SEMMELWEIS EGYETEM

DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2422.

RÁCZ RÓBERT BALÁZS

Fogorvostudományi kutatások

című program

Programvezető: Prof. Dr. Varga Gábor, egyetemi tanár

Témavezető: Prof. Dr. Varga Gábor, egyetemi tanár

Dr. Kerémi Beáta, egyetemi docens

Az amelogenezisben fontos pH szabályozási mechanizmusok és a szoros sejtkapcsolatok kialakulásának vizsgálata funkcionális *in vitro* modellben

Doktori értekezés

Rácz Róbert Balázs

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola

Témavezető: Dr. Varga Gábor, D.Sc, egyetemi tanár
Dr. Kerémi Beáta, Ph.D, egyetemi docens

Hivatalos bírálók: Dr. Venglovecz Viktória, Ph.D, tudományos főmunkatárs
Dr. Köles László, Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fábián Tibor†, Ph.D, professzor emeritus
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rakonczay Zoltán, D.Sc, professzor emeritus
Dr. Darvas Zsuzsa†, Ph.D, egyetemi docens

Budapest
2020

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke 3

2. Bevezetés 8

2.1 A fogfejlődés 8

2.2 A zománcérés és fázisai 11

2.3 Az ameloblaszt sejtek transzport folyamatai 14

2.3.1 Paracelluláris transzport és a szoros kapcsolatok, a szoros sejtkapcsolatok jelentősége ameloblasztokban 14

2.3.2 Kalcium transzport 17

2.3.3 A pH szabályozás és fontossága az amelogenezisben 19

2.3.3.1 Pufferelő rendszerek a szervezetben és a bikarbonát általános funkciói 19

2.3.3.2 A bikarbonát transzport és pH szabályozás szerepe a zománcérés során 21

2.3.3.3 Potenciális pH „szenzor” funkciót betöltő fehérjék 27

2.4 Az amelogenezis szabályozásában feltehetően szerepet játszó biológiailag aktív molekulák 29

2.4.1 Szteroid hormon receptorok 29

2.4.2 Extracelluláris ATP 30

2.4.3 Kalciumérzékelő receptor 31

2.4.4 G-fehérje kapcsolt receptorok 32

2.5 Az amelogenezis zavarai, genetikai tényezők 33

2.6 Környezeti faktorok, a fluorid kettős szerepe 35

2.7 A zománc fluorózis kialakulásának lehetséges mechanizmusai 37

2.8 Funkcionális vizsgálatok szükségessége, a HAT-7 sejtes modell 39

2.8.1 A HAT-7 sejtes modell 39

2.8.2. Az intracelluláris pH mérésének lehetőségei sejtekben 42

3. Célkitűzések 44

4. Módszerek 45

4.1 Sejttenyésztés és a polarizált sejtmodell előállítása 45

4.2 A transzepitél elektromos rezisztencia követése 46

4.3 Mikrofluorometria 47

4.3.1 Intracelluláris pH kalibráció.....50

4.3.2 A mérésekhez használt technikai módszerek és oldatok, reagensek.....50

4.4 Sejtéletképesség teszt.....52

4.5 Kvantitatív RT-PCR vizsgálat 53

4.6 Statisztikai analízis 54

5. Eredmények 55

5.1 A HAT-7 sejtek intracelluláris pH szabályozásában szerepet játszó fő bazolaterális transzporterek aktivitása 55

5.1.1 Nátrium-proton cserélő aktivitás.....55

5.1.2 Nátrium-bikarbonát kotranszporter aktivitás 57

5.1.3 Nátrium-kálium-klorid kotranszporter aktivitás 59

5.1.4 Anion-cserélő aktivitás.....61

5.2 Az akut fluorid expozíció hatása a HAT-7 sejtek bikarbonát szekréciójára.....63

5.3 A fluorid hatása a HAT-7 sejtek életképességére, transzepitél rezisztenciája és a szoros kapcsolati fehérjék génkifejeződésére 65

6. Megbeszélés 68

6.1 A pH szabályozásában szerepet játszó fő bazolaterális transzporterek 68

6.2 Akut nátrium-fluorid hatása a bikarbonát szekrécióra.....72

6.3 A nátrium-fluorid hatása a HAT-7 sejtek szoros kapcsolatainak kialakulására ...72

7. Következtetések.....76

8. Összefoglalás.....78

9. Summary.....79

10. Irodalomjegyzék 80

11. Saját publikációk jegyzéke 103

12. Köszönetnyilvánítás 104

1. Rövidítések jegyzéke

AE2/SLC4A2	az Slc4 családba tartozó anion-cserélő transzporter fehérje (2-es izotípus)
AI	amelogenesis imperfecta
ALP	alkalikus foszfatáz
AmelX, AmelY	amelogenint kódoló gén az X, ill. Y kromoszómán
AMI	amilorid inhibitor
AMTN	amelotin
ANO1/TMEM16A	anoctamin-1 kalcium-aktivált klorid-csatorna
ANOVA	analysis of variance, statisztikai módszer: variancia analízis
AP	apikális
AQP	aquaporin vízcsatorna
AR	androgén receptor
ATP	adenozin-trifoszfát
ATZ	acetazolamid szénsav-anhidráz inhibitor
BCECF(AM)	2',7'-bisz-(2-karboxietil)-5-(és-6)-karboxifluoreszcein (származéka)
BL	bazolaterális
BMP-2	bone morphogenic protein-2 növekedési faktor
BPA	biszfenol A
CA	szénsav-anhidráz
CaCC	kalcium-aktivált klorid-csatorna
Caco-2	humán kolorektális adenokarcinoma eredetű sejtvonal
cAMP	ciklikus adenozin-monofoszfát
Capan1	humán hasnyálmirigy ductalis adenocarcinoma eredetű sejtvonal
CaR	kalciumérzékelő receptor
CA	szénsav-anhidráz (carbonic-anhydrase)
CCK	kolecisztokinin
C-di-GMP	3', 5'-ciklikus-diguanilsav
cDNS	komplementer DNS

CFTR	cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor klorid-csatorna
CGRP	kalcitonin génhez kapcsolódó peptid
CL	a fogcsíra cervikális hurok régiója (cervical loop)
CLDN	klaudin fehérjecsaládba tartozó protein
CNNM4	Cyclin-M4 magnézium transzporter fehérje
CRAC	kalcium-felszabadulás által aktivált kalcium-csatornakomplex
DIDS	4,4'-diizotiocianatostilbén- 2,2'-diszulfonsav (anion-cserélők gátlószere)
DF	dentális follikulus (fogzacskó)
Dlx3	Distal-Less Homeobox 3 transzkripciós faktor
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle-féle tápoldat
DMEM-F12	DMEM és Ham-féle F-12 tápfolyadékok 1:1 arányú keveréke
DRA/SLC26A3	Down-Regulated in Adenoma membránfehérje, az Slc26 családba tartozó anion-cserélő
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
ENaC	epithelialis nátrium csatorna
ER	endoplazmatikus retikulum
ERK	extracelluláris szignál-regulált kináz (mitogen-aktivált protein kináz 1 és 3)
ERM	Malassez-féle sejtek (epithelial rest of Malassez)
F440	440 nm gerjesztő fényt követően 530 nm-en mért fluoreszcencia intenzitás
F490	490 nm gerjesztő fényt követően 530 nm-en mért fluoreszcencia intenzitás
FCS	foetális borjú szérum (fetal calf serum)
FGF10	fibroblaszt növekedési faktor-10
FORSK	forskolin
GPCR	G-fehérje kapcsolt receptor
GRP	gasztrin-felszabadító peptid
H2DIDS	4,4'-diizotiocianatodihidrostilbén- 2,2'-diszulfonsav (gátlószer)
HAT-7	patkány dentális epitélium (cervikális hurok) eredetű sejtvonal

HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetánszulfonsav (puffer)
HERS	Hertwig-féle hámhüvely
HPAF	humán hasnyálmirigy duktusz adenocarcinoma eredetű sejtvonal
IBMX	3-izobutil-1-metilxantin (foszfodiészteráz inhibitor)
IEE	belső zománchám (inner enamel epithelium)
KLK4	kallikrein-4
LS-8	egér ameloblaszt jellegű sejtvonal
MIH	moláris incizális hipomineralizáció
MMP20	mátrix metalloproteáz-20
NBCe1/SLC4a4	az Slc4 családba tartozó elektrogén nátrium-bikarbonát kotranszporter (1-es izotípus)
NCKX4/SLC24A4	kálium-függő nátrium/kalcium-cserélő transzporter fehérje (4-es izotípus)
NCX1-3	kálium-független nátrium/kalcium-cserélő fehérje (1-3 izotípusok)
NHE1/SLC9A1	az Slc9 családba tartozó nátrium/proton-cserélő membránfehérje (1-es izotípus)
NKCC1/SLC12A2	az Slc12 családba tartozó nátrium-kálium-klorid kotranszporter fehérje (1-es izotípus)
NMDG	N-metil-D-glükamin
NPY	neuropeptid-Y
OCCL	occludin
OEE	külső zománchám (outer enamel epithelium)
OER	ösztrogén receptor
ORAI	kalcium-felszabadulás által aktivált kalcium-csatorna
PABSo-E	immortalizált ameloblaszt-jellegű sejtvonalban
PACAP	hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid
Par-C10	patkány parotisz eredetű sejtvonal
PAT1/SLC26A6	az Slc26 családba tartozó anion-cserélő
PCR	polimeráz láncreakció
pH	H+ koncentráció negatív logaritmusa

PI3K/AKT	foszfatidil-inozitol 3 kináz /protein kináz B jelátviteli útvonal
PKC	protein kináz C
PL	papilláris réteg sejtjei (papillary layer)
PMCA	plazmamembrán kalcium ATPáz fehérjekomplex
PT-HSG	humán szubmandibuláris mirigy eredetű primer sejtkultúra
PYY	szomatosztatin, a peptid tirozin tirozin
qPCR	kvantitatív (real time) polimeráz láncreakció
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
QS	kvórum-érzékelés (quorum sensing)
RA	ruffle-ended ameloblaszt/fodros felszínű ameloblaszt
RNS	ribonukleinsav
Rplpo	savas riboszómális protein P0
RT-PCR	reverz transzkripciós polimeráz láncreakció
RT-qPCR	kvantitatív reverz-transzkripciós polimeráz láncreakció
Runx2	Runt-related transcription factor 2, transzkripciós faktor
SA	smooth ended ameloblaszt/sima felszínű ameloblaszt
sAC	szolubilis adenilát-cikláz
SEM	átlag standard hibája
SEM	standard error of mean/átlag szórása
SI	stratum intermedium
siRNS	small interfering RNS/kis interferáló RNS
SLC	a „solute carrier" molekulacsaládba tartozó transzporter fehérje
SLC26A4	pendrin, az Slc26 családba tartozó elektroneutrális anion-cserélő
SOCE	intracelluláris raktárak által vezérelt („store-operated") kalcium beáramlás
SR	stellate reticulum/reticulum stellata
STIM	kalcium szenzor sztrómális interakciós molekula
Tcirg1	vakuoláris H+ ATP-áz alegység (T cell immune regulator 1) protein
TER, TEER	transzepitél elektromos rezisztencia (ellenállás)
TJ	szoros sejtkapcsolat/zonula occludens (tight junction)
TRPM7	tranziens receptor potenciál melasztatin-7 kation csatorna

V-ATPáz	vakuoláris H^+ ATP-áz fehérjekomplex
VDR	D-vitamin receptor
VIP	vazoaktív intesztinális peptid
WDR72	WD repeat-containing protein 72
ZO, Tjp1	zonula occludens fehérje

