

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

**Szelektív matriptáz inhibitorok hatása a paracelluláris
transzportfolyamatokra**

Készítette: Barna Réka Fanni

Témavezető: Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébet PhD
SZIE ÁOTK, tudományos munkatárs

Budapest

2014

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK.....	2
1. BEVEZETÉS	3
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS.....	5
2.1 IPEC-J2 sejtvonal jellemzése	5
2.2 TTSP család általános jellemzése	6
2.3 A matriptáz expressziója és élettani funkciója nem daganatos sejtekben.....	6
2.4 Patológias matriptáz működés.....	8
2.4.1 Daganatos elváltozások.....	8
2.4.2 A matriptáz szerepe a porcbontásban és az osteoarthritisben	10
2.5 Matriptáz inhibitorok	11
2.6 Bélbarrier integritás, a bél védő szerepe.....	14
2.7 Paracelluláris permeabilitás jellemzői	15
3. ANYAG ÉS MÓDSZER.....	17
3.1 IPEC-J2 sejtek tenyésztése	17
3.2 Sejttoxicitás mérése Neutral red festéssel	17
3.3 Paracelluláris permeabilitás vizsgálatok.....	18
3.3.1 Ellenállás mérés voltohmméterrel.....	18
3.3.2 FD4 mennyiségi analízise	19
3.4 Occludin és matriptáz immunfluoreszcens festése	20
3.5 ROS mérés Amplex Red reagenssel.....	21
3.6 Statisztika.....	22
4. EREDMÉNYEK	23
4.1 Matriptáz kimutatása IPEC-J2 sejtekben.....	23
4.2 Citotoxicitási vizsgálat Neutral red (NRU) módszerrel	24
4.3 AEBSF TER csökkentő hatása az IPEC-J2 monolayerre	25
4.4 Matriptáz inhibitorok hatása a sejtréteg ellenállására	26
4.5 FD4 transzport vizsgálat matriptáz inhibitorokkal kezelt IPEC-J2 sejtréteken	27
4.6 Matriptáz inhibitorok oxidatív stresszkeltő hatásának mérése Amplex Red módszerrel	28
4.7 432 inhibitor hatása az occludin lokalizációjára	29
5. MEGBESZÉLÉS	31
6. ÖSSZEFOGLALÁS.....	34
7. SUMMARY	35
8. IRODALOMJEGYZÉK	37
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	39

RÖVIDÍTÉSEK

3-ApA: 3-amidino fenilalanin
ADAM: disintegrin és metalloproteáz fehérje
AEBSF: 4-(2-aminoetil)-benzoeszulfonilfluorid
AJC: apikális kapcsoló struktúra
BSA: szarvasmarha szérumbalbumin
DMEM: Dulbecco-féle módosított Eagle tápközeg
FBS: főtájs borjú szérumb
FD4: fluoreszcein izotiocianát-dextrán 4 kDa
HAI-1: hepatocita növekedési faktor aktivátor inhibitor 1
HAT: humán légúti tripszinszerű szerin- proteáz
HGF/SF: hepatocita növekedési faktor/ szóródási faktor
HRP:-tormaperoxidáz
IPEC-J2: sertés jejunális bélhámsejtvonal
LDL: alacsony denzitású lipoprotein
LDLRA- alacsony denzitású lipoprotein receptor A
MT-MMP: membrán típusú mátrix metalloproteáz
MT-SP1: membrán- típusú szerin- proteáz 1
NRU: Neutral red felvétel módszer
OA: osteoarthritis
PAR-2: proteáz-aktivált receptor-2
PBS: foszfáttal puffertolt sóoldat
ROS: reaktív oxigéngyökök
S1P: szfingozin-1- foszfát
ST14: suppressor of tumorigenicity 14
TER: transzepitheliális elektromos rezisztencia
TTSP: kettes típusú transzmembrán szerin- proteáz
TMPRSS2: transzmembrán szerin- proteáz 2
uPA: urokináz típusú plazminogén aktivátor
ZO: zonula occludens

1. BEVEZETÉS

A paracelluláris transzport szabályozásáért felelős folyamatok nem teljesen tisztázottak napjainkban. Az oxidatív stressz és a Gram-negatív baktériumok membránjában jelenlévő lipopoliszacharid (LPS) gyakran szerepelnek a bél gyulladásos folyamatainak kiváltó okai között. A vékonybélben lejátszódó komplex interakciók modellezésére alkalmas biológiai rendszerek kulcsfontosságúak a gyulladásos reakciók *in vitro* tanulmányozásában és az epithelium védő szerepének megértésében. A gastrointesztinális kórokozók elleni védelemben újabb lehetőségként vetődik fel a bélbarrier rezisztencia növelésére a probiotikumok használata mellett a szerin- proteáz aktivitással rendelkező matriptáz működésének befolyásolása [1].

Fontos szerepet tölthet be a tight junction szabályozásán át a matriptáz, amely egy kettes típusú transzmembrán szerin- proteázok (TTSPs) családjába tartozó enzim [2]. Élettani szerepet tölt be az epithelium eredetű sejtek növekedésében, érésében, az epithelium homeosztázis kialakításában és fenntartásában [3,4]. Patológias esetben a matriptáz daganat növekedésében és metasztázis képzésében betöltött hatása jelenleg is intenzív kutatás tárgya, illetve több kutatócsoport is vizsgálja a prognózis felállításában markerként történő alkalmazhatóságát. Szerepe lehet az osteoarthritis kialakításában és a porcbonthatásban [5]. Influenzavírus esetén a TMPRSS2 (amely a matriptázhoz nagyon hasonló szerin- proteáz) szerepét is vizsgálják a vírus-sejt fúzió esetén [6].

A bélhámsejtek esetén különösen fontos a sejtréteg integritása, ugyanis a bélhám képezi a szervezet és a külvilág közti erős fizikai és kémiai barriert a baktériumok, toxinok, és egyéb kémiai ágensek ellen. A védelmi feladatokon kívül feladatuk a különböző anyagok transzportja is, ez történhet transzcellulárisan vagy paracellulárisan. A sejtek közötti átjutás az apikális kapcsoló-struktúrákban található transzmembrán fehérjéktől függ, és az itt található tight junction-ok kialakulásának és fenntartásának szabályozásában vesz részt a matriptáz [7].

Kutatási munkánk célja egy poliészter membrán inzerten tenyésztett, újszülött sertés jejunum eredetű IPEC-J2 sejtmodell létrehozása volt, amely segítségével nyomon követhetővé vált a paracelluláris transzport-folyamatokat szabályozó matriptáz működése és a gátlószerek hatására sérült bélhámsejt- réteg integritásának változása. Kísérleti munkánk során vizsgálni kívántuk, hogy nem szelektív szerin- proteáz gátló AEBSF, és a 3-amidino-fenilalanin alapvázú matriptáz inhibitorok hozzáadás után a

matriptáz szerin- proteáz aktivitásának gátlása hogyan befolyásolja az IPEC-J2 sejtréteg paracelluláris permeabilitását. A bélhámsejtek integritásának vizsgálatához rétegellenállás mérést és fluoreszcens jelöléssel ellátott dextránmolekula transzport meghatározást végeztünk. Immunfluoreszcens vizsgálatokkal kívántuk tanulmányozni egy tight junction fehérje, az occludin megoszlását szelektív matriptáz inhibitor alkalmazásakor. Kutatási munkánk során célul tűztük ki az alkalmazott szelektív matriptáz inhibitorok hatásának vizsgálatát az IPEC-J2 sejtek életképességére és a hidrogén- peroxid termelésére.

Kísérleteink célja egyrészt annak eldöntése volt, hogy egy poliészter membrán inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtréteg alkalmas modellrendszernek bizonyul-e a vékonybél fiziológiás és megváltozott permeabilitásának tanulmányozására. Másrészt célul tűztük ki a matriptáz bélbarrier integritásban betöltött szerepének megismerését, amely jelentős mértékben járulhat hozzá a bélhámbarrier integritásváltozással járó humán (Crohn betegség, colitis ulcerosa) és gazdasági jelentőséggel bíró sertés, szarvasmarha megbetegedések biokémiai, farmakológiai befolyásolható folyamatainak megértéséhez.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 IPEC-J2 sejtvonala jellemzése

A kutatásunk során használt IPEC-J2 egy nem transzformált, sertés jejunumból származó sejtvonala, amelyet eredetileg újszülött malacból nyertek még a kolosztrum felvétele előtt [8,9]. Eredetileg sertés bélben található patogén mikroorganizmusok *in vitro* vizsgálatára, majd később humán vékonybél *in vitro* modelljeként is használták, mivel a sertés mind méretben, táplálkozásban, anatómiában közelebb van az emberhez. A sejtvonalat elektronmikroszkóppal és hisztokémiai vizsgálatokkal vizsgálva kiderült, hogy az élő állatok bélhámsejtjeihez hasonlóan az IPEC-J2 sejteknek is vannak apikálisan mikrovillusai, bazális és laterális részein különböző hosszúságú citoplazma nyúlványokat bocsát az intercelluláris részbe. A sejtek között az apikolaterális részen tight junction található és a sejtek apikális részét glikokalix fedi. A sejtek polarizálódnak az apikális kapcsoló struktúrák (AJC) (tight junction, zonula adherens, dezmoszómák) létrejötte után, a funkcionális integritás létrejötte és megléte mérhető a transzepitheliális rezisztencia (TER) mérésével. Immunfluoreszcens festést használva kiderült, hogy többféle fehérje található meg a TJ területén, mint például a claudin-3, claudin-4, lokalizálva az occludinnal a sejt apikolaterális membránjában. A sejtkapcsoló struktúrákban található fehérjék felelnek a barrier funkcióért, és a paracelluláris permeabilitásért is. Különbség viszont, hogy az IPEC-J2 sejtvonala nem tartalmaz kehelysejteket [9]. Előnye más, humán kolon karcinóma sejtvonalaival szemben, mint a Caco-2, hogy a glikolizációs mintázata, a sejtproliferáció mértéke és sebessége, illetve a kolonizációs képessége is sokkal inkább hasonlít az *in vivo* bélrendszerhez [10]. Az IPEC-J2 sejteket poliészter membránon tenyésztethetők, mert így érhető el az *in vivo* polarizált, egyrétegű epitheliumhoz legjobban hasonlító spontán sejt differenciáció és sejt polarizáció [11].

2.2 TTSP család általános jellemzése

A sejtfelszíni proteolitikus folyamatok fontos szabályozó feladatokat látnak el, így részt vesznek az extracelluláris mátrix bontásában, a véralvadásban, illetve a sejt növekedésben, adhézióban, migrációban és az apoptózisban is. Ide tartozó enzimesaládok például a MT-MMP proteázok, ADAM fehérjék, szerin- proteázok. A szerin- proteázok közé tartozó tripszinszerű szerin- proteázok egyik alcsoportja a TTSP, amely tagjai direkt a sejtmembránhoz kötöttek, és rendelkeznek egy N-terminális intracelluláris résszel [2]. A TTSP család azért számít különlegesnek, mert egyes tagjai kizárólag epitheliális sejteken és karcinóma sejteken találhatók meg ellentétben más, a szervek strómájában található proteázokkal, mint a legtöbb MMP [3]. TTSP családba tartozó fehérjékre jellemző egy rövid, intracelluláris N-terminális domén, egy transzmembrán domén, és egy nagyobb extracelluláris domén; ez utóbbi tartalmazza a változatos törzsszakaszt, a szerin- proteáz domént és a C-terminális részt. TTSP családot további négy alcsaládba osztják a szerin- proteáz domén filogenetikai analízise és a törzsrégió összetétele alapján. Ez a négy alcsalád a humán légúti tripszinszerű szerin- proteáz (HAT/DESC), a matriptáz, a hepszin/TMPRSS2 és a corin alcsalád [2,6]. A TTSP család összes tagja egyláncú zimogénként szintetizálódik, és aktiválásához egy proteolitikus vágást igényel a megfelelő helyen a katalitikus doménben. Számos tagja, mint a HAT, matriptáz, matriptáz-2, TMPRSS2 képes autokatalitikus aktivációra *in vitro* körülmények között. Az autoaktiváció alapján feltételezik, hogy a TTSP család funkciója a proteolitikus kaszkádok elindítása lehet. Az autoaktiváció lefolyása nem ismert, de hasonlít az oligomerizációhoz [12].

