatoSTIM oldatban tenyésztett sejtek között (ábrán nem mutatom).





**18 ábra: A  $\text{HCO}_3^-$  szekréciónban érintett molekulák expressziója HAT-7 sejtekben mRNA és fehérje szinten.** A) *Nhe1/Slc9a1*, *Ae2/Slc4a2*, *Nbce1/Slc4a4*, *Pendrin/Slc26a4*, *Cfr* és *Car2* mRNA szintű expressziója RT-PCR-rel kimutatva standard tenyésztőflaskában, kontrol médiumban fenntartott (P: plasztik), valamint Transwell membránokon kontrol (K), differenciáló (D) és HepatoSTIM tápoldatban tenyésztett HAT-7 mintákban. Pozitív kontrollként (+) patkány vesét, valamint a *Cfr* esetén patkány belet használtunk fel. B-L) A  $\text{HCO}_3^-$  transzportban résztvevő fehérjék immunocitokémiai lokalizációja: B) normál IgG kontrol; C) SLC4A4/NBCe1; D) SLC4A2/AE2 felülnézeti és E) keresztmetszeti elrendezésben; F) CFTR keresztmetszeti és G) felülnézeti elrendezésben; H) normál IgG kontrol, a nyilak laphám jellegű sejteket jelölnek; I) CAR2; J) SLC26A4/Pendrin, az I) és J) ábrán a nyilak az apikális oldal erősebb festődését jelzik; K) SLC26A6/PAT1, a nyilak az apikális oldal festődését mutatják, megfigyelhető, hogy a festődés folytonos a bal, míg szakadozott a jobb oldalon; L) SLC26A6/PAT1, a K) ábra bal oldalán látható bekeretezett terület nagyobb nagyításban. Zöld szín mutatja a kívánt immunfluoreszcens festődést, míg a narancs a sejtmagokat jelöli az E és F), valamint K és L) ábrán. A B-D) és G-J) peroxidáz jelölt mintáknál barna szín mutatja a pozitív immunreakciót, míg kék a sejtmagokat. A Transwell membrán elhelyezkedését csillag jelöli. A B-D), valamint I) és J) ábrán HepatoSTIM médiumban, míg a G) és H), valamint K) és L) ábrán differenciáló médiumban tenyésztett sejtek láthatók. Eredeti nagyítás: 400x, kivéve K) ábra, ahol 200x [241].

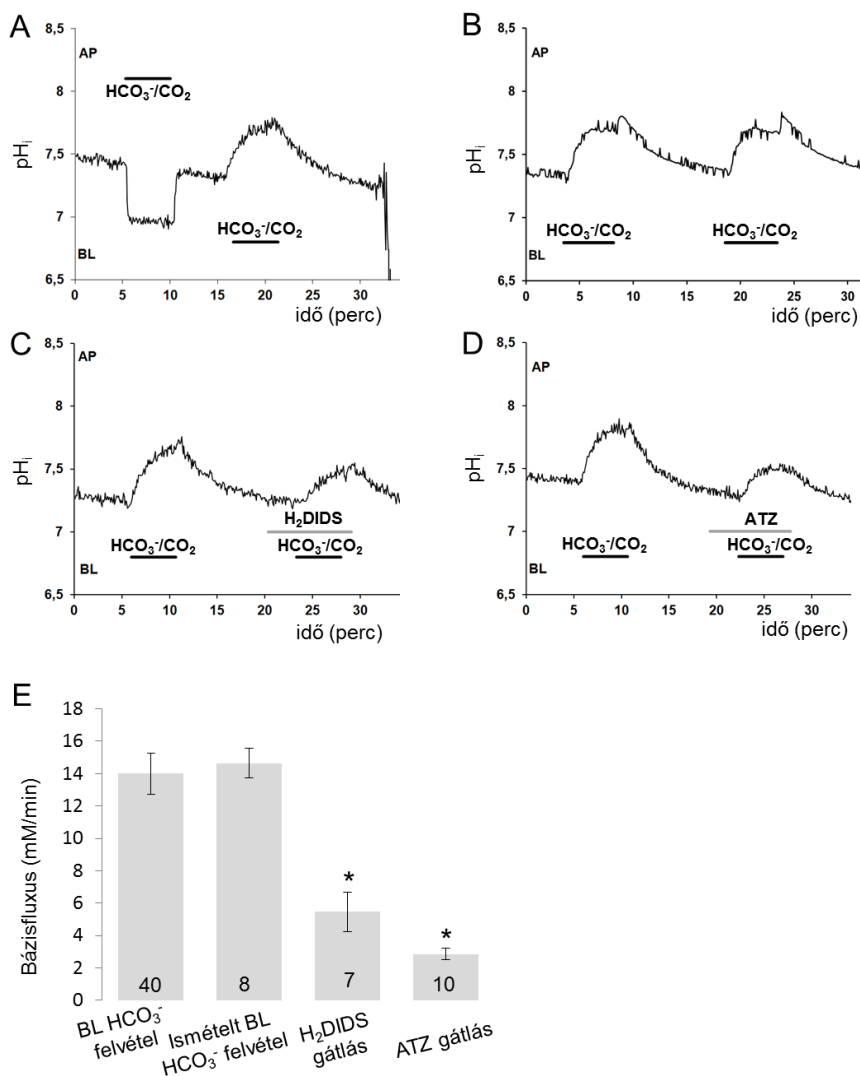
#### 5.4.4. A bikarbonát transzport funkcionális vizsgálata mikrofluorometriával

A korábbi expressziós és TER vizsgálatok során tapasztalt eltérések ellenére mindhárom tápoldatban tenyésztett sejteket alkalmasnak találtuk a funkcionális  $\text{HCO}_3^-$  transzport vizsgálatokra. A mikrofluorometriás mérések során azonban a HepatoSTIM tápoldatban tartott tenyészetek eredményei kevésbé reprodukálhatónak bizonyultak, mint a kontrol és differenciáló oldatban tenyésztett sejtek eredményei, ezért ezeket részletesebben nem vizsgáltuk. A kontrol és differenciáló tápoldatban tenyésztett sejtek viselkedése nagyban hasonlított, közülük a magasabb transzépítél ellenállású differenciáló mintát választottuk ki részletes jellemzésre.

Mikrofluorometriás méréseink során elsőként a HAT-7 sejtek membránjának bikarbonát és  $\text{CO}_2$  permeabilitását vizsgáltuk. A sejteket kezdetben mindkét oldalról  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  mentes HEPES mérőoldattal, majd átmenetileg apikális vagy bazolaterális oldalukat  $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_2$  pufferelt oldattal perfundáltuk. Amikor a HEPES-BIKARBONÁT oldatváltás apikálisan történt az intracelluláris pH gyors csökkenése volt megfigyelhető, ami a sejtbe beáramló  $\text{CO}_2$  hatásának tudható be. Ezt követően új egyensúly állt be, a pH stabilizálódott és egészen addig ezen a savasabb értéken maradt, míg az apikális oldalon visszaváltottuk a perfúziót HEPES oldatra. Ekkor a  $\text{CO}_2$  kiáramlott a sejtől, az intracelluláris pH pedig gyorsan visszatért a kiindulási értékre (19. A ábra). Ugyanez az oldatváltás a bazolaterális oldalon csupán igen kis pH csökkenést eredményezett, melyet az intracelluláris pH gyors emelkedése követett. Ez a  $\text{CO}_2$  és  $\text{HCO}_3^-$  beáramlás eredőjének tudható be. A lúgosabb egyensúlyi pH kisebb mértékű bazolaterális  $\text{CO}_2$  permeabilitásra és jelentős mértékű  $\text{HCO}_3^-$  felvételre utal (19. A-D ábra).

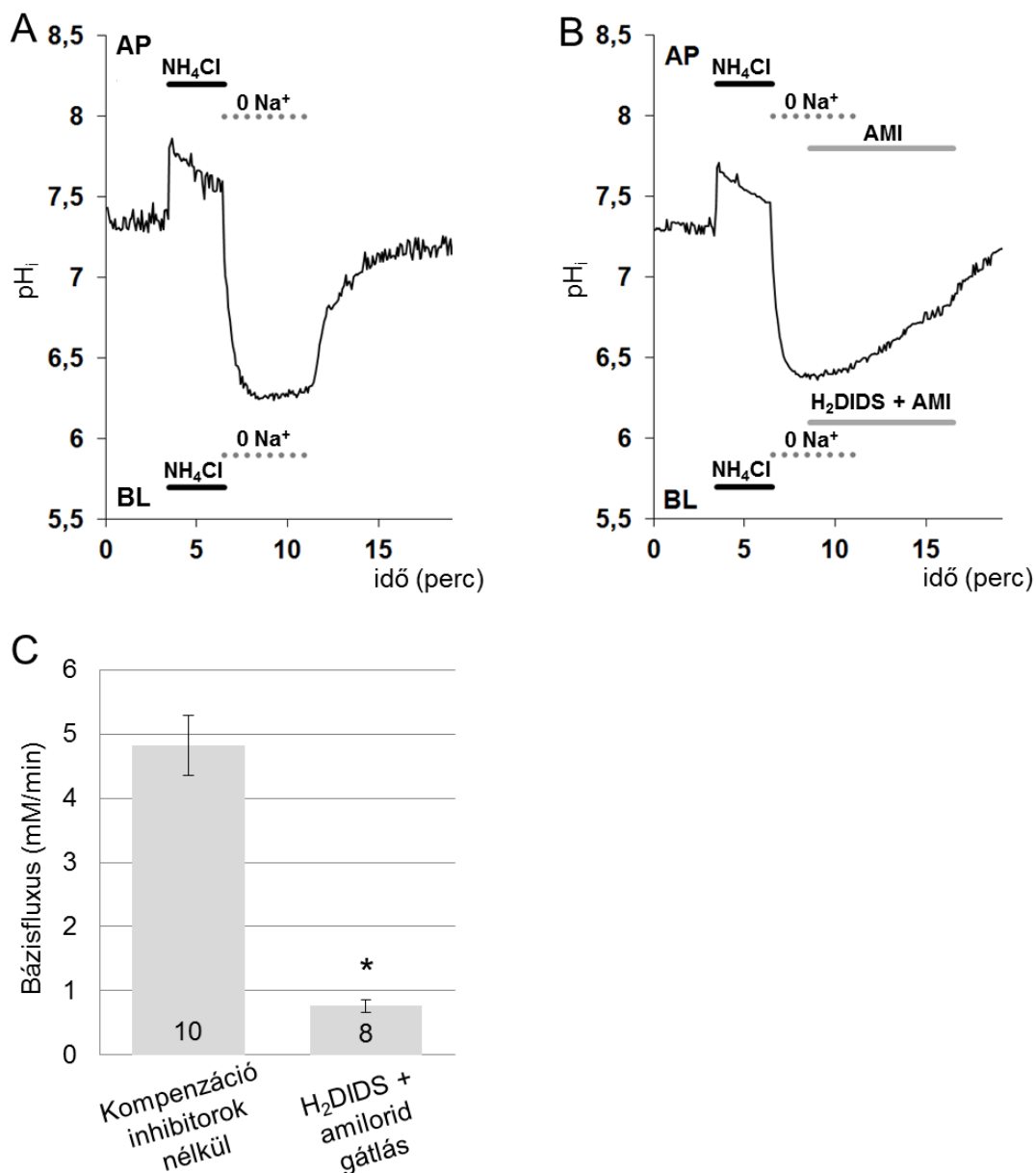
A bazolaterális  $\text{HCO}_3^-$  felvételt tovább vizsgálva a HEPES-BIKARBONÁT oldatváltást megismételtük  $\text{H}_2\text{DIDS}$  jelenlétében, valamint annak hiányában is. Az aniontranszport inhibitor hiányában a második oldatváltást követő intracelluláris pH változás dinamikája megegyezett az első váltás során tapasztalttal (19. B, E ábra).  $\text{H}_2\text{DIDS}$  jelenlétében azonban a mért lúgosodás lassabban ment végbe és a váltást követően beállt új egyensúlyi pH is alacsonyabb volt, mint a kontrollnál tapasztalt (19. C, E ábra), ami megerősíti, hogy a pH emelkedése  $\text{HCO}_3^-$  transzport következménye, az ebben érintett transzporter pedig a legnagyobb valószínűség szerint az Nbc4e1/Slc4a4. A szénsav anhidrázok  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélőkkel együttműködve szintén szerepet játszhatnak a  $\text{HCO}_3^-$  ionok felhalmozásában. Szerepüket membránpermeábilis gátlószerük, acetazolamid (az

ábrán ATZ) segítségével vizsgáltuk. Az acetazolamid jelenlétében a HEPES-BIKARBONÁT váltást követő lúgosodás gátolt, ami bizonyítja a szénsav-anhidrázok aktivitását a HAT-7 sejtekben (19. D, E ábra).



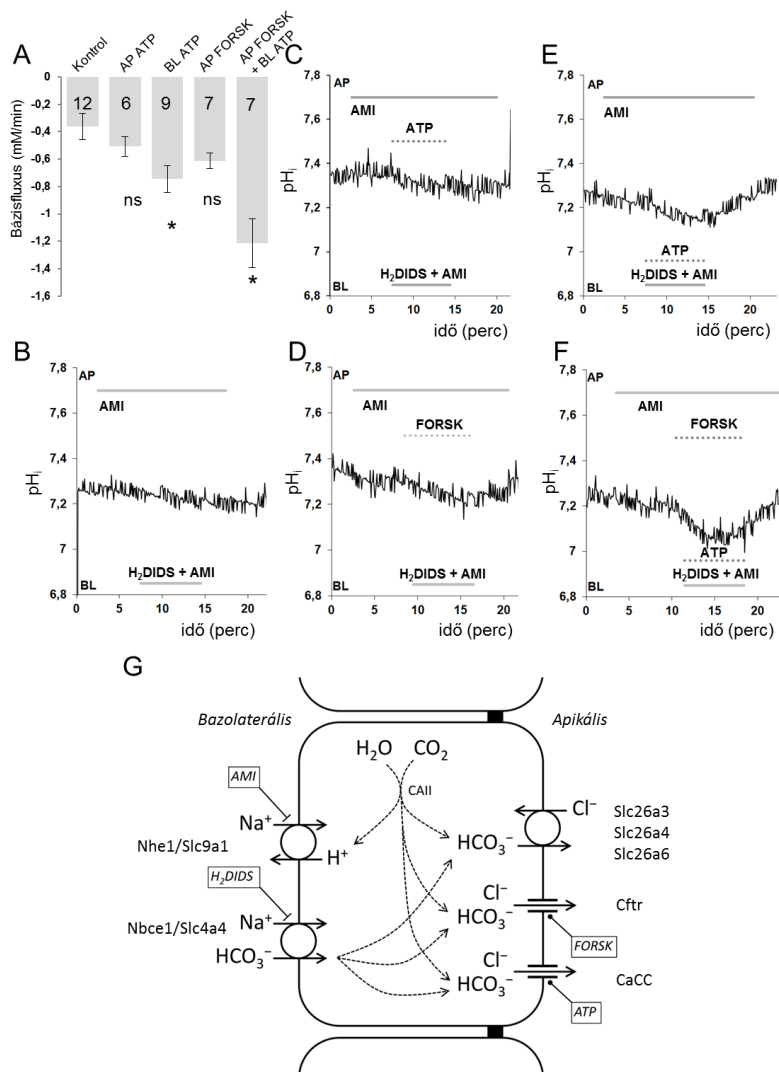
**19. ábra: A HAT-7 sejtek funkcionális polarizálódása és  $HCO_3^-$  felvétele.** A) Differenciáló médiumban Transwell membránon tenyésztett HAT-7 sejteket kezdetben  $HCO_3^-/CO_2$  mentes HEPES oldattal perfundáltunk, majd apikális (AP) és bazolaterális (BL) oldalukat külön-külön  $HCO_3^-/CO_2$  pufferelt oldatnak tettük ki 5 percre. Az ábrán a kezelés hatására bekövetkező intracelluláris pH változás látható. B) és C) Az intracelluláris pH változása bazolaterális HEPES- $HCO_3^-$  oldatváltást követően  $H_2DIDS$  (500  $\mu M$ ) hiányában és jelenlétében. D) Acetazolamid (ATZ, 100  $\mu M$ ) hatása az intracelluláris pH emelkedésére bazolaterális  $HCO_3^-/CO_2$  expozíciót követően. E) A bazolaterális  $HCO_3^-/CO_2$  expozíciót követő kezdeti pH változás sebességéből számított bázisfluxus inhibitorok hiányában, illetve jelenlétében. Adatok: átlag  $\pm$  SEM, elemszám az egyes oszlopokon megjelenítve (7-40). Statisztika: ismételt mérések ANOVA Dunnett post hoc teszttel. \*:  $p < 0,05$  a kontrollhoz viszonyítva [241].