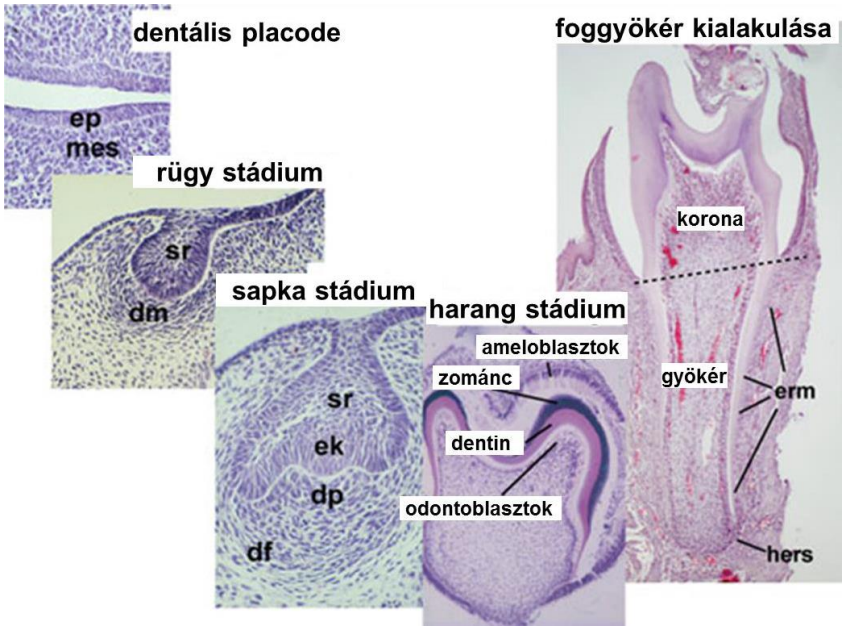
2. Bevezetés

2.1 A fogfejlődés

A gerincesek csontjai és fogai, bár sok hasonlóságot mutató keményszöveti struktúrák, de sok tekintetben különböző mechanizmusokon keresztül, eltérő embrionális fejlődési utakon alakulnak ki, és mai tudásunk alapján evolúciósan is két külön fejlődési útvonalon jöttek létre (Lacruz 2017). A **fog** egy igen összetett szövet/szerv, többfajta csíralemez sejtjeinek differenciálódásából alakul ki, amely ráadásul a rögzítéséhez szolgáló szövetekkel (az alveoláris csontszövettel, a cementummal és a periodontális ligamentummal) együtt, azokkal összhangban, szorosan szabályozott módon fejlődik.

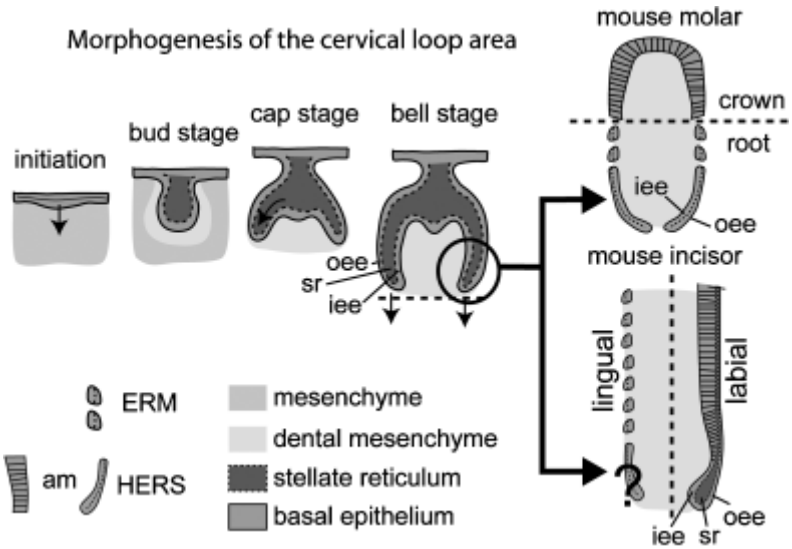
A fogak kialakulásának három fő szakasza van. A **kezdeti vagy iniciális szakaszban** a stomodeum (szájöböl) területén az embrionális feji ektoderma megvastagodó sejtcsoportja létrehozza a foglécet (lamina dentalis) és invaginációval betüremkedik az alatta levő mesenchymába, létrejön a dentális placod (Jernvall és Thesleff 2012, Nanci 2018). Ennek szomszédságában, a későbbi dentális papilla területén az ideglemezből kivándorló neuroektodermális dúcléc sejtek egyik csoportja mezodermális transzdifferenciációval létrehoznak egy ecto-mesenchymalis sejtcsoportot (Miletich és Sharpe 2004). Az **alaki vagy morfodifferenciációs szakaszban** ezen ektodermális és ecto-mesenchymalis sejtféleségek osztódásának eredményeként jön létre a fogcsíra, amelyből a bimbó (rügy), sapka, majd harang alakú stádiumokon keresztül (1.ábra) kialakul a zománcszerv, az alatta lévő kezdetben még differenciálatlan sejteket tartalmazó dentális papilla, és az ezeket kívülről nagyrészt befedő fogzacskó szintén ecto-mesenchymalis eredetű sejtcsoportjai (Nanci 2018, Tompkins 2006).

A zománcszerv ektodermális sejtjei a sapka és korai harang stádiumban elkezdenek differenciálódni kialakítva a *belső és külső zománchámot* (2.ábra), illetve a két sejtréteg között megjelenő *reticulum stellata* állományát, amely réteg csillag alakú sejtjei képesek ellátni a környező sejtek táplálását, energia-utánpótlását. Később a belső zománchám és a reticulum stellata között megjelenik egy (átmeneti) sejtréteg a belső zománchámot közvetlenül tápláló *stratum intermedium* sejtjei (3.ábra) (Nanci 2018).



1.ábra: ***A fogfejlődés főbb stádiumai***

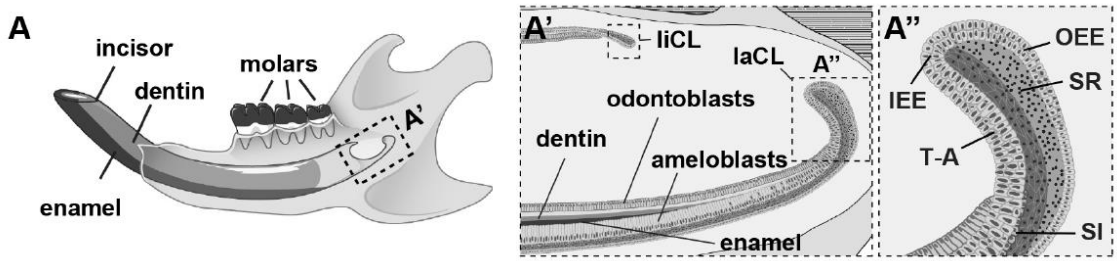
Jelmagyarázat: ep - epitélium, mes - mezenchima, sr - reticulum stellata, dm - dentális mesenchyma, dp - dentális papilla, df - dentális folliculus, ek - szignalizációs sejtcsomó (enamel knot), erm - Malassez-féle sejtek, hers - Hertwig-féle hámhüvely (Thesleff és Tummers 2008)



2.ábra: ***A cervikális loop régió kifejlődése, és a HERS***

Jelmagyarázat: am - ameloblasztok, iee - belső zománchám, oee - külső zománchám, sr - reticulum stellata, ERM - Malassez-féle sejtek, HERS - Hertwig-féle hámhüvely (Tummers és Thesleff 2008)

A zománcszerv apikális részén, a külső és belső zománchám találkozásánál kialakul az ún. *cervikális hurok régió* (cervical loop - gyökérnyaki áthajlás vagy kanyar) (2. és 3.ábra), amely még nem differenciálódott sejteket (őssejteket) tartalmaz, így biztosítja (rágcsálók folyamatosan növekvő metszőfogai esetében életük végéig megmaradva) a növekvő fog sejt-utánpótlását (Nanci 2018).



3.ábra: ***A patkány metszőfog cervikális loop régiójának elhelyezkedése***
Jelmagyarázat: IEE - belső zománchám, OEE - külső zománchám, SI - stratum intermedium, SR - reticulum stellata, liCL, laCL – lingalis és labialis cervikális loop, T-A - tranziens ameloblasztok (Chavez és mtsai 2014)

A harmadik, **szöveti vagy hisztodifferenciációs szakasz** során differenciálódnak az egymással való reciprok kölcsönhatások (epithelialis-ectomesenchymalis interakciók) és felszabaduló növekedési faktorok és szignálmolekulák hatására a belső zománchámból származó *ameloblaszt sejtek* rétege és az ectomesenchymalis sejtekből differenciálódó *odontoblasztok* sejtsora, és megkezdik a fogkorona keményszöveteinek mineralizációját (Jussila és Thesleff 2012, Nanci 2018, Tompkins 2006). Ez a két sejtréteg kezdetben közvetlenül egymáshoz simul, csak egy bazális membrán választja el őket. Ezek a sejtek alakítják ki a későbbiekben a zománcot és a dentint a két sejtréteg közé eső, egyre vastagodó mineralizációs térrészben, illetve a dentin-pulpa komplexét a fog belsejében. Ez a folyamat a korona kialakulásáig tart.

A foggyökér növekedésének megindulásakor a cervikális hurok régió megszűnik (a nem folyamatosan növekvő fogak esetén), a középső sejtcsoportok eltűnnek, és a külső és belső zománchám összesimul és kialakítja a **Hertwig-féle hámhüvelyt (HERS)** (2.ábra). A HERS-nek fontos funkciója van a foggyökér növekedésében, mivel belső sejtjei indukálják a mellettük fekvő dentális papilla sejtjeinek odontoblasztokká való differenciálódását, amelyek azután kialakítják a gyökér dentint. A HERS

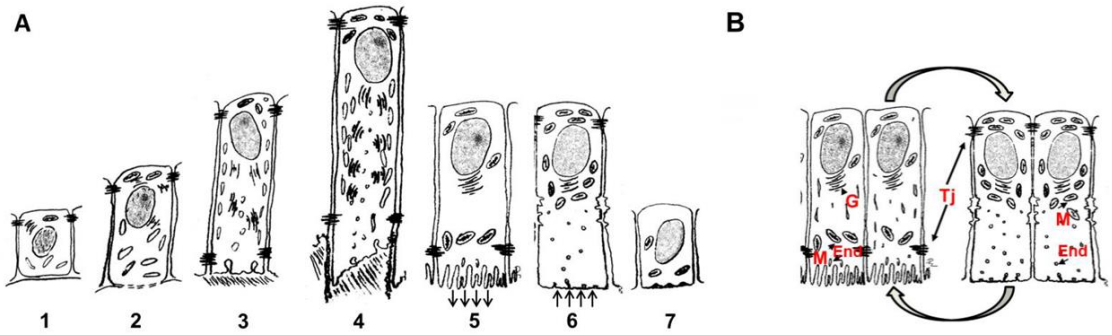
fragmentálódása után a dentális folliculus ecto-mesenchymalis sejtjei cementoblasztokká differenciálódnak és kialakítják a gyökér cementrétegét. A kialakuló foggyökér felszínén hálózatosan elhelyezkedő, a HERS fragmentálódása után visszamaradó epithelialis sejteket Malassez-féle sejteknek nevezzük (Nanci 2018).

Összefoglalva, a fogfejlődés egy molekuláris szinten szigorúan szabályozott folyamat, és a fog egy igen összetett szerv, ami egy morfogének, transzkripciós faktorok és szignálmolekulák ezrei és különböző eredetű sejtcsoportok összetett kölcsönhatásai által meghatározott fejlődési folyamat eredményeképpen jön létre. A zománcot az ektodermális eredetű zománcszerv és ameloblaszt sejtek hozzák létre, a dentint és pulpát a dentális papilla ectomesenchymalis eredetű sejtjeiből differenciálódó odontoblasztok alakítják ki, míg a dentális follikulus (fogzacskó) ecto-mesenchymalis eredetű sejtjei a cementum (cementoblasztok), a periodontális ligamentum (fibroblasztok) és az alveoláris csont (oszteoblasztok) kialakulásáért felelősek. Ezek közül, a jelen dolgozat fókuszában álló zománcot tekintve, ki kell emelnünk, hogy a zománcfejlődésben a fent említett tényezők és faktorok mellett nem kevésbé fontos szerepet játszanak az ameloblaszt sejtek által megvalósított **transzport folyamatok**, amelyek a zománcállomány kialakításában nélkülözhetetlen ásványi anyagok és zománcfehérjék „célbajutását” biztosítják.