2.3 A matriptáz expressziója és élettani funkciója nem daganatos sejtekben

A matriptáz alcsaládba három homológ fehérje (matriptáz, matriptáz-2,-3), és egy atipikus, mozaik szerkezetű fehérje, a poliszeráz-1 tartozik [2]. A matriptáz, más néven MT-SP1, TAGD-15, ST14 vagy epithin, epitheliumhoz kötött. Élettani esetben fontos feladata az epitheliumban a homeosztázis kialakítása és fenntartása, állatkísérletekben szükségesnek tűnik a születés utáni túléléshez, az epidermisz barrier funkciójához, a startum corneum keratinociták profilaggrinhoz kötött végső differenciációjához, a szőrtüszők fejlődéséhez és a timusz sejteinek túléléséhez. A matriptáz eredetileg egyláncú

zimogénként szintetizálódik [3]. Részei egy rövid citoplazmatikus aminorész, egy transzmembrán rész, és egy nagyobb extracelluláris törzszakasz, amely tartalmaz egy SEA (sperm protein enterkinase-agrin)-, két CUB (C1r/s- uegf-bone morphogenic protein-1)-, négy LDR class A receptor-, és a katalitikus szerin- proteáz domént [12]. A katalitikus szerin- proteáz domén szerkezete hasonlít más családba tartozó fehérjékére, mint a kimotripszin és más, szerin- proteázokéra, mint a trombin vagy a Xa faktor [2]. A matriptáz S1 kötőhelye viszont kissé hidrofilebb és tágabb a trombinhoz viszonyítva, ugyanis leucin helyett fenilalanin van a 99-es pozícióban [13]. A matriptáz aktivációja 3 lépcsőben van szorosan szabályozva: aktiváció, inhibíció, és az ektodomén leválása. Ismert a matriptáz egy inhibitora, a hepatocita növekedési faktor aktivátor inhibitor 1 (HAI-1), amely egy I- típusú integrál membrán fehérje. A HAI-1 részt vesz a matriptáz expressziójának, szállításának és aktiválódásának szabályozásában, nélküle a matriptáz az ER/Golgi területén maradna. *In vitro* és *in vivo* is a matriptáz az egyedüli, amelynek az expressziója korrelál a HAI-1 szinttel, kolokalizálva fordul elő a sejtekben, illetve együtt szállítódik a sejt-sejt kapcsolódáshoz emlős epithel sejtekben. A matriptáz aktívává válásához kell a Golgi vagy az ER területén, a SEA doménben egy hasítás a 149. glicin után, ezt követi az intracelluláris szállítása a még nem szorosan kötődő HAI-1-matriptáznak a komplexben [3]. A glikolizációt követően egy autokatalitikus hasítás történik a szerin- proteáz domén 614. arginin és 615. pozíciójú valin között. Az autoaktivációt a törzszakasz szabályozza, de az autoaktiváció beindításáért felelős jelet nem ismerjük. Az autoaktiváció eredménye, hogy az egyláncú zimogénből diszulfid-híd kötött, kétláncú aktív enzim lesz, de léteznek aktiválói is, mint a suramin, S1P vagy az androgének. Az aktiváción átesett matriptáz azonnal összekapcsolódik a HAI-1 inhibitorral, ez a kötés olyan erős, hogy detektálni lehet nem redukált és nem forralt közegben végzett immunblot módszerrel. Az intracelluláris szállítás után a matriptáz-HAI-1 komplexnek le kell szakadnia a sejt felszíni membránról [2]. Humán daganatoknál, ha a matriptáz és a HAI-1 egyensúlya felborul, az a matriptáz aktiválását eredményezi, amely több esetben a korrelál a rossz kórjóslattal [3].

Humán szöveteket vizsgálva, a matriptáz mRNS-e fiziológias esetben megtalálható a legtöbb epithel sejteket tartalmazó szervben, mint a tüdőben, epidermiszen, korneán, száj- és orrüregben, nyálmirigyekben, pajzsmirigyben, csecsemőmirigyben, nyelőcsőben, légcsőben, bronchiolusokban, alveolusokban, gyomorban, epehólyagban, pankreaszban, duodenumban, a vékonybélben, kolonban, rektumban, vesében, húgyhólyagban, herében, petefészekben, méhben, vaginában, ureterben, mellékherében és prosztatában [4]. A

matriptáz fehérjét és mRNS-ét a szövetek microarray módszerrel és immunhisztokémiás festésével vizsgálva kiderült, hogy a humán szövetek közül kizárólag csak hámszövetekben található [3], és az összes típusú epithel sejtből, mint laphám-, köbhám-, vagy hengerhámsejt jelentős a matriptáz expresszió. A matriptáz sose expresszálódik a strómával rendelkező szervek fibroblasztjaiban, ugyanez igaz a HAI-1 proteinre is. A duodenum, illetve a vékonybél további területein is különböző volt a matriptáz immunreakciójának mértéke a kriptá- bélboholy teteje tengely mentén: mérsékelt mennyiség található a kripták környékén, és egyre erősebb a reakció a boholy csúcsa irányába [4]. A bélhám integritásváltozását figyelték meg ST14 hipomorf egereken, ahol csökkent a TER érték a kontrollhoz képest, viszont a simaizom kontraktilitásában és a glükóz felszívásban a kontrollhoz képest nem volt eltérés. Ugyanez igaz a formalin-fixált mikroszkópos vizsgálatra: az ileum és kolon területén nem volt szignifikáns különbség a villusok szerkezete, száma, a goblet sejtek, mucosa vagy kripták között [7]. A matriptáz szerepe nélkülözhetetlen még a keratinociták profilagrinhoz kapcsolt végső differenciálódásához, fontos a születés utáni túléléshez, epidermisz barrier funkciójához, a szőrtüszők fejlődéséhez és a pajzsmirigy homeosztázisához egerekben [3,4,6], illetve a sejtek közti kapcsolóstruktúrák kialakításának szabályozásában [4].

2.4 Patológias matriptáz működés

2.4.1 Daganatos elváltozások

A malignus szövetátalakulásoknál gyakran találkozunk az extracelluláris mátrixot bontó proteázok túlermelődésével, mint az MMP és ADAM metalloproteázok, vagy a szerin- proteáz család tagjaival. A TTSP család számos tagja magas koncentrációban van jelen a tumor fejlődésénél és túlzott expressziójával fontos szabályozó szerepet tölt be a tumorsejtek proliferációjában, migrációjában és inváziójában. Több tumor esetén találkozhatunk a hepszin, a matriptáz vagy a TMPRSS2 megemelkedett expressziójával [2]. A matriptáz kutatás fontos szerepet kap a daganatok kutatásában is, ugyanis számos, epithel sejteket tartalmazó humán tumorban megtalálható a matriptáz, így a prosztata-, mell-, vastagbél-, gyomor-, pancreasz-, petefészekrákban is [14,15]. A matriptáz más enzimek (HGF/SF, uPA, PAR-2) aktiválásán át fontos szerepet játszik a tumor fejlődésében és a metasztázis képzésében [16,17]. Az áttétképzés összetett folyamat, ami igényel számos proteolitikus folyamatot, növekedési faktor aktiváló anyagot, MMP-t,

szerin- proteáz az extracelluláris mátrixban. Ha az elsődleges tumornak a mátrixbontás után sikerül a penetráció az alaphártyán át, akkor a tumorsejtek elvándorolhatnak a környező szövetekbe, illetve intravasálisan a vérrel vagy a nyirokáramlással távoli szövetekbe is és létrehozhatnak áttéteket [13, 14].

Daganatok esetén a matriptáz szerepét nemcsak a tumor növekedésben és a metasztázisban vizsgálják, hanem mint markert is: van-e összefüggés a különböző daganattípusok matriptázexpressziója és a kórjóslat között. Számos esetben a megemelkedett matriptáz-, cMet receptor és HAI-1 szint együtt jár a rossz kórjóslattal [3]. A matriptáz gátlása szelektív 3-amidino-fenilalanin származék inhibitorokkal szignifikánsan csökkentette a sejtszóródást és mátrix inváziót: csökkent a sejtfelszínen a pro- HGF/SF átalakulása aktív faktorrá [14]. Oberst kutatása szerint, ellentétben a mell és egyéb, női nemi szerveket érintő daganatokkal a kolon epithel rétegében számos alkalommal normális esetben is olyan magas a matriptáz aktivitás, mint ha daganatos elváltozás lenne ezen a területen- ez esetben nem használható markernek a matriptáz. A változó matriptáz szinttel korrelált a HAI-1 szint [15]. Ezt megerősíti, hogy kutatók a bélrendszer malignus szövetszaporulata esetén matriptáz és HAI-1 szint csökkenést tapasztaltak a normális részekhez képest, a matriptáz-HAI-1 arányban nem találtak a kontrollhoz képest változást [18]. Más kutatók összehasonlították a matriptáz szintet egészséges, benignus prosztatata megnagyobbodás, prosztaták és prosztaták metasztázisos szöveteket, prosztatata tumoros sejtvonalak esetén, és arra az eredményre jutottak, hogy a matriptáz szint szignifikánsan magasabb volt a daganatos és áttétes szövetek esetén a normális prosztatához képest. Ezen kívül csökkent HAI-1 szintet találtak mellette. Az eredményekből azt a következtetést vonták le, hogy prosztaták esetén a matriptáz szint emelkedése és a HAI-1 szint csökkenése együtt jár a rossz kórjóslattal, itt úgy tűnik markernek használható a matriptáz [19]. Vizsgálták még a matriptáz expressziót elsődleges humán mellrák sejtvonalaknál is: több esetben megemelkedett a matriptáz és HAI-1 szint, de a matriptáz transzkripciójára úgy tűnik, nem hat az ösztrogén vagy a progeszteron [15]. Összefoglalva, a stage I/II csoportba tartozó tumorok esetén gyakrabban magas a matriptáz expresszió, mint a jobb kórjóslatú stage III/IV tumorok esetén. A matriptáz/ HAI-1 arány eltolódása rosszabb kórjóslattal jár általában, mivel a növekvő enzimatis aktivitás miatt nő a tumor progresszió, így az invázió és áttétképződés esélye is [2].

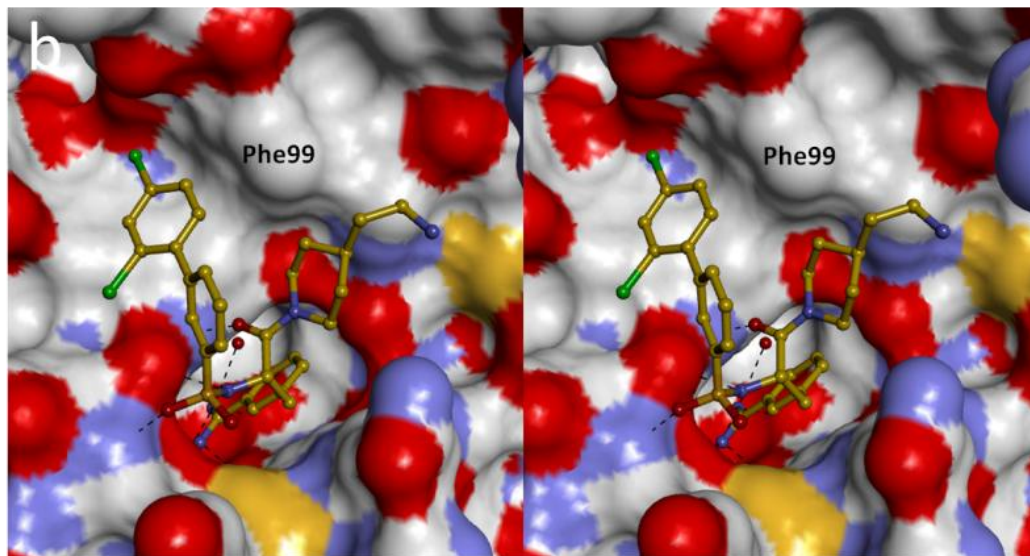
Ezeket a megfigyeléseket támasztja alá az, hogy ha több matriptázt expresszáló transzgenikus egereket állítanak elő, akkor nő a spontán laphámsejtes karcinóma kialakulása és az indukált tumor létrejöttének esélye [13].

2.4.2 A matriptáz szerepe a porcbontásban és az osteoarthritisben

A jelenleg kutatási irányok között szerepel a matriptáz szerepének vizsgálata a porc degradációnak és a kollagénbontásnak a szabályozásában. A matriptáz modulálja az egyik legfontosabb extracelluláris mátrix (ECM) strukturális alkotó, a kettes típusú kollagén turnoverjét. Ezen kívül megfigyelték a matriptáz túltermelődését osteoarthritis (OA) esetén is, itt is a kollagénbontás aktivátora lehet a PAR-2 receptor aktiválásával. A kísérletek során a PAR-2 receptor gátlókkal sikerült gátolni a kollagénbontást, illetve a PAR-2 aktiválásával nőtt az MMP-1 és MMP-13 kollagénbontást végző proteázok szintje a porcok területén. Továbbá, a matriptáz aktivitás OA esetén szintén indukálta a MMP-ok aktivációját. Mindezekből következik, hogy a matriptáz a későbbiekben fontos célpontja lehet az OA terápiának [2,5].

2.5 Matriptáz inhibitorok

A szelektív matriptáz inhibitorok előállítását nehezíti, hogy mind a matriptáz, mind számos, kimotripszin családhoz tartozó proteáz és tripszinszerű szerin- proteáz, mint a trombin vagy a Xa faktor katalitikus szerin- proteáz doménje (S1 kötőzseb) nagyon hasonlít egymáshoz (1. ábra, Hammami, 2012 [2]).



1. ábra A 432-es vegyület kötődési helyei a matriptázhoz, a felületi atomok színekkel jelöltek. Az enzim-szubsztrát modell alapja a thrombin-432 komplexben a trombin matriptázzal való helyettesítése a pdb-kódokkal azonosított kristályszerkezet koordinátái alapján (2gv6) [13], illetve a trombin ezt követő törlése. A trombinhoz viszonyítva a matriptáznak relatíve nyitott és hidrofílebb S1 kötőhelye van- a leucin helyett fenilalanin van a 99-es pozícióban.

A szelektív matriptáz inhibitorok fejlesztése 2 útvonalon indult el, ebből az egyik egy C-terminális végén argintint tartalmazó peptidszerű szubsztrát analóg széria, mint a CVS-3983, szignifikánsan javuló matriptáz affinitást mutatott (K_i érték: 3,3 nM), és sokkal kisebb affinitással bírt a Xa faktor, plazmin, uPA esetén ($K_i > 1 \mu\text{M}$) [20].

A másik irányt, a szulfonált 3- amidinofenilalanin származékot tartalmazó piperidin és piperazin szintetikus inhibitorokat eredetileg tripszinszerű szerin- proteázok, mint a trombin, vagy urokináz gátlására használták. Számos hárombázisú 3- amidinofenilalanin analógot később, mint matriptáz inhibitorot használtak, mert magas szelektivitást és affinitást mutattak a matriptáz iránt alacsony, nanomólos mennyiségben. Hammami és munkatársai [21] által publikált cikkben az 1. inhibitor, amely erős matriptáz, de gyenge trombin inhibitornak bizonyult, erősen bázikus jellege miatt a sejtekbe való bejutása korlátozott volt. A következő inhibitor N- terminális végére egy

bifenil-3-szulfonil csoport került, a C-terminális 2-aminoetilpiperidin helyére pedig egy töltéssel nem rendelkező rész került, így a 2. inhibitor dibázisos, a 3. inhibitor monobázisos lett, így segítve a vegyületek sejtmembránon való közlekedését. Ebből kiindulva Steinmetzer, Hammami és munkatársai új analógokat hoztak létre.