A  $\text{HCO}_3^-$  ionok bazolaterális felvétele fundamentális szerepet tölt be azok vektoriális szekréciójában, emellett azonban a sejt intracelluláris pH szabályozásának is részét képezi. A pH szabályozás másik fontos eleme a  $\text{H}^+$  ionok leadása, mely minden sejtben működő mechanizmus. A HAT-7 sejtek pH szabályozásának felderítése érdekében  $\text{NH}_4^+$  pulzus technikát alkalmaztunk. A mérést standard BIKARBONÁT mérőoldattal kezdtük, majd a sejteket három percig mindkét oldalról 20 mM  $\text{NH}_4^+$ -ot is tartalmazó oldattal kezeltük. Ezt ismét standard BIKARBONÁT oldatos perfúzió követte. Az ammónium pulzus használata a várakozásoknak megfelelően először átmeneti alkalózist, majd ezt követő jelentős acidózist eredményezett (20. A, B ábra). A  $\text{HCO}_3^-$  és  $\text{CO}_2$  pufferelt oldatban az acidózist a sejtek néhány perc alatt kompenzálják (ábrán nem mutatom), ebben szerepet játszhatnak proton pumpák és/vagy  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők a  $\text{H}^+$ -ok leadása révén, valamint  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$  kotranszporerek, melyek a  $\text{HCO}_3^-$  ionok felvételéért felelősek. Amikor az ammónium pulzust követően olyan BIKARBONÁT mérőoldattal perfundáltuk a sejteket, melyben a  $\text{Na}^+$ -ot a membránon átjutni képtelen kationra,  $\text{NMDG}^+$ -re cseréltük az acidózis kompenzációja gyakorlatilag teljesen elmaradt (20. A, B ábra). A  $\text{Na}^+$  megvonás megszűnését követően azonban az intracelluláris pH gyorsan helyreállt, jelezve a transzport mechanizmusok  $\text{Na}^+$  függését, valamint hogy a HAT-7 sejtek pH szabályozásában proton pumpák nem vesznek részt. Korábbi ameloblasztok pH szabályozó szerepével foglalkozó vizsgálatok eredményeiből valószínűsíthető volt, hogy a transzport elsősorban  $\text{Nhe1}/\text{Slc9a1}$  és  $\text{Nbce1}/\text{Slc4a4}$  molekulák által megy végbe. Hogy teszteljük ezt a hipotézist, a kompenzáció gátlására ezek inhibitorait használtuk közvetlenül a  $\text{Na}^+$  megvonás megszűnését követően (20. B, C ábra). A HEPES-BIKARBONÁT váltáson alapuló kísérleteink megállapításainak megfelelően feltételeztük, hogy  $\text{HCO}_3^-$  felvétel kizárólag a HAT-7 sejtek bazolaterális membránján keresztül valósul meg, így bazolaterálisan 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DIDS}$ -et (bikarbonát felvétel gátlása) alkalmaztunk. Ugyanezek a kísérletek a  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők működésére, elhelyezkedésére vonatkozóan nem szolgáltatottak információt, így a  $\text{H}^+$  leadás gátlására mindkét oldalról 300  $\mu\text{M}$  amiloridot alkalmaztunk. Az említett inhibitorok jelenlétében az intracelluláris pH kompenzációjának sebessége mintegy 85%-kal csökkent (20. A-C ábra).



**20 ábra: Az intracelluláris pH változás kompenzációjáért felelős mechanizmusok vizsgálata HAT-7 sejtekben savterhelést követően HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> jelenlétében.** Differenciálós médiumban Transwell membránon tenyésztett HAT-7 sejteket tettünk ki mindkét oldalról 20 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-ot tartalmazó HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> oldatnak. Az NH<sub>4</sub><sup>+</sup> pulzust kétoldali Na<sup>+</sup> megvonás követte. A) Az intracelluláris pH kompenzáció a kétoldali Na<sup>+</sup> megvonás megszűnését követően. B) A kétoldali Na<sup>+</sup> megvonás megszűnését követő kompenzáció gátlása bazolaterális (BL) H<sub>2</sub>DIDS (500 μM) és amilorid (AMI, 300 μM) jelenlétében. Az esetleges apikális NHE gátlása érdekében amiloridot tartalmazott az apikális (AP) perfúziós oldat is. C) A pH változás kezdeti sebességéből számított bázisfluxus értékek inhibitorok hiányában és jelenlétében. Az adatok megadása átlag ± SEM formában történt, elemszám (az egyes oszlopokon megjelenítve): 8-10. Statisztika: egyutas t próba. \*:  $p < 0,05$  a kontrollhoz viszonyítva [241].

A bazolaterális  $\text{HCO}_3^-$  felvételi utak és a  $\text{H}^+$  leadáson alapuló pH szabályozás gátlása lehetővé teszi az apikális  $\text{HCO}_3^-$  szekréció mértékének meghatározását. Az apikális szekréció ugyanis egy ideig a bazolaterális felvétel gátlása mellett is folytatódik, ez viszont az intracelluláris pH csökkenésével jár. A savasodás kezdeti sebessége így az apikális  $\text{HCO}_3^-$  szekréció mértékét jelzi. A HAT-7 sejtek nyugalmi  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióját serkentőszerek alkalmazása nélkül mértük BIKARBONÁT mérőoldatban az  $\text{NH}_4^+$  pulzus kísérletekben hatékonynak bizonyult bazolaterális  $\text{H}_2\text{DIDS}$  ( $500 \mu\text{M}$ ) és kétoldali amilorid ( $300 \mu\text{M}$ ) gátlás mellett (21. A, B ábra). Ezt követően pedig a szekréció stimulálására különböző serkentőket, úgymint az intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  mobilizációt előidéző ATP-t ( $50 \mu\text{M}$ ) (21. A, C, E, F ábra) és/vagy az intracelluláris cAMP szintet növelő membránpermeábilis forskolin ( $10 \mu\text{M}$ ) és IBMX ( $500 \mu\text{M}$ ) kombinációt (21. A, D, F ábra) alkalmaztunk. Stimuláció hiányában a bázisfluxus igen alacsony (21. A ábra), ami alapján a nyugalmi  $\text{HCO}_3^-$  szekréció elenyésző. A purinerg receptorokon keresztül ható ATP apikális alkalmazása nem eredményezett szignifikáns változást (21. A, C ábra), ellenben bazolaterálisan adagolva a szekréció kismértékű, de már statisztikailag jelentős növekedését tapasztaltuk (21. A, E ábra). Az ATP-vel ellentétben a forskolin és az IBMX nem receptoron keresztül fejt ki hatását, hanem átjut a sejtmembránon. Ezek így nem kellett mindkét oldalon alkalmazni. Adagolásukra az apikális oldalt választottuk, mivel itt a mérőoldat közvetlenül érintkezik a sejtekkel, nem csak a Transwell membrán pórusain keresztül, mint a bazolaterális oldalon. Az apikális forskolin és IBMX kezelés ugyan valamelyest növelte a HAT-7 sejtek  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióját, azonban ez sem bizonyult szignifikánsnak (21. A, D ábra). A legnagyobb mértékű szekréciós választ a bazolaterális ATP és apikális forskolin és IBMX stimuláció együttese váltotta ki (21. A, F ábra), mutatva egyfelől a  $\text{Ca}^{2+}$  és cAMP mediálta jelátviteli utak közötti szinergizmust, másfelől egyértelműen bizonyítva, hogy a HAT-7 sejtek képesek bazolaterális-apikális irányú  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióra.



**21. ábra: A HAT-7 sejtek HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciós képességének vizsgálata ATP és/vagy forskolin stimuláció mellett vagy anélkül alkalmazott bazolaterális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvétel gátlás segítségével.** A differenciáló médiumban Transwell membránon tenyésztett HAT-7 sejtek HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvételének gátlását 500 μM H<sub>2</sub>DIDS és 300 μM amiloride (AMI) együttes bazolaterális (BL) alkalmazásával értük el. Az esetleges apikális NHE gátlása érdekében amiloridot tartalmazott az apikális (AP) perfúziós oldat is. A) A bazolaterálisan adagolt H<sub>2</sub>DIDS és amilorid hatására bekövetkező pH változás kezdeti sebességéből számított bázisfluxus értékek ATP és/vagy forskolin és IBMX (FORSK) stimuláció hiányában és jelenlétében. Adatok: átlag ± SEM formában történt, elemszám az egyes oszlopokon megjelenítve (6-12). Statisztika: egyszempontú ANOVA Dunnett post hoc teszttel. \*: p < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva. B-F) Az intracelluláris pH változását mutató reprezentatív mérési görbék. B) Kontrol körülmények között, stimuláció hiányában, C) apikális ATP (50 μM), D) apikális forskolin (10 μM) és IBMX (500 μM), E) bazolaterális ATP (50 μM) és F) apikális forskolin (10 μM) és IBMX, valamint bazolaterális ATP (50 μM) együttes hatására fellépő savasodás. G) Sematikus rajz a HAT-7 sejtek HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transzportjának feltételezett mechanizmusáról, melyen a folyamatban érintett főbb transzporterek és csatornák is feltüntetésre kerültek [241].

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Vegyes acináris-duktális tulajdonságok primer humán nyálmirigy kultúrákban

A szájszárazság számos beteg életét keseríti meg nap, mint nap, ezért a terápiás lehetőségek kutatása igen nagy jelentőséggel bír. Az acinusok teljes pusztulása esetén megoldást jelenthet egy mesterséges nyálmirigy megalkotása, melynek legfontosabb eleme az ion- és folyadékszekrécióna képes epitélium [13, 94, 245]. Ehhez olyan graft sejtek szükségesek, amelyek a nyálmirigy acinussejtekhez hasonló tulajdonságokat mutatnak, azonban az eddig tanulmányozott tenyészetek leginkább duktális tulajdonságokkal rendelkeznek [94, 98, 119, 246, 247]. A HuSMG sejtek eredeti leírása során transzmissziós elektronmikroszkópos morfológiai vizsgálatok és folyadékszekréción mérések eredményeiből Tran és munkatársai is azt a következtetést vonták le, hogy a sejtek duktális jellegűek [96]. A PT-HSG sejtek is relatíve kevésbé hasonlítanak acinusokra, leginkább duktális fenotípussal voltak jellemezhetőek [107].

Jelen munkánkban bizonyítottuk, hogy bár csak részben, az izolálási és tenyésztési körülmények megváltoztatásával mind a HuSMG, mind a PT-HSG kultúrák képesek az acináris tulajdonságok megőrzésére. A sejtekben kimutatható az acinusok jellemző transzportere az NKCC1 [4, 18, 19], de ugyanakkor ENaC duktális Na<sup>+</sup> csatornák [4, 20] is kifejeződtek bennük (13. ábra). Az acinusokban működő alternatív Cl<sup>-</sup> felvételi út, az NHE1 és AE2 kapcsolt működése révén valósul meg [4, 18, 19], ezeket az ioncserélőket szintén sikerült kimutatnunk mind PT-HSG (13. ábra), mind huSMG sejtekben. A primer humán sejt kultúrákban expresszálandó NBCe1 (13. ábra) nyálszekréciónban betöltött szerepéről kevesebbet tudunk. Patkány, egér, tengerimalac és ember parotisában, illetve parotis eredetű sejt vonalakon az acinusok bazolaterális membránjában [76, 207, 208, 234, 248, 249], illetve tengerimalacban a duktuszok lumenális membránjában mutatták ki [248]. Ezzel szemben szubmandibuláris mirigyben jelenlétét a duktuszok apikális [250, 251] és bazolaterális felszínén [248, 250] írták le. A génextpresszió további kvantitatív vizsgálata az általunk létrehozott HuSMG és PT-HSG sejteken jelentős dedifferenciálódást mutatott *in vitro* körülmények között, melyet a duktális markerek (ENaC, Claudin-1) mennyiségének növekedése, míg az acináris



markerek (AQP5, NKCC1, amiláz) csökkenése jelzett, ennek ellenére a sejtek megőrizték az acinusokra jellemző szekréciós képességüket [242]. Rövidzárlati áram mérésekkel a Na<sup>+</sup> reabszorpció mellett bazolaterális-apikális irányú anion szekréció is kimutatható volt, emellett az iontranszport a Ca<sup>2+</sup> mediálta jelátviteli út aktiválásával növekedett és az NKCC1 aktivitása is igazolódott [242].

## 6.2. Transzgén expresszió és folyadékszékreció Par-C10 sejtekben

A nyálmirigy génterápia alapötlete Dr. Bruce Baum és kutatócsoportja nevéhez fűződik. Hipotézisük szerint az acináris szekréció hiányában a ductuszok képesek lehetnek bazolaterális-apikális irányú KHCO<sub>3</sub> ozmotikus gradiens létrehozására, mely elégséges hajtóerőt szolgáltat a víztranszporthoz, ha a ductuszsejteket vízcsatornák beépítésével átjárhatóvá teszik [95, 116]. Bár a KHCO<sub>3</sub> gradiens létrejöttét még nem bizonyították, az AQP1 génbevitel hatékonynak bizonyult mind *in vitro*, mind *in vivo* kis és nagy állatmodellben, a humán klinikai vizsgálat pedig tolerálhatóságát is igazolta [118].

A géntranszfer eredményességét először sejtvonalakon (két vese-: HEK 293, MDCK és egy nyálmirigy eredetű: SMIE) igazolták, mindhárom típusú sejtben kifejeződött a humán AQP1 fehérje 5-ös szerotípusú adenovírus vektorral történő transzdukciót követően [116], ráadásul MDCK sejtekben az expresszió mind az apikális, mind a bazolaterális membránban megjelent, ami a teljes transzcelluláris átjárhatóság feltétele [116, 252]. Eredményeink alapján a Par-C10 sejtekben szintén könnyen kimutatható volt a humán AQP1 jelenléte mRNS szinten 1, 10 és 100 víruspartikulum/sejt arányú transzdukciót követően (15. A ábra), ezen kívül egy másik vírusvektor felhasználásával, az AdEYFP segítségével is igazolható volt, hogy a bevitt transzgént a sejtek jelentős hányada kifejezi (14. ábra).

Delporte és munkatársai kívülről biztosított ozmotikus gradiens (apikális oldal 300 mosm, bazális oldal 400 mosm tápfolyadék) hatására ötszörösre emelkedett nettó vízmozgást mutattak ki AdhAQP1 vírussal kezelt MDCK sejteken keresztül, míg a nem transzdukált sejtekben minimális folyadékmozgást mértek, mely nem különbözött a kontroll vírussal kezelt sejtektől [116]. SMIE sejtvonalat 5 MOI (multiplicity of infection, 5 bizonyítottan fertőzőképes víruspartikulum/ sejt) arányban transzdukálva az apikális oldalon a folyadékmennyiség 15-30 percig lineárisan emelkedett, 30 perc után a

transzdukált sejtekben nagyjából  $60 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ -nek adódott a nettó vízmozgás szemben a nem transzdukált sejtekben mért  $5 \mu\text{l}/\text{cm}^2$ -rel [253]. A folyadékmozgás ezen kívül dózis függést is mutatott, 0,1-1 MOI között meredeken nőtt 15 perces inkubációs időt alkalmazva, ennél nagyobb vírudózisok alkalmazása esetén platófázis elérése volt megfigyelhető [253]. Hasonló eredményre jutottunk mi is, már 3 víruspartikulum/sejt arány alkalmazása is elegendőnek bizonyult a folyadékmozgás szignifikáns növekedéséhez a kezeletlen Par-C10 sejtekhez viszonyítva, bár ezeken a sejteken vizsgálva 2 óra inkubációs időt alkalmazva is csak  $30 \mu\text{l}$  körülnek bizonyult a folyadék mennyiségének növekedése az apikális oldalon kb.  $1 \text{ cm}^2$  felületű membránokat felhasználva (15. B ábra). Ennek egyik lehetséges oka, hogy a Par-C10 sejtek a SMIE sejtvonalhoz képest nagyságrendekkel zártabb epitéliumot alakítanak ki (Par-C10: kb.  $2000 \Omega\text{cm}^2$ , SMIE:  $< 100 \Omega\text{cm}^2$ ) [234, 254].