2.2 A zománcérés és fázisai

A zománc az emberi test legkeményebb struktúrája. A csontszövethez hasonlóan ez a szövet is mátrix közvetítette mineralizációval jön létre, de a csontnál sokkal magasabb fokú mineralizációt (96-97%) ér el, kollagént nem tartalmaz, és a mesenchymalis eredetű oszteoblasztokkal ellentétben ektodermális eredetű epithelialis sejtek, az ameloblasztok hozzák létre. A zománcérés két fő funkcionális szakaszra osztható: első lépésben (szekréciós szakasz) egy kevésbé mineralizált, proteinekben gazdag mátrixállomány jön létre, ahol a zománckristályok elérik teljes hosszúságukat. A következő lépésben (érési szakasz) az organikus állomány szinte teljes felszívódása történik, amely mellett az ásványi alkotók intenzív transzportja és mineralizációja folyik a zománckristályok vastagságbani növekedését eredményezve (Nanci 2018, Smith 1998). A zománc létrejöttét elsősorban a különböző differenciációs stádiumokon áteső

ameloblaszt sejtek szekréciós és szabályozó tevékenysége teszi lehetővé, de emellett szükség van más típusú (az ecto-mesenchymalis vagy például a papilláris) sejtek közreműködésére is. Az ameloblaszt fejlődési alakok időrendben: a morfogenikus, induktív, korai szekréciós, késői szekréciós, átmeneti, fodros és sima felszínű érési, végül protektív ameloblasztok (4.ábra). Az egyes ameloblaszt alakok nemcsak morfológiailag eltérőek, hanem funkcionálisan is különböző feladatok ellátását szolgálják az adott zománcérési fázis során.



4.ábra: ***Az ameloblaszt sejtek főbb differenciációs stádiumai***
(A) 1. morfogenetikus, 2. induktív, 3. korai szekréciós, 4. késői szekréciós, 5. fodros felszínű érési, 6. sima felszínű érési, 7. protektív ameloblaszt sejt alakok (B) a fodros és sima felszínű érési ameloblaszt formák modulációja
Jelmagyarázat: End – endoplazmatikus retikulum, G – Golgi-apparátus, M - mitokondrium, Tj - szoros sejtkapcsolat (Varga és mtsai 2015)

A belső zománchám sejtjeinek differenciálódása pre-ameloblaszt sejtekké a **morfogenikus** fázisban kezdődik meg. Ezeket a köbös hámsejteket még bazális membrán választja el az alatta levő mesenchymától. A pre-ameloblasztok fontos funkciója, hogy az általuk szekretált szignál molekulák fogják **indukálni** a szomszédos dentális papilla ecto-mesenchymalis sejtjeit, hogy odontoblasztokká differenciálódjanak. A következő **pre-szekréciós** fázisban a sejtek megnyúlnak, sejtalkotóik átrendeződnek, és felkészülnek a fehérjeszintézisre. Az ameloblasztok között junkcionalis komplexek alakulnak ki mind a proximális (a stratum intermedium felé néző), mind a disztális (a zománc felé néző) oldalon (Nanci 2018). A **szekréciós fázisban** az ameloblasztok hosszú, oszlopos sejtekké alakulnak, mitokondriumokban gazdag citoplazmával, kiterjedt endoplazmás retikulummal és Golgi apparátussal, mivel

aktív fehérjeszintézist folytatnak. A sejtek apikális végén jellegzetes Tomes nyúlvány található, mely az intenzív transzport-folyamatok számára biztosít kiterjedt felületet. A sejtek emellett a kristályosodáshoz szükséges Ca^{2+} és PO_4^{3-} ionokat szekretálják a mineralizációs térbe. A kristályképződés az itt termelt mátrixfehérjéken indul meg. Ezek közül a legnagyobb mennyiségben az amelogenin szekretálódik, további fontos, de még kevésbé ismert szerepű mátrix fehérjék az ameloblasztin és az enamelin (Nanci 2018, Smith 1998). A szekréciós fázis végére kialakul a zománc teljes szélességében, de csupán 30%-os mineralizáltsággal: a hosszú, keskeny parallel hidroxiapatit kristályok közt a teret még mátrixfehérjék (elsősorban az amelogenin) töltik ki. Ebben a fázisban indul meg a mátrixfehérjék hasításáért felelős mátrix metalloproteáz-20 (MMP20) termelése is, amely aktivitás a folyamatos kristályképződést segíti.

A szekréciós-érési fázis közötti **átmeneti** szakaszban indul meg a következő, az érési fázis egyik fontos markere, az amelotin expressziója, ami még a redukált zománchámban is fennmarad. A fehérje valószínűleg fontos szerepet tölt be az amelogenezisben (túltermelése elvékonyodott zománcot eredményez), de pontos funkcióját még nem ismerjük (Somogyi-Ganss és mtsai 2012).

Az amelogenezis **érési fázisában** kezdődik meg a zománc átépülése, intenzív mineralizációja, amelyet kétféle morfológiát mutató érési ameloblaszt forma alakít ki: a fodros felszínű (RA) és a sima felszínű (SA) ameloblaszt sejtek, melyek ciklikusan átalakulnak egymásba, váltják egymást. Patkányokban a ciklus hossza nyolc óra, körülbelül négy órás fodros felszínű, két órás sima felszínű, és két órás fokozatosan visszaépülő sejtformákkal. A kétféle sejttípus átalakulásakor a szoros sejtkapcsolataik is átrendeződnek apikális elhelyezkedésűből (fodros felszínű ameloblasztok) bazális elhelyezkedésűbe (sima felszínű ameloblasztok). A ciklusnak nagyon fontos szerepe van a kristályosodási folyamat megfelelő kiteljesedésének lehetővé tételében. (A ciklus és a szoros kapcsolatok átrendeződése a későbbi alfejezetekben lesz tárgyalva).

Az érési fázis mátrixfehérje-hasításért felelős legfontosabb proteáza a kallikrein-4 (KLK4), amely nélkülözhetetlen a normális zománcéréshez, és a részben már hasított proteineknek az MMP20-nál sokkal teljesebb degradációját végzi. A folyamat végére az amelogenin szinte teljes lebontása lehetővé teszi a hidroxiapatit kristályok oldalirányú növekedését, szorosan elhelyezkedő, csaknem átjárhatatlan kristályszerkezet

létrehozását, így az érési fázis végére a zománc mintegy 96-98%-ban mineralizált lesz. A zománcérésben az ameloblasztok mellett, az alattuk elhelyezkedő, a reticulum stellata és stratum intermedium helyén kialakuló *papilláris sejteknek* is fontos szerepük van (Josephsen és mtsai 2010, Kallenbach 1978, Robinson 2014, Zhu és mtsai 2014). Ezek a sejtek egymással és az ameloblaszt sejtekkel „gap junction" típusú kapcsolatokon (réskapcsolatok, pórusszerű csatornák) keresztül tudnak kommunikálni (Inai és mtsai 1997, Josephsen és mtsai 2010), de pontos funkcióik még csak kevéssé ismertek.

A zománcérés befejeztével az ameloblasztok (és papilláris sejtek) morfológiailag és funkcionálisan is redukálódnak egy **protektív** funkciójú szimpla hámréteggé, amely megvédi a zománcot a közben meginduló cementogenezis folyamataitól. A fog előtörésekor az ameloblaszt sejtek végleg eltűnnek (Nanci 2018).

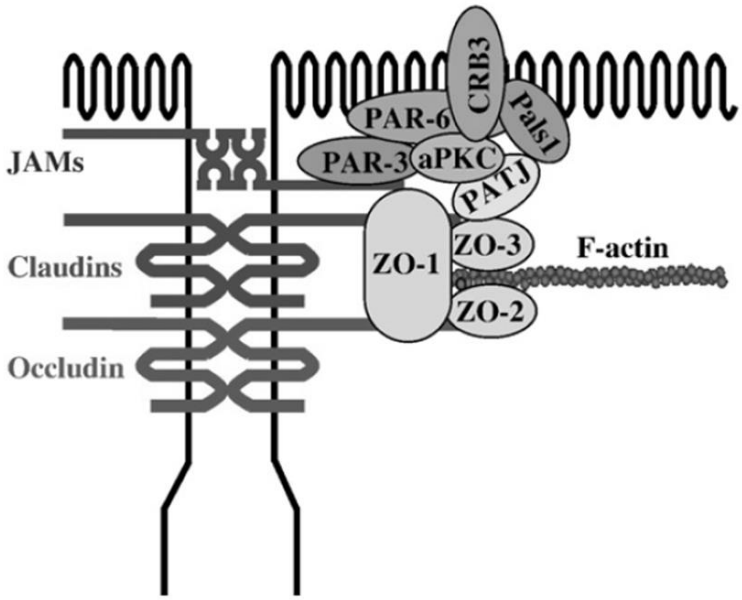
2.3 Az ameloblaszt sejtek transzport folyamatai

2.3.1 Paracelluláris transzport és a szoros kapcsolatok, a szoros sejtkapcsolatok jelentősége ameloblasztokban

A szekréciós epitélsejtek a szervezet bármely részében olyan barriert (védőgátat) alkotnak, amelyek amellett, hogy elválasztanak két folyadékteret és így biztosítják a folyadékterek egyedi összetételét, megakadályozzák keveredésüket, amellett irányított transzportfolyamatokat is valósítanak meg, azaz biztosítják a folyadékterek összetételének folyamatos fenntartását, szabályozását. Ezek a transzportfolyamatok történhetnek a sejtek között, intercellulárisan (paracelluláris transzport) vagy a sejteken, sejtmembránokon keresztül (transzcellulárisan). A zománcérés során a legfontosabb inorganikus ásványok és mátrixfehérjék transzcelluláris úton jutnak a zománctérbe: membráncsatornák és transzporter fehérjék közvetítésével, illetve a mátrix-proteinek szekréciója és lebontása, visszavétele az endo/lizoszómális útvonalon keresztül történik.

Sok más szekréciós hámszövethez hasonlóan a **paracelluláris** utaknak is fontos élettani szerepe lehet az amelogenezis során. A paracelluláris transzport meghatározó struktúrái a **szoros sejtkapcsolatok** (tight junctions – TJ). Ezek azok a struktúrák a többi sejt-sejt kapcsolat-típus közül, amelyek a legszorosabb kapcsolódást biztosítják a sejtek számára; mintegy „övszerűen" körbeveszik a sejteket, lezárva az intercelluláris teret az

extracelluláris külvilágtól. Sok esetben ez a „gátrendszer” kisebb-nagyobb ionok, molekulák gradiens szerinti diffúzióját megengedi. Az utóbbi években egyre több bizonyíték gyűlt össze, ami alátámasztja azt az elképzelést, miszerint ezek nem csupán passzív pórusok, hanem dinamikusan szabályozható struktúrák, egyfajta csatornaként működhetnek (Steed és mtsai 2010), így fontos összetevői lehetnek a transzportfolyamatok szabályozásának. Egy másik nagyon fontos, az epitél-polarizáció fenntartása szempontjából esszenciális szerepük a szoros sejtkapcsolatoknak az apikális és bazolaterális membrándomének elválasztása, azaz hogy megakadályozzák a különböző összetételű domének, a membráncsatornák, transzporter és receptor fehérjék szabad laterális diffúzióját az adott membránrészek között.



5. ábra: A szoros sejtkapcsolatok (TJ) kialakításában részt vevő főbb molekulák interakcióinak sematikus szemléltetése (Chiba és mtsai 2008)

Az ún. apikális junctionalis komplex része a szoros sejtkapcsolat (5.ábra), amely molekuláris komponensei a transzmembrán fehérjék (okkludin, klaudinok és a JAM/junctionalis adhéziós molekulák), ezekhez asszociált "scaffold" fehérjék (ZO-1, ZO-2, ZO-3/zonula occludens fehérjék), amik kihorgonyozzák a struktúrát az aktin citoszkeletonhoz, továbbá polaritás proteinek (pl. PAR-3). Az evolúciósan konzervált CRB-PALS1-PATJ és Par6-aPKC-Par3 komplexek kritikus jelentőségűek a szoros

kapcsolatok kialakulásában polarizált sejtekben (Bazzoun és mtsai 2013, Rodriguez-Boulan és Macara 2014).