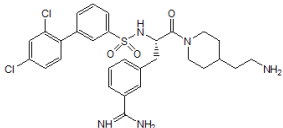
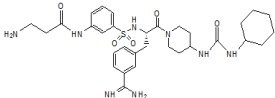
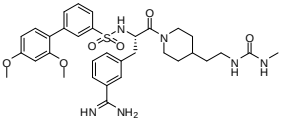
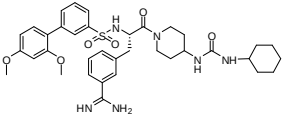
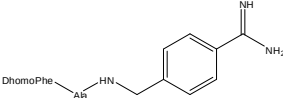
Az első sorozat analógjai (4-19) egy terminális aril gyűrűt kaptak (amelyhez flour, klór, vagy oxigén atomok kapcsolódtak) a bifenil-3- szulfonil- részre, amíg a C terminális részre két különböző amid csoportot szintetizáltak. Az első sorozatról elmondható, hogy azok az analógok, amelyeknek a C-terminális részére a még egy bázist tartalmazó 2-aminoetilpiperidint csatoltak, 3-6-szorosan hatékonyabb matriptáz inhibitorok voltak, mint a monobázisos analógok (ezek jobb trombin gátlók voltak). Az első sorozat analógjai közül a legerősebbnek a 19. inhibitor bizonyult, amely egy kétbázisú, 2,4- dimetoxi-származék: $K_i=0,001$, 20-szor kevésbé kötődött egyéb proteázokhoz (**1. táblázat**, 432).

A második sorozat analógjai (20-31) azon a megfigyelésen alapul, hogy a trombin kötőhelyén található egy kötődési hurok, ami a matriptáz esetén hiányzik, így a matriptáz relatív tágabb: ezért az inhibitor C- terminális helyére egy töltéssel nem rendelkező urea került. Ez elég rigiddé tette az inhibitort, így csökkent az affinitása a trombin iránt. Azért, hogy ne legyen az oldhatósággal probléma az urea miatt, b- alaninamid N- terminális végére fenilszulfonil csoportot szubsztituáltak. A csoportra jellemző volt a szelektivitás a matriptázra (se matriptáz-2, se Xa faktorra nem volt nagy az affinitás), de sokkal kevésbé bizonyultak hatékony inhibitoroknak (a leghatékonyabb inhibitor $K_i= 8 \text{ nM}$), (**1. táblázat**, 453).

A harmadik széria (32-35) tagjai monobázikusak, a második széria két leghatékonyabb tagjának, a 22 és 29 inhibitornak átalakításával készültek, az urea helyére vagy 2,4-dimetoxifenil vagy 2,4-diklorofenil került. A második szériához képest nőtt a matriptáz iránti affinitásuk, 34 és 35 esetén 500-szoros affinitás volt a matriptázhoz a trombinhoz képest (34: $K_i=0,0027 \text{ nM}$, $K_i \text{ trombin}= 1,23\text{nM}$). Levonható az a következtetés, hogy a C- terminálisnál található aminoetil csoport elég hosszú, hogy ne tudjon bekötődni a trombin kötődési hurokhoz, és így az inhibitor nem is túl hidrofób (**1. táblázat**, 460,463). [21]

A kísérletünk során használt matriptáz inhibitorok számkódját Hammami értekezése alapján használjuk [2]. Az öt választott matriptáz gátló a következő (**1. táblázat**):

1. táblázat Szeletív matriptáz inhibitorok. Az inhibitorok főbb tulajdonságai (szerkezeti képletek, K_i értékek és a bázikus csoportok száma) a táblázatban láthatóak.

Vegyület sorszáma	Képlet	K_i matriptáz (nM)	K_i trombin (nM)	Bázikus csoporto k száma	Megjegyzés
432		0,002	0,02	2	az első széria leghatékonyabb dikloroszárma zékot tartalmazó tagja (11), mind matriptáz, mind trombin esetén
453		0,008	35,9	2	a második, ureát tartalmazó csoport legszelektívebb, és második leghatékonyabb (29) tagja
460		0,0018	0,051	1	harmadik széria tagja (32)
463		0,0027	1,23	1	a harmadik széria egyik legszelektívebb tagja (34)
469		0,044	0,73		

2.6 Bélbarrier integritás, a bél védő szerepe

A bélhám jelentős barriert képez a külvilág és az élő szervezet között, véd az enterális kórokozók és mikrobiális termékek, táplálékallergének és egyéb emésztés során felszabaduló fizikokémiai stressz ellen is. Az egy rétegben elhelyezkedő bélhámsejtek feladata a víz, a különböző ionok és a táplálékból felszabaduló makromolekulák szelektív felszívása. A szelektivitásért a paracelluláris szabályozó feladatok a felelősek. A paracelluláris folyamatok pedig az apikális kapcsoló struktúrák (AJC) által vannak szabályozva, amelynek részei az legapikálisabb tight junction, a laterális adherens junction-k és a dezmoszómák. Mindezekből látszik, hogy a bélhámbarrier integritása nagyon fontos, és nagyon erősen szabályozott folyamat. A matriptáz jelentős szerepet tölt be a barrier kialakításában és fenntartásában.

A bél barrier funkcióját transzepitheliális rezisztenciaméréssel (TER) vizsgálták St14 hipomorf egereken - amelyekben százszorosán csökkent a matriptáz mRNS szintje-, és 35%-os csökkenést tapasztaltak az *ex vivo* intesztinális szöveteken a kontroll TER értékéhez képest. Meg kell jegyezni, hogy a bélboly simaizom elemei és glükóz felszívása a kontrollhoz képest nem változott, és nem találtak abnormális eltérést a formalin fixált ileum és kolon villusok szerkezetében és számában. Ezen kívül Caco-2 egyrétegű sejtenyészetben az epitheliális differenciáció kezdetén a matriptáz az E-cadherinnel kolokalizálódott az apikális kapcsoló komplexben. Együtt detektálták a zonula occludens-1 (ZO-1) és occludin fehérjékkel, amelyek az adherens junctionhoz kapcsolják a matriptázt. Mielőtt a sejtek nagyobb tömeget értek volna el, a matriptáz expressziója alacsony volt (1. nap), a sejtek növekedésekor drasztikusan nőtt a matriptáz expresszió, és emelkedett maradt a 21. napig. A legmagasabb matriptáz fehérje szintet a differenciált bélboly csúcson mérték. Érdekes, hogy a matriptáz mRNS szintje nem változott e periódus alatt, ami azt mutatja, hogy a matriptáz fehérjének megjelenése a transzláció után szabályozódik. Sejtproliferációs vizsgálatoknál nem találtak a sejtek száma között különbséget a matriptáz gátolt és kontroll Caco-2 sejteknél. A matriptáz aktivitás nem szelektív szerin- proteáz gátlóval, AEBSF-el, illetve CVS-3983 szintetikus inhibitorral gátolva a Caco-2 sejteken hasonló TER csökkenést tapasztaltak, és 5 napos kezelés után háromszorosára nőtt az fluoreszcein izotiocianát-dextrán 4 kDa (FD4) áteresztés a kontrollhoz képest, ami a megnövekedett paracelluláris permeabilitást jelzi. Az inhibitor kezelés megszüntetése után úgy tűnt, a kezelés nincs hatással a sejtek életképességére. A matriptáz megvonás nincs irreverzibilis hatással a barrier fejlődésére,

de szükség van rá a normális bélhámbarrier kialakításához. A csökkent matriptáz aktivitás együtt járt a claudin-2 fehérje fokozott megjelenésével a tight junction területén. A matriptáz eltűnése közel háromszoros, stabil claudin-2 szintnövekedést okoz. Ez a fehérje járul hozzá a „lyukas” tight junction és egy áteresztőbb bélhám kialakulásához. A többi tight junction fehérje, mint occludin, claudin-1, -3, -4 és -8, ZO-1, és az adherens junction E-cadherin esetén nem volt szignifikáns különbség a kontrollhoz képest [7].

2.7 Paracelluláris permeabilitás jellemzői

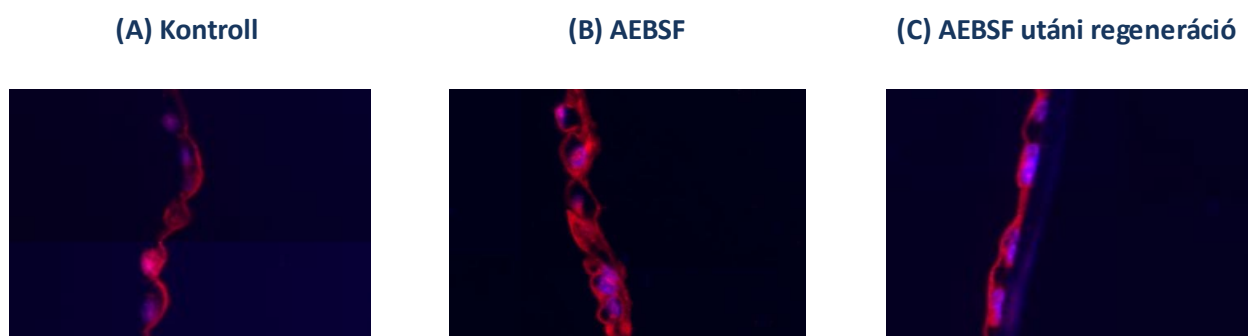
A paracelluláris folyamatok szabályozásáért az apikális kapcsoló struktúrák felelősek, ide tartozik az apikális részhez közel található kapcsolóstruktúra, ez a zonula occludens, vagy más néven tight junction, az adherens junction és a dezmoszómák. Az AJC képes számos fiziológiás és patológias hatásra is dinamikusan átalakulni. Az AJC tartalmazza a transzmembrán fehérjéket, mint occludin, claudinok, cadherineket, amelyekhez intracellulárisan zonula occludens fehérjék kapcsolódnak. A tight junctiont elektronmikroszkóppal vizsgálva a szomszédos sejtek membránja között nem található intercelluláris rés. Fagyasztva töréses metszetkészítésnél pedig kiderült, hogy itt egymással anasztomizáló vonalakból álló rendszer található, amelyek integráns membránfehérje komplexekből áll össze. Ezek a fehérjék az occludin, claudin és a junkcionális adhézios molekulák (JAM). A komplexek az extracelluláris végükkel a szomszédos membrán hasonló komplexeihez kapcsolódnak, és résmentesen összehúzzák a két szomszédos membránt. A tight junction teljesen körbefut a sejtmembránon, így két részre osztja: a felső apikálisra és a bazolaterális membránrészre. A két membránrészlet fehérjekészlete eltérő.

A tight junction kettős barrier szerepe a következő: az egyik a sejtek közötti szabad diffúzió megakadályozása, a másik pedig a membrán apikális és bazolaterális doménje közti laterális diffúziót akadályozza meg. A különböző hámokban a tight junction átjárhatósága nem egyforma mértékű, szorosabb az agykapillárisok endothelsejtjei között, amíg a vékonybélhamban kevésbé szoros. Ezt valószínű a többféle, eltérő áteresztési tulajdonsággal bíró claudin fehérje eltérő aránya okozza [22].

A claudin család tagjai transzmembrán fehérjék, neve a latin claudere, „zárni” szóból származik. A család tagjai specifikus ioncsatornákat formáznak, és szabályozzák az átjárhatóságot méret, elektromos ellenállás, és iontöltés alapján. A legtöbbjük feladata

az áteresztőbb epitheliális barrier „szorossá” tétele, mint a claudin-1, -4, -5, -7, -8, -11, -15, -16, -18, -19 esetében. Viszont pár kivétel, mint a claudin-2 vagy claudin-10 speciális csatornákat hoz létre, és „lazítják” a szorosabb epitheliális barriert, így csökkentik az epitheliális rezisztenciát [23]. Buzza Caco-2 sejteken végzett kísérletei során azt tapasztalta, hogy csökkent matriptáz aktivitás a claudin-2 fehérje növekedésével járt együtt [7]. A Tanszéken először foglalkoztak IPEC-J2 bélhámsejteken claudin-2 detektálással. Nem szelektív, AEBSF szerin- proteáz inhibitor hatására a claudin-2 fehérjék az apikális membránon kívül a bazolaterális membránban is jelentős mennyiségben megjelentek, AEBSF megvonás után viszont újra csak az apikális membránban voltak kimutathatók (**2. ábra**) [24].

A tight junctionon másik meghatározó fehérjeje az occludin, amelyet először az 1990-es évek elején találtak meg epithel és endothel sejteken, kizárólag a tight junction területén a sejtmembrán kapcsolódásánál. Az occludin áll négy transzmembrán doménből, egy hosszú C-terminális, és egy rövid aminoterminális citoplazmatikus doménből, illetve két extracelluláris hurokból [25,26]. A transzmembrán occludin a citoplazmatikus ZO-1 fehérjével direkt kapcsolódik [26]. Az occludinnak fontos szerepe van a tight junction létrejöttében és fenntartásában, és a kísérletekből kiderült, hogy az occludin gén nélkülözhetetlen szerepet játszik a különböző szervek epitheliális tight junction komplexek szabályozásában. Szabályozó szerepben szükséges az occludin foszforilációja/defoszforilációja, de pontos funkciója még nem teljesen tisztázott [27].