Természetesen az adenovírusok alkalmazása számos kockázattal jár, ráadásul csak tranziens génexpresszió előidézésére alkalmasak, ezért kiemelt jelentősége van a génterápiás vektorok kutatásának, ezen belül is a biztonságosabb vírusvektorok (ilyenek például a természetüknél fogva replikáció deficiens adeno-asszociált vírusok (AAV)), valamint nem vírus eredetű, fizikai/kémiai elven működő vektorok (például az ultrahang segítségével elért géntranszfer (szonoporáció)) vizsgálatának [255-259]. Ezen kívül, a vízcsatornák beépítése mellett, a génterápia számos más lehetőséget is tartogat, így például a mirigyek radioprotekciója is elképzelhető génbevétel alkalmazásával [260-265] vagy a szájszárazság kezelésétől elvonatkoztatva a nyálmirigyek génterápiás célszervként felhasználhatóak lehetnek számos endokrin és exokrin faktor termeltetésére is [99].

## **6.3. *In vitro* ameloblaszt transzport modell jellemzése**

### **6.3.1. Ameloblaszt markerek expressziója**

Az ameloblasztok transzportfolyamatairól igen keveset tudunk, ezen belül is  $\text{HCO}_3^-$  szekréciójukat klasszikus sejtfiziológiai módszerekkel korábban nem vizsgálták, a leírt mechanizmusok elsősorban expressziós vizsgálatokon alapulnak. Munkánk során olyan *in vitro* modell létrehozása volt a célunk, mely alkalmas az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$

transzportjának vizsgálatára. A cervikális hurok epitéliumából létrehozott HAT-7 sejtvonal [229] ígéretes modellnek bizonyult abban az értelemben, hogy ameloblaszt specifikus markerek expresszióját számos alkalommal vizsgálták rajta sikerrel. A sejtkultúra megalapításakor immuncitokémiával a szekréción fázisra jellemző amelogenint és ameloblasztint mutatták ki a sejtekben [229]. Úgy tűnik azonban, hogy a sejtek részben megőrizték plaszticitásukat, bár elsősorban ameloblaszt fenotípust mutatnak, mely a Notch1 jelátviteli útvonal aktivitásának köszönhető, viszont a Jagged1 jelátviteli útvonal aktiválásával a sejtek stratum intermedium irányba is differenciálthatók, melyet az alkalikus-foszfátáz (ALP) pozitív sejtek arányának növekedése jelez [229, 230]. A sejtek markerexpresszióját számos faktor befolyásolja, így növekedési faktorok, óragének, de maga az amelogenin jelenléte is. Xu és munkatársai úgy találták, hogy a HAT-7 sejtek képesek egér rekombináns amelogenin felvételére, mely az endogén amelogenin mRNS mennyiségét növelte a tenyésztetben annak stabilizálásával [266]. A fogfejlődés irányításában jelentős szerepe van az epiteliális-mezenchymális kölcsönhatásoknak, számos növekedési faktor vesz részt a folyamatban [121, 122]. A HAT-7 sejteken számos növekedési faktor hatását vizsgálták, melyek közül a BMP-2 növelte az amelogenin expresszióját, de enyhén csökkentette a Hes1 stratum intermedium marker kifejeződését [267]. Idegi növekedési faktorok (NGF, BDNF és NT-4) szintén növelték az ameloblasztin és enamelin mennyiségét, ezen belül az NT-4 az amelogenin expresszióját is megemelte [232], ellenben a fibroblaszt növekedési faktor FGF10 az ameloblaszt markerek (amelogenin, ameloblasztin, KLK4) downregulációját okozta [268]. A szekréción fázis markereként számoltartott amelogenin és enamelin RNS expressziós szintje csökkent Runx2 és növekedett Dlx3 túltermelés hatására [269]. Viszont az érési fázisra jellemző KLK4 upregulációja következett be mind Dlx3, mind Runx2 jelenlétében [269]. A HAT-7 sejteket mezenchimális eredetű pulpa őssejtekkel (DPSC) vagy dentális folliculus eredetű sejtvonallal (BCPb8) kokultúrában tenyésztve szintén az ameloblaszt markerek (elsősorban ameloblasztin) kifejeződésének növekedését figyelhetjük meg [231, 270]. Az ameloblasztok strukturális-funkcionális átalakulásai időben szorosan szabályozott mechanizmust feltételeznek, így óragének érintettsége is felvetődött a folyamat szabályozásában. Úgy tűnik, hogy a HAT-7 sejtek valóban expresszálnak óragéneket,

ráadásul az egyes markerek (amelogenin, enamelin, KLK4, MMP20) ezek irányítása alatt állnak [233, 269].

Ahogy a fentiekből is látható, a HAT-7 sejtek tenyésztési körülményektől függően az ameloblaszt markerek széles tárházát képesek produkálni, ezért többféle ameloblaszt típus modelljeként szolgálhatnak. A markerek vizsgálata így azért is fontos, hogy a különböző ameloblaszt állapotokat elkülönítsük és megjósoljuk, hogy a sejtek leginkább melyik ameloblaszt funkció(k) modellezésére alkalmasak. Munkánk során a HAT-7 sejteket permeábilis poliészter membránokon tenyésztettük három különféle tápoldatot (kontrol (K), differenciáló (D), HepatoSTIM (H)) alkalmazva. Az általunk alkalmazott tenyésztési körülmények között a HAT-7 monolayerek, bár morfológiájuk eltért (16. és 18. ábra) a szekréción és érési fázisú ameloblasztok hisztológiai képétől [126], expresszáltak két igen fontos markert, a KLK4-et, mely az érési fázis jellemző proteáza [160] és az amelotint (16. ábra), melyet szintén az érési fázisra jellemző fehérjének tartanak, bár expresszióját kimutatták a fogelőtörést követően a junkcionális epitéliumban is [143]. Az expressziót az alkalmazott tápoldat nem befolyásolta. Mivel a kristályképződés az érési fázisban a legnagyobb mértékű, ekkor a legfontosabb a pH szabályozás is [156], így a markerexpresszió alapján a HAT-7 sejtvonal valóban alkalmas modellje lehet az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportjának.

### **6.3.2. A vektoriális transzport szükséges feltétele – szoros kapcsolatok**

A vektoriális transzport létrejöttének előfeltétele a szoros kapcsolatok kialakulása az epitél sejtek között, melyek limitálják a sejtek közötti szabad diffúziót, azonban bizonyos ionok mozgását lehetővé teszik [15, 18, 58]. A HAT-7 sejtek közötti szoros kapcsolatok kialakulását jelzi, hogy a sejtek képesek transzepitél ellenállás kialakítására (17. A ábra).

Az ameloblasztokban kimutatott szoros kapcsolati fehérjék közül [167-173] számos expresszálódik HAT-7 sejtekben is. Modellünk jellemzése során *Occl*, *Zo-1*, *Zo-2*, *Cldn1*, *Cldn4*, *Cldn7* és *Cldn8* expresszióját mutattuk ki mRNS szinten (17. B ábra), melyek közül az első három széles körben (így ameloblasztokban is) expresszálódó strukturális elem [167, 168, 170, 171, 271], míg a claudinok jelentős variabilitást mutatnak az egyes szövetek között, fontos szerepet tulajdonítanak nekik a paracelluláris

permeabilitás szabályozásában [271, 272]. A *Cldn2* és *Cldn10* nem volt kimutatható a sejtekben, ellentétben a korábbi eredményekkel [169, 174], munkánk során a *Cldn6* és *Cldn9* expresszióját nem vizsgáltuk.

A HAT-7 sejtekben expresszázó claudinok elsősorban a paracelluláris permeabilitás csökkentésének irányába hatnak, és az irodalmi adatok alapján mindegyiket megtalálták rágszálók érési fázisú ameloblasztjainak szoros kapcsolataiban [169, 170, 172]. A CLDN1 barrier funkciója viszonylag jól ismert, *Cldn1* deficiens egerek órákkal születésüket követően elpusztulnak a nagymértékű transzdermális folyadékvesztés következtében [273]. *Cldn4* túltermelése MDCK II sejtekben a paracelluláris  $\text{Na}^+$  permeabilitás csökkenését eredményezte [274], hasonló eredményt hozott az exogén *Cldn8* bevitele is [275], sőt a CLDN8 az MDCK II sejtek közötti sav-bázis (így  $\text{H}^+$ ,  $\text{HCO}_3^-$  és  $\text{NH}_4^+$ ) permeabilitást is csökkentette [276]. A CLDN4 és CLDN8 egymással kölcsönhatásban is állhat, interakciójukat vesében írták le, ahol a *Cldn8* kiütése esetén a CLDN4 is hiányzott a szoros kapcsolatból [277]. MDCK II sejtekben a *Cldn4* és *Cldn7* csendesítése siRNS segítségével csökkentette a sejtek transzepitel ellenállását és növelte azok paracelluláris  $\text{Na}^+$  permeabilitását, míg a  $\text{Cl}^-$  permeabilitás változatlan maradt [278]. LLC-PK1 sejtekben azt is igazolták, hogy a CLDN4 és CLDN7 paracelluláris  $\text{Cl}^-$  csatornaként is funkcionálhat, anion permeabilitásra gyakorolt hatásuk függ a szoros kapcsolat többi alkotójától [278].

A HAT-7 sejtek claudin expresszióját a tenyésztési körülmények is befolyásolták, az mRNS mennyiségének növekedése volt kimutatható a permeabilis membránon tenyésztett minták esetében a standard plaztik tenyésztőedényben tartott sejtekhez viszonyítva (17. B ábra). Az alkalmazott tápoldat is befolyásolta az expressziót, legszembetűnőbb különbség a *Cldn8* kifejeződésében mutatkozott, a kontroll médiumban tenyésztett sejtek esetén volt a legalacsonyabb, míg a HepatoSTIM minták esetében a legmagasabb (közel négy-ötszöröse a kontrol médiumban tenyésztett sejtek expressziójának). A transzepitel ellenállás mérések eredményei is tükrözik a *Clau8* kifejeződésében tapasztalható különbségeket (17. A ábra), összhangban az irodalmi adatok alapján várt hatással [275]. Talán éppen a túl magas transzepitel ellenállás és a paracelluláris  $\text{Na}^+$  transzport túlzott limitációja eredményezte a H minták kevésbé reprodukálható viselkedését és kevésbé jó eredményeit a mikrofluorometriás vizsgálatok során, hiszen számos  $\text{Cl}^-$  és  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót mutató epitéliumban, így

nyálmirigy acinusokban [16-18] és hasnyálmirigy duktuszokban [58] az anionokkal párhuzamosan mozgó kationok paracellulárisan távoznak. Azonban a másik véglet, a túl alacsony TER értékekkel jellemezhető modellek használata sem célravezető, saját nem publikált méréseink alapján az LS-8 sejtek TER értéke a vak mintától gyakorlatilag nem különbözött és a sejtek a funkcionális mérések során sem teljesítettek jól. Amennyiben az ameloblasztokban is paracelluláris  $\text{Na}^+$  áram követi a  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót, feltételezhetjük relatíve áteresztő („leaky”), de még a szabad diffúziót limitáló szoros kapcsolatok jelenlétét a sejteken. Ezért is választottuk ki részletes jellemzésre a néhány  $100 \Omega\text{cm}^2$  transzepitél ellenállású D mintákat (17. A ábra), melyek TER értékei hasonló nagyságrendűek voltak, mint a mérhető aniontranszporttal rendelkező primer humán nyálmirigy kultúráknál tapasztalt értékek [242].

### 6.3.3. $\text{HCO}_3^-$ transzportban és pH szabályozásban résztvevő fehérjék kifejeződése

Ameloblasztokon számos transzporter, csatorna és szénsav-anhidráz expresszióját vizsgálták, illetve az egyes transzporterekre nézve deficiens állatmodellek segítségével igazolták ezek szerepét az amelogenezisben [140, 192, 195-197, 204, 209, 210, 215, 226]. Arról azonban a mai napig viták folynak, hogy pontosan milyen transzporterek fejeződnek ki az amelogenezis egyes szakaszaiban és ezek az ameloblasztok melyik oldalán találhatóak.

A legfrissebb összefoglaló közlemények alapján ameloblasztokon CAR2, NHE1, AE2, NBCe1 és CFTR jelenlétét tartják általánosan elfogadottnak [139, 175, 279], HAT-7 sejteken ezek a kulcsmolekulák szintén kifejeződnek, ráadásul nem csak mRNS (18. A ábra), de fehérje szinten is (18. B-I ábra). A HAT-7 sejtek az alkalmazott tenyésztési körülmények között érési fázisú markereket expresszálnak (16. ábra), így a modellünk azokat a vizsgálatokat látszik alátámasztani, melyek ezeket a fontos pH szabályozó molekulákat érési fázisú ameloblasztokon találták meg vagy legalábbis azok expressziós szintjének növekedését írták le az érési fázis során [140, 192, 196, 204, 209, 211, 215]. A fentieken kívül két *Slc26a* családba tartozó anioncserélő (SLC26A4 és SLC26A6) is megtalálható volt az általunk modellként használt sejtvonalon (18. ábra A, J-L), melyeket szintén azonosítottak ameloblasztokon [195, 226], az SLC26A6 esetén az irodalmi adatokkal összhangban [226] az apikális membrán lokalizáció is kimutatható

volt (18. K, L ábra). Úgy tűnik azonban, hogy a fehérjék megjelenése a HAT-7 sejtekben nem homogén, azok egyes sejtcsoportokhoz köthetőek (18. ábra D, G), ami egyfelől mutathatja a HAT-7 sejtek részleges differenciációját/plaszticitását [229, 230], másfelől viszont nem befolyásolta a transzport méréseket. A HepatoSTIM oldatban tenyésztett sejtek kivételével reprodukálható eredményeket kaptunk, melyek az előkísérletek alapján a kontrol és differenciáló tápoldatban tenyésztett sejtek között sem mutattak jelentős különbséget. Az általunk alkalmazott immuncitokémiai festéssel a legtöbb esetben a transzporterek membránlokalizációja sem volt elkülöníthető (18. ábra C, E, F). Ugyanakkor a korábbi vizsgálatokban ezek polarizált expressziót írtak le ameloblasztokon [140, 192, 195-197, 204, 209, 211, 215], illetve saját transzport méréseink során egyértelmű funkcionális különbség mutatkozott az apikális és a bazolaterális membrán között (19. A ábra). Lehetséges, hogy a festési eljárás és mintakezelés finomításával a transzporterek membránlokalizációja is láthatóvá tehető.

#### **6.3.4. Funkcionális polarizáció és mérhető $\text{HCO}_3^-$ szekréció**

Jelen munkánk egyik legfontosabb eredménye, hogy sikerült HAT-7 sejtekből polarizált monolayereket létrehoznunk, melyet egyfelől a szoros kapcsolatok jelenléte (17. A, B ábra), másfelől a sejtek funkcionális viselkedése is jelez (19. A ábra). A sejtek apikális membránja jelentős  $\text{CO}_2$  permeabilitással jellemezhető, azonban  $\text{HCO}_3^-$  felvételére nem képes, míg bazolaterális oldalukon kisebb a  $\text{CO}_2$  permeabilitás, azonban  $\text{HCO}_3^-$  felvétel mérhető (19. A, B ábra). Ameloblasztokon korábban ilyen jellegű méréseket nem végeztek, azonban hasonló jelenséget tapasztaltak más jelentős  $\text{HCO}_3^-$  transzportot folytató epitéliumok esetén, így tengerimalac hasnyálmirigy duktuszok [280] és emberi hasnyálmirigy duktusz eredetű sejtvonal, CFPAC vizsgálata során is [281]. A megfigyelés ugyancsak alátámasztja azt a hipotézist, mely szerint az ameloblasztok rendelkeznek a  $\text{HCO}_3^-$  transzporthoz szükséges molekuláris háttérrel és képesek semlegesíteni a hidroxipapatit felszabadulása során keletkező  $\text{H}^+$ -okat [133, 156, 175, 209].