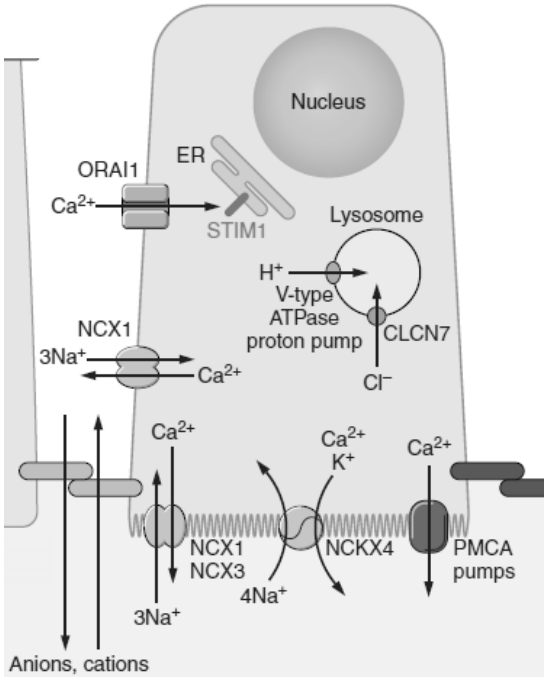
A paracelluláris transzport szempontjából meghatározó komponensek a klaudin fehérjék komplexe, amelyek összetétele meghatározza a struktúra kapu („gate”) funkcióját, vagyis hogy egyfajta, az ionok töltése és mérete szerinti szelektivitást tesz lehetővé különböző permeabilitással rendelkező „csatornákat” alakítva ki (ún. „pore” és „leaky” típusú TJ-k) (Gunzel és Yu 2013). Míg ameloblaszt sejtekben a paracelluláris transzportról még csak nagyon kevés információval rendelkezünk, addig más típusú sejtekben, pl. különböző vesetubulus sejtekben a szoros sejtkapcsolatok, klaudinok és a paracelluláris transzport közti összefüggésekről már sokkal többet tudunk (Prot-Bertoye és Houillier 2020). A klaudin fehérjecsaládnak emlősökben legalább 27 tagja van, és ameloblaszt sejtekben is leírták már számos típusát fajtól és fejlődési stádiumtól függően. A klaudin-1 (CLDN1) expresszióját mind rágcsálók metszőfogában mind emberben kimutatták (Bello és mtsai 2007) jellemzően a szekréciós ameloblasztokban (Hata és mtsai 2010, Inai és mtsai 2008), illetve a fodros felszínű érési forma disztális membránjában is (Hata és mtsai 2010, Nishikawa és Abe 2010). A klaudin-4 (CLDN4) patkány metszőfogban szintén a fodros felszínű ameloblasztokban jelent meg elsősorban, a sima felszínű formák csak gyenge festődést mutattak (Inai és mtsai 2008), ahogy az emberi ameloblasztok szintén egy gyengébb pozitivitást mutattak (Bello és mtsai 2007). A klaudin-7 (CLDN7) humán fogcsírában és egér metszőfogak érési fázisú ameloblasztjaiban is erős festődést mutattak, mind a sima, mind a fodros felszínű ameloblasztokban kimutatták jelenlétét (Bello és mtsai 2007, Hata és mtsai 2010). Egér metszőfogakban mindkét érési fázisú ameloblasztokban kimutatták még a klaudin-8 (CLDN8) és klaudin-9 (CLDN9) jelenlétét míg a klaudin-6 (CLDN6) és a klaudin-10 (CLDN10) expresszióját csak az érési fázisban detektálták (Hata és mtsai 2010), továbbá egér moláris fogcsírákban csak a klaudin-2 (CLDN2) expresszióját tudták kimutatni (Inai és mtsai 2008, Ohazama és Sharpe 2007).

Tumorokban gyakran diszregulálódik a klaudinok expressziója: ameloblasztómákban a megváltozott klaudin expresszió különbözőképpen befolyásolhatja a tumor viselkedését és a betegség prognózisát, például a klaudin-1 elvesztése hozzájárulhat lokálisan invazív természetű ameloblasztóma kialakulásához (Phattarataratip és Sappayatosok 2020).

2.3.2 Kalcium transzport

A zománc inorganikus száraz tömegének többségét alkotó kalcium és foszfát ionok mineralizációs térbe jutása, azaz a papilláris sejtek által körbevett vererek felől történő, az ameloblaszt sejtréteg által végrehajtott transzcelluláris transzport módja mind a mai napig nem teljesen ismert. A passzív (paracelluláris) transzport régi elképzeléseivel szemben ma már bizonyosnak látszik, hogy aktív transzcelluláris mechanizmusoknak kell ellátniuk ezt a funkciót az ameloblasztokban. Mint jól ismert, a bivalens Ca^{2+} ionoknak számos alapvető funkciója van, elengedhetetlen a sejtek differenciálódásához és túléléséhez, mint másodlagos hírvivő a jelátviteli, génexpressziós és más szabályozási folyamatok kitüntetett szereplője. Így nagyon fontos a Ca^{2+} intracelluláris koncentrációjának rugalmas szabályozhatósága, és az, hogy mindezek a funkciók valamilyen módon elválaszthatóak legyenek a zománctér felé irányuló folyamatos Ca^{2+} transzporttól. A zománcérés során a sejteknek képesnek kell lenniük nagy mennyiségű Ca^{2+} és PO_4^{3-} ion szállítására, és a Ca^{2+} magas, potenciálisan toxikus citoszólikus szintjének kivédésére. Erre a szerepre többfajta potenciálisan megfelelő kelátor, „puffer" molekulát írtak le ameloblaszt sejtekben, mint például a calmodulin, parvalbumin, calretinin, calcineurin és kétfajta calbindin (9kDa, 28kDa) fehérjék expresszióját (Nurbaeva és mtsai 2017). Az utóbbi évek eredményei mégis inkább az intracelluláris raktárak (endoplazmatikus retikulum - ER, mitokondrium) kitüntetett szerepét látszanak igazolni (6.ábra). Lacruz és mtsai kutatásai (Nurbaeva és mtsai 2015a, Nurbaeva és mtsai 2018, Nurbaeva és mtsai 2015b) megerősítették, hogy az ún. „store-operated calcium entry" (SOCE) a fő Ca^{2+} felvételi mechanizmusa az érési fázisú ameloblaszt sejteknek (amelyik fázisban a legnagyobb mértékű a Ca^{2+} transzport, a mineralizáció). Ez a mechanizmus abban áll, hogy a (görög hórákról elnevezett) plazmamembrán csatorna ORAI1 és az endoplazmás retikulum STIM1/STIM2 (Ca^{2+} sensor stromal interaction molecule) fehérjék komplexe által alkotott CRAC csatornákon (Ca^{2+} release-activated channels) keresztül a sejtek, érzékelve az ER kalcium raktárak lemerülését, felveszik a kalciumot (Nurbaeva és mtsai 2017). A STIM1 és ORAI1 komplex zománcérésben és kalcium transzportban játszott esszenciális szerepére utal az is, hogy ezen gének defektusa alulmineralizált zománcot, annak amelogenesis imperfecta-szerű fenotípusát eredményezi mind emberben, mind

egér modellben (Eckstein és mtsai 2019, Eckstein és mtsai 2017, Lacruz és Feske 2015).



6. ábra: A ameloblaszt sejtek feltételezett kalcium-transzport mechanizmusai (Lacruz és mtsai 2017)

Egy mind humán családokban, mind knock-out egerekben megfigyelt másik zománcérést érintő géndefektus, az SLC24A4 gén defektusa (Eckstein és mtsai 2018, Parry és mtsai 2013) felhívja a figyelmet egy másik Ca^{2+} transzport mechanizmus fontosságára: az NCKX4 kálium-függő nátrium/kalcium cserélő (antiporter) fehérje lehet az érési ameloblaszt sejtek egyik fő Ca^{2+} leadási útja a zománctér felé (Hu és mtsai 2012). Ezen kívül a kálium-független nátrium/kalcium cserélő fehérjék (NCX1-3) és a plazmamembrán Ca^{2+} ATPáz (PMCA) szerepét is valószínűsítik ezekben a sejtekben a zománcérés különböző stádiumaiban (Okumura és mtsai 2010, Zaki és mtsai 1996), bár még pontos szubcelluláris lokalizációjuk nem tisztázott (Takano 1995), és szerepük, súlyuk vita tárgya.

A közelmúltban felmerült egy különleges, kináz funkcióval is rendelkező divalens csatorna szerepe: a tranziens receptor potenciál melasztatin-7 kation csatorna (TRPM7) heterozigóta mutáns egérnek súlyosan hipomineralizált zománc és csont defektusai vannak, alacsonyabb Ca^{2+} és magasabb Mg^{2+} tartalommal (Nakano és mtsai 2016). Bár

maga a TRPM7 nem egy SOCE ioncsatorna, érdekes közelmúltbeli bizonyítékok összekapcsolták a SOCE-vel, ugyanis a TRPM7 kináz aktivitásán keresztül modulálja a STIM1-et, ezáltal részt vehet a Ca^{2+} homeosztázisban (Faouzi és mtsai 2017). A legújabb megfigyelések szerint, a TRPM7 nem képes Ca^{2+} beáramlást stimulálni ameloblasztokban ORAI hiányában, de a CRAC csatorna előzetes aktiválását követően pozitívan modulálhatja a SOCE hatásait (Souza Bomfim és mtsai 2020).

2.3.3 A pH szabályozás és fontossága az amelogenezisben

2.3.3.1 Pufferelő rendszerek a szervezetben és a bikarbonát általános funkciói

Valamennyi élő szervezet pufferelő rendszerekkel rendelkezik annak céljából, hogy az intracelluláris és extracelluláris folyadéktereket megóvják a bekerülő savak vagy bázisok okozta jelentős pH-változásoktól. A vér pH-ját szabályozó három fő pufferrendszer a bikarbonát, foszfát és fehérje pufferrendszerek. Ezek közül kétségtelenül a bikarbonát/CO_2 a legfontosabb, mert ez az egyetlen pufferelő rendszer, amely a légzőrendszerrel kapcsolódik, ráadásul minden élő szervezetben ennek a legmagasabb a teljes funkcionális pufferkapacitása. A szekretált bikarbonát nagyon sokfajta szerv esetében lát el fontos semlegesítési funkciókat, így például mind a hasnyálmirigynek, mind a nyálmirigyeknek bikarbonátban gazdag szekréciós termékük van. A két szerv működésében jelentős különbségek vannak, de az általuk végzett ion- és proteinszekréció mind kétlépéses folyamat (Racz és mtsai 2018). A hasnyálmirigy az izotóniás, de nagy mennyiségű, koncentrált bikarbonátot tartalmazó hasnyálmirigy nedvet juttatja a bélbe, hogy puffereli a gyomor savasságát. A nyálmirigyek termelik a szervezet legmagasabb víztartalmú, leginkább hipotóniás folyadékát (nyál) a savas ételek és italok pufferelésére (Racz és mtsai 2018). Ha figyelembe vesszük a szájüregben található fiziológiai funkcióinak teljes skáláját, fel kell ismernünk a bikarbonát néhány további tulajdonságát amellett, hogy egy puffer ion. Ezek közé tartozik a mucin-molekulák szekréciójának és „kicsomagolásának" szabályozása (Quinton 2010), valamint az szolubilis adenilát-cikláz (sAC) aktivitásának szabályozása mind az eukarióta, mind a prokarióta sejtekben (egy ősi, evolúciósan konzervált mechanizmust jelezve) (Rahman és mtsai 2013). Az exocitózis előtt a mucinmolekulák

intracelluláris vezikulákban tárolódnak, amelyekben a kalcium- és a protonkoncentráció szignifikánsan magasabb, mint a citoszolban. A mucinmolekulák negatív töltéseinek védelme érdekében a Ca^{2+} ionok magas szintje (> 200 mM) és a savas környezet (pH <6) szükséges ahhoz, hogy azok becsomagolt állapotban maradjanak. A mucin és Ca^{2+} és H^+ ionok vezikulákból való felszabadulása után extracellulársan a bikarbonát a Ca^{2+} ionokhoz és H^+ ionokhoz kötődik, $Ca(HCO_3)_2$ -t és H_2CO_3-ot képezve. Következésképpen a mucin negatív töltései szabadon maradnak, és az elektrosztatikus taszító erők következtében a mucinmolekulák megnyílnak, a mukociliáris védelmi rendszer számára transzportálhatóvá válnak (Quinton 2010). Az amelogeninek a vezikuláris savas környezetben hasonlóképpen oldódhatnak, és az ameloblasztok egy hasonló rendszert használhatnak az amelogeninek oldatban tartására intracellulárisan, hogy azután extracellulárisan kiszabadulva olyan hidrofób tulajdonságokat alakítsanak ki a zománcmátrixban (például önszerveződő „nanoszalagok” kialakításával), amik kritikusak az amelogenezis szekréciós fázisában a kristálynövekedés szervezéséhez (Lacruz és mtsai 2017).