2. ábra Claudin-2 (pirossal) immunfluoreszcens festése poliészter membrán inzertten tenyésztett IPEC-J2 sejteken (A) kontrollminta esetén, (B) AEBSF kezelés során, (C) az AEBSF eltávolítása utáni regeneráció alatt. A sejtmagokat (kék) DAPI festékkel jelöltük [24].

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 IPEC-J2 sejtek tenyésztése

Az IPEC-J2 sejteket Dulbecco-féle módosított Eagle tápközeg (DMEM) és Ham's F-12 Nutrient Mixture (F12) 1:1 arányú tápfolyadékban tenyésztettük, ehhez adtunk hozzá 5% főtális borjú szérumot (FBS), 5 µg/ml inzulint, 5 µg/ml transferrint, 5 ng/ml szelént, 5 ng/ml epidermális növekedési faktort és 1% penicillin-sztreptomicint [11].

A sejtek differenciálódva poliészter membrán inzerten egyrétegű sejtréteggé nőttek (egy membrán inzert átlagosan $1,5 \times 10^5$ sejtet tartalmaz), és egymással kapcsolódva kialakultak a tigh junction komplexek. A sejtekkel a TER, FD4 vizsgálatokat hatlyukú sejttenyésztő edényekben, Transwell poliészter membrán inzerten (pórusméret 0,4 µm, a felület nagysága 4,67 cm²) végeztük. A hatlyukú sejttenyésztő edény apikális részére 1,5 ml tápfolyadékot, a basolaterális részre pedig 2,6 ml DMEM folyadékot helyeztünk. A két folyadékrész között az átjárás egyedül a 0,4 µm átmérőjű pórusokon át volt lehetséges. A továbbiakban a sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ szint mellett tenyésztettük, 2 naponta cseréltük a tápfolyadékot, a sejtek differenciálódását pedig TER méréssel ellenőriztük a cserék alkalmával.

3.2 Sejttoxicitás mérése Neural red festéssel

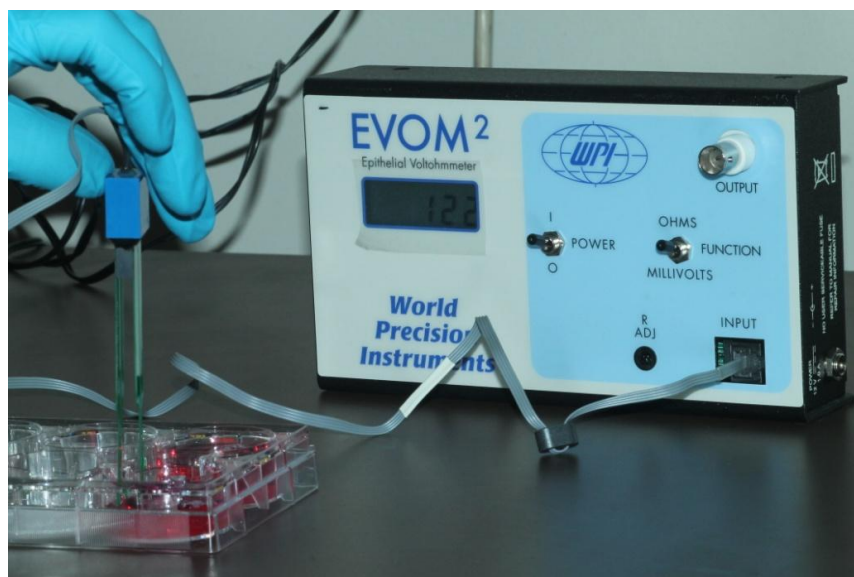
A Neutral Red felvétel (NRU) vizsgálat egy kvantitatív citotoxicitást mérő módszer, az élő sejtek meghatározására szolgál sejt kultúrában. A módszer alapja, hogy az élő sejtek felveszik és megkötik a vitális neutral red festéket a lizoszómáikban [28]. A sejteket 96 lyukú plate-n vizsgáltuk, és szelektív matriptáz inhibitorokkal 50 µM-os koncentrációban kezeltük. Kontrollként fenolvörös mentes, szérummentes DMEM folyadékot adtunk a kezeltlen sejtekhez. A sejtek mosása után következett a tényleges kimutatási módszer, 5 párhuzamos mérést végeztünk inhibitoronként. Első lépésként 375 µl Neutral red Solution (3,3 g/l, Sigma-Aldrich) festéket 20 ml fenolvörös mentes, szérummentes DMEM mediumban oldunk, így 45 mg/l koncentrációjú oldatot állítunk elő, majd minden lyukba 100 µl mennyiséget pipetázunk, és két óra inkubációs időt várunk. Ezt követte három mosás 3X100 µl fenolvörös mentes, szérummentes DMEM oldattal, hogy a fel nem vett festéket eltávolítsuk. A következő lépés a festék előhívás:

célunk, hogy az élő sejtek lizoszómaiból kiszabaduljon a festék, és piros színreakciót lássunk. A festék előhívásához 15 ml, 7,5 ml etanol, 7,4 ml ioncserélt vizet és 150 μ l jégecetet tartalmazó oldatot használunk, 10 perc inkubációs idővel. A spektrofotometriás abszorbancia méréshez EZ Read Biochrom 400 microplate olvasót használtunk, a detektálás 540 nm-es hullámhosszon történt. A kezelt sejtek és a kontroll sejtek abszorbancia értékeit ezután összehasonlítottuk, és ebből következtettünk az IPEC-J2 sejtek életképesség változásaira a kezelést követően.

3.3 Paracelluláris permeabilitásvizsgálatok

3.3.1 Ellenállás mérés voltohmméterrel

A paracelluláris folyamatok vizsgálatára használják a transzepitheliális rezisztenciamérést (TER), illetve az FITC- dextrán 4 kDa (FD4) átjutás kísérletet is. A TER mérést két folyadéktér között végezhetjük, ahol eltérő az ionok mennyisége a két folyadéktér között; például egy egyrétegű, membrán inzerten levő sejtrétegen (**3. ábra**). A TER fenntartásáért a két rész közti ionegyensúly a felelős. A gyakorlatban a sejtek polarizáltságának mértéke mérhető vele: minél polarizáltabb egy sejtréteg, annál magasabb a TER értéke. Ha sérül a sejtréteg integritása, úgy csökkenni fog a sejtréteg ellenállása, és így a TER értéke is.

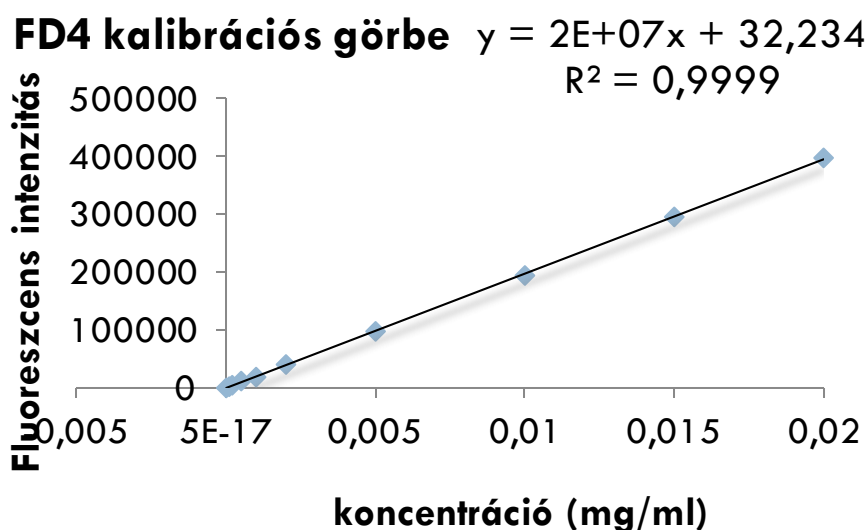


3. ábra A TER mérése membrán inzerten tenyésztett IPEC-J2 sejtek apikális és bazolaterális kompartmentjei között.

Kísérletünk során először TER mérést végeztünk 6 lyukú, poliészter membrán inzerten tenyésztett egyrétegű sejtenyészetben 25 μM koncentrációjú AEBSF kezelés esetén az inhibitor hozzáadása után 24, 48, 72 óra múlva, illetve egy nap regenerációt követően. A szelektív inhibitorokat fél, egy négy és huszonnégy óra múlva vizsgáltuk a kezelést követően. A szelektív inhibitorokat 50 μM koncentrációban használtuk. A transzepitheliális rezisztenciaméréseket EVOM Epithelial Tissue Volt/ Ohmmeter segítségével végeztük.

3.3.2 FD4 mennyiségi analízise

FD4 egy olyan nemionos jelző molekula- fluoreszcein izotiocianát, amely kizárólag paracelluláris transzporttal jut át a monorétegen [7]. Kísérletünkben FD4 átjutással is vizsgáltunk a paracelluláris permeabilitást a szelektív matriptáz inhibitorok 50 μM -os koncentrációval való kezelése után 4, 24 és 48 órával (**4. ábra**). A módszer alkalmas 0.1% FD4 átjutás pontos kvantitatív meghatározására.



4. ábra FD4 kalibrációs egyenes és egyenlet.

A sejteket tartalmazó apikális részhez 1mg/ml koncentrációban FD4 tartalmú, fénolvörös mentes DMEM oldatot adtunk, majd négy, huszonnégy és negyvennyolc óra után mértük a bazolaterális tér FD4 koncentrációját. A 4 kDa-os fluoreszcein izotiocianát (FD4) kvantitatív méréséhez Victor X2 2030 fluorometert használtunk 485nm excitációs és 535nm emissziós hullámhosszon (**5. ábra**).



5. ábra A fluoriméter mérési adatainak megjelenítése FD4 mérések során. A kvantitatív méréseknél a megbízható méréstartomány 1000-500000 közötti fluoreszcencia intenzitás egységben definiált.

3.4 Occludin és matriptáz immunfluoreszcens festése

Első lépésként az membrán inzertet metanollal fixáltuk 5 percig. Ezt követte az 5%, foszfáttal pufferolt sóoldatban (PBS) oldott szarvasmarha szérum albumin (BSA) protein blokk alkalmazása 20 percig. A következő lépés az elsődleges antitest, a poliklonális anti- matriptáz, illetve a további kísérletekben pedig anti- occludin kötődése volt (1:200 hígításban, anti- rabbit, Sigma), ehhez egy órás inkubációs időre volt szükség. A másodlagos antitestnek az Alexa546-ot (1:200 hígítás, piros színű) használtuk, szintén egy óra inkubálással. A sejtmembránban található szíálsav maradékot búzacsíra agglutininnel (WGA, 1:200 hígítás, WGA Alexa Fluor 488, Invitrogen. Molecular Probes) festettük meg. A sejtmag festését (kék) 4,6-diamidino-2- fenilindol (DAPI, 1:500 hígítás, Invitrogen. Molecular Probes) festéssel végeztük, 10 percig inkubációs idővel. Az inkubációk között PBS-sel 3-szor két perces mosásokat végeztünk. Végezetül a rögzítéshez fluoreszcens ragasztóanyagot (DAKO) használtunk.

3.5 ROS mérés Amplex Red reagenssel

A kísérlet során vizsgáltuk, hogy a szelektív matriptáz inhibitorok IPEC-J2 sejtenyészeten indukálnak-e H_2O_2 felszabadulást. Ez a kísérlet kellett annak kizárására, hogy a szelektív inhibitorok hatásukat reaktív oxigéngyökök felszabadulásával érik-e a H_2O_2 szint emelkedése ugyanis csökkenti a barrier integritást [11]. A méréshez Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit-et használtunk, amely tartalmaz 5 fiola Amplex red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) reagenst (fiolánként 154 μM reagenst), 700 μl DMSO-t (dimetilszulfid), 5X reakció puffert (5X RB), 10 egység tormaperoxidáz (HRP), 200 μl 3%-os hidrogén-peroxidot. A szobahőmérsékletre való felmelegítés után elkészítettük a 10 mM Amplex Red reagenst tartalmazó törzsoldatot, amelyet a kísérlethez használtunk:

- 10 mM Amplex Red: 60 μl DMSO-ban 1 fiola Amplex Red feloldása
- 1X RB: 4 ml 5X RB-hez 16 ml desztillált víz
- 10 U/ml tormaperoxidáz: 1 ml 1X RB-ben 1 fiola HRP
- 20 mM H_2O_2 : 3% H_2O_2 adása 1X RB-hez.

A kalibrációs görbe elkészítéséhez a hidrogén-peroxidot mértünk a következő koncentrációkban (μM): 0; 0,1; 0,25; 0,5; 0,5; 1; 2,5; 5. 0-5. Mikromólos koncentrációtartományban lineáris összefüggés adódott a festék intenzitása és a koncentráció között Amplex red mérőmódszerrel. A kalibrációs görbe egyenlete a következő: $y = 44773x + 3321$, $R^2 = 0,9934$

Fél óra inkubáció után az 560 nm extinkciós és 590 nm emissziós hullámhosszon fluoreszcencia intenzitást mértünk (Victor X2 2030 multilabel reader).

A ROS mérést 96 lyukú plate-n végeztük, a plate-n található sejtekhez 10, 25 és 50 μM koncentrációban 50 μM matriptáz inhibitorokat mértünk fenolvörös mentes DMEM-ben feloldva (a sejtek alatt 50 μl fenolvörös mentes DMEM volt). A kémiai interakció kizárása céljából vizsgáltuk, hogy a sejt nélküli, 50 μM koncentrációjú inhibítort tartalmazó oldatok esetén a festék reagál-e az inhibítorral. Kontrollként 50 μl fenolvörös mentes, inhibitor nélküli DMEM-hez 50 μl Amplex red/HRP oldatot adtunk hozzá.