A  $\text{HCO}_3^-$  felvétel legnagyobb valószínűséggel két úton valósulhat meg ameloblasztokban,  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$  kotranszport révén, valamint  $\text{CO}_2$  diffúziójával, melynek átalakulását  $\text{H}^+$  és  $\text{HCO}_3^-$  ionokká szénsav-anhidrázok katalizálják [175, 197, 209]. A mi

kísérleti körülményeink között a HAT-7 sejtek  $\text{HCO}_3^-$  felvétele  $\text{H}_2\text{DIDS}$  segítségével jelentős mértékben gátolható volt (19. C, E és 20. B ábra), ráadásul a savterheléses kísérletekben a pH kompenzáció  $\text{Na}^+$  függőnek bizonyult (20. A-C ábra), arra utalva, hogy a  $\text{HCO}_3^-$  felvétel jelentős részéért valóban az NBCe1/SLC4A4 felelős. Ez ismét párhuzamba állítható a hasnyálmirigy duktuszok működésével, melyekben szintén az NBCe1 a felelős legnagyobb részét a  $\text{HCO}_3^-$  sejtbé juttatásáért [282]. A membrán permeábilis szénsav-anhidráz gátló acetazolamid alkalmazása szintén csökkentette a bazolaterális bázisfluxust HEPES-BIKARBONÁT oldatváltást követően HAT-7 sejtekben (19. D, E ábra), ez arra utal, hogy a  $\text{HCO}_3^-$  felvétel szénsav-anhidrázok és  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélők együttműködése révén, alternatív úton is megvalósulhat. Az ameloblasztokban a több szénsav-anhidráz izoformát is találtak [189, 190, 193, 238], melyek közül mi a CAR2 expresszióját szintén kimutattuk a HAT-7 sejtekben (18. A, I ábra).

Ammónium pulzus technikával savterhelést előidézve vizsgáltuk, hogy a HAT-7 sejtek milyen mechanizmusok révén képesek intracelluláris pH-juk helyreállítására és igazoltuk, hogy nátrium megvonással a pH kompenzáció teljesen teljes egészében meggátolható (20. A ábra), más  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót mutató epitéliumokhoz (parotis acinus sejtek, hasnyálmirigy duktuszok) hasonlóan [234, 239, 282]. Ez egyúttal azt is mutatta, hogy a HAT-7 sejtek plazmamembránjáról az ameloblasztokban kimutatott  $\text{H}^+$ -ATPázok [140, 190, 227] minden bizonnyal hiányoznak, ugyanis ezek képesek lettek volna a savterhelést extracelluláris  $\text{Na}^+$  hiányában is kompenzálni. Eddigi *in vitro* méréseink így inkább az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  szekréciójáról szóló hipotéziseket erősítik [133, 156, 175], semmint  $\text{H}^+$  szekréciót leíró elméleteket [140, 185].

A savterheléses kísérletek során, 300  $\mu\text{M}$  amiloridot és 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DIDS}$ -et használva az NHE1/SLC9A1 és NBCe1/SLC4A4 gátlására [4, 234, 282] a pH kompenzáció mintegy 85%-os csökkenését értük el (20. A-C) ábra), mely további bizonyítéka annak, hogy az NHE1/SLC9A1 és NBCe1/SLC4A4 együttesen felelős  $\text{HCO}_3^-$  felvétel/pH szabályozás legnagyobb részéért.

Miután sikeresen blokkolni tudtuk a bazolaterális  $\text{HCO}_3^-$  felvétel túlnyomó többségét amilorid és  $\text{H}_2\text{DIDS}$  segítségével, lehetőségünk nyílt a  $\text{HCO}_3^-$  szekréció vizsgálatára egy relatív egyszerű módszer segítségével. A  $\text{HCO}_3^-$  ionokat szekretáló epitéliumokban a  $\text{HCO}_3^-$  bazolaterális felvételét annak apikális leadása követi, így a bazolaterális



felvételi utak gátlásával, de folytatódó apikális szekréció mellett az intracelluláris pH csökkenése következik be [234, 239, 282]. A pH csökkenés kezdeti sebessége így a  $\text{HCO}_3^-$  szekréció mértékére utal. Együttes amilorid és  $\text{H}_2\text{DIDS}$  gátlást alkalmazva nyugalmi állapotú (stimulálószerrel nem kezelt) sejteken kismértékű, lassú acidózist figyeltünk meg, mely fokozható volt serkentőszerek alkalmazásával (21. B-F), ezzel először igazoltuk egy *in vitro* ameloblaszt modellben, hogy sejtek képesek aktív transzcelluláris  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióra. Az extracelluláris ATP, mely purinerg receptorokon keresztül ható, intracelluláris  $\text{Ca}^{2+}$  szintet növelő molekula [283], stimulálta a  $\text{HCO}_3^-$  transzportot a bazolaterális oldalról adagolva, azonban hatástalan volt az apikális oldalon (21. C, E ábra). Más epitéliumokban szintén az ATP eltérő hatását figyelték meg az alkalmazás helyétől függően [234, 239, 283, 284]. Eredményeink felvetik annak a lehetőségét, hogy az extracelluláris ATP az ameloblasztok transzportfolyamataiban fontos szabályozó szerepet töltsön be, talán éppen a nemrégiben azonosítottak érési fázisú ameloblasztokon azonosított  $\text{Ca}^{2+}$  aktiválta  $\text{Cl}^-$  csatornák működésére hatva [285]. Bár a forskolinnak, mely a cAMP/PKA útvonalra hat és ismert az ameloblasztokon is kimutatott CFTR aktivátora önmagában nem volt szignifikáns hatása [215], jelentősen potenciálta az ATP hatását, mely a két jelátviteli út kölcsönhatását mutatja hasonlóan más epitéliumokban tapasztaltakhoz [6].

### 6.3.5. A modell korlátai

Jelen munkánk legnagyobb érdeme, hogy elsőként igazoltuk egy sejtvonalról, hogy alkalmas modellje lehet az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportjának, mivel a HAT-7 sejtek expresszálták mind az érési fázisú ameloblasztok markereit, mind azok fontos transzportereit, emellett képesek voltak szoros kapcsolatok kialakítására, apikális és bazolaterális oldaluk elkülönült és vektorialis  $\text{HCO}_3^-$  szekréciót mutattak. Mindemellett azonban kell néhány szót ejtenem a modell korlátairól is. Egyfelől a HAT-7 sejtvonal a cervikális hurok epitéliumából származik és ismert, hogy több irányba is képes differenciálódni [229, 230]. Ráadásul az ameloblaszt specifikus fehérjék közül is képes a tenyésztési körülményektől függően más és más fázisra jellemző markereket expresszálni [232, 233, 267], ezért nagyon fontos lenne a differenciálódás fontos faktorainak jobb megismerése, hogy pontosabban behatárolható legyen a sejtek állapota.

Az is ismert, hogy különböző funkciót tulajdonítanak a sima és fodros felszínű ameloblasztoknak [156], így fontos lenne tudni, hogy ezek az alakok megjelennek-e a HAT-7 monolayereken belül, illetve hogyan lehet befolyásolni átalakulásukat. Harmadszor, úgy tűnik, hogy az érési fázis során az ameloblasztok egy egységként működnek a velük gap junctionnel kapcsolódó papilláris sejtekkel [140], ezért szükség lehet ezeknek az interakcióknak a modellezésére is. A felvetett kérdések egy részére megoldást kínálhat a sejtenyésztési módszerek finomítása, például megfelelő növekedési faktorok [232, 267, 269] és/vagy kokultúrák alkalmazása [231, 270].

## 7. Következtetések

Az elvégzett kísérletek és az irodalom áttekintése után az alábbi következtetéseket vontuk le:

1. Frakcionált emésztést és kondicionált médiumot alkalmazva sikeresen létrehozhatóak/fenntarthatóak olyan primer humán szubmandibuláris nyálmirigy eredetű tenyészetek, melyekben a sejtek részben megőrzik az acináris sajátságokat, így expresszálják például az acinusok karakterisztikus transzporterét az *NKCC1*-et
2. A Par-C10 sejtvonal adenovirális géntranszfer kísérletekre alkalmas, a bevitt transzgént a sejtek nagy hányada expresszálja, AdAQP1 transzdukciót követően a sejtek vízpermeabilitása kimutathatóan megnő
3. A HAT-7 sejtek érési fázisú ameloblasztokra jellemző markereket (KLK4-et és amelotint) expresszálják Transwell membránon DMEM-F12 alapú és HepatoSTIM médiumokban
4. A HAT-7 sejtek képesek szoros kapcsolatok kialakítására, melyet transzepitél ellenállás kialakulása jelez. Szoros kapcsolataik permeabilitása eltérő az alkalmazott tenyésztési körülményektől függően, HepatoSTIM tápoldatban a paracelluláris permeabilitás jelentősen csökken, melyért elsősorban a *Cldn8* megnövekedett expressziója felelős
5. A HAT-7 sejtek expresszálják az összes fontos enzimet, transzportert és csatornát (CAR2, NHE1, AE2, NBC1, Pendrin, PAT-1, CFTR), melyeket ameloblasztokban is leírtak és melyeknek szerepe lehet az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportjában
6. DMEM-F12 alapú,  $\text{CaCl}_2$ -dal és dexametazonnal kiegészített tápoldatban tenyésztve a HAT-7 sejtek alkalmasak transzport mérések elvégzésére
  - a) a mikrofluorometriás mérések alapján a sejtek funkcionális értelemben is polarizáltak, apikális membránjuk jelentős  $\text{CO}_2$  permeabilitással jellemezhető, míg bazolaterális oldalukon  $\text{HCO}_3^-$  felvételre képesek
  - b)  $\text{HCO}_3^-$  szekréciójuk mérhető és stimulációra reagál

A fentiek alapján elmondható, hogy elsőként hoztunk létre olyan *in vitro* modellt, mely alkalmas az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportjának funkcionális vizsgálatára.

## 8. Összefoglalás

Az szájüregi egészség megteremtésében és fenntartásában kiemelt szerepe van az epitél folyadék- és elektrolitszekréciónak. Bár maga a végső szekrétum igen különböző – gondoljunk a hipotóniás összetételű nyálra vagy a fogzománkra – bizonyos mechanizmusok ugyanúgy működnek minden epitéliumban. Amíg azonban a nyáleválasztás folyamata és orális egészségre gyakorolt hatása már gazdag szakirodalommal rendelkezik és a kutatások egyre inkább a gyakorlati alkalmazás irányába tolódnak, addig az ameloblasztok transzportfolyamatai alig ismertek.

A fej-nyaki tumorok terápiás besugárzása vagy Sjögren szindróma következtében fellépő acinussejt-pusztulás és következményes nyálmirigy hipofunkció jelentősen rontja a betegek életminőségét. Jelenleg hatékony gyógyszeres kezelés nem ismert, azonban a szövetregeneráció és a génterápia új lehetőséget jelenthet. Munkánk során igazoltuk, hogy frakcionált emésztést és kondicionált médiumot alkalmazva primer humán nyálmirigy eredetű sejt kultúrákban az acinusok elektrolitszekréciónájában kulcs szerepet betöltő NKCC1 expressziója mutatható ki, jelezve, hogy a sejtek részben képesek megőrizni az acináris sajátosságokat *in vitro*, így potenciálisan felhasználhatóak szövetépítéshez. Bizonyítottuk továbbá, hogy a Par-C10 sejtvonal a nyálmirigy génterápia modelljeként alkalmazható.

A fogzománc mineralizációjában fontos szerepe van a pH szabályozásnak, mivel a hidroxipapatit keletkezése nagy mennyiségű  $H^+$  felszabadulásával jár. Pufferelés hiányában ez hipomineralizált, törékeny zománcot eredményezhet. Gén- és fehérje expressziós vizsgálatok arra utalnak, hogy az ameloblasztok felelősek a pH szabályozásért, ezt azonban funkcionális transzport mérésekkel még nem támasztották alá. HAT-7 patkány dentális epitélium eredetű sejtvonalból kialakított monolayerek vizsgálata során igazoltuk, hogy ezek a sejtek az ameloblasztok jellemző markereit és transzportereit expresszálják, szoros kapcsolatokat alakítanak ki, funkcionális szempontból polarizáltak, míg apikális membránjuk nagyfokú  $CO_2$  permeabilitással jellemezhető, addig bazolaterálisan  $HCO_3^-$  felvételre képesek, valamint stimuláció hatására vektoriális  $HCO_3^-$  szekréciónak mutatnak. A fentiek alapján elsőként hoztunk létre olyan *in vitro* modellt, amely alkalmas az ameloblasztok  $HCO_3^-$  transzportjának funkcionális vizsgálatára.

## 9. Summary

Epithelial fluid and electrolyte secretion has particular importance in the development and maintenance of oral health. Although the final product may show great differences – see e.g. the example of hypotonic saliva and dental enamel – some mechanisms are shared in different epithelia. While saliva secretion and its effect on oral health is well-studied in the scientific literature and research is moving towards practical applications of the accumulated knowledge, the transport processes of ameloblasts are barely known. The destruction of salivary acini caused by Sjögren syndrome or the therapeutic irradiation in case of head and neck cancers and the consequent salivary hypofunction considerably decreases the patient's quality of life. Currently, an effective pharmacological therapy is not available but tissue regeneration or gene therapy may offer new possibilities to cure xerostomia. We have demonstrated that by applying fractionated digestion for isolation and conditioned medium for cell culture, the expression of *NKCC1*, the key electrolyte transporter of salivary acini is detectable in primary human submandibular gland cell cultures, suggesting a possibility that these cells partially retain the acinar characteristics *in vitro* thereby constituting a potential cell source for salivary gland tissue engineering. We also provided evidence that the Par-C10 cell line is a suitable model for salivary gland gene therapy.

pH regulation plays an important role in enamel mineralization as the growth of hydroxyapatite crystals releases a large amount of  $H^+$ . Without buffering this could result in the formation of hypomineralized, fragile enamel. Gene and protein expression studies indicate that ameloblasts may be involved in the pH regulation process however this hypothesis was not confirmed by functional transport measurements. We have demonstrated that rat dental epithelial HAT-7 cells are able to express the characteristic marker proteins and transporters of ameloblasts and are capable to form tight junctions on Transwell membranes. The cells are also functionally polarized: their apical membranes show great  $CO_2$  permeability, while  $HCO_3^-$  uptake occurs through the basolateral membrane. Following stimulation, the cells are able to secrete  $HCO_3^-$  in basolateral to apical direction. Therefore, we established an *in vitro* model for the first time that is suitable to study the  $HCO_3^-$  transport of ameloblasts by functional measurements.

## 10. Irodalomjegyzék

1. Delporte C, Bryla A, Perret J. (2016) Aquaporins in Salivary Glands: From Basic Research to Clinical Applications. *Int J Mol Sci*, 17: in press.
2. Varga G. (2012) Physiology of the salivary glands. *Surgery*, 30: 578-583.
3. Pinna R, Campus G, Cumbo E, Mura I, Milia E. (2015) Xerostomia induced by radiotherapy: an overview of the physiopathology, clinical evidence, and management of the oral damage. *Ther Clin Risk Manag*, 11: 171-188.
4. Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S. (2012) Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO<sub>3</sub> secretion. *Physiol Rev*, 92: 39-74.
5. Proctor GB. (2016) The physiology of salivary secretion. *Periodontol 2000*, 70: 11-25.
6. Hong JH, Park S, Shcheynikov N, Muallem S. (2014) Mechanism and synergism in epithelial fluid and electrolyte secretion. *Pflugers Arch*, 466: 1487-1499.
7. Marsh PD, Do T, Beighton D, Devine DA. (2016) Influence of saliva on the oral microbiota. *Periodontol 2000*, 70: 80-92.
8. Melvin JE. (1991) Saliva and dental diseases. *Curr Opin Dent*, 1: 795-801.
9. Pedersen AM, Bardow A, Jensen SB, Nauntofte B. (2002) Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. *Oral Dis*, 8: 117-129.
10. Slomiany BL, Murty VL, Piotrowski J, Slomiany A. (1996) Salivary mucins in oral mucosal defense. *Gen Pharmacol*, 27: 761-771.
11. Buzalaf MA, Hannas AR, Kato MT. (2012) Saliva and dental erosion. *J Appl Oral Sci*, 20: 493-502.
12. Atkinson JC, Fox PC. (1993) Sjogren's syndrome: oral and dental considerations. *J Am Dent Assoc*, 124: 74-76, 78-82, 84-76.
13. Rakonczay Z, Jr., Vag J, Foldes A, Nagy K, Nagy A, Hegyi P, Varga G. (2014) Chronic inflammation in the pancreas and salivary glands--lessons from similarities and differences in pathophysiology and treatment modalities. *Curr Pharm Des*, 20: 1104-1120.