A bikarbonát egy másik felismert fontos szerepe az intracelluláris ciklikus-AMP szint (cAMP) szabályozásában van. A ciklikus-AMP egy másodlagos hírvivő molekula, amely kulcsfontosságú szerepet játszik a különböző sejtfunkciók szabályozásában. A sAC a cAMP egyik forrása, és közvetlenül a bikarbonát szabályozza, aktíválja két mechanizmuson keresztül: (i) a szubsztrát gátlás megszüntetésével, és (ii) az aktív hely záródásának megkönnyítésével emeli a szubsztrát turnover-t, a sAC enzim Vmax értékét (Rahman és mtsai 2013). Valójában a bikarbonát által szabályozott sAC fehérjét a sejtek egyik (indirekt) pH-szenzor molekulájának tartják, amely a fiziológiás 2-25 mM tartományban érzékeny a bikarbonát/CO_2-koncentráció lokális változásaira (Wiggins és mtsai 2018).

Végül érdemes megemlíteni a bikarbonát antimikrobiális tulajdonságait (Gutierrez-Huante és mtsai 2015). Például cisztás fibrózisban súlyosan csökkent a légúti hámfelszíni folyadék (ASL - airway surface liquid) baktériumölő képessége (Pezzulo és mtsai 2012). Ezt a defektust $NaHCO_3$ beadásával korrigálni lehet, ami arra utal, hogy a bikarbonát helyreállítja az antimikrobiális peptidek, például a laktoferrin és a lizozim aktivitását, amint azt egy cisztás fibrózis törpesertés modellben kimutatták (Pezzulo és mtsai 2012). A bikarbonát közvetlen anti-biofilm aktivitását számos megfigyeléssel

alátámasztották (Dobay és mtsai 2018, Gawande és mtsai 2008). Az ún. kvórum-érzékelés (QS - quorum sensing) a baktériumok egy kommunikációs formája, amelyet a baktériumok egymással együttműködve használnak biofilm közösségeik építésére. A kvórum-érzékelő inhibitorok megzavarják a biofilm-képződést és növelik a biofilmek érzékenységét az antibiotikumokra (Sun és mtsai 2013). A közelmúlt adatai azt mutatják, hogy a bikarbonát megzavarja ezt a kvórum-érzékelő rendszert a 3', 5'-ciklikus-diguanilsav (c-di-GMP) másodlagos hírvivő szintjének csökkentésével a baktériumokban, a c-di-GMP bontását katalizáló foszfodiészteráz aktivitásának serkentésével (Koestler és Waters 2014).

2.3.3.2 A bikarbonát transzport és pH szabályozás szerepe a zománcérés során

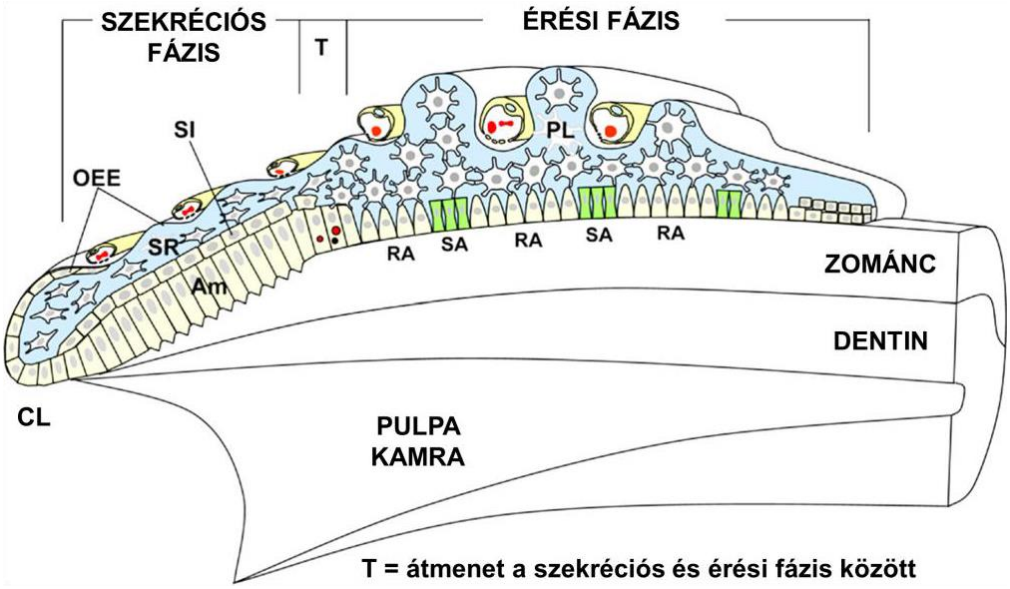
A sav/bázis egyensúly és annak szabályozása kitüntetett szerepet játszik a zománc hidroxiapatit képződésében, mivel a kristálynövekedés nagymértékben függ az extracelluláris folyadék ionösszetételétől és pH-jától, illetve ezeknek finom sejtes szabályozásától (Takagi és mtsai 1998). Az ameloblaszt sejteknek tehát képesnek kell lenniük mind az extracelluláris térben, mind intracellulárisan a sav/bázis egyensúly, a pH szigorú, de némiképp mégis rugalmas szabályozására (kifejtve lásd később). Maga a hidroxiapatit molekula képződése során minden mól hidroxiapatit képződése nyolc mól proton felszabadulását eredményezi (7.ábra). Az amelogenezis érési szakaszában ezért a hidroxiapatit képződése nagy mennyiségű protont generál, és megfelelő pH szabályozás hiányában a helyi savas körülmények megakadályoznák a kalcium és foszfát további precipitációját, a mineralizációs folyamat leállását okoznák. Következésképp a kristálynövekedés fenntartása érdekében ezeket a protonokat semlegesíteni kell (Josephsen és mtsai 2010, Lacruz és mtsai 2010a, Lyaruu és mtsai 2008, Smith 1998, Varga és mtsai 2015) neutralizáló bázikus ionok, elsősorban bikarbonát zománctérbe való kiválasztásával.

$$10\ Ca^{2+} + 6\ HPO_4^{2-} + 2\ H_2O \leftrightarrow Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 + \mathbf{8H^+}$$

7.ábra: A hidroxiapatit képződés sztöchiometriai egyenlete (Lacruz és mtsai 2017)

A pH szabályozás fontosságát a zománcérés során nagyon szemléletesen demonstrálja az egerek metszőfogain végzett zománc-festéses kísérletek. A rágcsálók folyamatosan

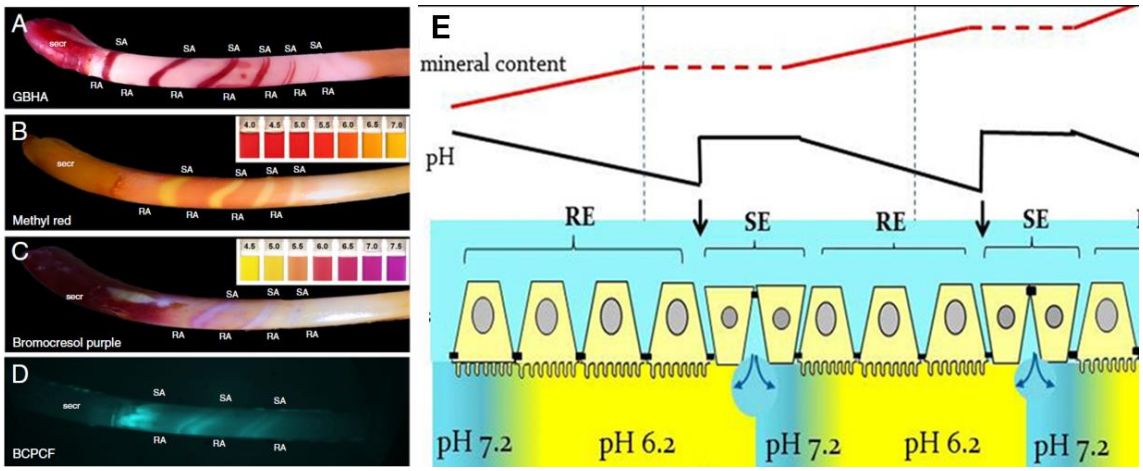
növő metszőfoga különösen ideális eszköze az amelogenezis-kutatásnak, ugyanis a különböző érési fázisú ameloblaszt típusok, illetve zománc-szakaszok (fejlődési) sorban és egyszerre vannak jelen a növekedő-kopó fog teljes hosszában, és együtt tanulmányozhatóak (8.ábra).



8. ábra: A rágcsálók folyamatosan növő metszőfogain térben elkülönülten, de időben egyszerre találhatóak meg, így egyszerre vizsgálhatóak a különböző fejlődési fázisú ameloblaszt sejtek és a felettük képződött fogzománc.
Jelmagyarázat: Am – ameloblasztok, CL – cervikális loop, OEE – külső zománchám, PL – papillaris sejtek, RA – fodros felszínű, SA – sima felszínű ameloblasztok, SI – stratum intermedium, SR – stellata reticulum, T – tranziens fázis (Josephsen és mtsai 2010)

Az egerek metszőfogainak érési stádiumú zománca különböző (kolorimetriás és fluoreszcens) pH-indikátorokkal megfestve jellegzetes mintázatot (9A-D.ábra), széles savas és keskeny neutrális sávokat mutat (Damkier és mtsai 2014, Josephsen és mtsai 2010). Ezek a zónák a két morfológiailag is elkülönülő ameloblaszt altípusnak feleltethetőek meg: a semleges régiókhoz a sima felszínű, *proximális* elhelyezkedésű szoros sejtkapcsolatokkal rendelkező ameloblasztok (SA) köthetőek, míg a savas zónák a fodros felszínű ameloblaszt sejtekhez (RA) kapcsolódnak *disztális* szoros sejtkapcsolatokkal (9E.ábra). A sima felszínű ameloblasztok ciklikusan fodros felszínű ameloblasztokká alakulnak, és vissza (Josephsen és mtsai 2010, Smith 1998). Ez a

modulációs folyamat egyfajta hullámos mintázatban megy végbe a maturációs zóna kezdetétől a metszőfog széléig, a zománc hosszában keresztirányú sávokat eredményezve (9A-D.ábra). Ratiometrikus fluorometriával és kolorimetriás pH-indikátorok alkalmazásával kimutatták, hogy a zománcfelszín pH-ja 7,2 és 6,2 között váltakozik (9E.ábra) az érés során a sima felszínű, illetve fodros felszínű ameloblasztok felett (Damkier és mtsai 2014). A ciklus (és így a pH szabályozás) kulcsfontosságú az ember fogfejlődése, zománcérése során is, de a jelenség pontos funkciója, kialakulásának és szabályozásának módja, molekuláris mechanizmusa még csak kevéssé ismert.