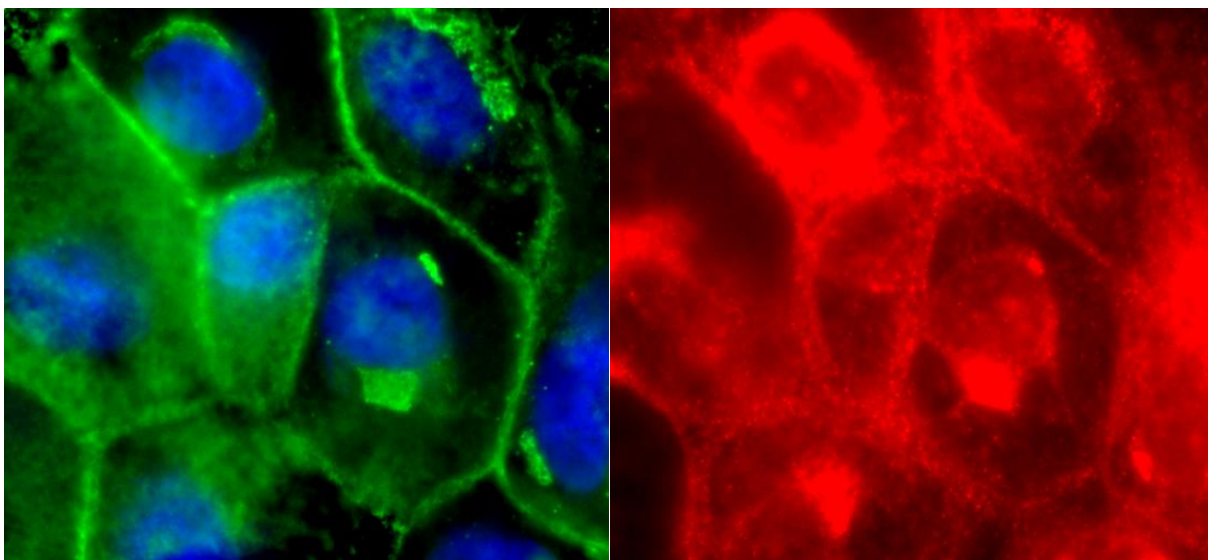
3.6 Statisztika

Az eredmények statisztikai elemzéséhez az R2.11.1 szoftvert használtuk. Szignifikánsnak akkor tekintettük a kapott eredmények közti különbséget, ha a p értéke 0,05-nél kisebb volt- az ábrákon ezt csillaggal jelöltük. A normál eloszlású minták esetén a vizsgált csoportok közötti különbségek megállapítására egytényezős varianciaanalízist (one-way ANOVA) és post-hoc Tuckey tesztet végeztünk el. A kísérletek során mért adatok ábrázolása átlag $\pm$ szórásként történt, a méréseket legalább háromszor megismételtük.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Matriptáz kimutatása IPEC-J2 sejtekben

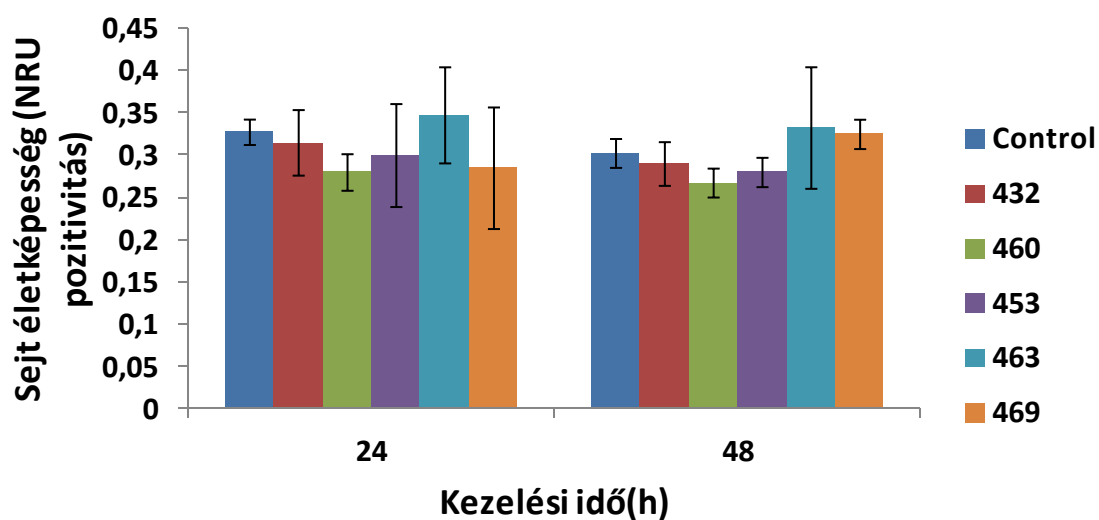
A matriptáz IPEC-J2 sejtekben való elhelyezkedésének, megoszlásának megismerése céljából immunfluoreszcens festést végeztünk. A sejtmagot kékre (DAPI) a sejtmembránban található szíálsavat pedig zöldre (WGA) festettük, a matriptáz enzim sejten belüli lokalizációs vizsgálatához. A Alexa 546-tal jelölt piros színben látható matriptáz elhelyezkedése nemcsak citoplazmatikus, hanem főként a zöld szíálsav maradékkal látható kolokalizálódva, a sejtmembránban található (6. ábra).



6. ábra A matriptáz sejten belüli megoszlása. WGA jelöli a sejtmembránt (zöld), DAPI a sejtmagokat (kék szín). A matriptáz piros színnel látható (Alexa 546), főként a sejtmembrán területére lokalizálódva a szíálsavmaradékokkal.

4.2 Citotoxicitási vizsgálat Neutral red (NRU) módszerrel

Vizsgáltuk a szelektív, matriptáz inhibitorok (432, 453, 460, 463, 469) toxicitását, ehhez Neutral red módszert használtunk. Az inhibitorokat 50 μM koncentrációban adtuk a sejtekhez 48 óráig, és a kísérlet végén megállapítottuk, hogy a vegyületek nem befolyásolták az IPEC-J2 sejtek életképességét (7. ábra).

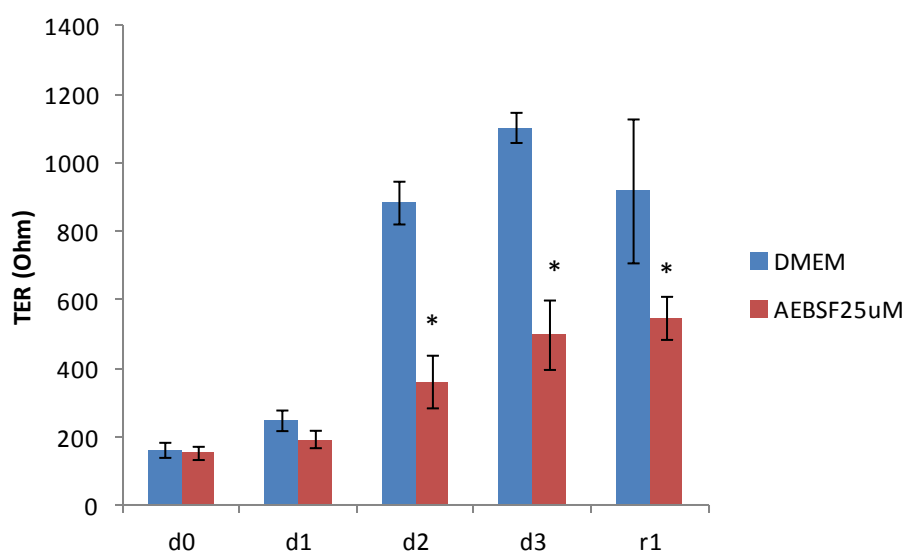


7. ábra Szelektív matriptáz inhibitoroknak kitett IPEC-J2 sejteken 24 és 48 órás NRU vizsgálat. A meghatározásokat 5 párhuzamos méréssel végeztük 96-os platen. Nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($p > 0,05$) a kontroll és az inhibitorral kezelt sejtek között.

4.3 AEBSF TER csökkentő hatása az IPEC-J2 monolayerre

Az AEBSF kezelés során vizsgáltuk, hogy a szerin- proteáz gátlás milyen hatással van az IPEC-J2 sejtek differenciálódására. Célunk ezzel a bélbarrier integritásban szerepet játszó szerin- proteázok működésének megfigyelése volt. Az AEBSF kezelést 25 μ M koncentrációban, 3 napon át alkalmaztuk. A membrán inzertre rakott sejtek TER értéke 200 Ohm alatti értékről indult a kezelést megelőzően. A kontroll sejtek esetén folyamatos TER növekedést tapasztaltunk: az első napon $247,67 \pm 107$ Ohm-ot, a második napon $883,22 \pm 122$ Ohm-ot a harmadik napon $102,67 \pm 85$ Ohm-ot mértünk.

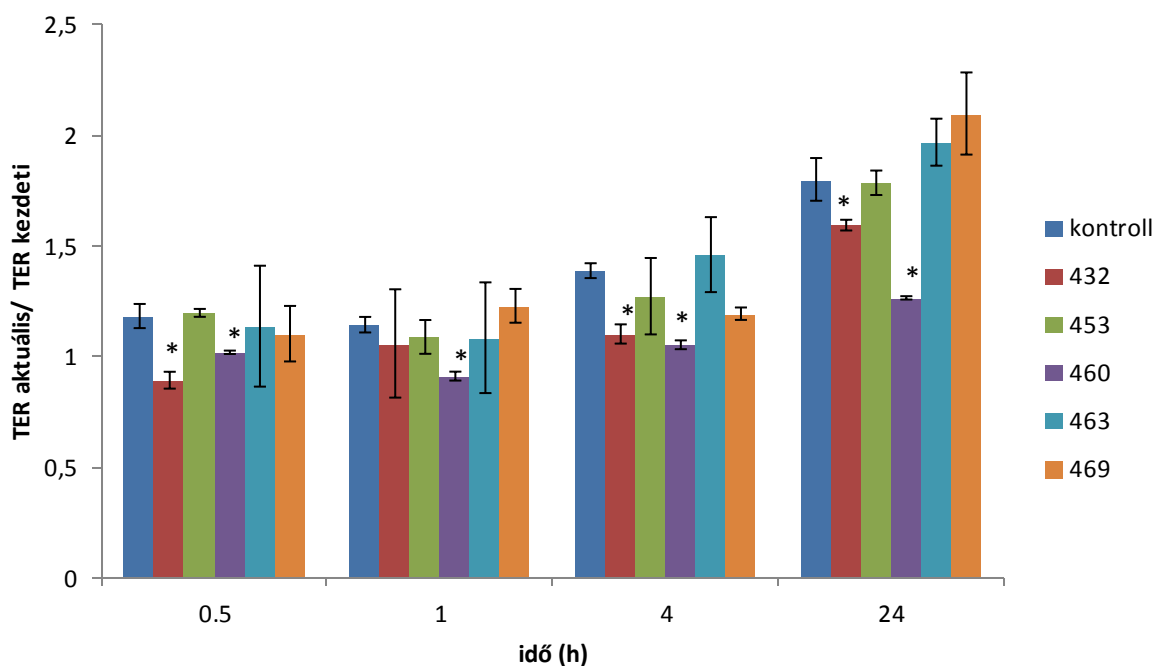
A sejtek differenciálódása során az AEBSF-fel kezelt sejtek esetén szintén TER növekedést tapasztaltunk de, jelentősen kisebb mértékben a kontroll, inhibitor nélküli DMEM-et tartalmazó sejtekhez képest a második és harmadik kezelési nap esetén. A kezelt sejtek kontrollhoz viszonyított TER növekedés első nap 78,14 %, második nap 40,77 %, harmadik nap 45,1 % volt (**8. ábra**).



8. ábra AEBSF hatására a TER jelentős mértékben csökkent ($p < 0,05$) a kezelt sejteken a kontrollhoz képest. A kezelés kezdetekor a sejtek nem teljes mértékben differenciálódtak (< 200 Ohm). A kezelés 3 napig (d) tartott, r= regeneráció, 24 óra.