14. Thaysen JH, Thorn NA, Schwartz IL. (1954) Excretion of sodium, potassium, chloride and carbon dioxide in human parotid saliva. *Am J Physiol*, 178: 155-159.
15. Anderson JM. (2001) Molecular structure of tight junctions and their role in epithelial transport. *News Physiol Sci*, 16: 126-130.
16. Baker OJ. (2010) Tight junctions in salivary epithelium. *J Biomed Biotechnol*, 2010: 278948.
17. Zhang GH, Wu LL, Yu GY. (2013) Tight junctions and paracellular fluid and ion transport in salivary glands. *Chin J Dent Res*, 16: 13-46.
18. Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. (2005) Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. *Annu Rev Physiol*, 67: 445-469.
19. Turner RJ, Paulais M, Manganel M, Lee SI, Moran A, Melvin JE. (1993) Ion and water transport mechanisms in salivary glands. *Crit Rev Oral Biol Med*, 4: 385-391.
20. Melvin JE. (1999) Chloride channels and salivary gland function. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10: 199-209.
21. Bundgaard M, Moller M, Poulsen JH. (1977) Localization of sodium pump sites in cat salivary glands. *J Physiol*, 273: 339-353.
22. Lau KR, Howorth AJ, Case RM. (1990) The effects of bumetanide, amiloride and Ba<sup>2+</sup> on fluid and electrolyte secretion in rabbit salivary gland. *J Physiol*, 425: 407-427.
23. Evans RL, Park K, Turner RJ, Watson GE, Nguyen HV, Dennett MR, Hand AR, Flagella M, Shull GE, Melvin JE. (2000) Severe impairment of salivation in Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/2Cl<sup>-</sup> cotransporter (NKCC1)-deficient mice. *J Biol Chem*, 275: 26720-26726.
24. Martinez JR, Cassity N. (1985) Effects of 4,4'-diisothiocyano-2,2'-stilbene disulphonic acid and amiloride on salivary secretion by isolated, perfused rat submandibular glands. *Arch Oral Biol*, 30: 797-803.
25. Novak I, Young JA. (1986) Two independent anion transport systems in rabbit mandibular salivary glands. *Pflugers Arch*, 407: 649-656.

26. Olsnes S, Tonnessen TI, Sandvig K. (1986) pH-regulated anion antiport in nucleated mammalian cells. *J Cell Biol*, 102: 967-971.
27. Pirani D, Evans LA, Cook DI, Young JA. (1987) Intracellular pH in the rat mandibular salivary gland: the role of Na-H and Cl-HCO<sub>3</sub> antiports in secretion. *Pflugers Arch*, 408: 178-184.
28. Schroeder BC, Cheng T, Jan YN, Jan LY. (2008) Expression cloning of TMEM16A as a calcium-activated chloride channel subunit. *Cell*, 134: 1019-1029.
29. Yang YD, Cho H, Koo JY, Tak MH, Cho Y, Shim WS, Park SP, Lee J, Lee B, Kim BM, Raouf R, Shin YK, Oh U. (2008) TMEM16A confers receptor-activated calcium-dependent chloride conductance. *Nature*, 455: 1210-1215.
30. Romanenko VG, Catalan MA, Brown DA, Putzier I, Hartzell HC, Marmorstein AD, Gonzalez-Begne M, Rock JR, Harfe BD, Melvin JE. (2010) Tmem16A encodes the Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel in mouse submandibular salivary gland acinar cells. *J Biol Chem*, 285: 12990-13001.
31. Nakamoto T, Srivastava A, Romanenko VG, Ovitt CE, Perez-Cornejo P, Arreola J, Begenisich T, Melvin JE. (2007) Functional and molecular characterization of the fluid secretion mechanism in human parotid acinar cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 292: R2380-2390.
32. Romanenko VG, Nakamoto T, Srivastava A, Begenisich T, Melvin JE. (2007) Regulation of membrane potential and fluid secretion by Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in mouse submandibular glands. *J Physiol*, 581: 801-817.
33. Park K, Case RM, Brown PD. (2001) Identification and regulation of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channels in human parotid acinar cells. *Arch Oral Biol*, 46: 801-810.
34. Maruyama Y, Petersen OH, Flanagan P, Pearson GT. (1983) Quantification of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels under hormonal control in pig pancreas acinar cells. *Nature*, 305: 228-232.
35. Hayashi T, Young JA, Cook DI. (1996) The Ach-evoked Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> current in mouse mandibular secretory cells. Single channel studies. *J Membr Biol*, 151: 19-27.



36. Nehrke K, Quinn CC, Begenisich T. (2003) Molecular identification of Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels in parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 284: C535-546.
37. Romanenko V, Nakamoto T, Srivastava A, Melvin JE, Begenisich T. (2006) Molecular identification and physiological roles of parotid acinar cell maxi-K channels. *J Biol Chem*, 281: 27964-27972.
38. Begenisich T, Nakamoto T, Ovitt CE, Nehrke K, Brugnara C, Alper SL, Melvin JE. (2004) Physiological roles of the intermediate conductance, Ca<sup>2+</sup>-activated potassium channel Kcnn4. *J Biol Chem*, 279: 47681-47687.
39. Hayashi M, Kunii C, Takahata T, Ishikawa T. (2004) ATP-dependent regulation of SK4/IK1-like currents in rat submandibular acinar cells: possible role of cAMP-dependent protein kinase. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286: C635-646.
40. Nakamoto T, Romanenko VG, Takahashi A, Begenisich T, Melvin JE. (2008) Apical maxi-K (KCa1.1) channels mediate K<sup>+</sup> secretion by the mouse submandibular exocrine gland. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294: C810-819.
41. Hashimoto S, Murakami M. (2009) Morphological evidence of paracellular transport in perfused rat submandibular glands. *J Med Invest*, 56 Suppl: 395-397.
42. Murakami M, Murdiastuti K, Hosoi K, Hill AE. (2006) AQP and the control of fluid transport in a salivary gland. *J Membr Biol*, 210: 91-103.
43. Gresz V, Burghardt B, Ferguson CJ, Hurley PT, Takacs M, Nielsen S, Varga G, Zelles T, Case RM, Steward MC. (1999) Expression of aquaporin 1 (AQP1) water channels in human labial salivary glands. *Arch Oral Biol*, 44 Suppl 1: S53-57.
44. Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, Varga G, Zelles T, Nielsen S, Case RM, Steward MC. (2001) Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 281: G247-254.
45. Beroukas D, Hiscock J, Gannon BJ, Jonsson R, Gordon TP, Waterman SA. (2002) Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjogren's syndrome. *Lab Invest*, 82: 1547-1552.

46. Hosoi K. (2016) Physiological role of aquaporin 5 in salivary glands. *Pflugers Arch*, 468: 519-539.
47. Ma T, Song Y, Gillespie A, Carlson EJ, Epstein CJ, Verkman AS. (1999) Defective secretion of saliva in transgenic mice lacking aquaporin-5 water channels. *J Biol Chem*, 274: 20071-20074.
48. Krane CM, Melvin JE, Nguyen HV, Richardson L, Towne JE, Doetschman T, Menon AG. (2001) Salivary acinar cells from aquaporin 5-deficient mice have decreased membrane water permeability and altered cell volume regulation. *J Biol Chem*, 276: 23413-23420.
49. Alper SL. (2009) Molecular physiology and genetics of Na<sup>+</sup>-independent SLC4 anion exchangers. *J Exp Biol*, 212: 1672-1683.
50. Melvin JE, Moran A, Turner RJ. (1988) The role of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in the response of rat parotid acinar cells to muscarinic stimulation. *J Biol Chem*, 263: 19564-19569.
51. Ishikawa Y, Yuan Z, Inoue N, Skowronski MT, Nakae Y, Shono M, Cho G, Yasui M, Agre P, Nielsen S. (2005) Identification of AQP5 in lipid rafts and its translocation to apical membranes by activation of M3 mAChRs in interlobular ducts of rat parotid gland. *Am J Physiol Cell Physiol*, 289: C1303-1311.
52. Steinfeld S, Cogan E, King LS, Agre P, Kiss R, Delporte C. (2001) Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjogren's syndrome patients. *Lab Invest*, 81: 143-148.
53. Kawedia JD, Nieman ML, Boivin GP, Melvin JE, Kikuchi K, Hand AR, Lorenz JN, Menon AG. (2007) Interaction between transcellular and paracellular water transport pathways through Aquaporin 5 and the tight junction complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 3621-3626.
54. Evans RL, Bell SM, Schultheis PJ, Shull GE, Melvin JE. (1999) Targeted disruption of the *Nhe1* gene prevents muscarinic agonist-induced up-regulation of Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> exchange in mouse parotid acinar cells. *J Biol Chem*, 274: 29025-29030.
55. Catalan MA, Nakamoto T, Gonzalez-Begne M, Camden JM, Wall SM, Clarke LL, Melvin JE. (2010) Cfr and ENaC ion channels mediate NaCl absorption in the mouse submandibular gland. *J Physiol*, 588: 713-724.

56. Cook DI, Dinudom A, Komwatana P, Kumar S, Young JA. (2002) Patch-clamp studies on epithelial sodium channels in salivary duct cells. *Cell Biochem Biophys*, 36: 105-113.
57. Luo X, Choi JY, Ko SB, Pushkin A, Kurtz I, Ahn W, Lee MG, Muallem S. (2001) HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> salvage mechanisms in the submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem*, 276: 9808-9816.
58. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. (2005) Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol*, 67: 377-409.
59. Zeng W, Lee MG, Yan M, Diaz J, Benjamin I, Marino CR, Kopito R, Freedman S, Cotton C, Muallem S, Thomas P. (1997) Immuno and functional characterization of CFTR in submandibular and pancreatic acinar and duct cells. *Am J Physiol*, 273: C442-455.
60. Ishibashi K, Okamura K, Yamazaki J. (2008) Involvement of apical P2Y<sub>2</sub> receptor-regulated CFTR activity in muscarinic stimulation of Cl<sup>(-)</sup> reabsorption in rat submandibular gland. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 294: R1729-1736.
61. Zeng W, Lee MG, Muallem S. (1997) Membrane-specific regulation of Cl<sup>-</sup> channels by purinergic receptors in rat submandibular gland acinar and duct cells. *J Biol Chem*, 272: 32956-32965.
62. Ishibashi K, Yamazaki J, Okamura K, Teng Y, Kitamura K, Abe K. (2006) Roles of CLCA and CFTR in electrolyte re-absorption from rat saliva. *J Dent Res*, 85: 1101-1105.
63. Shcheynikov N, Yang D, Wang Y, Zeng W, Karniski LP, So I, Wall SM, Muallem S. (2008) The Slc26a4 transporter functions as an electroneutral Cl<sup>-</sup>/I<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger: role of Slc26a4 and Slc26a6 in I<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion and in regulation of CFTR in the parotid duct. *J Physiol*, 586: 3813-3824.
64. Stewart AK, Yamamoto A, Nakakuki M, Kondo T, Alper SL, Ishiguro H. (2009) Functional coupling of apical Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange with CFTR in stimulated HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion by guinea pig interlobular pancreatic duct. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296: G1307-1317.
65. Wang Y, Soyombo AA, Shcheynikov N, Zeng W, Dorwart M, Marino CR, Thomas PJ, Muallem S. (2006) Slc26a6 regulates CFTR activity in vivo to

- determine pancreatic duct HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion: relevance to cystic fibrosis. *EMBO J*, 25: 5049-5057.
66. Knauf F, Yang CL, Thomson RB, Mentone SA, Giebisch G, Aronson PS. (2001) Identification of a chloride-formate exchanger expressed on the brush border membrane of renal proximal tubule cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98: 9425-9430.
  67. Shcheynikov N, Wang Y, Park M, Ko SB, Dorwart M, Naruse S, Thomas PJ, Muallem S. (2006) Coupling modes and stoichiometry of Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchange by slc26a3 and slc26a6. *J Gen Physiol*, 127: 511-524.
  68. Bymaster FP, Carter PA, Yamada M, Gomeza J, Wess J, Hamilton SE, Nathanson NM, McKinzie DL, Felder CC. (2003) Role of specific muscarinic receptor subtypes in cholinergic parasympathomimetic responses, in vivo phosphoinositide hydrolysis, and pilocarpine-induced seizure activity. *Eur J Neurosci*, 17: 1403-1410.
  69. Nauntofte B, Poulsen JH. (1986) Effects of Ca<sup>2+</sup> and furosemide on Cl<sup>-</sup> transport and O<sub>2</sub> uptake in rat parotid acini. *Am J Physiol*, 251: C175-185.
  70. Lundberg JM, Anggard A, Fahrenkrug J. (1982) Complementary role of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and acetylcholine for cat submandibular gland blood flow and secretion. *Acta Physiol Scand*, 114: 329-337.
  71. Lundberg JM, Anggard A, Fahrenkrug J, Hokfelt T, Mutt V. (1980) Vasoactive intestinal polypeptide in cholinergic neurons of exocrine glands: functional significance of coexisting transmitters for vasodilation and secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 1651-1655.
  72. Cornec D, Devauchelle-Pensec V, Tobon GJ, Pers JO, Jousse-Joulin S, Saraux A. (2012) B cells in Sjogren's syndrome: from pathophysiology to diagnosis and treatment. *J Autoimmun*, 39: 161-167.
  73. Manoussakis MN, Kapsogeorgou EK. (2010) The role of intrinsic epithelial activation in the pathogenesis of Sjogren's syndrome. *J Autoimmun*, 35: 219-224.
  74. Pers JO, Lahiri A, Tobon GJ, Youinou P. (2012) Pathophysiological cytokine network in primary Sjogren's syndrome. *Presse Med*, 41: e467-474.

75. Barrera MJ, Bahamondes V, Sepulveda D, Quest AF, Castro I, Cortes J, Aguilera S, Urzua U, Molina C, Perez P, Ewert P, Alliende C, Hermoso MA, Gonzalez S, Leyton C, Gonzalez MJ. (2013) Sjogren's syndrome and the epithelial target: a comprehensive review. *J Autoimmun*, 42: 7-18.
76. Roussa E, Romero MF, Schmitt BM, Boron WF, Alper SL, Thevenod F. (1999) Immunolocalization of anion exchanger AE2 and Na(+)-HCO(-)(3) cotransporter in rat parotid and submandibular glands. *Am J Physiol*, 277: G1288-1296.
77. Enger TB, Aure MH, Jensen JL, Galtung HK. (2014) Calcium signaling and cell volume regulation are altered in Sjogren's Syndrome. *Acta Odontol Scand*, 72: 549-556.
78. Yoshimura S, Nakamura H, Horai Y, Nakajima H, Shiraishi H, Hayashi T, Takahashi T, Kawakami A. (2016) Abnormal distribution of AQP5 in labial salivary glands is associated with poor saliva secretion in patients with Sjogren's syndrome including neuromyelitis optica complicated patients. *Mod Rheumatol*, 26: 384-390.
79. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, 55: 74-108.
80. Johnson JT, Ferretti GA, Nethery WJ, Valdez IH, Fox PC, Ng D, Muscoplat CC, Gallagher SC. (1993) Oral pilocarpine for post-irradiation xerostomia in patients with head and neck cancer. *N Engl J Med*, 329: 390-395.
81. Lee N, Puri DR, Blanco AI, Chao KS. (2007) Intensity-modulated radiation therapy in head and neck cancers: an update. *Head Neck*, 29: 387-400.
82. Ramaekers BL, Joore MA, Grutters JP, van den Ende P, Jong J, Houben R, Lambin P, Christianen M, Beetz I, Pijls-Johannesma M, Langendijk JA. (2011) The impact of late treatment-toxicity on generic health-related quality of life in head and neck cancer patients after radiotherapy. *Oral Oncol*, 47: 768-774.
83. Talal N. (1987) Overview of Sjogren's syndrome. *J Dent Res*, 66 Spec No: 672-674.
84. Grundmann O, Mitchell GC, Limesand KH. (2009) Sensitivity of salivary glands to radiation: from animal models to therapies. *J Dent Res*, 88: 894-903.

