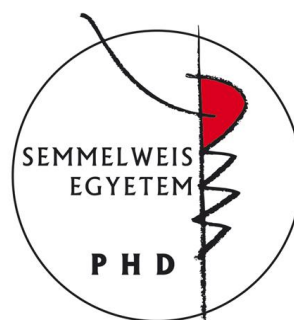


# A zománcképződés és a nyálszekréció epiteliális transzportfolyamatainak jellemzése

Doktori tézisek

**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

# Bevezetés

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 fogzománcra, amely szervezetünk legkeményebb szövete – 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. Jelen disszertáció témája a nyálmirigy hipofunkció biológiai kezelési lehetőségeinek tanulmányozása primer humán szubmandibuláris nyálmirigy eredetű sejt kultúrákon és patkány parotisz eredetű sejt vonalon, valamint elsőként mutat be egy olyan *in vitro* modellt, melynek segítségével az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportja vizsgálható.

Nyálunk elektrolitokat és fehérjéket tartalmazó folyadék, amely meghatározó szerepet tölt be a szájüreg mechanikai, kémiai és mikrobiológiai védelmében. 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, akár a beszéd is gondot okozhat számukra, megemelkedik náluk a fogszuvasodás és a szájüregi fertőzések gyakorisága és a parodontitisz rizikója. Súlyos esetekben szájüregi és nyelőcsővi fekélyek is kialakulhatnak.

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. Bár a kiváltó okok eltérőek, kialakulásának hátterében az elektrolit- és folyadékszékrecióért felelős nyálmirigy acinusok funkcióvesztése áll, míg a kevésbé érzékeny, reabszorptív funkcióval bíró dukális rendszer intakt marad. Jelenleg hatékony kezelési mód nem áll rendelkezésre, új lehetőséget kínálnak azonban szájszárazság

enyhítésére a biológiai terápiák (duktális-acináris transzdifferentiáció, őssejtek, génterápia, mesterséges nyálmirigy). Ezek kutatása elsősorban az acinusokra jellemző tulajdonságok megőrzésére/helyreállítására (duktális-acináris transzdifferentiáció, őssejtek, mesterséges nyálmirigy), valamint a duktuszsejtek működésének átalakítására (génterápia) fókuszál.

Az ameloblasztok a nyálmirigy sejtekhez hasonlóan epitél eredetűek, a fogfejlődés harang fázisa során differenciálódnak a belső zománchám sejtjeiből. Maga a fogzománc – a nyálhoz hasonlóan – két lépésben keletkezik. A szekréciós fázis során az ameloblasztok a  $\text{Ca}^{2+}$  és  $\text{PO}_4^{3-}$  ionok transzportja mellett mátrix fehérjéket (amelogenin, ameloblasztin, enamelin) szekretálnak, amelyeken megindulhat a kristályosodás, míg az érési fázis során ezek a fehérjék lebontásra és visszavételre kerülnek szintén az ameloblasztok által, a mineralizáció folytatódik, az ásványi anyag tartalom 30%-ról 96-98%-ra nő az érés során. Az érési fázisra jellemző ameloblaszt marker az amelotin, amelynek funkciója jelenleg kevésbé ismert, valamint a mátrix proteáz kallikrein 4 (KLK4). A fenti funkcióikon túlmenően úgy tűnik, az ameloblasztok fontos szerepet játszanak a mineralizációs tér puffereálásában is. Egyfelől a hidroxipapatit kristályok képződése során nagy mennyiségű proton szabadul fel, mivel fiziológiai körülmények között ennek építőkövei – a foszfát ionok – leginkább hidrogénfoszfátok formájában vannak jelen. Másfelől számos fontos pH regulátor jelenlétét (szénsav-anhidrázok (CAR), anion cserélők (AE), nátrium-bikarbonát kotranszporter (NBC), nátrium-proton cserélő (NHE), cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR), v-típusú proton ATPáz) kimutatták ameloblaszt sejteken, ráadásul ezek hiánya zománctfejlődési rendellenességekhez vezetett. Az ameloblasztok aktív  $\text{HCO}_3^-$  transzportjának különösen fontos szerepe lehet az érési fázisban, mivel ekkor a legnagyobb mértékű a kristályosodás.