4.4 Matriptáz inhibitorok hatása a sejtréteg ellenállására

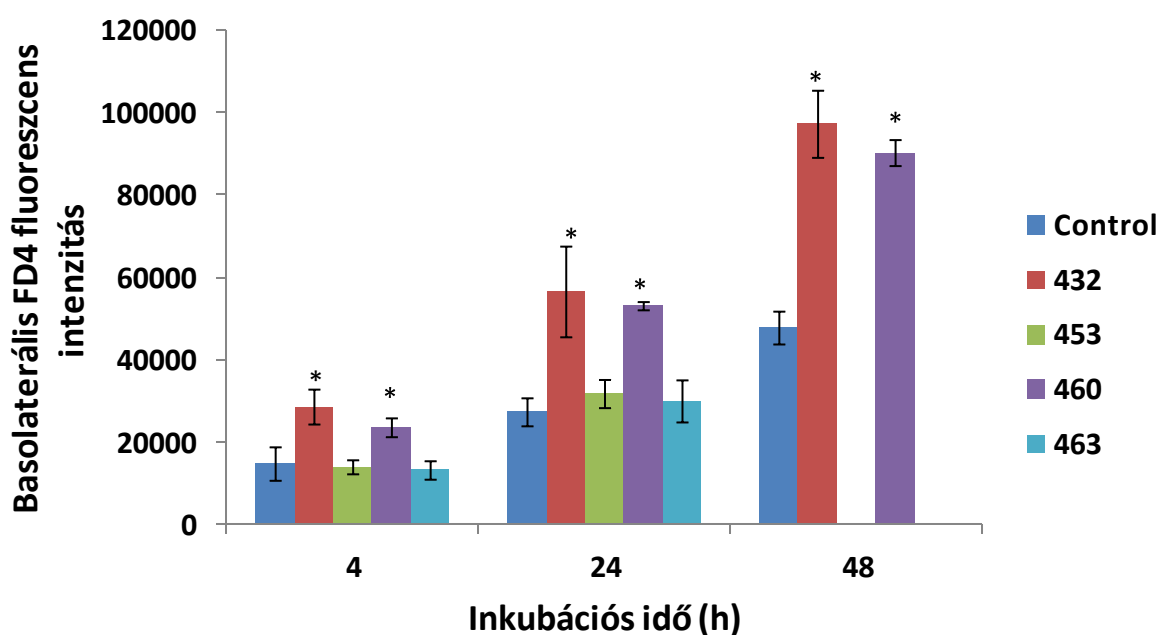
Kísérleteink során vizsgáltuk a 3- amidinofenilalanin származékú szelektív matriptáz inhibitorok TER csökkentő hatását IPEC-J2 sejteken. Az inhibitorokat 50 μ M koncentrációban adtuk az IPEC-J2 sejteket tartalmazó membrán inzertekhez, és vizsgáltuk az IPEC-J2 sejtréteg TER értékét 0,5, 1, 4 és 24 óra után. A kísérlet során a 432 és 460 inhibitor csökkentette a legnagyobb mértékben a TER értékét a kontroll, kezeltlen sejtekhez képest. A kontroll sejtek esetén a TER $861,83 \pm 53,00$ Ohm, a fél órás mérésnél $1016,83 \pm 47,05$ Ohm, az egy órás mérésnél $983,17 \pm 30,26$ Ohm, a négy órás mérésnél $1193,50 \pm 28,95$ Ohm, végül a 24 órás mérésnél $1559,67 \pm 96,85$ Ohm-nak adódott. A kontrollhoz képest a 432 vegyület hatására a TER értékek fél óra múlva 25,28%-kal, egy óra múlva 34,43%-kal, négy óra múlva 18,75%-kal, 24 óra múlva 20,80%-kal csökkentek, míg a 460 inhibitor esetén a csökkenés fél óra múlva 15,05%-os, egy óra múlva 16,53%-os, négy óra múlva 16,53%-os, 24 óra múlva 33,33%-os volt a kontrollhoz viszonyítva (9. ábra).



9. ábra 3- amidinofenilalanin alapvázú matriptáz gátlók TER csökkentő hatása. A kezelés 0,5; 1; 4; 24 óráig tartott. Az eredmények a kezdeti TER értékhez viszonyítva kerültek ábrázolásra. A legnagyobb mértékben a 432 és 460 inhibitor csökkentette a sejtréteg transzepitheliális ellenállását (*p < 0,05).

4.5 FD4 transzport vizsgálat matriptáz inhibitorokkal kezelt IPEC-J2 sejtrétegen

A matriptáz inhibitorok hatására bekövetkezett paracelluláris permeabilitás változásának mértékét vizsgáltuk FD4 átjutásának mennyiségi mérésével. A szelektív inhibitorokat 50 μ M-os koncentrációban használtuk, a méréseket 4, 24, 48 óra inkubáció után végeztük. A fluoreszcens anyaggal jelölt marker apiko-bazolaterális transzportja jelentősen megemelkedett a 432 és a 460 inhibitor esetén. A négy órás mérésnél a kontroll sejteknél 14767 ± 4063 fluoreszcens intenzitást mértünk, amelyhez viszonyítva a 432 esetén 193,64%-os, 460 inhibitornál pedig 159,6%-os intenzitás-növekedést mértünk. Az intenzitás 24 óra után a kontroll sejteknél 27322 ± 3397 volt, amelyhez képest, a 432 inhibitor esetén 206,92%-os, 460 esetén pedig 194,27%-os növekedést mértünk. 48 óra után a kontroll 47773 ± 3982 értékéhez képest a növekedés mértéke 203,51%-osnak, 460 inhibitor esetén pedig 188,89%-osnak adódott. (10. ábra).

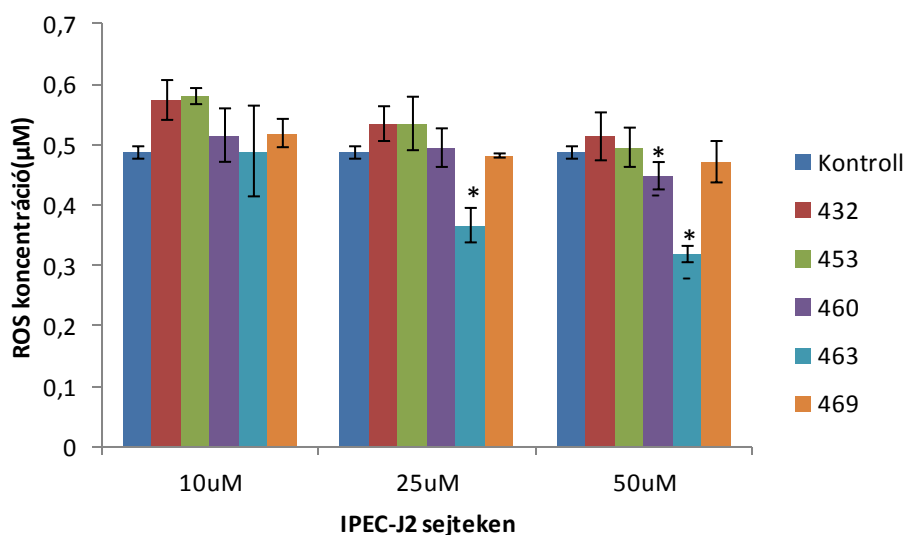


10. ábra Szelektív matriptáz inhibitorok paracelluláris permeabilitásra gyakorolt hatása. (* $p < 0,05$, három párhuzamos mérést végeztünk). Az értékek ábrázolása átlag $\pm$ szórásként történt.

4.6 Matriptáz inhibitorok oxidatív stresszkeltő hatásának mérése Amplex Red módszerrel

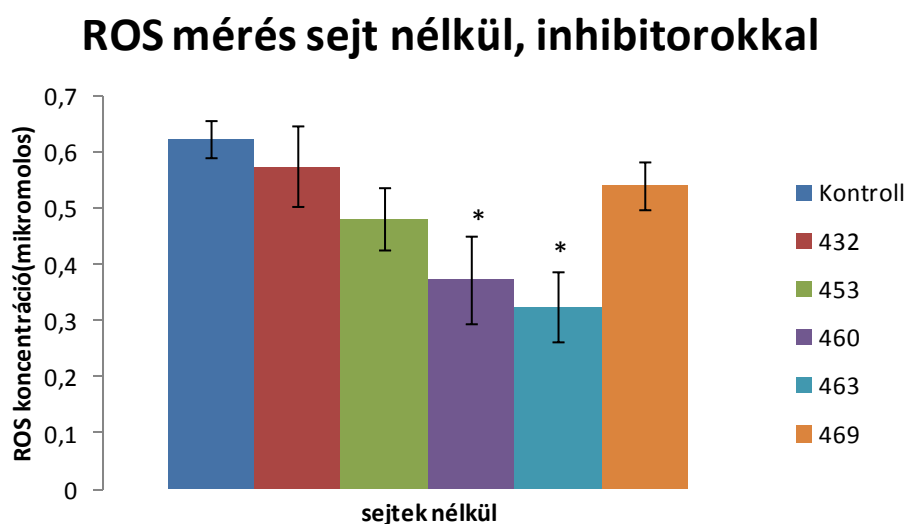
Vizsgálatokat végeztünk, hogy a szelektív matriptáz inhibitorok az IPEC-J2 sejteken okoznak-e H_2O_2 felszabadulást 10, 25 és 50 μM koncentrációban. Kontrollként a sejtekhez inhibitor nélküli DMEM oldatot adtuk. A mérésekhez tormaperoxidázt (HRP) és Amplex red reagenst használtunk. A kémiai interakció kizárása céljából vizsgáltuk, hogy sejt nélküli, 50 μM inhibitorot tartalmazó oldatok esetén a festék reagál-e az inhibitorral. A kísérlet során fél óra inkubációs időt követően mértük az Amplex Red festék fluoreszcenciás intenzitását.

Az inhibitorok 10, 25 és 50 μM hozzáadása esetén sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget az intenzitásban az egyes inhibitorok kezelése esetén a kontrollhoz képest (11. ábra). Kivétel ez alól a 460 és a 463 matriptáz inhibitor, amelyek esetében azonban a kémiai interakció van. 460 inhibitor esetén 50 μM koncentráció esetén 7,90%-os intenzitáscsökkenést, míg 463 inhibitor esetén 25 μM esetén 24,71%, és 50 μM esetén pedig 34,54% intenzitáscsökkenést tapasztaltunk az IPEC-J2 sejteken végzett mérések esetén.



11. ábra Hidrogén peroxid mérés Amplex Red módszerrel. Nem tapasztaltunk jelentős ROS koncentrációemelkedést egyik inhibitor esetén sem, ROS csökkenést csak a 460 és a 463 esetében detektáltunk (* $p < 0.05$, négy párhuzamos mérést végeztünk). Az értékek ábrázolása átlag $\pm$ szórásként történt.

A sejtek nélküli vizsgálatból kiderült, hogy fél óra inkubációs idő után a 460 és a 463 inhibitor reagált az Amplex Red festékekkel. Az interakciós vizsgálat eredményei megerősítik, hogy a 460 és 463 vegyületek nem az IPEC-J2 sejtek alap ROS termelését csökkentik, hanem kémiai reakcióba lépnek az Amplex red festékekkel. 460 inhibitor esetén 35,23%-os, 463 inhibitornál pedig 43,54%-os intenzitáscsökkenést tapasztaltunk méréseink során (**12. ábra**).

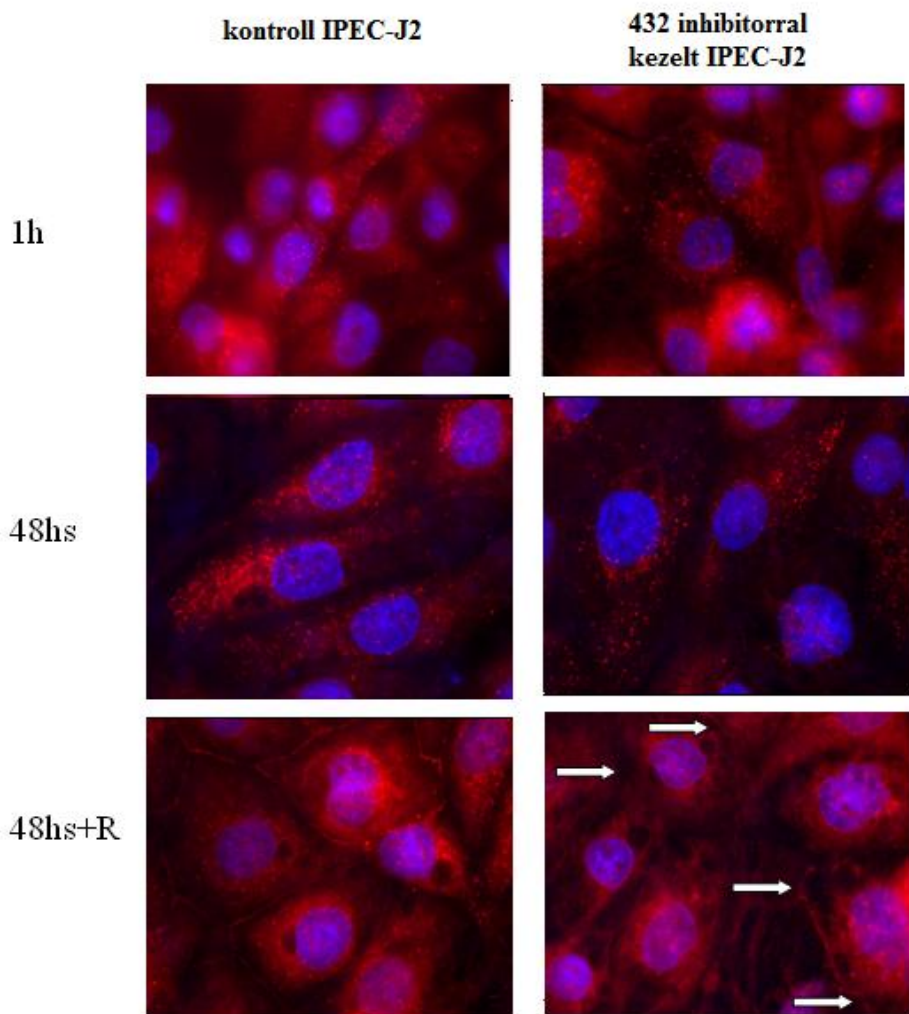


12. ábra Kémiai interakció kizárására végeztük el sejtek nélkül is a ROS mérést. A 460 és 463 inhibitor is reagált az Amplex Red festékekkel. (* $p < 0,05$, három párhuzamos mérés).