85. Shannon IL, McCrary BR, Starcke EN. (1977) A saliva substitute for use by xerostomic patients undergoing radiotherapy to the head and neck. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 44: 656-661.
86. Kwong DL, Pow EH, Sham JS, McMillan AS, Leung LH, Leung WK, Chua DT, Cheng AC, Wu PM, Au GK. (2004) Intensity-modulated radiotherapy for early-stage nasopharyngeal carcinoma: a prospective study on disease control and preservation of salivary function. *Cancer*, 101: 1584-1593.
87. Tsang RK, Kwong DL, Ho AC, To VS, Ho WK, Wei WI. (2012) Long-term hearing results and otological complications of nasopharyngeal carcinoma patients: comparison between treatment with conventional two-dimensional radiotherapy and intensity-modulated radiotherapy. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 74: 228-233.
88. Burlage FR, Roesink JM, Kampinga HH, Coppes RP, Terhaard C, Langendijk JA, van Luijk P, Stokman MA, Vissink A. (2008) Protection of salivary function by concomitant pilocarpine during radiotherapy: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 70: 14-22.
89. Berk L. (2008) Systemic pilocarpine for treatment of xerostomia. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 4: 1333-1340.
90. Jha N, Seikaly H, Harris J, Williams D, Sultanem K, Hier M, Ghosh S, Black M, Butler J, Sutherland D, Kerr P, Barnaby P. (2009) Phase III randomized study: oral pilocarpine versus submandibular salivary gland transfer protocol for the management of radiation-induced xerostomia. *Head Neck*, 31: 234-243.
91. Wong RK, James JL, Sagar S, Wyatt G, Nguyen-Tan PF, Singh AK, Lukaszczyk B, Cardinale F, Yeh AM, Berk L. (2012) Phase 2 results from Radiation Therapy Oncology Group Study 0537: a phase 2/3 study comparing acupuncture-like transcutaneous electrical nerve stimulation versus pilocarpine in treating early radiation-induced xerostomia. *Cancer*, 118: 4244-4252.
92. Wu F, Weng S, Li C, Sun J, Li L, Gao Q. (2015) Submandibular gland transfer for the prevention of postradiation xerostomia in patients with head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*, 77: 70-86.

93. Atkinson JC, Baum BJ. (2001) Salivary enhancement: current status and future therapies. *J Dent Educ*, 65: 1096-1101.
94. Baum BJ, Tran SD. (2006) Synergy between genetic and tissue engineering: creating an artificial salivary gland. *Periodontol 2000*, 41: 218-223.
95. Baum BJ, Zheng C, Cotrim AP, McCullagh L, Goldsmith CM, Brahim JS, Atkinson JC, Turner RJ, Liu S, Nikolov N, Illei GG. (2009) Aquaporin-1 gene transfer to correct radiation-induced salivary hypofunction. *Handb Exp Pharmacol*: 403-418.
96. Tran SD, Wang J, Bandyopadhyay BC, Redman RS, Dutra A, Pak E, Swaim WD, Gerstenhaber JA, Bryant JM, Zheng C, Goldsmith CM, Kok MR, Wellner RB, Baum BJ. (2005) Primary culture of polarized human salivary epithelial cells for use in developing an artificial salivary gland. *Tissue Eng*, 11: 172-181.
97. Neumann Y, David R, Stiubea-Cohen R, Orbach Y, Aframian DJ, Palmon A. (2012) Long-term cryopreservation model of rat salivary gland stem cells for future therapy in irradiated head and neck cancer patients. *Tissue Eng Part C Methods*, 18: 710-718.
98. Baum BJ. (2000) Prospects for re-engineering salivary glands. *Adv Dent Res*, 14: 84-88.
99. Perez P, Rowzee AM, Zheng C, Adriaansen J, Baum BJ. (2010) Salivary epithelial cells: an unassuming target site for gene therapeutics. *Int J Biochem Cell Biol*, 42: 773-777.
100. Quissell DO, Redman RS, Barzen KA, McNutt RL. (1994) Effects of oxygen, insulin, and glucagon concentrations on rat submandibular acini in serum-free primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 30A: 833-842.
101. Redman RS, Quissell DO, Barzen KA. (1988) Effects of dexamethasone, epidermal growth factor, and retinoic acid on rat submandibular acinar-intercalated duct complexes in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol*, 24: 734-742.
102. Maria OM, Maria O, Liu Y, Komarova SV, Tran SD. (2011) Matrigel improves functional properties of human submandibular salivary gland cell line. *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 622-631.

103. Kleinman HK, Martin GR. (2005) Matrigel: basement membrane matrix with biological activity. *Semin Cancer Biol*, 15: 378-386.
104. Szlavik V, Vag J, Marko K, Demeter K, Madarasz E, Olah I, Zelles T, O'Connell BC, Varga G. (2008) Matrigel-induced acinar differentiation is followed by apoptosis in HSG cells. *J Cell Biochem*, 103: 284-295.
105. Vag J, Byrne EM, Hughes DH, Hoffman M, Ambudkar I, Maguire P, O'Connell BC. (2007) Morphological and functional differentiation of HSG cells: role of extracellular matrix and trpc 1. *J Cell Physiol*, 212: 416-423.
106. Baker OJ, Schulz DJ, Camden JM, Liao Z, Peterson TS, Seye CI, Petris MJ, Weisman GA. (2010) Rat parotid gland cell differentiation in three-dimensional culture. *Tissue Eng Part C Methods*, 16: 1135-1144.
107. Szlavik V, Szabo B, Vicsek T, Barabas J, Bogdan S, Gresz V, Varga G, O'Connell B, Vag J. (2008) Differentiation of primary human submandibular gland cells cultured on basement membrane extract. *Tissue Eng Part A*, 14: 1915-1926.
108. Maria OM, Zeitouni A, Gologan O, Tran SD. (2011) Matrigel improves functional properties of primary human salivary gland cells. *Tissue Eng Part A*, 17: 1229-1238.
109. Leigh NJ, Nelson JW, Mellas RE, McCall AD, Baker OJ. (2014) Three-dimensional cultures of mouse submandibular and parotid glands: a comparative study. *J Tissue Eng Regen Med*.
110. McCall AD, Nelson JW, Leigh NJ, Duffey ME, Lei P, Andreadis ST, Baker OJ. (2013) Growth factors polymerized within fibrin hydrogel promote amylase production in parotid cells. *Tissue Eng Part A*, 19: 2215-2225.
111. Pradhan S, Zhang C, Jia X, Carson DD, Witt R, Farach-Carson MC. (2009) Perlecan domain IV peptide stimulates salivary gland cell assembly in vitro. *Tissue Eng Part A*, 15: 3309-3320.
112. Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, Faber H, Stokman MA, Kok T, Visser WH, Kampinga HH, de Haan G, Coppes RP. (2008) Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. *PLoS One*, 3: e2063.



113. Sumita Y, Liu Y, Khalili S, Maria OM, Xia D, Key S, Cotrim AP, Mezey E, Tran SD. (2011) Bone marrow-derived cells rescue salivary gland function in mice with head and neck irradiation. *Int J Biochem Cell Biol*, 43: 80-87.
114. Sugito T, Kagami H, Hata K, Nishiguchi H, Ueda M. (2004) Transplantation of cultured salivary gland cells into an atrophic salivary gland. *Cell Transplant*, 13: 691-699.
115. Tran SD, Liu Y, Xia D, Maria OM, Khalili S, Wang RW, Quan VH, Hu S, Seuntjens J. (2013) Paracrine effects of bone marrow soup restore organ function, regeneration, and repair in salivary glands damaged by irradiation. *PLoS One*, 8: e61632.
116. Delporte C, O'Connell BC, He X, Lancaster HE, O'Connell AC, Agre P, Baum BJ. (1997) Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA to irradiated rat salivary glands. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3268-3273.
117. Shan Z, Li J, Zheng C, Liu X, Fan Z, Zhang C, Goldsmith CM, Wellner RB, Baum BJ, Wang S. (2005) Increased fluid secretion after adenoviral-mediated transfer of the human aquaporin-1 cDNA to irradiated miniature pig parotid glands. *Mol Ther*, 11: 444-451.
118. Baum BJ, Alevizos I, Zheng C, Cotrim AP, Liu S, McCullagh L, Goldsmith CM, Burbelo PD, Citrin DE, Mitchell JB, Nottingham LK, Rudy SF, Van Waes C, Whatley MA, Brahim JS, Chiorini JA, Danielides S, Turner RJ, Patronas NJ, Chen CC, Nikolov NP, Illei GG. (2012) Early responses to adenoviral-mediated transfer of the aquaporin-1 cDNA for radiation-induced salivary hypofunction. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109: 19403-19407.
119. Aframian DJ, Tran SD, Cukierman E, Yamada KM, Baum BJ. (2002) Absence of tight junction formation in an allogeneic graft cell line used for developing an engineered artificial salivary gland. *Tissue Eng*, 8: 871-878.
120. Maria OM, Tran SD. (2011) Human mesenchymal stem cells cultured with salivary gland biopsies adopt an epithelial phenotype. *Stem Cells Dev*, 20: 959-967.
121. Cobourne MT, Sharpe PT. (2003) Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first branchial arch. *Arch Oral Biol*, 48: 1-14.

122. Thesleff I, Sharpe P. (1997) Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev*, 67: 111-123.
123. Smith MM. (2003) Vertebrate dentitions at the origin of jaws: when and how pattern evolved. *Evol Dev*, 5: 394-413.
124. Stock DW. (2007) Zebrafish dentition in comparative context. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 308: 523-549.
125. Thesleff I, Tummers M. Tooth organogenesis and regeneration. In: Girard L (szerk.), *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute, Cambridge (MA), 2008.
126. Nanci A. *Ten Cate's Oral Histology: Development, Structure and Function*. Elsevier Mosby, St. Louis, Missouri, 2008.
127. Jernvall J, Thesleff I. (2000) Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, 92: 19-29.
128. Kallenbach E. (1978) Fine structure of the stratum intermedium, stellate reticulum, and outer enamel epithelium in the enamel organ of the kitten. *J Anat*, 126: 247-260.
129. Sloan A. Chapter 2: Development of the dentition. In: Adams C, Carabott R, Evans S (szerk.), *Forensic Odontology: An Essential Guide*. Wiley Blackwell, 2014.
130. Harada H, Kettunen P, Jung HS, Mustonen T, Wang YA, Thesleff I. (1999) Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J Cell Biol*, 147: 105-120.
131. Tummers M, Thesleff I. (2003) Root or crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development*, 130: 1049-1057.
132. Tummers M, Thesleff I. (2008) Observations on continuously growing roots of the sloth and the K14-Eda transgenic mice indicate that epithelial stem cells can give rise to both the ameloblast and root epithelium cell lineage creating distinct tooth patterns. *Evol Dev*, 10: 187-195.
133. Smith CE. (1998) Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 9: 128-161.

134. Smith CE, Nanci A. (1995) Overview of morphological changes in enamel organ cells associated with major events in amelogenesis. *Int J Dev Biol*, 39: 153-161.
135. Robinson C, Fuchs P, Deutsch D, Weatherell JA. (1978) Four chemically distinct stages in developing enamel from bovine incisor teeth. *Caries Res*, 12: 1-11.
136. Warshawsky H, Smith CE. (1974) Morphological classification of rat incisor ameloblasts. *Anat Rec*, 179: 423-446.
137. Robinson C. (2014) Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias. *Front Physiol*, 5: 388.
138. Reith EJ, Boyde A. (1981) The arrangement of ameloblasts on the surface of maturing enamel of the rat incisor tooth. *J Anat*, 133: 381-388.
139. Varga G, Keremi B, Bori E, Foldes A. (2015) Function and repair of dental enamel - Potential role of epithelial transport processes of ameloblasts. *Pancreatology*, 15: S55-60.
140. Josephsen K, Takano Y, Frische S, Praetorius J, Nielsen S, Aoba T, Fejerskov O. (2010) Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. *Am J Physiol Cell Physiol*, 299: C1299-1307.
141. Warshawsky H. (1978) A freeze-fracture study of the topographic relationship between inner enamel-secretory ameloblasts in the rat incisor. *Am J Anat*, 152: 153-207.
142. Hu JC, Sun X, Zhang C, Simmer JP. (2001) A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. *Eur J Oral Sci*, 109: 125-132.
143. Ganss B, Abbarin N. (2014) Maturation and beyond: proteins in the developmental continuum from enamel epithelium to junctional epithelium. *Front Physiol*, 5: 371.
144. Moradian-Oldak J. (2012) Protein-mediated enamel mineralization. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 17: 1996-2023.
145. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Diekwisch TG, Lyaruu DM, Wright JT, Bringas P, Jr., Slavkin HC. (1995) Evidence for amelogenin "nanospheres" as

- functional components of secretory-stage enamel matrix. *J Struct Biol*, 115: 50-59.
146. Moradian-Oldak J, Simmer JP, Lau EC, Diekwisch T, Slavkin HC, Fincham AG. (1995) A review of the aggregation properties of a recombinant amelogenin. *Connect Tissue Res*, 32: 125-130.
  147. Moradian-Oldak J, Paine ML, Lei YP, Fincham AG, Snead ML. (2000) Self-assembly properties of recombinant engineered amelogenin proteins analyzed by dynamic light scattering and atomic force microscopy. *J Struct Biol*, 131: 27-37.
  148. Moradian-Oldak J, Iijima M, Bouropoulos N, Wen HB. (2003) Assembly of amelogenin proteolytic products and control of octacalcium phosphate crystal morphology. *Connect Tissue Res*, 44 Suppl 1: 58-64.
  149. Rauth RJ, Potter KS, Ngan AY, Saad DM, Mehr R, Luong VQ, Schuetter VL, Miklus VG, Chang P, Paine ML, Lacruz RS, Snead ML, White SN. (2009) Dental enamel: genes define biomechanics. *J Calif Dent Assoc*, 37: 863-868.
  150. Nylen MU, Eanes ED, Omnell KA. (1963) Crystal growth in rat enamel. *J Cell Biol*, 18: 109-123.
  151. Kerebel B, Daculsi G, Kerebel LM. (1979) Ultrastructural studies of enamel crystallites. *J Dent Res*, 58: 844-851.
  152. Josephsen K, Fejerskov O. (1977) Ameloblast modulation in the maturation zone of the rat incisor enamel organ. A light and electron microscopic study. *J Anat*, 124: 45-70.
  153. Sasaki T. (1984) Morphology and function of maturation ameloblasts in kitten tooth germs. *J Anat*, 138 333-342.
  154. Sasaki T, Watanabe C, Suzuki H, Higashi S. (1988) An ultrastructural study of the kitten enamel organ in the zone of transition between enamel secretion and maturation. *Showa Shigakkai Zasshi*, 8: 11-22.
  155. Takagi T, Ogasawara T, Tagami J, Akao M, Kuboki Y, Nagai N, LeGeros RZ. (1998) pH and carbonate levels in developing enamel. *Connect Tissue Res*, 38: 181-187; discussion 201-205.
  156. Smith CE, Chong DL, Bartlett JD, Margolis HC. (2005) Mineral acquisition rates in developing enamel on maxillary and mandibular incisors of rats and