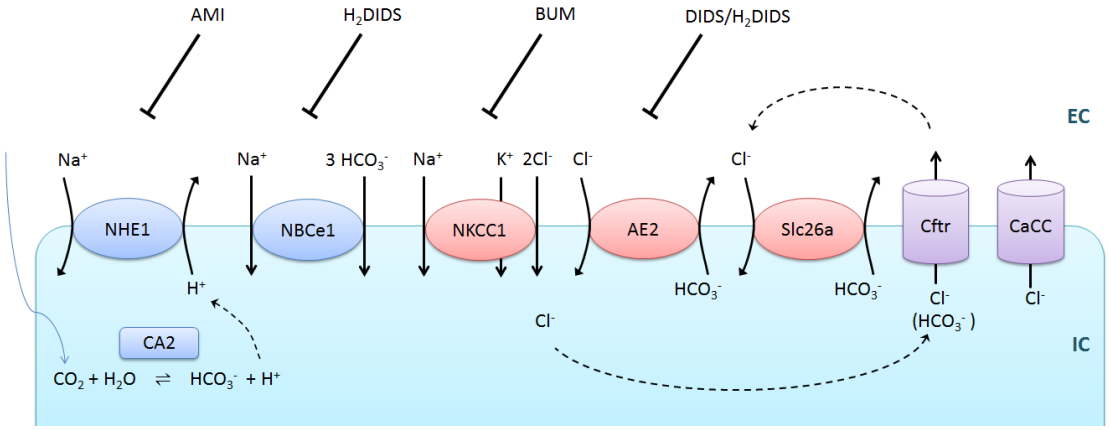
9.ábra: ***A patkány metszőfog különböző pH-indikátorokkal megfestve*** *(A) GBHA-val, (B) metilvörössel, (C) brómkrezol-ibolyával és (D) a ratiometrikus pH indikátor BCPCF-vel (Damkier és mtsai 2014). (E) A pH moduláció, az ionszintek, az ásványi anyag tartalom és a transzporterek expressziójának változása a zománcérés során metszőfogban a fodros felszínű (RE) és sima felszínű (SE) ameloblaszt sejtekkel. (Bronckers 2017)*

A respiratórikus és gasztrointesztinális rendszer minden szakaszán találhatóak pH szabályozást és/vagy bikarbonát-szekréciót ellátó különböző típusú epitélsejtek, amelyek bizonyos jól meghatározott, általában az Slc4, Slc12, Slc26, és ABC transzporter fehérjecsaládokból kikerülő ion-csatornákat és transzporter membránfehérjéket alkalmaznak a H^+ és HCO_3^- ionok irányított „mozgatására”. Az utóbbi évtizedben több ilyen, a pH szabályozásban potenciálisan szerepet játszó transzporter fehérjét mutattak ki ameloblaszt sejtekben is (Lacruz és mtsai 2017).

Jóllehet az öröklődő zománc-defektusok (amelogenesis imperfecta) túlnyomó részét valamilyen mátrix-fehérje génmutációja okoz (pl. amelogenin, enamelin, MMP-20, KLK-4), az is jól mutatja a pH szabályozás zománcfejlődésben játszott szerepének fontosságát, hogy számos esetben azonosították (általában valamely szindrómához kapcsoltan) bizonyos zománcfejlődési zavarok hátterében egy pH szabályozásban érintett transzportfehérje mutációját (Duan 2014, Wright és mtsai 2015). Az utóbbi évtizedben számos ilyen transzportfehérje jelentősége nyert igazolást knock-out egér modellek immunhisztológiai vizsgálatai során. Így a CFTR klorid-csatorna (Arquitt és mtsai 2002, Bronckers és mtsai 2010, Sui és mtsai 2003, Wright és mtsai 1996a, Wright és mtsai 1996b), az anion-cserélő-2 (AE2) (Lyaruu és mtsai 2008), az elektrogén Na^+-HCO_3^- kotranszporter-1 (NBCe1) (Lacruz és mtsai 2010b), a Na^+/H^+ cserélő-1 (NHE1), a szénsav-anhidráz 2 és 6 (CA2, CA6), a pendrin (SLC26A4), DRA (SLC26A3) és Pat1 (SLC26A6) transzporter fehérjék (Jalali és mtsai 2015, Yin és mtsai 2015) jelenlétét mind kimutatták az ameloblaszt sejtek szekréciós és/vagy érési stádiumaiban, és ezeknek a transzportfehérjéknek az „elrontása” bizonyítottan károsítja az ameloblaszt moduláció folyamatát, befolyásolja a korrekt zománcérést (Damkier és mtsai 2014, Josephsen és mtsai 2010, Lacruz és mtsai 2013b, Lacruz és mtsai 2012b). Ez a megfigyelés arra utal, hogy az extracelluláris pH-nak jelentős szerepe van az ameloblaszt moduláció irányításában, a sima felszínű sejtek fodros felszínű sejtekké alakulásának folyamatában az érési szakaszban. Az ameloblaszt funkciók sérült, hibás modulációja késleltetheti a mineralizációs folyamat végbemenetelét, és a fog előtörése után könnyen erodálódó, hipomineralizált zománcot eredményezhet (Bronckers 2017).

A rendelkezésre álló adatok még ellentmondásosak a sav/bázis szabályozás tekintetében a képződő zománcban (Bronckers és mtsai 2012, Damkier és mtsai 2014, Lacruz és mtsai 2013a). Nyilvánvaló azonban, hogy az ameloblasztoknak elegendő molekuláris apparátussal kell rendelkezniük a bikarbonát ionok szekréciójához a zománctérbe, hogy neutralizálni tudják az egy mól hidroxiapatit képződés során felszabadult nyolc mól protont (Varga és mtsai 2018). Az AE2 és CFTR mellett az ameloblasztok modulálhatják az extracelluláris és intracelluláris pH változásait (10. ábra) az elektrogén Na^+-HCO_3^- kotranszporter-1 (NBCe1), a Na^+/H^+ cserélő-1 (NHE1), a szénsav-anhidráz 2 és 6 (CA2, CA6), a pendrin (SLC26A4), DRA (SLC26A3) és Pat1 (SLC26A6) transzporter fehérjék expresszióján keresztül (Damkier és mtsai 2014, Jalali és mtsai

2015, Josephsen és mtsai 2010, Lacruz és mtsai 2010a, Lacruz és mtsai 2013b, Lacruz és mtsai 2012b).



10. ábra: A pH szabályozásban potenciálisan fontos szerepet betöltő transzporterek, ioncsatornák és gátlószerük (lásd később) sematikus szemléltetése (saját ábra)

A *nátrium-bikarbonát kotranszporter* (SLC4A4/NBCe1) a nátrium- és bikarbonát-ionok elektrogén szimportját valósítja meg, így számos epitélsejt-féleségben (pl. hasnyálmirigy duktusz vagy nyálmirigy acinus és duktusz sejtekben) látja el a bikarbonát bazolaterális felvételét. Az NBCe1 transzporter fehérjének fontos szerepe van a zománcérés során is. Ezt mutatja, hogy defektusa a zománcfejlődés épségét súlyosan érinti mind egérben mind emberben (Inatomi és mtsai 2004, Jalali és mtsai 2014, Lacruz és mtsai 2010b). Paine és mtsai szekréciós fázisú ameloblasztok bazolaterális membránjában mutatták ki egerekben (Paine és mtsai 2008). Lacruz és mtsai megfigyelék az NBCe1 transzporter expressziójának növekedését érési fázisú egér ameloblaszt sejtekben is (Lacruz és mtsai 2010b).

Az *anion-cserélők* elengedhetetlen szerepére is vannak bizonyítékaink. Köztük a legtöbb adat az klorid-bikarbonát cserélő SLC4A2/AE2 transzporterről áll rendelkezésre. Ezek a klorid- és bikarbonát-ionok elektroneutrális antiportját végzik, a legtöbb epitélsejt bazolaterális membránjában kifejeződnek, és stilbén-származékokkal (pl. DIDS) hatékonyan gátolhatók. Az AE2 transzporter defektusa még kifejezettebb zománcszerkezeti és fogfejlődési rendellenességeket okoz, ahogy azt különböző knock-out egér modellekben megfigyelték (Bronckers és mtsai 2009b, Lyaruu és mtsai 2008). Leginkább az érési fázisú ameloblasztok laterális, bazolaterális membránjában expresszálódik (Bronckers és mtsai 2009b, Josephsen és mtsai 2010), ami azt

valószínűsíti, hogy a kloridionok ellenében a bikarbonát intercelluláris térbe való leadásáért, ottani feldúsításáért lehet felelős.

Az utóbbi években felbukkantak adatok egy másik anion-cserélő fehérjecsalád tagjainak zománcérésben játszott potenciális szerepéről is. Az *SLC26A családba tartozó* pendrin/SLC26A4, PAT1/SLC26A6 és SUT2/SLC26A7 transzporterek szintén a klorid- és bikarbonát-ionok elektroneutrális cseréjét teszik lehetővé. Ezeket is elsősorban érési fázisú ameloblasztokban mutatták ki (Yin és mtsai 2015), de jelentőségük még kevésbé bizonyított, ugyanis az egyes transzporterek knock-out modelljei nem okoztak fenotípusos változást a zománcban (Bronckers és mtsai 2011, Jalali és mtsai 2015, Yin és mtsai 2015). Ez lehet annak is az eredménye, hogy ezek az anion-cserélők kiegészítik egymást, képesek egymás hatását kompenzálni (Jalali és mtsai 2015). Az SLC26A1 és SLC26A7 hiányában az SLC26A9 és más transzporterek, ioncsatornák (CFTR, CA2, NBCe1) expressziója megnő (Yin és mtsai 2015). Az SLC26A6 és SLC26A7 anion-cserélők hiánya állatokban a sav-bázis egyensúly súlyos diszregulációját okozza (Yin és mtsai 2015), és ezek hasonló apikális eloszlást mutatnak mint a CFTR anion-csatorna. Ameloblasztokban is valószínűleg a sejtek apikális pólusán segítenek a bikarbonát leadásában, szekréciójában, a CFTR csatornával együttműködve (Bronckers és mtsai 2011, Yin és mtsai 2015).

A *CFTR (cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor)* egy ABC-transzporterek (ATP-kötő kazetta transzporterek) családjába tartozó, ciklikus-AMP (cAMP) által regulált klorid-csatorna. Testszerte széleskörűen expresszálódik szekréciós epitél típusú sejtek (pl. különböző mirigyhám sejtek) apikális membránjában, és mutációi a folyadék-transzport diszregulációjához vezetnek, komoly diszfunkciót okozva a tüdőben, a hasnyálmirigyben és más szervekben (cisztás fibrózis). A CFTR-csatorna immunhisztokémiával detektálható érési fázisú ameloblasztok apikális membránjában (Bronckers és mtsai 2010) és a késői érési fázisban jelentősen emelkedett az expressziója a szekréciós fázishoz képest (Lacruz és mtsai 2012b).

CFTR knock-out (CF) egerekben a késői szekréciós, ill. korai érési fázisú ameloblasztok morfológiája megváltozik (Wright és mtsai 1996a, Wright és mtsai 1996b), a zománc normális vastagságú, de porózusabb és kevésbé mineralizált, továbbá a fogzománc Cl^--tartalma alacsonyabb (Arquitt és mtsai 2002, Wright és mtsai 1996a).

Azonkívül a CFTR knock-out egerek zománcából hiányoznak a "neutrális sávok", ami a klorid-transzportnak az ameloblaszt sejtek pH regulációjában játszott fontos szerepét mutatja (Sui és mtsai 2003). A CFTR ameloblasztokban leggyakrabban az apikális oldalon fejeződik ki, a növekvő zománckristályok közvetlen közelében, és valószínűleg a klorid-ionok leadása a funkciója (Bronckers és mtsai 2010), de nem zárható ki hogy a (közvelen vagy közvetett) bikarbonát transzportban is szerepet játszik (Ishiguro és mtsai 2009).

2.3.3.3 Potenciális pH „szenzor" funkciót betöltő fehérjék

Még csak kevéssé ismert, hogy az ameloblaszt sejtek milyen módon érzékelik az extracelluláris mátrix pH-jának változásait. Egy ilyen funkció bizonyosan szükséges az ameloblasztok pH szabályozó mechanizmusainak irányításához (Varga és mtsai 2018). Az elmúlt években számos fehérje esetében merült fel, hogy egyfajta molekuláris pH-érzékelőként viselkednek a sejtben nagyrészt vesefunkciókkal kapcsolatos kutatásokban. Ilyen pH szenzor fehérjék a sav/bázis érzékelő receptorok (GPR4, GPR65, GPR68, InsR-RR), kinázok (Pyk2, ErbB1/2), pH-érzékeny ioncsatornák (ASIC, TASK, ROMK) és a bikarbonát által stimulált szolúbilis adenilil-cikláz (sAC) (Brown és Wagner 2012). Egyes szövetekben léteznek más savérzékelő mechanizmusok is, mint például az ízlelőbimbókban lévő CAII-PDK2L1 rendszer, amelyek hasonlóképpen szerepet játszhatnak a pH-szabályozásban is (Brown és Wagner 2012). Számos egyéb membráncsatorna és transzporter funkciója is megváltozhat a sejten belüli vagy kívüli pH-változások hatására, továbbá a celluláris metabolikus enzimek expressziója és működése szintén módosíthatja a sav-bázis szabályozást (Brown és Wagner 2012). Így lehetséges, hogy valójában nem létezik egyetlen központi pH-érzékelő, amely az amelogenezis során szabályozza a pH-ciklusokat, hanem egy sor olyan molekulával rendelkeznek az ameloblasztok, amelyek „szkennelni" képesek a sejt környezetét a sav-bázis homeosztázis fenntartása, szabályozása érdekében mind a sejtben mind a környezetében.