Az ameloblasztok tanulmányozásának legfőbb gátja nehéz hozzáférhetőségük. *In vivo* vagy *ex vivo* vizsgálatuk komoly akadályokba ütközik, mivel egyetlen sejtsort alkotnak a fejlődő zománc felszínén. A mineralizációs térből sem lehet mintát venni, csupán a kialakult zománcon látható változásokból lehet következtetni a lezajlott folyamatokra. Ráadásul az

ameloblasztok a fogak előtörése után a nem folyamatosan növekvő fogak esetén eltűnnek, ami humán vizsgálatoknál embrionális fogcsírák felhasználását teszi szükségessé, amely etikai problémákat is felvet. Mindezekből következik, hogy leginkább hisztológiai, fehérje- és génexpressziós módszerek alkalmazhatóak, ezek is elsősorban rágszálók folyamatosan növekvő metszőfogainak tanulmányozására, melyeknél az ameloblasztok egyes alakjai egyszerre megtalálhatóak a fejlődő fog felületének különböző szakaszain. Ezért is fontos olyan *in vitro* modellek megalkotása, amelyek lehetővé teszik funkcionális mérések elvégzését.

## Célkitűzés

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

1. primer humán szubmandibuláris nyálmirigy kultúrákat hozzunk 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*,
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?

## Módszerek

A primer humán szubmandibuláris nyálmirigy eredetű sejteket a korábban Tran és munkatársai, valamint Szlávik és munkatársai által leírt protokoll alapján izoláltuk, azzal a különbséggel, hogy frakcionált enzimes emésztést, a tenyésztés során pedig kondicionált médiumot alkalmaztunk annak érdekében, hogy növeljük az életképes sejtek arányát, valamint megelőzzük az érzékenyebb acinus sejtek károsodását. Kétféle sejt kultúrát alakítottunk ki, a PT-HSG tenyészetet, amely kevertebb, mezenchimális-epiteliális kultúra, valamint a kiültetést követő első napon még lebegő sejtaggregátumokból a huSMG tenyészetet, amely a lassabban letapadó epitél sejtekben dúsabb. Ezeket HepatoSTIM tápoldatban, Transwell membránokra ültetve tenyésztettük, génexpressziójukat RT-PCR segítségével vizsgáltuk.

A Par-C10 sejteket DMEM-F12 tápoldatban tartottuk fenn, amely a következő kiegészítőket tartalmazta: 10 % FCS, 0,1  $\mu$ M retinsav, 2 nM trijód-tironin és 0,4  $\mu$ g/ml hidrokortizon. Fluoreszcens fehérjét (AdEYFP), valamint vízcsatornát (AdAQP1) kódoló adenovírus vektorokat készítettünk, illetve szaporítottunk a He és munkatársai, valamint Delporte és munkatársai által leírt módon. A bevitt transzgén kifejeződését gén-, illetve fehérje szinten RT-PCR (AQP1), valamint fluoreszcens mikroszkópia (EYFP) segítségével igazoltuk. Gravimetriával mértük a vízmozgást Transwell membránra ültetett Par-C10 sejteken keresztül 3 víruspartikulum/sejt arányú AdAQP1 transzdukciót követően.

A HAT-7 sejteket háromféle tápoldatban tenyésztettük Transwell membránon. 10% borjúszérummal (HyClone) kiegészített DMEM-F12 médiumot alkalmaztunk kontroll tápoldatként. A sejtek differenciálódásának elősegítésére emellett két másik médiumot is felhasználtunk, a kontroll médiumot 2,1 mM kalcium végkoncentrációig  $\text{CaCl}_2$ -dal, valamint  $10^{-5}$  mM végkoncentrációig dexametazonnal kiegészítve kaptuk az ún. differenciáló médiumot, valamint tenyésztettük HAT-7 sejteket a primer humán nyálmirigy kultúráknál sikeresen alkalmazott HepatoSTIM oldatban is. A sejtek gén- és fehérjeexpresszióját RT-PCR