- mice: implications to extracellular acid loading as apatite crystals mature. *J Bone Miner Res*, 20: 240-249.
157. Lacruz RS, Nakayama Y, Holcroft J, Nguyen V, Somogyi-Ganss E, Snead ML, White SN, Paine ML, Ganss B. (2012) Targeted overexpression of amelotin disrupts the microstructure of dental enamel. *PLoS One*, 7: e35200.
  158. Nunez SM, Chun YP, Ganss B, Hu Y, Richardson AS, Schmitz JE, Fajardo R, Yang J, Hu JC, Simmer JP. (2015) Maturation stage enamel malformations in *Amtn* and *Klk4* null mice. *Matrix Biol*, 52-54: 219-233.
  159. Bartlett JD, Beniash E, Lee DH, Smith CE. (2004) Decreased mineral content in MMP-20 null mouse enamel is prominent during the maturation stage. *J Dent Res*, 83: 909-913.
  160. Bartlett JD, Simmer JP. (1999) Proteinases in developing dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med*, 10: 425-441.
  161. Zhu L, Liu H, Witkowska HE, Huang Y, Tanimoto K, Li W. (2014) Preferential and selective degradation and removal of amelogenin adsorbed on hydroxyapatites by MMP20 and KLK4 in vitro. *Front Physiol*, 5: 268.
  162. Lu Y, Papagerakis P, Yamakoshi Y, Hu JC, Bartlett JD, Simmer JP. (2008) Functions of KLK4 and MMP-20 in dental enamel formation. *Biol Chem*, 389: 695-700.
  163. Kallenbach E. (1966) Electron microscopy of the papillary layer of rat incisor enamel organ during enamel maturation. *J Ultrastruct Res*, 14: 518-533.
  164. Garant PR, Nalbandian J. (1968) The fine structure of the papillary region of the mouse enamel organ. *Arch Oral Biol*, 13: 1167-1185.
  165. Inai T, Nakamura K, Kurisu K, Shibata Y. (1997) Immunohistochemical localization of connexin43 in the enamel organ of the rat upper incisor during ameloblast development. *Arch Histol Cytol*, 60: 297-306.
  166. Okumura R, Shibukawa Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Nakagawa K, Tazaki M, Shimono M. (2010) Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts. *J Pharmacol Sci*, 112: 223-230.
  167. Joao SM, Arana-Chavez VE. (2004) Tight junctions in differentiating ameloblasts and odontoblasts differentially express ZO-1, occludin, and claudin-

- 1 in early odontogenesis of rat molars. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 277: 338-343.
168. Unda FJ, Perez-Nanclares G, Le Morvan V, Hernandez C, Vilaxa A, De-la-Fuente M, Gorry P. (2003) Dynamic assembly of tight junction-associated proteins ZO-1, ZO-2, ZO-3 and occludin during mouse tooth development. *Histol Histopathol*, 18: 27-38.
169. Hata M, Kawamoto T, Kawai M, Yamamoto T. (2010) Differential expression patterns of the tight junction-associated proteins occludin and claudins in secretory and mature ameloblasts in mouse incisor. *Med Mol Morphol*, 43: 102-106.
170. Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y. (2008) Differential expression of the tight junction proteins, claudin-1, claudin-4, occludin, ZO-1, and PAR3, in the ameloblasts of rat upper incisors. *Anat Rec (Hoboken)*, 291: 577-585.
171. Joao SM, Arana-Chavez VE. (2003) Expression of connexin 43 and ZO-1 in differentiating ameloblasts and odontoblasts from rat molar tooth germs. *Histochem Cell Biol*, 119: 21-26.
172. Nishikawa S, Abe M. (2010) Immunocytochemical localization of claudin-1 in the maturation ameloblasts of rat incisors. *Front Physiol*, 1: 150.
173. Bello IO, Soini Y, Slootweg PJ, Salo T. (2007) Claudins 1, 4, 5, 7 and occludin in ameloblastomas and developing human teeth. *J Oral Pathol Med*, 36: 48-54.
174. Ohazama A, Sharpe PT. (2007) Expression of claudins in murine tooth development. *Dev Dyn*, 236: 290-294.
175. Lacruz RS, Smith CE, Kurtz I, Hubbard MJ, Paine ML. (2013) New paradigms on the transport functions of maturation-stage ameloblasts. *J Dent Res*, 92: 122-129.
176. Hu P, Lacruz RS, Smith CE, Smith SM, Kurtz I, Paine ML. (2012) Expression of the sodium/calcium/potassium exchanger, NCKX4, in ameloblasts. *Cells Tissues Organs*, 196: 501-509.
177. Parry DA, Poulter JA, Logan CV, Brookes SJ, Jafri H, Ferguson CH, Anwari BM, Rashid Y, Zhao H, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ. (2013) Identification of mutations in SLC24A4, encoding a potassium-dependent

- sodium/calcium exchanger, as a cause of amelogenesis imperfecta. *Am J Hum Genet*, 92: 307-312.
178. Wang S, Choi M, Richardson AS, Reid BM, Seymen F, Yildirim M, Tuna E, Gencay K, Simmer JP, Hu JC. (2014) STIM1 and SLC24A4 Are Critical for Enamel Maturation. *J Dent Res*, 93: 94S-100S.
  179. Seymen F, Lee KE, Tran Le CG, Yildirim M, Gencay K, Lee ZH, Kim JW. (2014) Exonal deletion of SLC24A4 causes hypomaturation amelogenesis imperfecta. *J Dent Res*, 93: 366-370.
  180. Duan X. (2014) Ion channels, channelopathies, and tooth formation. *J Dent Res*, 93: 117-125.
  181. Simmer JP, Fincham AG. (1995) Molecular mechanisms of dental enamel formation. *Crit Rev Oral Biol Med*, 6: 84-108.
  182. Hubbard MJ. (2000) Calcium transport across the dental enamel epithelium. *Crit Rev Oral Biol Med*, 11: 437-466.
  183. Ryu OH, Hu CC, Simmer JP. (1998) Biochemical characterization of recombinant mouse amelogenins: protein quantitation, proton absorption, and relative affinity for enamel crystals. *Connect Tissue Res*, 38: 207-214; discussion 241-206.
  184. Sasaki S, Takagi T, Suzuki M. (1991) Cyclical changes in pH in bovine developing enamel as sequential bands. *Arch Oral Biol*, 36: 227-231.
  185. Damkier HH, Josephsen K, Takano Y, Zahn D, Fejerskov O, Frische S. (2014) Fluctuations in surface pH of maturing rat incisor enamel are a result of cycles of H(+)-secretion by ameloblasts and variations in enamel buffer characteristics. *Bone*, 60: 227-234.
  186. Kondo K, Kuriaki K. (1961) Carbonic anhydrases in dental tissue and effect of parathyroid hormone and fluoride on its activity. *Journal of Dental Research*, 40: 971-974.
  187. Dogterom AA, Bronckers AL. (1983) Carbonic anhydrase in developing hamster molars. *J Dent Res*, 62: 789-791.
  188. Sugimoto T, Ogawa Y, Kuwahara H, Shimazaki M, Yagi T, Sakai A. (1988) Histochemical demonstration of carbonic anhydrase activity in the odontogenic cells of the rat incisor. *J Dent Res*, 67: 1271-1274.

189. Lacruz RS, Hilvo M, Kurtz I, Paine ML. (2010) A survey of carbonic anhydrase mRNA expression in enamel cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 393: 883-887.
190. Lin HM, Nakamura H, Noda T, Ozawa H. (1994) Localization of H(+)-ATPase and carbonic anhydrase II in ameloblasts at maturation. *Calcif Tissue Int*, 55: 38-45.
191. Toyosawa S, Ogawa Y, Inagaki T, Ijuhin N. (1996) Immunohistochemical localization of carbonic anhydrase isozyme II in rat incisor epithelial cells at various stages of amelogenesis. *Cell Tissue Res*, 285: 217-225.
192. Lacruz RS, Smith CE, Moffatt P, Chang EH, Bromage TG, Bringas P, Jr., Nanci A, Baniwal SK, Zabner J, Welsh MJ, Kurtz I, Paine ML. (2012) Requirements for ion and solute transport, and pH regulation during enamel maturation. *J Cell Physiol*, 227: 1776-1785.
193. Smith CE, Nanci A, Moffatt P. (2006) Evidence by signal peptide trap technology for the expression of carbonic anhydrase 6 in rat incisor enamel organs. *Eur J Oral Sci*, 114 Suppl 1: 147-153; discussion 164-145, 380-141.
194. Wang X, Suzawa T, Ohtsuka H, Zhao B, Miyamoto Y, Miyauchi T, Nishimura R, Inoue T, Nakamura M, Baba K, Kamijo R. (2010) Carbonic anhydrase II regulates differentiation of ameloblasts via intracellular pH-dependent JNK signaling pathway. *J Cell Physiol*, 225: 709-719.
195. Bronckers AL, Guo J, Zandieh-Doulabi B, Bervoets TJ, Lyaruu DM, Li X, Wangemann P, DenBesten P. (2011) Developmental expression of solute carrier family 26A member 4 (SLC26A4/pendrin) during amelogenesis in developing rodent teeth. *Eur J Oral Sci*, 119 Suppl 1: 185-192.
196. Lyaruu DM, Bronckers AL, Mulder L, Mardones P, Medina JF, Kellokumpu S, Oude Elferink RP, Everts V. (2008) The anion exchanger Ae2 is required for enamel maturation in mouse teeth. *Matrix Biol*, 27: 119-127.
197. Paine ML, Snead ML, Wang HJ, Abuladze N, Pushkin A, Liu W, Kao LY, Wall SM, Kim YH, Kurtz I. (2008) Role of NBCe1 and AE2 in secretory ameloblasts. *J Dent Res*, 87: 391-395.



198. Awad M, Al-Ashwal AA, Sakati N, Al-Abbad AA, Bin-Abbas BS. (2002) Long-term follow up of carbonic anhydrase II deficiency syndrome. *Saudi Med J*, 23: 25-29.
199. Nagai R, Kooh SW, Balfe JW, Fenton T, Halperin ML. (1997) Renal tubular acidosis and osteopetrosis with carbonic anhydrase II deficiency: pathogenesis of impaired acidification. *Pediatr Nephrol*, 11: 633-636.
200. Ohlsson A, Cumming WA, Paul A, Sly WS. (1986) Carbonic anhydrase II deficiency syndrome: recessive osteopetrosis with renal tubular acidosis and cerebral calcification. *Pediatrics*, 77: 371-381.
201. Strisciuglio P, Sartorio R, Pecoraro C, Lotito F, Sly WS. (1990) Variable clinical presentation of carbonic anhydrase deficiency: evidence for heterogeneity? *Eur J Pediatr*, 149: 337-340.
202. Orłowski J, Grinstein S. (2004) Diversity of the mammalian sodium/proton exchanger SLC9 gene family. *Pflugers Arch*, 447: 549-565.
203. Romero MF, Chen AP, Parker MD, Boron WF. (2013) The SLC4 family of bicarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) transporters. *Mol Aspects Med*, 34: 159-182.
204. Bronckers AL, Lyaruu DM, Jansen ID, Medina JF, Kellokumpu S, Hoeben KA, Gawenis LR, Oude-Elferink RP, Everts V. (2009) Localization and function of the anion exchanger Ae2 in developing teeth and orofacial bone in rodents. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 312B: 375-387.
205. Gawenis LR, Ledoussal C, Judd LM, Prasad V, Alper SL, Stuart-Tilley A, Woo AL, Grisham C, Sanford LP, Doetschman T, Miller ML, Shull GE. (2004) Mice with a targeted disruption of the AE2 Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger are achlorhydric. *J Biol Chem*, 279: 30531-30539.
206. Medina JF, Recalde S, Prieto J, Lecanda J, Saez E, Funk CD, Vecino P, van Roon MA, Ottenhoff R, Bosma PJ, Bakker CT, Elferink RP. (2003) Anion exchanger 2 is essential for spermiogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100: 15847-15852.
207. Kim YB, Yang BH, Piao ZG, Oh SB, Kim JS, Park K. (2003) Expression of Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter and its role in pH regulation in mouse parotid acinar cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 304: 593-598.

208. Park K, Hurley PT, Roussa E, Cooper GJ, Smith CP, Thevenod F, Steward MC, Case RM. (2002) Expression of a sodium bicarbonate cotransporter in human parotid salivary glands. *Arch Oral Biol*, 47: 1-9.
209. Jalali R, Guo J, Zandieh-Doulabi B, Bervoets TJ, Paine ML, Boron WF, Parker MD, Bijvelds MJ, Medina JF, DenBesten PK, Bronckers AL. (2014) NBCe1 (SLC4A4) a potential pH regulator in enamel organ cells during enamel development in the mouse. *Cell Tissue Res*, 358: 433-442.
210. Lacruz RS, Nanci A, White SN, Wen X, Wang H, Zalzal SF, Luong VQ, Schuetter VL, Conti PS, Kurtz I, Paine ML. (2010) The sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1) is essential for normal development of mouse dentition. *J Biol Chem*, 285: 24432-24438.
211. Zheng L, Zhang Y, He P, Kim J, Schneider R, Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK. (2011) NBCe1 in mouse and human ameloblasts may be indirectly regulated by fluoride. *J Dent Res*, 90: 782-787.
212. Dinour D, Chang MH, Satoh J, Smith BL, Angle N, Knecht A, Serban I, Holtzman EJ, Romero MF. (2004) A novel missense mutation in the sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1/SLC4A4) causes proximal tubular acidosis and glaucoma through ion transport defects. *J Biol Chem*, 279: 52238-52246.
213. Gawenis LR, Bradford EM, Prasad V, Lorenz JN, Simpson JE, Clarke LL, Woo AL, Grisham C, Sanford LP, Doetschman T, Miller ML, Shull GE. (2007) Colonic anion secretory defects and metabolic acidosis in mice lacking the NBC1 Na<sup>+</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter. *J Biol Chem*, 282: 9042-9052.
214. Inatomi J, Horita S, Braverman N, Sekine T, Yamada H, Suzuki Y, Kawahara K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Shimadzu M, Endou H, Fujita T, Seki G, Igarashi T. (2004) Mutational and functional analysis of SLC4A4 in a patient with proximal renal tubular acidosis. *Pflugers Arch*, 448: 438-444.
215. Bronckers A, Kalogeraki L, Jorna HJ, Wilke M, Bervoets TJ, Lyaruu DM, Zandieh-Doulabi B, Denbesten P, de Jonge H. (2010) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in maturation stage ameloblasts, odontoblasts and bone cells. *Bone*, 46: 1188-1196.

216. Primosch RE. (1980) Tetracycline discoloration, enamel defects, and dental caries in patients with cystic fibrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 50: 301-308.
217. Primosch RE. (1980) Dental and skeletal maturation in patients with cystic fibrosis. *J Oral Med*, 35: 7-13.
218. Wright JT, Hall KI, Grubb BR. (1996) Enamel mineral composition of normal and cystic fibrosis transgenic mice. *Adv Dent Res*, 10: 270-274; discussion 275.
219. Wright JT, Kiefer CL, Hall KI, Grubb BR. (1996) Abnormal enamel development in a cystic fibrosis transgenic mouse model. *J Dent Res*, 75: 966-973.
220. Cua FT. (1991) Calcium and phosphorous in teeth from children with and without cystic fibrosis. *Biol Trace Elem Res*, 30: 277-289.
221. Koller BH, Kim HS, Latour AM, Brigman K, Boucher RC, Jr., Scambler P, Wainwright B, Smithies O. (1991) Toward an animal model of cystic fibrosis: targeted interruption of exon 10 of the cystic fibrosis transmembrane regulator gene in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88: 10730-10734.
222. Snouwaert JN, Brigman KK, Latour AM, Malouf NN, Boucher RC, Smithies O, Koller BH. (1992) An animal model for cystic fibrosis made by gene targeting. *Science*, 257: 1083-1088.
223. Arquitt CK, Boyd C, Wright JT. (2002) Cystic fibrosis transmembrane regulator gene (CFTR) is associated with abnormal enamel formation. *J Dent Res*, 81: 492-496.
224. Sui W, Boyd C, Wright JT. (2003) Altered pH regulation during enamel development in the cystic fibrosis mouse incisor. *J Dent Res*, 82: 388-392.
225. Chang EH, Lacruz RS, Bromage TG, Bringas P, Jr., Welsh MJ, Zabner J, Paine ML. (2011) Enamel pathology resulting from loss of function in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in a porcine animal model. *Cells Tissues Organs*, 194: 249-254.
226. Jalali R, Zandieh-Doulabi B, DenBesten PK, Seidler U, Riederer B, Wedenoja S, Micha D, Bronckers AL. (2015) Slc26a3/Dra and Slc26a6 in Murine Ameloblasts. *J Dent Res*, 94: 1732-1739.