Azonban a legutóbbi megfigyelések azt mutatják, hogy mégis lehet az ameloblaszt sejtekben egy kiemelt fontosságú pH-szenzor (Parry és mtsai 2016). A GPR68 gén egy G-fehérjéhez kapcsolt proton érzékelő receptort kódol, amely receptor érzékenysége pont abban a pH tartományban van, ami az amelogenezis során a fejlődő zománcmátrix

szempontjából releváns lehet. Ez egy oszteoblasztokban és oszteocitákban már ismert pH-szenzor funkcióval rendelkező membránfehérje, amely az extracelluláris tér pH-ját 7,8 (teljesen inaktív) és 6,8 (teljesen aktív) között érzékeli (Ludwig és mtsai 2003). Aktiválódása inozitol-triszfoszfát képződését és kalcium-ionok felszabadulását eredményezi az intracelluláris raktárakból (Ludwig és mtsai 2003). A zománcképződés szempontjából egy igen fontos megfigyelés, hogy a humán GPR68 fehérje egyes homozigóta allélvariánsai amelogenesis imperfecta-t okoztak három egymástól független családban is, funkcionálisan „loss of function" fenotípust eredményezve (Parry és mtsai 2016). Patkány mandibulák immunhisztokémiai vizsgálatai megerősítették a GPR68 lokalizációját a zománcszervben az amelogenezis mindegyik szakaszában (Parry és mtsai 2016). Egy másik vizsgálatban, a Caco-2 bélhám sejtvonalban a GPR68 „overexpressziója" a környezet savasodására fokozott barrierképződéshez vezetett (De Valliere és mtsai 2015), amely funkció felveti annak a lehetőségét, hogy hasonló szerepet tölthet be a receptor a zománcérés alatt az érési ameloblaszt sejtformák közötti „cycling" során, a szoros sejtkapcsolatok átrendeződésekor (Varga és mtsai 2018). Továbbá leírták, hogy epithelialis sejtekben a GPR68 jelátvitel szabályozni képes a Na^+/H^+ antiporterek és H^+-ATPáz transzporterek expresszióját (Mohebbi és mtsai 2012).

Ezek az adatok összességében arra utalnak, hogy a GPR68 protonérzékelőként működhet a zománcképződésben, de nyilvánvalóan további funkcionális vizsgálatokra van szükség ameloblasztok és ameloblaszt eredetű sejtek, például a HAT-7 sejtvonal alkalmazásával a GPR68 jelátvitel és a pH-szabályozás pontos molekuláris mechanizmusainak megerősítéséhez.

Végül megemlítendő egy másik potenciális jelölt, mint pH-szenzor, a fentiekben már részben bemutatott sAC. Nemrégiben leírtuk, hogy a cAMP/protein-kináz A útvonalat aktiváló forskolin szignifikánsan erősítette az ATP serkentő hatását a HAT-7 sejtek vektoriális bikarbonát szekréciójára (Bori és mtsai 2016). A CFTR csatorna aktiválódásához szükség van a protein-kináz A általi foszforilációjára, ezért a CFTR-csatornát gyakran cAMP-aktivált klorid-csatornának is hívják (Moran 2017). Több bizonyíték is utal rá, hogy ez a csatorna erősen expresszálódik érési stádiumú ameloblasztokban (Bronckers és mtsai 2015, Lacruz és mtsai 2013b). Mint korábban említettem, a sAC a cAMP egyik forrása, és közvetlenül a bikarbonát szabályozza, azaz

a bikarbonát/CO_2 koncentráció megváltozása, és így a pH befolyásolja aktivitását, egyfajta pH-érzékelőnek tekinthető (Rahman és mtsai 2013). A sAC-t először a vese interkaláris sejtjeiben azonosították, ahol a vakuoláris típusú (V-) ATPázzal nagymértékű kolokalizációt mutat (Clague és mtsai 1994). Ezekben a sejtekben a luminálisan vagy bazolaterálisan belépő, és intracellulárisan akkumulálódó bikarbonát a cAMP szint növekedését okozza. Ez a cAMP jel a V-ATPáznak az interkaláris sejtek apikális membránfelszínén való felhalmozódásához vezet, valószínűleg annak foszforilációjával (Brown és Wagner 2012). A megnövekedett intracelluláris bikarbonát indukálhatja az apikális V-ATPáz fokozott aktivitását, míg az intracelluláris savasodás egy ellentétes hatáshoz vezethet (Schmid és mtsai 2014).

Az, hogy az ameloblaszt sejtekben létezik-e ilyen pH-szabályozó mechanizmus, jelenleg nem ismert, de észszerű felvetés lenne, és érdemes lehet megvizsgálni, hogy szerepet játszhat-e egy hasonló mechanizmus az intracelluláris és luminális pH szabályozásában az amelogenezis során.

2.4 Az amelogenezis szabályozásában feltehetően szerepet játszó biológiailag aktív molekulák

2.4.1 Szteroid hormon receptorok

Az ameloblasztok működését és differenciálódását irányító hormonális és neuronális szabályozó tényezők nagyrészt még ismeretlenek. Az egyetlen kivétel a szteroid hormon receptorok részvétele. Amikor felnőtt patkányok zománcszerveiből izolált ameloblaszt sejtek mRNS expressziós mintázatát vizsgálták a differenciálódás különböző szakaszaiban, az RXR retinoid receptor szintje, a D-vitamin receptorhoz (VDR) hasonlóan a legmagasabb volt, de más szteroid receptorokat, mint például az androgén receptor (AR), az ösztrogén receptor (OER) és a progeszteron receptor kifejeződését szintén kimutatták érési stádiumú ameloblasztokban is (Houari és mtsai 2016). Immunofluoreszcens vizsgálattal megerősítették a VDR, OER és AR jelenlétét főként az érési stádiumú ameloblasztokban. Ezek az adatok azt bizonyítják, hogy az ameloblasztok a hormonális receptorok egy specifikus kombinációját fejezik ki attól

függően, hogy milyen fejlődési stádiumukban vannak (Houari és mtsai 2016). Számos vizsgálatot végeztek *in vivo* kísérleti állatokban, és *in vitro* a HAT-7 sejtvonal használatával, hogy felmérjék a szteroid tengelyt érintő endokrin rendszert károsító vegyszerek, például a biszfenol A (BPA) hatását, ami befolyásolhatja az amelogenezist (Jedeon és mtsai 2014b). Ez olyan zománc hipomineralizációt eredményezett (Babajko és mtsai 2017), amely hasonló a humán moláris incizális hipomineralizációhoz (MIH), egy nem oly régen leírt zománcbetegséghez (Weerheijm 2003, Weerheijm és mtsai 2001, William és mtsai 2006). A napi BPA bevitelnek kitett patkányok a MIH-hez hasonló zománc hipomineralizációt mutattak (Jedeon és mtsai 2014a). Az androgén, ösztrogén és BPA expozíció *in vivo* patkányokban és *in vitro* HAT-7 sejtekben is módosította az ameloblaszt sejtek proliferációját, és befolyásolta az SLC26A4/pendrin transzporter és a KLK4 szerin-proteáz expresszióját, amelyek mindegyike fontos a zománcérés szempontjából (Babajko és mtsai 2017, Jedeon és mtsai 2016, Jedeon és mtsai 2014b). Nyilvánvalón még számos megválaszolatlan kérdés van a szteroid receptorok zománcképződésben betöltött szerepéről. A HAT-7 sejtmodell alkalmazása lehetővé teszi ezen faktorok sejt-szintű hatásainak vizsgálatát. Bár ezek a pilot vizsgálatok egyértelműen jelzik a hormonális szabályozás jelentőségét az ameloblaszt differenciálódásban és zománcképződésben, nyilvánvalóan a szteroid hormonok nem képesek szabályozni az érési stádiumú ameloblaszt formák rövid időtávú, kb. 8 órás ciklusát (Damkier és mtsai 2014, Josephsen és mtsai 2010, Smith 1998), mert hatásuk inkább hosszú távú szabályozást tesz lehetővé; kifejezetten a funkcionális fehérjék expresszióját befolyásolják, nem az aktivitásukat. Az ilyen szabályozói szerepre a legvalószínűbb jelöltek a különböző G-fehérje-kapcsolt receptorok és pH-érzékelők, amelyekről ismert, hogy hasonló funkciókkal rendelkeznek a különböző szekréciós és abszorpciós epitheliumokban.

2.4.2 Extracelluláris ATP

A potenciális szabályozási útvonalak egyikét az extracelluláris ATP, egy bioaktív molekula aktiválhatja, amely purinerg receptorokon keresztül hat az intracelluláris Ca^{2+} szint növelésére (Novak 2011, Schwiebert és Zsembery 2003). Patkányban a szekréciós és érési ameloblaszt sejtek a P2ry1, P2ry2, P2ry4, és P2ry6 ATP-receptorokat mind expresszálják, de az érési fázis során a P2ry2 és P2ry6 szintje szignifikánsan megnő (Nurbaeva és mtsai 2018). Az ATP-stimulálta purinerg receptorok (P2X inotróp és P2Y

metabotróp receptorok) (Burnstock 2018, Koles és mtsai 2008, Mclarnon 2005) megnövelik a citoszol Ca^{2+} koncentrációját, ami viszont aktiválja a Ca^{2+}-függő klorid-csatornákat (CaCC). A klorid kiáramlása (Cl^--efflux) csökkenti annak intracelluláris koncentrációját, ami így nagyobb hajtóerőt eredményez a bikarbonát-szekrécióhoz a Cl^-/HCO_3^- anioncserélőn keresztül (Zsembery és mtsai 2000). Továbbá magas citoszolikus Ca^{2+} szintek mellett a Ca^{2+}-függő klorid-csatornák permeabilitása a bikarbonátra nagymértékben megnő, ami közvetlen kiáramlási útvonalat biztosít a HCO_3^- számára (Jung és mtsai 2013). Ezért feltételezhető, hogy az extracelluláris ATP és a Ca^{2+}-függő klorid-csatornák részt vehetnek a pH érzékelésében és/vagy szabályozásában. A HAT-7 sejtekben a külsőleg adott ATP stimulálta a bikarbonát-transzportot, amikor azt a bazolaterális oldalon alkalmaztuk, ám apikálisan adva nem történt szignifikáns stimuláció (Bori és mtsai 2016). Más szekréciós epitéliumokban az apikális és a bazolaterális ATP-nek a bikarbonát szekrécióra gyakorolt eltérő hatásai jól ismertek (Baggaley és mtsai 2007, Demeter és mtsai 2009a, Schwiebert és Zsembery 2003, Szucs és mtsai 2006). A HAT-7 sejtekkel végzett vizsgálataink felvetik annak a lehetőségét, hogy az ATP az ameloblaszt funkciók egy fontos extracelluláris szabályozója lehet kalcium-aktivált kloridcsatornákon keresztül fejtve ki hatását, amely csatornák expresszióját már kimutatták maturációs ameloblasztokban (Lacruz és mtsai 2012a). Történetesen egy hasonló funkció már jól ismert más exokrin szervekben, például nyálmirigyekben (Nakamoto és mtsai 2009, Novak és mtsai 2010) és hasnyálmirigyben (Kordas és mtsai 2004, Novak 2011, Szucs és mtsai 2006).