és immuncitokémia segítségével vizsgáltuk. Epiteliális volt-ohm méterrel (EVOM) mértük a HAT-7 monolayerek transzepitél ellenállását, amely a szoros kapcsolatokat jellemző érték. A sejtek  $\text{HCO}_3^-$  transzportját mikrofluorometria segítségével vizsgáltuk. Ennek lényege röviden, hogy a sejteket pH érzékeny BCECF fluoreszcens festékkel töltjük fel, majd az extracelluláris körülmények kontrollálásával (ionösszetétel, transzporter inhibitorok) teremtünk olyan feltételeket, amelyek között a  $\text{HCO}_3^-$  transzport egyes elemei elkülöníthetően vizsgálhatók, így az intracelluláris pH változásaiból következtethetünk az adott körülmények között lezajlott transzportfolyamatokra.

## Eredmények

Az irodalmi adatoknak megfelelően, natív nyálmirigy szövetből mind az acinusok  $\text{Cl}^-$  transzportjában érintett  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$  kotranszporter 1 (*NKCC1*),  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  cserélő 1 (*NHE1*) és anioncserélő 2 (*AE2*), mind a ductuszok jellemző  $\text{Na}^+$  csatornája az *ENaC* kimutatható volt RNS szinten. A fenti transzportereken és csatornákon kívül  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  kotranszporter 1 (*NBC1*) szintén expresszáldott a szövetben. A primer humán nyálmirigy sejt kultúrák génextpresszióját összehasonlítva a natív szövettel 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. Bár az acinusok elektrolitszekréciójában kulcsszerepet betöltő *NKCC1* expressziója jelentősen csökkent a PT-HSG és huSMG sejtekben, ami azok *in vitro* dedifferenciálódásársa utal, azonban az acináris tulajdonságok részben megőrizhetőek voltak.

A Par-C10 sejtek adenovirális transzdukciót követően képesek voltak a bevitt transzgenek kifejezésére. Igazoltuk a humán *AQP1* expresszióját mRNS szinten 1, 10 és 100 vírusrészecske/sejt vírudózis alkalmazását követően, ellenben azokban a tenyészetekben, amelyek víruskezelést nem kaptak az *AQP1* mRNS nem volt kimutatható. Ad*AQP1* génbevitelt követően a Par-C10 monolayerek vízpermeabilitása növelhető volt: a transzdukción át nem esett sejtek esetében  $0,4 \pm 4,5 \mu\text{l}$  vízmozgás volt mérhető izoozmotikus médiumban 2 óra inkubációs időt követően, amelyet az apikálisan alkalmazott hiperozmotikus médium vírusfertőzés hiányában is  $14,0 \pm 5,7 \mu\text{l}$ -re növelt. Az Ad*AQP1* 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 hiperozmotikus hajtóerő biztosítása esetén, amely utóbbi szignifikánsan magasabbnak bizonyult, mint a transzdukción át nem esett sejtek esetén hiperozmotikus körülmények között mért érték. Az EYFP fluoreszcens fehérjét 3 víruspartikulum/sejt arányú transzdukciót követően szintén expresszálda a sejtek jelentős hányada.



A HAT-7 sejtek 2-3 nap alatt elérték a konfluenciát a Transwell membrán felületén függetlenül az alkalmazott médiumtól. Fáziskontraszt mikroszkópos kép alapján tipikus „kockakő” epitél morfológiával jellemezhetőek. Az immuncitokémiai metszetek alapján a sejtekben megjelentek az érési fázis jellemző fehérjéi, expresszálták mind a mátrix proteáz KLK4-et, mind az újabban felfedezett érési markert, az amelotint.