227. Sarkar J, Wen X, Simanian EJ, Paine ML. (2015) V-type ATPase proton pump expression during enamel formation. *Matrix Biol*, 52-54: 234-245.
228. Bronckers AL, Lyaruu DM, Bervoets TJ, Medina JF, DenBesten P, Richter J, Everts V. (2012) Murine ameloblasts are immunonegative for Tc1r1, the v-H-ATPase subunit essential for the osteoclast plasma proton pump. *Bone*, 50: 901-908.
229. Kawano S, Morotomi T, Toyono T, Nakamura N, Uchida T, Ohishi M, Toyoshima K, Harada H. (2002) Establishment of dental epithelial cell line (HAT-7) and the cell differentiation dependent on Notch signaling pathway. *Connect Tissue Res*, 43: 409-412.
230. Harada H, Ichimori Y, Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Kawano S, Katsube K, Wakisaka S. (2006) Stratum intermedium lineage diverges from ameloblast lineage via Notch signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, 340: 611-616.
231. Matsumoto A, Harada H, Saito M, Taniguchi A. (2011) Induction of enamel matrix protein expression in an ameloblast cell line co-cultured with a mesenchymal cell line in vitro. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 47: 39-44.
232. Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Yuasa K, Iwamoto T, Fukumoto E, Harada H, Saito M, Nakasima A, Nonaka K, Yamada Y, Fukumoto S. (2008) Neurotrophic factor neurotrophin-4 regulates ameloblastin expression via full-length TrkB. *J Biol Chem*, 283: 3385-3391.
233. Zheng L, Seon YJ, Mourao MA, Schnell S, Kim D, Harada H, Papagerakis S, Papagerakis P. (2013) Circadian rhythms regulate amelogenesis. *Bone*, 55: 158-165.
234. Demeter I, Szucs A, Hegyesi O, Foldes A, Racz GZ, Burghardt B, Steward MC, Varga G. (2009) Vectorial bicarbonate transport by Par-C10 salivary cells. *J Physiol Pharmacol*, 60 Suppl 7: 197-204.
235. Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S. (2012) Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. *J Biol Chem*, 287: 10590-10601.

236. He X, Goldsmith CM, Marmary Y, Wellner RB, Parlow AF, Nieman LK, Baum BJ. (1998) Systemic action of human growth hormone following adenovirus-mediated gene transfer to rat submandibular glands. *Gene Ther*, 5: 537-541.
237. Delporte C, O'Connell BC, He X, Ambudkar IS, Agre P, Baum BJ. (1996) Adenovirus-mediated expression of aquaporin-5 in epithelial cells. *J Biol Chem*, 271: 22070-22075.
238. Reibring CG, El Shahawy M, Hallberg K, Kannius-Janson M, Nilsson J, Parkkila S, Sly WS, Waheed A, Linde A, Gritli-Linde A. (2014) Expression patterns and subcellular localization of carbonic anhydrases are developmentally regulated during tooth formation. *PLoS One*, 9: e96007.
239. Szucs A, Demeter I, Burghardt B, Ovari G, Case RM, Steward MC, Varga G. (2006) Vectorial bicarbonate transport by Capan-1 cells: a model for human pancreatic ductal secretion. *Cell Physiol Biochem*, 18: 253-264.
240. Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, Racker E. (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry*, 18: 2210-2218.
241. Bori E, Guo J, Racz R, Burghardt B, Foldes A, Keremi B, Harada H, Steward MC, Den Besten P, Bronckers AL, Varga G. (2016) Evidence for Bicarbonate Secretion by Ameloblasts in a Novel Cellular Model. *J Dent Res*, 95: 588-596.
242. Hegyesi O, Foldes A, Bori E, Nemeth Z, Barabas J, Steward MC, Varga G. (2015) Evidence for Active Electrolyte Transport by Two-Dimensional Monolayers of Human Salivary Epithelial Cells. *Tissue Eng Part C Methods*, 21: 1226-1236.
243. Bori E, Racz G, Burghardt B, Demeter I, Hegyesi O, Varga G, Foldes A. (2014) [ParC-10 cells for modelling parotid gland tissue reorganization]. *Fogorv Sz*, 107: 99-105.
244. Varga G, Bori E, Kallo K, Nagy K, Tarjan I, Racz GZ. (2013) Novel possible pharmaceutical research tools: stem cells, gene delivery and their combination. *Curr Pharm Des*, 19: 133-141.
245. Nelson J, Manzella K, Baker OJ. (2013) Current cell models for bioengineering a salivary gland: a mini-review of emerging technologies. *Oral Dis*, 19: 236-244.
246. Baum BJ. (1993) Principles of saliva secretion. *Ann N Y Acad Sci*, 694: 17-23.

247. Baum BJ, Adriaansen J, Cotrim AP, Goldsmith CM, Perez P, Qi S, Rowzee AM, Zheng C. (2010) Gene therapy of salivary diseases. *Methods Mol Biol*, 666: 3-20.
248. Koo NY, Li J, Hwang SM, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, Kim JS, Lee JH, Park K. (2006) Molecular cloning and functional expression of a sodium bicarbonate cotransporter from guinea-pig parotid glands. *Biochem Biophys Res Commun*, 342: 1114-1122.
249. Perry C, Baker OJ, Reyland ME, Grichtchenko, II. (2009) PKC $\alpha$  $\beta$  $\gamma$ - and PKC $\delta$ -dependent endocytosis of NBCe1-A and NBCe1-B in salivary parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 297: C1409-1423.
250. Brandes A, Oehlke O, Schumann A, Heidrich S, Thevenod F, Roussa E. (2007) Adaptive redistribution of NBCe1-A and NBCe1-B in rat kidney proximal tubule and striated ducts of salivary glands during acid-base disturbances. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 293: R2400-2411.
251. Namkoong E, Shin YH, Bae JS, Choi S, Kim M, Kim N, Hwang SM, Park K. (2015) Role of Sodium Bicarbonate Cotransporters in Intracellular pH Regulation and Their Regulatory Mechanisms in Human Submandibular Glands. *PLoS One*, 10: e0138368.
252. He X, Kuijpers GA, Goping G, Kulakusky JA, Zheng C, Delporte C, Tse CM, Redman RS, Donowitz M, Pollard HB, Baum BJ. (1998) A polarized salivary cell monolayer useful for studying transepithelial fluid movement in vitro. *Pflugers Arch*, 435: 375-381.
253. Delporte C, Hoque AT, Kulakusky JA, Braddon VR, Goldsmith CM, Wellner RB, Baum BJ. (1998) Relationship between adenovirus-mediated aquaporin 1 expression and fluid movement across epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 246: 584-588.
254. Michikawa H, Fujita-Yoshigaki J, Sugiya H. (2008) Enhancement of barrier function by overexpression of claudin-4 in tight junctions of submandibular gland cells. *Cell Tissue Res*, 334: 255-264.
255. Geguchadze R, Wang Z, Zourelis L, Perez-Riveros P, Edwards PC, Machen L, Passineau MJ. (2014) Proteomic profiling of salivary gland after nonviral gene

- transfer mediated by conventional plasmids and minicircles. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 1: 14007.
256. Geguchadze RN, Machen L, Zourelas L, Gallo PH, Passineau MJ. (2012) An AAV2/5 vector enhances safety of gene transfer to the mouse salivary gland. *J Dent Res*, 91: 382-386.
  257. Momot D, Zheng C, Yin H, Elbekai RH, Vallant M, Chiorini JA. (2014) Toxicity and biodistribution of the serotype 2 recombinant adeno-associated viral vector, encoding Aquaporin-1, after retroductal delivery to a single mouse parotid gland. *PLoS One*, 9: e92832.
  258. Passineau MJ, Zourelas L, Machen L, Edwards PC, Benza RL. (2010) Ultrasound-assisted non-viral gene transfer to the salivary glands. *Gene Ther*, 17: 1318-1324.
  259. Voutetakis A, Zheng C, Mineshiba F, Cotrim AP, Goldsmith CM, Schmidt M, Afione S, Roescher N, Metzger M, Eckhaus MA, Chiorini JA, Dunbar CE, Donahue RE, Baum BJ. (2007) Adeno-associated virus serotype 2-mediated gene transfer to the parotid glands of nonhuman primates. *Hum Gene Ther*, 18: 142-150.
  260. Arany S, Benoit DS, Dewhurst S, Ovitt CE. (2013) Nanoparticle-mediated gene silencing confers radioprotection to salivary glands in vivo. *Mol Ther*, 21: 1182-1194.
  261. Cotrim AP, Sowers A, Mitchell JB, Baum BJ. (2007) Prevention of irradiation-induced salivary hypofunction by microvessel protection in mouse salivary glands. *Mol Ther*, 15: 2101-2106.
  262. Guo L, Gao R, Xu J, Jin L, Cotrim AP, Yan X, Zheng C, Goldsmith CM, Shan Z, Hai B, Zhou J, Zhang C, Baum BJ, Wang S. (2014) AdLTR2EF1alpha-FGF2-mediated prevention of fractionated irradiation-induced salivary hypofunction in swine. *Gene Ther*, 21: 866-873.
  263. Palaniyandi S, Odaka Y, Green W, Abreo F, Caldito G, De Benedetti A, Sunavala-Dossabhoy G. (2011) Adenoviral delivery of Tausled kinase for the protection of salivary glands against ionizing radiation damage. *Gene Ther*, 18: 275-282.

264. Timiri Shanmugam PS, Dayton RD, Palaniyandi S, Abreo F, Caldito G, Klein RL, Sunavala-Dossabhoy G. (2013) Recombinant AAV9-TLK1B administration ameliorates fractionated radiation-induced xerostomia. *Hum Gene Ther*, 24: 604-612.
265. Zheng C, Cotrim AP, Rowzee A, Swaim W, Sowers A, Mitchell JB, Baum BJ. (2011) Prevention of radiation-induced salivary hypofunction following hKGF gene delivery to murine submandibular glands. *Clin Cancer Res*, 17: 2842-2851.
266. Xu L, Harada H, Yokohama-Tamaki T, Matsumoto S, Tanaka J, Taniguchi A. (2006) Reuptake of extracellular amelogenin by dental epithelial cells results in increased levels of amelogenin mRNA through enhanced mRNA stabilization. *J Biol Chem*, 281: 2257-2262.
267. Miyoshi K, Nagata H, Horiguchi T, Abe K, Arie Wahyudi I, Baba Y, Harada H, Noma T. (2008) BMP2-induced gene profiling in dental epithelial cell line. *J Med Invest*, 55: 216-226.
268. Yan Z, Chen G, Yang Y, Sun L, Jiang Z, Feng L, Yu M, Guo W, Tian W. (2014) Expression and roles of syndecan-4 in dental epithelial cell differentiation. *Int J Mol Med*, 34: 1301-1308.
269. Athanassiou-Papaefthymiou M, Kim D, Harbron L, Papagerakis S, Schnell S, Harada H, Papagerakis P. (2011) Molecular and circadian controls of ameloblasts. *Eur J Oral Sci*, 119 Suppl 1: 35-40.
270. Ravindran S, Song Y, George A. (2010) Development of three-dimensional biomimetic scaffold to study epithelial-mesenchymal interactions. *Tissue Eng Part A*, 16: 327-342.
271. Van Itallie CM, Anderson JM. (2014) Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol*, 36: 157-165.
272. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. (2014) Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin Cell Dev Biol*, 36: 166-176.
273. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol*, 156: 1099-1111.



274. Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM. (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest*, 107: 1319-1327.
275. Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE. (2003) Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation. *J Biol Chem*, 278: 17350-17359.
276. Angelow S, Kim KJ, Yu AS. (2006) Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. *J Physiol*, 571: 15-26.
277. Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. (2010) Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 18010-18015.
278. Hou J, Gomes AS, Paul DL, Goodenough DA. (2006) Study of claudin function by RNA interference. *J Biol Chem*, 281: 36117-36123.
279. Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright JT, Paine ML. (2010) Regulation of pH During Amelogenesis. *Calcif Tissue Int*, 86: 91-103.
280. Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Suzuki A, Yamamoto A, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. (2000) CO<sub>2</sub> permeability and bicarbonate transport in microperfused interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. *J Physiol*, 528: 305-315.
281. Rakonczay Z, Jr., Fearn A, Hegyi P, Boros I, Gray MA, Argent BE. (2006) Characterization of H<sup>+</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transporters in CFPAC-1 human pancreatic duct cells. *World J Gastroenterol*, 12: 885-895.
282. Ishiguro H, Steward MC, Lindsay AR, Case RM. (1996) Accumulation of intracellular HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> by Na<sup>(+)</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol*, 495: 169-178.
283. Schwiebert EM, Zsembery A. (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. *Biochim Biophys Acta*, 1615: 7-32.
284. Baggaley E, McLarnon S, Demeter I, Varga G, Bruce JI. (2007) Differential regulation of the apical plasma membrane Ca<sup>(2+)</sup>-ATPase by protein kinase A in parotid acinar cells. *J Biol Chem*, 282: 37678-37693.
285. Lacruz RS, Smith CE, Bringas P, Jr., Chen YB, Smith SM, Snead ML, Kurtz I, Hacia JG, Hubbard MJ, Paine ML. (2012) Identification of novel candidate

genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. *J Cell Physiol*, 227: 2264-2275.

## 11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

2016

Bori E, Guo J, Racz R, Burghardt B, Foldes A, Keremi B, Harada H, Steward MC, Den Besten P, Bronckers AL, Varga G. (2016) Evidence for Bicarbonate Secretion by Ameloblasts in a Novel Cellular Model. J Dent Res, 95: 588-596.

IF: 4.139\*\*

2015

Hegyesi O, Foldes A, Bori E, Nemeth Z, Barabas J, Steward MC, Varga G. (2015) Evidence for Active Electrolyte Transport by Two-Dimensional Monolayers of Human Salivary Epithelial Cells. Tissue Eng Part C Methods, 21: 1226-1236

IF: 4.448\*

Varga G, Keremi B, Bori E, Foldes A. (2015) Function and repair of dental enamel - Potential role of epithelial transport processes of ameloblasts. Pancreatology, 15: S55-60.

IF: 2.873\*

2014

Bori E, Racz G, Burghardt B, Demeter I, Hegyesi O, Varga G, Foldes A. (2014) Par-C10 sejtek a parotis szöveti szerveződésének modellezésére. [ParC-10 cells for modelling parotid gland tissue reorganization]. Fogorv Sz, 107: 99-105.

2013

Varga G, Bori E, Kallo K, Nagy K, Tarjan I, Racz GZ. (2013) Novel possible pharmaceutical research tools: stem cells, gene delivery and their combination. Curr Pharm Des, 19: 133-141.

IF: 3.288

## 12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Varga Gábornak, szakmai irányítását, segítségét, valamint hogy lehetőséget biztosított számomra PhD munkám elkészítéséhez, melynek köszönhetően hat évig az Orálbiológiai Tanszék csapatában dolgozhattam.

Hálával tartozom Martin C. Stewardnak felbecsülhetetlen módszertani tanácsaiért és szakmai/emberi támogatásáért.

Köszönöm Pamela DenBestennek és Antonius LJJ. Bronckersnek, hogy általuk megismerkedhettem az ameloblasztokkal kapcsolatos kutatásokkal.

Köszönettel tartozom Dr. Földes Annának és Dr. Rácz Gábornak, akik megtanítottak a kutatómunka alapjaira. Hálás vagyok útmutatásaikért, módszertani segítségükért, valamint a jó hangulatú közös munkáért.

Külön köszönet illeti munkatársaimat Dr. Burghardt Beátát és Rácz Róbertet, valamint TDK hallgatóimat, Angler Dorottyát és Sinka Dórát a kísérletekben nyújtott segítségükért.

Hálás vagyok munkatársaimnak: Dr. Demeter Irmának, Dr. Hegyesi Orsolyának, Dr. Kerémi Beának, Dr. Kádár Kristófnak, Dr. Simonné Dr. Nagy Krisztinának, Jobbágy-Óvári Gabriellának, Dr. Stiedl Péternek, Dr. Perczel-Kovács Katalinnak, Dr. Beck Anitának, Kálló Karolának<sup>†</sup> és az Orálbiológiai Tanszék összes többi dolgozójának, hogy megosztották velem tapasztalataikat, tudásukat, ötleteiket és gondolataikat. Külön köszönöm Dr. Simon György professzor úrnak szakmai és emberi támogatását.

Végül pedig szeretném megköszönni családomnak a támogatást, kitartást, és azt hogy munkám során mindvégig mellettem álltak.