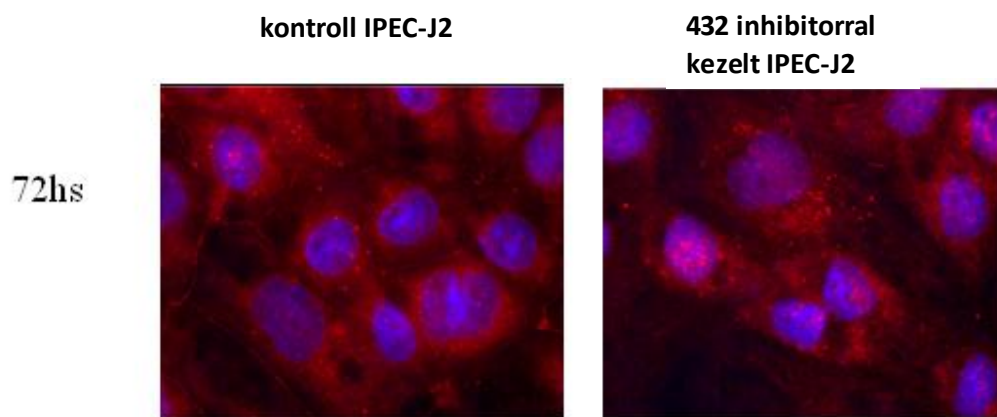
4.7 432 inhibitor hatása az occludin lokalizációjára

A differenciálódó sejtek esetén immunfluoreszcens festéssel vizsgáltuk az occludin megoszlását a kontroll és 432-vel kezelt IPEC-J2 sejteken. Megállapítottuk, hogy a differenciálódás előrehaladásával az occludin a sejtmembránba közlekedett a kontroll mintában, azonban a 432-vel kezelt sejtek esetében a citoplazmatikus elhelyezkedés jelentős maradt. A 432 inhibitor megvonása után viszont a sejt elkezdett regenerálódni, és az occludin kezdett megjelenni a sejtmembránban is (**13. ábra**, fehér nyilak).

A 72 óráig tartó 432 inhibitorral történő kezelést hatására látható, hogy az IPEC-J2 sejtekben az occludin megoszlása eltér a kezeletlen kontroll sejtekhez képest, és az occludin citoplazmatikus elhelyezkedése továbbra is megmarad (**14. ábra**).



13. ábra A sejteket mikroszkóppal vizsgáltuk a 432 kezelés után 1 és 48 órával, majd az inhibitor megvonása után, a harmadik napon. Immunfluoreszcens festékekkel ellátott másodlagos antitesttel jelöltük az occludin (piros) és DAPI festékekkel (kék) a sejtmagot. R= egy nap regenerációs idő



14. ábra Occludin megoszlás-változása 72 órás 432 kezelés hatására. Bal oldali a kontroll. A jobb oldali, kezelt sejteknél az occludin sejtmembránban való festődése nem jelentős

5. MEGBESZÉLÉS

Napjainkban intenzív kutatások folynak a matriptáz élettani szerepének [3,4], illetve farmakológiai célpontként való felhasználásának vizsgálatával kapcsolatban. Vizsgálatok történtek a tumor metasztázis képződésben betöltött szerepének megértése céljából, ugyanis a matriptáz megnövekedett szintje az extracelluláris mátrixot bontó kaszkádrendszerek elindítása, a HGF/SF és uPa aktiválásán át a metasztázis képződésének esélyét növeli [14]. Ezen kívül markerként is használható számos daganat esetén, megnövekedett koncentrációja gyakran rossz kórjóslathoz társul [3,14,17]. Osteoarthritis és porcbontás esetén modulálja a kettes típusú kollagén turnover idejét, illetve elindít egy kollagénbontást végző kaszkádrendszert a PAR-2 receptoron át [5], tehát gátlása hatékony gyógymód lehet sokízületi gyulladás esetén. Humán influenzavírusos megbetegedésénél pedig vizsgálják a matriptáz egy közeli rokona, a TMPRSS2 szerepét, ugyanis a vírus hemagglutininjének enzimatis hasításával segíti a vírus- sejt fúzió kialakulását- gátlása a jövőben hasznos influenza elleni gyógyszer lehet [6]. Az általunk választott irány a bélbarrier integritásban betöltött szerepe volt, ugyanis sok gyulladásos bélbetegségnél nem tudunk oki terápiát alkalmazni, mert nem ismerjük a megnövekedett áteresztés patomechanizmusát.

A matriptáz élettani esetben a bélbarrier integritásáért felelős tight junction-ok kialakításában és fenntartásában vesz részt szabályozó proteázként. Kiemelendő, hogy eddig csak humán bélhám-sejtvonalakon, pl, Caco-2 sejtvonalon, illetve matriptáz knock-out vagy hipomorf egerek *ex vivo* bélszakaszain vizsgálták [7]. Kutatási munkánkat nem-transzformált IPEC-J2 sertés jejunum sejtvonalon végeztük, ezen a sejtvonalon eddig még senki nem végzett matriptázra vonatkozó kutatásokat. A sejtvonal előnye a Caco-2 sejtvonallal szemben, hogy az IPEC-J2 sejtvonal glikolizációs mintázata, a sejtnövekedés mértéke és kolonizációs képessége is jobban hasonlít az *in vivo* körülményekhez [10].

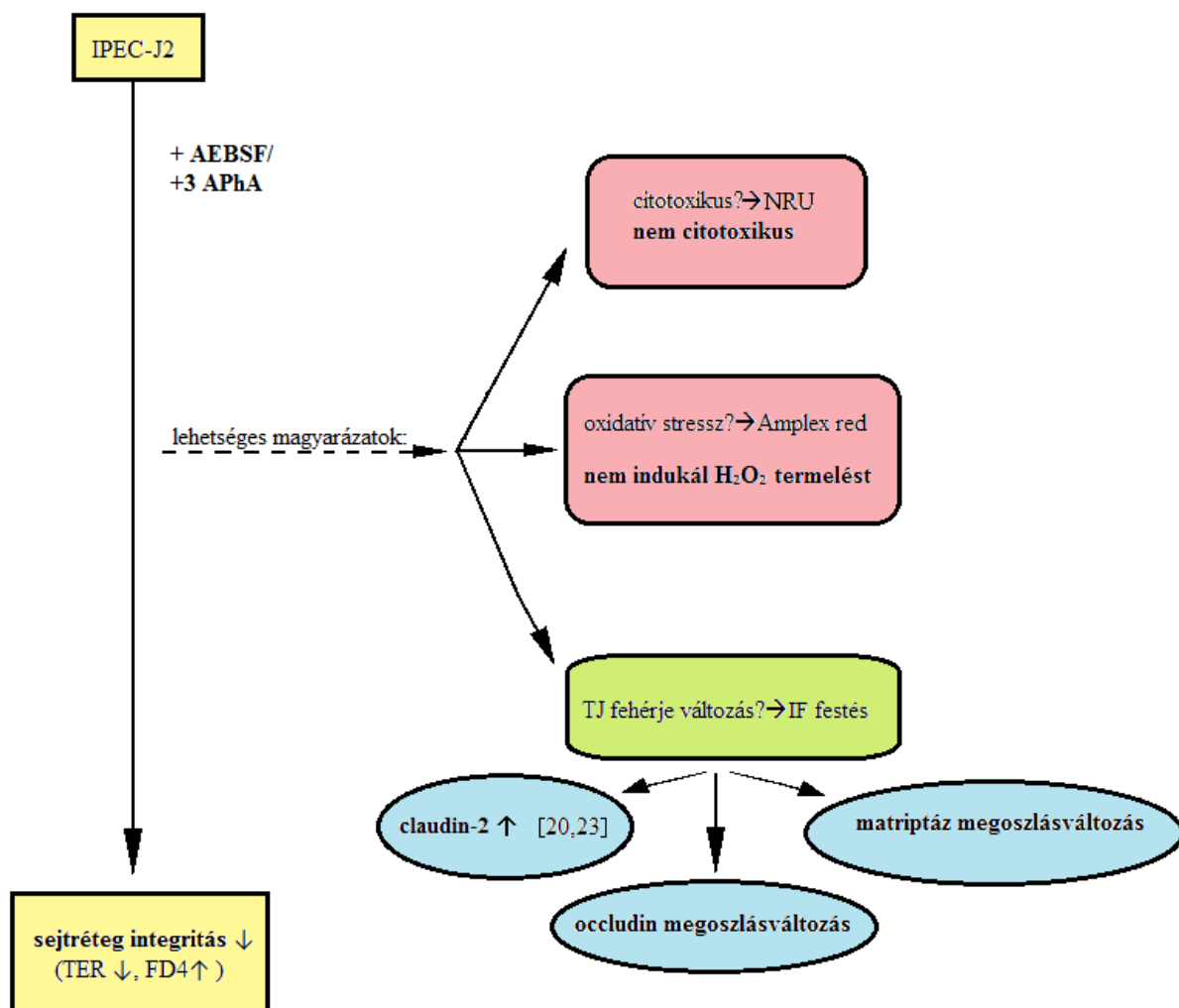
Kutatásunk célja a szerin- proteázok epithelium integritásában fenntartásában betöltött szerepének *in vitro* vizsgálata volt. Kísérleteinkben indirekt módon vizsgáltuk a matriptáz szerepét: először nem szelektív, AEBSF szerin- proteáz inhibitor használtunk, amelynek hatására az IPEC-J2 sejtréteg transzepitheliális rezisztenciája csökkent, a kezelés harmadik napjára a kezelt sejtek kontrollhoz viszonyított TER növekedése mindössze 45,1 % volt.

A kutatási munka második fázisát Steinmetzer és munkatársai által újonnan szintetizált, kereskedelmi forgalomban még nem kapható 3- amidinofenilalanin alapvázú szelektív matriptáz inhibitorok bélbarrier integritásra gyakorolt hatásának vizsgálatával folytattuk. [2, 20]. Kísérleteinkben ellenőriztük, hogy az új inhibitorok citotoxikus hatásúak-e azért, hogy kizárható legyen, hogy a pusztuló sejtréteg miatt csökkent a sejtréteg ellenállása. Erre a célra NRU vizsgálatot végeztünk, és azt tapasztaltuk, hogy az általunk használt inhibitorok 2 napon keresztül alkalmazva 50 μ M koncentrációban nem sejtkárosító hatásúak.

A Tanszéken végzett, korábbi kísérletek [11,29] alapján végeztünk H_2O_2 mérést, ugyanis a reaktív oxigéngyökök nem specifikusan képesek ugyanezt a bélbarrier csökkentő hatást elérni. Ellenőrizni kellett, hogy a matriptáz aktivitásának változása nem az IPEC-J2 sejtek H_2O_2 -termelésének megváltoztatásán keresztül fejt ki a sejtkapcsoló struktúrákat szabályozó működését, így elvégeztünk egy Amplex red festést. Kiderült, hogy a szelektív inhibitorok nem indukálnak ROS növekedést, hatásukat tehát nem az oxidatív stressz indukálásán keresztül, hanem közvetlenül a matriptáz gátláson át fejtik ki.

Ezután vizsgáltuk, hogyan hatnak a szelektív matriptáz inhibitorok a tight junction-ok kialakulására. Buzza [7] Caco-2 sejteken végzett kutatásával összhangban mi is a TER csökkenését és az FD4 átjutás növekedését tapasztaltuk matriptáz gátlás során, ezt követően a TER csökkentő anyagok közül kiválasztottuk a 432 vegyületet. A tight junction területén bekövetkezett változásokat láthatóvá szeretnénk volna tenni. Korábbi kutatásokban kiderült, hogy ilyenkor megnő a claudin-2 áteresztő csatornákat létrehozó fehérje mennyisége [7,24], és ez adta az ötletet arra, hogy feltérképezzük, hogy mi történik az occludinnal, ami szintén egy tight junction kialakulásáért felelős transzmembrán fehérje matriptáz gátlás hatására [27]. Kiderült, hogy az occludinnak is megváltozik a lokalizációja, sejtmembrán helyett a citoplazmában maradt, tehát a tight junction komplex szerkezete megváltozik. A szelektív inhibitor hatása reverzibilisnek bizonyult, az inhibitor megvonása után elkezdtek újrászerveződni a tight junction-ok.

Kísérleteink eredményeit összegezve elmondható, hogy hatékony, nem sejtkárosító, ROS termelést nem kiváltó, matriptázra szelektív szerin- proteáz inhibitorokat használtunk IPEC-J2 sejtvonalon. A kontrollhoz képest szignifikáns eltérést tapasztaltunk mind a TER csökkenés, mind az FD4 áteresztés vizsgálatoknál. Az immunfluoreszcens festés eredményét is hozzátéve megállapítottuk, hogy a matriptáz gátlása modulálja a tight junction-ok kialakulását, szerveződését (15. ábra).



15. ábra Matriptáz inhibitorok lehetséges hatásmechanizmusa. A matriptáz gátlók gyengítették a bélbarrier integritást, ez a hatás a TJ komplex szerveződésében kialakult változások miatt következett be (claudin-2 és occludin megoszlásváltozás). A matriptáz inhibitorok nem indukáltak oxidatív stresszt. Az IPEC-J2 sejtréteg ellenállásának csökkenése nem a vegyületek citotoxikus hatásának eredménye, a sejtek életképessége a matriptáz inhibitorokkal történt kezelés során nem változott.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

A matriptáz egy olyan kettes típusú transzmembrán szerin- proteáz, amely kizárólag epithel sejteken, és epitheliális eredetű daganatokban jelenik meg. Számos szelektív matriptázgátlót találtak jelenleg is hatékonynak osteoarthritisben, influenzavírus fertőzésekben és daganatos megbetegedésekben a metasztázis-képződés gátlásában. Jelenlegi kutatásunk célja újonnan szintetizált 3-amidinofenilalanin alapvázú szelektív matriptázgátlók bélhámréteg integritására gyakorolt hatásának meghatározása, valamint a matriptáz szerepének feltérképezése a paracelluláris permeabilitás modulálásában.