A különböző médiumokban tenyésztett HAT-7 sejtek transzepitél ellenállás (TER) értékei között igen jelentős különbségek mutatkoztak. Az ellenállás görbék tipikusan az ötödik napon maximumot értek el, majd egy alacsonyabb platófázisba mentek át a hetedik napra. A TER érték a kontroll médiumban tenyésztett sejtek esetén adódott a legalacsonyabbnak, míg a HepatoSTIM oldatban tenyésztett sejtek esetén a legmagasabbnak, az ötödik napon mért TER értékek kontroll, differenciáló és HepatoSTIM tápoldatok alkalmazása esetén rendre a következők voltak:  $187 \pm 23 \Omega \text{cm}^2$ ,  $567 \pm 170 \Omega \text{cm}^2$ ,  $1606 \pm 277 \Omega \text{cm}^2$ . A szoros kapcsolatok molekuláris vizsgálata a következő szoroskapcsolati fehérjék génszintű expresszióját mutatta: zonula occludens 1 (*Zo1*) és 2 (*Zo2*), occludin (*Occl*), valamint claudin 1, 4, 7 és 8 (*Cldn1*, *4*, *7* és *8*). Az expresszió szemikvantitatív értékelése során a legszembetűnőbb különbség a *Cldn8* kifejeződésében mutatkozott, a kontroll médiumban tenyésztett sejtek esetén volt a legalacsonyabb, míg a HepatoSTIM tápoldatban tenyésztett sejtek esetében a legmagasabb (nagyjából háromszorosa a kontroll médiumban tenyésztett sejtek expressziójának), összhangban a transzepitél ellenállás mérések eredményeivel. A HAT-7 sejtekben expresszálandó claudinok elsősorban a paracelluláris permeabilitás csökkentésének irányába hatnak és az irodalmi adatok alapján mindegyiket megtalálták rágsálók érési fázisú ameloblasztjainak szoros kapcsolataiban.

Az irodalmi adatok alapján ameloblasztokon megtalálható,  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióban érintett elektrolittranszporterek, valamint csatornák, úgymint *Nhe1*, *Ae2*, *Nbc1*, *Pendrin* és *Cftr* mRNS szintű expressziója kimutatható volt a HAT-7 sejtekben függetlenül a tenyésztési körülményektől, különbség kizárólag ezek mennyiségében volt a különböző tápoldatokban

tenyésztett sejtek között. Szintén expresszáldott a sejtekben a *Car2* citoplazmában előforduló szénsav-anhidráz izoforma. A differenciáló és HepatoSTIM médiumban, Transwell membránon tenyésztett sejteket immuncitokémia módszerrel vizsgálva az NBC1, AE2, Pendrin, PAT1, CFTR és CAR2 fehérje szinten is kimutatható volt; mennyiségi és expressziós mintázatbeli különbség nem mutatkozott a differenciáló és HepatoSTIM oldatban tenyésztett sejtek között.

Mikrofluorometriás méréseink során elsőként a HAT-7 sejtek membránjának bikarbonát és CO<sub>2</sub> permeabilitását vizsgáltuk. A sejteket kezdetben mindkét oldalról HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> mentes HEPES mérőoldattal perfundáltuk, majd apikális vagy bazolaterális oldalukat HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> pufferelt oldatnak tettük ki. Amikor az oldatváltás apikálisan történt az intracelluláris pH gyors csökkenése volt megfigyelhető, ami a sejtbe beáramló CO<sub>2</sub> 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 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> mentes HEPES mérőoldatra, jelezve, hogy az apikális oldalon HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvétel nincs. Ugyanez az oldatváltás a bazolaterális oldalon csupán igen kis pH csökkenést eredményezett, amelyet az intracelluláris pH gyors emelkedése követett, ami jelentős mértékű HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvételre utalt. A bazolaterális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvétel gátolható volt az NBC gátlószere, 500 μM H<sub>2</sub>DIDS segítségével, valamint az intracelluláris pH emelkedést csökkentette a szénsav-anhidrázok permeábilis gátlószere, 100 μM acetazolamid alkalmazása is, jelezve hogy ezek az enzimek is aktívak a HAT-7 sejtekben. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> pufferelt mérőoldatot alkalmazva, a sejteket savterhelésnek kitéve, az intracelluláris pH kompenzációjában szerepet játszhatnak proton pumpák és/vagy Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> cserélők a H<sup>+</sup>-ok leadása révén, valamint Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> kotranszporerek, amelyek a HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ionok felvételéért felelősek. Annak érdekében, hogy ezek jelenlétét igazoljuk, a savterhelést követően megvontuk a Na<sup>+</sup>-ot a mérőoldatból, amelynek hatására az intracelluláris pH kompenzációja teljes mértékben elmaradt, jelezve, hogy proton pumpák nem találhatóak a HAT-7 sejtekben, a kompenzációért csak Na<sup>+</sup>-függő folyamatok felelősek. A Na<sup>+</sup> megvonás