Kutatásunk során célul tűztük ki egy *in vivo* körülményekhez közelítő, a vékonybél apikális és bazolaterális kompartmentje közötti szabályozott anyagforgalom vizsgálatára alkalmas sejtmodell kifejlesztését, amelyhez egy membrán inzerten tenyésztett nem daganatos eredetű, sertés vékonybélhámsejt vonalat, az IPEC-J2 sejteket használtunk fel. A kezeléseket egy nem szelektív, szerin- proteáz inhibitor, a 4-(2-aminoetil)-benzoszulfonilfluorid (AEBSF), és több 3- amidinofenilalanin alapvázú szelektív matriptáz/TMPRSS2 inhibitor alkalmazásával végeztük. A matriptáz inhibitorokkal kezelt sejtréteg kompartmentjei között szignifikáns transzepitheliális elektromos rezisztencia (TER) csökkenést mértünk, a csökkenés mértéke és reverzibilitása függött az inhibitorok koncentrációjától és a sejtek differenciáltságától is. A csökkent barrierfunkciót támasztotta alá a megnövekedett paracelluláris permeabilitás is, amelyet párhuzamosan, fluorescein-izotiocianáttal jelölt dextrán molekula (FD4) átjutás fluorimetriás mennyiségi vizsgálatával bizonyítottunk. Kísérleti eredményeink szerint az occludin lokalizációja megváltozik a diklorobifenil-benzimidamid alapvázú matriptáz inhibitor kezelés hatására, amely a gátolt szerin- proteáz aktivitás hatására bekövetkező tight junction fehérjekomplex szerkezeti átalakulását mutatja.

Kísérleti eredményeink alapján a szelektív matriptáz inhibitorok az IPEC-J2 sejtréteg ellenállását csökkentették, és a paracelluláris marker, az FD4 apiko-bazolaterális transzportját növelték, valamint elősegítették az egyik tight junction fehérje, az occludin vándorlását a sejtmembránból a citoplazmába. A barrier integritás mérések alapján a matriptáz szabályozó hatással rendelkezik a paracelluláris permeabilitást meghatározó tight junction komplex kialakításában és fenntartásában. A matriptáz szerepének megértése jelentősen hozzájárulhat egyes bélgyulladások, mint a Crohn- betegség, colitis ulcerosa kezelési alternatíváinak kidolgozásához, vagy más, nagy gazdasági károkat okozó, használatokban kialakuló fertőzőses eredetű állatbetegségek gyógyszeres terápiájának megtervezéséhez is.

7. SUMMARY

The effect of selective matriptase inhibitors on paracellular permeability

Matriptase is a type II transmembrane serine protease, and it is expressed in non-transformed and cancerous epithelial cells. Some of the selective matriptase inhibitors have been found to be efficient drug candidates in the treatment of osteoarthritis, human influenza, and tumor metastases. In this study we used 3-aminidophenylalanine-structure based inhibitors to investigate putative changes in the integrity of IPEC-J2 monolayer and to examine role of matriptase in modulation of paracellular permeability.

Our aim was to establish a cell model suitable for tracing transport processes between the apical and basolateral compartments mimicking physiological processes in small intestine. We used non-tumorigenic, porcine jejunal cell monolayer, IPEC-J2 cells cultured on membrane insert. IPEC-J2 cells were treated with non-selective, serine protease inhibitor 4-(2-aminoethyl)-benzoesulphonylfluoride (AEBSF), and selective 3-amidinophenylalanine-structure based matriptase/TMPRSS2 inhibitors. Significant decrease was found in transepithelial electrical resistance (TER) between apical and basolateral compartments of treated IPEC-J2 cell monolayer. The rate and reversibility of decrease in TER was dependent on the inhibitor concentration and the cell differentiation. Based on findings from apico-basolateral transport of fluorescein isothiocyanate-labelled dextran 4 kDa (FD4) significant increase in paracellular permeability of cell monolayer exposed to matriptase inhibition was confirmed as a result of barrier dysfunction. Neutral red uptake assay proved that cell viability did not alter in cells treated with matriptase inhibitors compared to that of control groups. Hydrogen peroxide level analyzed with Amplex red assay did not indicate oxidative stress during and after application of selective matriptase inhibitors. Immunofluorescent staining revealed changes in the distribution pattern of occludin in the dichlorobiphenyl-sulfonamidobenzimidamide-treated cells as a consequence of the effect of matriptase inhibitor on structural alterations of tight junction protein assembly.

In conclusion, it was found that the matriptase inhibitors decreased TER and simultaneously increased the apico-basolateral transport of FD4, with relocalization of occludin from cell membrane to cytoplasm. Based on these results matriptase could play significant role in regulation of the paracellular permeability by modulating tight junction assembly. In the future, the in-depth understanding of matriptase effect may contribute to

establishment of new therapeutical options in the treatment of Crohn-disease, colitis ulcerosa or to invent defensive strategies in veterinary practice to restore barrier dysfunction in infectious diseases in livestock.

8. IRODALOMJEGYZÉK

- [1] PÁSZTINÉ GERE E., BARNA RF., KÖVÁGÓ CS., MEGGYESHÁZI N., FODOR L., GÁLFI P.: *Bélggyulladások vizsgálata és kezelési lehetőségei IPEC-J2 modellrendszerben*. TOX 2014 Tudományos konferencia, Visegrád, 2014. 10. 08- 10.
- [2] HAMMAMI, M.: *Development of new inhibitors for the type II transmembrane serine protease matriptase*. PhD thesis, 2012.
- [3] LEE, MS.: *Matrix-degrading type II transmembrane serine protease matriptase: its role in cancer development and malignancy*. Journal of Cancer Molecules, 2006. 2. vol. 5. no.p. 183-190.
- [4] OBERST, M. D., SINGH, B., OZDEMIRLI, M., DICKSON, R. B., JOHNSON MD., LIN, CY.: *Characterisation of matriptase expression in normal human tissues*. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 2003. 51. vol. p.1017-1025.
- [5] MILNER, JM., PATEL, A., ROWAN, AD.: *Emerging roles of serine proteinases in tissue turnover in arthritis*. Arthritis & Rheumatology, 2008. 58. vol. 12. no. p. 3644-3656.
- [6] MEYER, D., SIELAFF, F., HAMMAMI, M., BÖTTCHER-FRIEBERTSHAUSER, E., GARTEN, W., STEINMETZER, T.: *Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation*. Biochemical Journal, 2013. 452. vol. 2. no. p.331-343.
- [7] BUZZA, M.S., NETZEL-ARNETT, S., SHEA- DONOHUE, T., ZHAO, A., LIN, C.Y., LIST, K., SZABO, R., FASANO, A., BUGGE, T. H., ANTALIS, TM.: *Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2010.107. vol. 9. no. p. 4200-4205.
- [8] GEENS, MM., NIEWOLD, TA.: *Optimizing culture conditions of a porcine epithelial cell line IPEC-J2 through a histological and physiological characterization*. Cytotechnology, 2011. 63. vol. p. 415-423.
- [9] SCHIERACK, P., NORDHOFF, M., POLLMANN, M., WEYRAUCH, KD., AMASHEH, S., LODEMANN, U., JORES, J., TACHU, B., KLETA, S., BLIKSLAGER, A., TEDIN, K., WIELER, LH.: *Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine*. Histochemistry and Cell Biology, 2006. 125. vol. p. 293-305.
- [10]CENCIC, A., LANGERHOLC., T.: *Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology- a review*. International Journal of Food Microbiology, 2010. 141. vol. p.S4-S14.
- [11] PÁSZTINÉ-GERE E.: *Strategies for protecting enterocytes from oxidative stress-induced inflammation*. PhD thesis, 2013. Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar, Budapest
- [12] BUGGE, TH., ANTALIS, TM., WU, Q.: *Type II transmembrane serine proteases*. The Journal of Biological Chemistry, 2009. 284. vol. 35. p. 23177-23181.
- [13] STEINMETZER, T., SCHWEINIT, A., STÜRZEBECHER, A., DÖNNECKE, D., UHLAND, E., SCHUSTER, O., STEINMETZER, P., MÜLLER, F., FRIEDRICH, R., THAN, M. E., BODE, W., STÜRZEBECHER, J.: *Secondary amides of sulfonylated 3-amidinophenylalanine. New potent and selective inhibitors of matriptase*. Journal of Medicinal Chemistry, 2006. 49. vol. p. 4116-4126.
- [14] FÖRBS, D., THIEL, S., STELLA, MC., STÜRZEBECHER, A., SCHWEINITZ, A., STEINMETZER, T., STÜRZEBECHER, J., UHLAND, K.: *In vitro inhibition of matriptase prevents invasive growth of cell lines of prostate and colon carcinoma*. International Journal of Oncology, 2005. 27. vol. p. 1061-1070.

-
- [15] OBERST, M., ANDERS, J., XIE, B., SINGH, B., OSSANDON, M., JOHNSON, M., DICKSON, R.B., LIN, C.Y.: *Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo*. The American Journal of Pathology, 2001. 158. vol. p.1301-1311
- [16] SHI, X., GANGADHARAN, B., BRASS, L.F., RUF, W., MUELLER, B.M.: *Protease- activated receptors (PAR1 and PAR2) contribute to tumor cell motility and metastasis*. Molecular Cancer Research, 2004. 2. vol. 7. no. p. 395-402.
- [17] JIN, X., YAGI, M., AKIYAMA, N., HIROSAKI, T., HIGASHI, S., LIN CY, DICKOS RB, KITAMURA, H., MIYAZAKI, K.: *Matriptase activates stromelysin (MMP-3) and promotes tumor growth and angiogenesis*. Cancer Science, 2006. 97. vol. 12. no. p. 1327-1334.
- [18] ZENG, L., CAO, J., ZHANG, X.: *Expression of serine protease SPC19/matriptase and its inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in normal and malignant tissue of gastrointestinal tract*. World Journal of Gastroenterology, 2005. 11. vol. 39. no. p. 6202-6207.
- [19] SALEEM, M., ADHAMI, V.M., ZHONG, W., LONGLEY, B.J., LIN CY., DICKSON, R.B., REAGAN- SHAW, S., JARRARD, D.F., MUKHTAR, H.: *A novel biomarker for staging human prostate adenocarcinoma: overexpression of matriptase with concomitant loss of its inhibitor, hepatocyte growth factor activator inhibitor-1*. Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention, 2006. 15. vol. 2. no. p. 217-227.
- [20] GALKIN, A.V., MULLEN, L., FOX, W.B., BROWN, J., DUNCAN, D., MORENO, O., MADISON, E.L., AGUS, D.B.: *CVS-3983, a selective matriptase inhibitor, suppresses the growth of androgen independent prostate tumor xenografts*. Prostate, 2004. 61. vol. 3. no. p. 228-235.
- [21] HAMMAMI, M., RUHMANN, E., MAURER, E., HEINE, A., GUTSCHOW, M., KLEBE, G., STEINMETZER, T.: *New 3- amidinophenylalanine- derived inhibitors of matriptase*. Medicinal Chemistry Communication, 2012. 3. vol. p.807-813.
- [22] RÖLICH P.: *Sejtkapcsoló struktúrák*. In: RÖLICH P. (szerk.): Szövektan. Budapest: Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, harmadik kiadás, 2006. p. 94-95.
- [23] ANDERSON, J.M., VAN ITALLIE, C.M.: *Physiology and function of the tight junction*. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2009. 1. vol. 2. no. DOI: 10.1107/a002584.
- [24] PÁSZTINÉ GERE E., GÁLFI P., MOLNÁR ZS., CSAVOJETZ A., MEGGYESHÁZI N., SZAUDER I., UJHELYI G., KÖVÁGÓ CS.: *Bélműregellenállás vizsgálata IPEC-J2 modellrendszerben*. Magyar Állatorvosok Lapja, 2014.11. évf. 136. sz. p. 651-659.
- [25] FURUSE, M., HIRASE, T., ITOH, M., NAGAFUCHI, A., YONEMURA, S., TSUKITA, S., TSUKITA, S.: *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at the tight junction*. The Journal of Cell Biology, 1993. 123. vol. 6 part2 no. p.1777-1788.
- [26] KIMURA, Y., SHIOZAKI, H., HIRAO, M., MAENO, Y., DOKI, Y., INOUE, M., MONDEN, T., ANDO-AKATSUKA, Y., FURUSE, M., TSUKITA, S., MONDEN, M.: *Expression of occludin, tight junction associated protein, in human digestive tract*. The American Journal of Pathology, 1997. 151. vol. 1. no. p.45-54.
- [27] RAO, R.: *Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junction*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2009. 1165. vol. p. 62-68.
- [28] REPETTO, G., PESO, A.D., ZURITA, J.L.: *Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity*. 2008. Nature Protocols, 3. vol. p. 1125-1131.
- [29] PÁSZTI-GERE E., BARNA R.F., KÖVÁGÓ CS., IPOLY SZ., UJHELYI G., JAKAB CS., MEGGYESHÁZI N., SZEKACS A.: *Changes in the distribution of type II*

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik bármilyen módon hozzájárultak tudományos diákköri munkám létrejöttéhez. Legelőször Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébet témavezetőmnek szeretnék köszönetet mondani a folyamatos útmutatásért, segítségnyújtásért, építő jellegű kritikákért és a kutatási munkám alappilléreit jelentő koncepciók kialakításáért. Köszönöm Prof. Dr. Gálfi Péter Professzor Úrnak, aki támogatta a Szent István Egyetem Állatorvos- tudományi Karának Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken végzett kísérleteinket. Köszönet illeti Dr. Meggyesházi Nórát (Semmelweis Egyetem, I. Sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet) és Dr. Kóvágó Csabát, akik az immunfluoreszcens festés összes lépésénél, a fixálástól a fotózásig segítségemre voltak. Külön köszönet illeti Prof. Dr. Torsten Steinmetzer Professzor Urat (Philipps Egyetem, Gyógyszerésztudományi Kar, Gyógyszerészi Kémiai Intézet, Marburg, Németország) a szelektív matriptáz inhibitorok többlépéses szintézisútjának kifejlesztéséért és a vegyületek előállításáért. A kutatás a TÁMOP-4.2.4.A/2-11-1-2012-0001 azonosító számú Nemzeti Kiválóság Program-Hazai hallgatói, illetve kutatói személyi támogatást biztosító rendszer kidolgozása és működtetése konvergencia program című kiemelt projekt keretében zajlott. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósul meg.