megszűnését követően az intracelluláris pH gyorsan helyreállt, azonban mintegy 85%-ban gátolható volt az NHE1-re ható 300  $\mu\text{M}$  amilorid és az NBC1-re ható 500  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>DIDS együttes alkalmazásával.

A bazolaterális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvételi utak és a H<sup>+</sup> leadáson alapuló pH szabályozás gátlása lehetővé teszi az apikális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréció mértékének meghatározását. Az apikális szekréció ugyanis egy ideig a bazolaterális HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> felvétel gátlása mellett is folytatódik, ez viszont az intracelluláris pH csökkenésével jár. HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/CO<sub>2</sub> pufferelt mérőoldatot és bazolaterális oldali amilorid és H<sub>2</sub>DIDS gátlást alkalmazva vizsgáltuk a HAT-7 sejtek HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekrécióját. A szekréció stimulálására különböző serkentőket, úgymint az intracelluláris Ca<sup>2+</sup> mobilizációt előidéző 50  $\mu\text{M}$  ATP-t és/vagy az intracelluláris cAMP szintet növelő membránpermeábilis 10  $\mu\text{M}$  forskolin és 500  $\mu\text{M}$  IBMX kombinációt alkalmaztunk. Stimuláció hiányában a HAT-7 sejtek nyugalmi HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciója elenyésző volt, azonban 50  $\mu\text{M}$  ATP bazolaterális alkalmazását követően mérhető intracelluláris pH csökkenést tapasztaltunk. A bazolaterálisan alkalmazott ATP hatását a forskolin és IBMX nagymértékben növelte, a Ca<sup>2+</sup> és cAMP mediálta jelátviteli utak közötti szinergizmust jelezve, amelyet számos más epitéliumban (így nyálmirigyekben is) kimutattak.

## 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, amelyekben a sejtek részben megőrzik az acináris sajátosságokat, 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) expresszálnak 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, amelyért 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), amelyeket 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, amely alkalmas az ameloblasztok  $\text{HCO}_3^-$  transzportjának funkcionális vizsgálatára.

## Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent közlemények:

2016

1. E Bori, J Guo , R Rác , B Burghardt , A Földes , B Kerémi , H Harada , M C Steward , P Den Besten , A L J J Bronckers , G Varga  
Evidence for Bicarbonate Secretion by Ameloblasts in a Novel Cellular Model  
**JOURNAL OF DENTAL RESEARCH** 95:(5) pp. 588-596. (2016)

2015

2. Hegyesi O , Foldes A , Bori E, Nemeth Z , Barabas J , Steward MC , Varga G  
Evidence for Active Electrolyte Transport by Two-Dimensional Monolayers of Human Salivary Epithelial Cells.  
**TISSUE ENGINEERING PART C METHODS** 21:(12) pp. 1226-1236. (2015)
3. Varga G , Kerémi B , Bori E, Földes A  
Function and repair of dental enamel – Potential role of epithelial transport processes of ameloblasts  
**PANCREATOLOGY** 15:(4. Suppl) pp. S55-S60. (2015)

2014

4. Bori E, Rác G , Burghardt B , Demeter I , Hegyesi O , Varga G , Földes A  
Par-C10 sejtek a parotis szöveti szerveződésének modellezésére  
**FOGORVOSI SZEMLE** 107:(3) pp. 99-105. (2014)

2013

5. Varga G , Bori E, Kallo K , Nagy K , Tarjan I , Racz GZ  
Novel Possible Pharmaceutical Research Tools: Stem Cells, Gene Delivery and their Combination.  
**CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN** 19:(1) pp. 133-141. (2013)