2.4.3 Kalciumérzékelő receptor

Az extracelluláris kalciumérzékelő receptor (CaR) kulcsszerepet játszik a kalcium-homeosztázis fenntartásában, és széles körben expresszálódik a kalcium-anyagcserében részt vevő szövetekben (Riccardi és Valenti 2016). Számos szövetben azonosították, többek között a vesében (Riccardi és Valenti 2016, Ward és Riccardi 2002) és a hasnyálmirigyben (Racz és mtsai 2002). Mivel a kalcium a fogzománc, a dentin és a környező extracelluláris mátrix meghatározó összetevője is, a Ca^{2+} valószínűsíthetően a CaR receptoron keresztül is szabályozhatja a fogképződést egy hasonlóan G-fehérjéhez kapcsolt receptor aktiválással (Mathias és mtsai 2001). Valójában kimutatták, hogy a CaR ténylegesen kifejeződik a fejlődő fogakban, különösen az ameloblasztokban (Mathias és mtsai 2001). Továbbá egy immortalizált ameloblaszt-jellegű sejtvonalban

(PABSo-E) is detektálták a CaR expresszióját, és annak fokozódását tapasztalták a magas extracelluláris Ca^{2+}-koncentráció stimulált intracelluláris Ca^{2+}-jelszint emelkedésére. Ezek a vizsgálatok azt sugallják, hogy a CaR kifejeződik a fejlődő fogakban és részt vesz az intracelluláris jelutak szabályozásában (Mathias és mtsai 2001). Mindazonáltal az intracelluláris és transzcelluláris ionmozgásokban ennek hatására bekövetkező változások tisztázásához, különösen a Ca^{2+} és a bikarbonát transzportfolyamatok szabályozásában betöltött szerepe felderítéséhez azonban jövőbeli vizsgálatok szükségesek.

2.4.4 G-fehérje kapcsolt receptorok

Még kevésbé vannak ismereteink az egyéb G-fehérje kapcsolt receptor (GPCR) aktivátorok amelogenezisben betöltött potenciális szerepéről, bár egyes bizonyítékok alátámasztani látszanak egy ilyen szerepet a kolecisztokinin (CCK), a gasztrin-felszabadító peptid (GRP), az hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP), és a neuropeptid-Y (NPY) esetében. A kolecisztokinin egy fontos szabályozó peptid mind a gyomor-bél traktusban, mind az agyban, és úgy tűnik lényeges szerepet tölt be a zománcérés során is. A receptor-jelátvitele a Gq fehérje aktivációjához kapcsolódik, ami foszfolipáz C (béta) aktivációhoz, a kalcium-jel növekedéséhez vezet, PKC-indukált ERK-aktivációt eredményezve (Racz és mtsai 2006). Ez, szövettől függően számos funkció aktiválódásához vezet, például a hasnyálmirigy-szekréció (Szalmay és mtsai 2001) és a bélrendszer motoros funkciójának növekedéséhez (Varga és mtsai 2004). A rágcsálók metszőfogából izolált ameloblasztok génexpressziós vizsgálataiban a legnagyobb mértékben kifejeződött gén-transzkriptum a CCK volt (Lacruz és mtsai 2012a). Ezenkívül a korai és a késői érési ameloblaszt formák között a qPCR vizsgálattal mért CCK-expresszió mértéke 20-szoros növekedést mutatott (Lacruz és mtsai 2011). A gasztrin-felszabadító peptid (GRP) egy fontos gasztrointesztinális szabályozó peptid, és emellett tumornövekedést elősegítő növekedési faktorként tartják számon. A receptora egy G-protein kapcsolt receptor (GPCR). A GRP indukálja a kalcium mobilizálását az intracelluláris raktárakból (Burghardt és mtsai 2001), amellyel számos szekréciós és motoros funkciót szabályoz a bélben (Milusheva és mtsai 1998, Szalmay és mtsai 2001). Egy nem oly régen végzett vizsgálat egerekben a GRP metszőfog-fejlődésben játszott funkciójának azonosítására, „gain-of-function” analízissel, GRP „overexpresszált” fogcsíra vese kapszula transzplantációjával (a

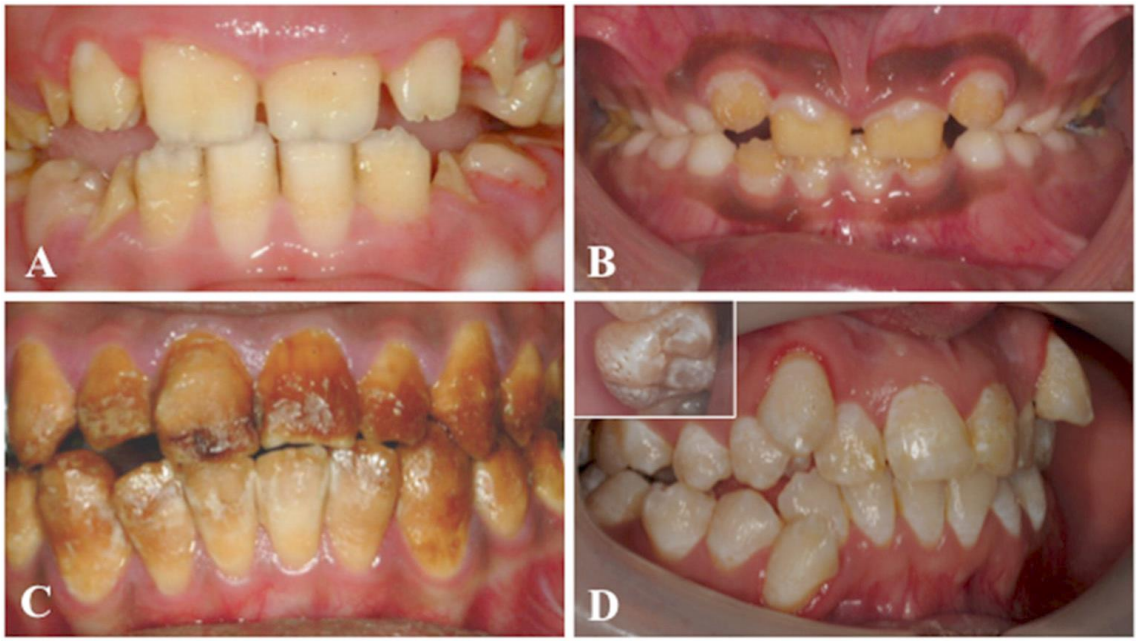
capsula fibrosa renis / rostos tok alá kísérletes célból ültetett szövet graft) megnövekedett zománc- és dentinvastagságot eredményezett (Lee és mtsai 2015). Továbbá GRP „overexpresszált" metszőfog szervkultúrákban morfológiai változásokat is megfigyeltek, de nem végeztek molekuláris vagy sejt fiziológiai vizsgálatokat (Lee és mtsai 2015).

A hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) egy széleskörűen kifejeződő pleiotróp neuropeptid. A fogakhoz kapcsolódó struktúrákban is találtak PACAP-immunreaktív rostokat. PACAP-hiányos egerek moláris és metszőfogaiban mind a dentinben, mind a zománcban súlyos szerkezeti elváltozásokat figyeltek meg (Sandor és mtsai 2014, Sandor és mtsai 2016), továbbá PACAP-hiányos egerek moláris ameloblaszt sejtjeiben emelkedett Notch2 receptor és ligand expressziót detektáltak (Fulop és mtsai 2019). Ezidáig még nem végeztek funkcionális vizsgálatokat a peptid fogakat érintő hatásmechanizmusainak felderítésére. Hasonlóképpen egy másik neuropeptid, a NPY expresszióját is megfigyelték patkány metszőfogak ameloblaszt sejtjeiben, és a késői érési forma csökkent kifejeződését találták a korai formához képest, ám ennek jelentése, jelentősége még nem ismert (Lacruz és mtsai 2011). Néhány más szabályozó peptid, mint például a szomatosztatin, a peptid tirozin tirozin (PYY), a galanin, a vazoaktív intesztinális peptid (VIP), a kalcitonin génhez kapcsolódó peptid (CGRP) és a „substance P", amelyek szintén G-protein-kapcsolt receptorok aktiválásán keresztül fejtik ki hatásukat, ugyancsak lehetséges regulátora lehet az amelogenezis epithelialis differenciációs és transzportfolyamatainak (Monteiro és Batterham 2017), de ezekről még nem állnak rendelkezésre adatok. Kétségtelen, hogy funkcionális vizsgálatokra alkalmas *in vitro* sejtes rendszerek szükségesek ahhoz, hogy azonosítsuk funkcióikat a megfelelő zománcképződéshez vezető iontranszport folyamatokban.

2.5 Az amelogenezis zavarai, genetikai tényezők

Az előző alfejezetekben leírtak demonstrálják, hogy az amelogenezis egy nagyon speciális, többlépcsős, sok tényezőn múló, szigorú szabályozási folyamatok által meghatározott érési folyamat, ezért nem meglepő, hogy fejlődési zavarai mögött is rendkívül sokféle, sok esetben még ma sem teljesen ismert okok lehetnek. A zománcérési defektusok hátterében mind genetikai, mind környezeti faktorok hatása

állhat. Ezidáig közel 100 olyan öröklődő genetikai eltérésről tudunk, ami a zománcot is érintő fenotípusos elváltozással jár (Wright és mtsai 2015), és többségükben ismeretes is, hogy az érintett génlokusz milyen molekuláris funkciót takar. Ezek leggyakrabban enzimeket, szabályozó fehérjéket, mátrix-proteineket, transzkripciós faktorokat és transzmembrán fehérjéket érintenek, és legtöbbször fenotípusosan zománc hipoplázia vagy hipomineralizált zománc formájában jelentkeznek. Az elsődlegesen a zománcot érintő, szisztémás elváltozásokat nem mutató öröklődő betegségek elnevezése az **amelogenesis imperfecta** (AI). Ezeket a kondiciókat klinikai megjelenésük szerint négy típusba (és 14 altípusba) soroljuk (11.ábra).



11. ábra: ***Az amelogenesis imperfecta négy fő klinikai megjelenési formája.*** *(A) hypoplasticus, (B) hypomaturatios, (C) hypocalcificatios, és (D) kevert típusok (Smith és mtsai 2017)*

A *hypoplasticus zománcdefektusnál (I.típus)* a mátrixállomány képződése szenved zavart, így csak egy vékony, de kemény és áttetsző fogzománc keletkezik, felszínén gödröcskékkel, amely hajlamos a kopásra, elszíneződésre.

A *hypomaturatios formában (II. típus)* a zománc szerves mátrixa normálisan képződik, a mineralizáció is lezajlik, de a hidroxilapatit kristályok abnormálisan fejlődnek rendezetlenül elhelyezkedő, elvékonyodott zománcprizmák alakulnak ki. Így ez a zománc is hajlamos a kopásra, törésre.

A *hypocalcificatios formában (III. típus)* a zománc vastagsága általában normális, de a kalcifikáció defektusa miatt lágyabb és nagyon könnyen törik, könnyen leválhat, a dentint szabadon hagyva. A fogak színe opak vagy sárgás-barnás, mert hajlamos az elszíneződésre.

A *hypomaturatios-hypoplasticus zománcdefektus taurodontizmussal (IV. típus)* klinikai képére az I. és II. típusok jellegzetességeinek keveréke jellemző, amelyek taurodontizmussal (gyökérképződési rendellenesség) társulnak.

Az összes AI típusra jellemző a rossz minőségű zománc, amely ennélfogva fokozottan érzékeny a fogszuvasodásra. Az ezek hátterében álló károsodott fehérje általában egy mátrixprotein (amelogenin, enamelin, MMP-20, KLK-4), de okozhatja transzkripciós faktor (DLX3), vezikula transzportot szabályozó fehérje (WDR72) vagy kalcium-cserélő transzportfehérje (SLC24A4). Klorid-csatorna vagy klorid-cserélő antiporter genetikai hibája szintén jelenkezik zománcot is érintő fenotípussal (CFTR, AE2). (Duan 2014)

Ezenkívül sok, valamely **szindrómával** társított géndefektus megjelenő szimptómái között szerepel súlyos zománcprobléma (Wright és mtsai 2015). Ezek sokszor szintén valamely fontos transzkripciós faktorhoz (pl. RUNX2, TP63) vagy növekedési faktorhoz (pl. FGF3, FGFR3) kapcsolhatóak, illetve lehet például kalcium transzportban érintett fehérje (STIM1), bikarbonát transzporter (SLC4A4), magnézium transzporter (CNNM4).

2.6 Környezeti faktorok, a fluorid kettős szerepe

A Ca^{2+}, PO_4^{3-} és OH^- ionokon kívül egyéb ionok, nyomelemek is képesek beépülni a zománckristályokba, ami befolyásolja annak szerkezetét, stabilitását. A kisebb ionrádiuszú ionok (például a F-) nem növelik meg a rácspontok közötti távolságot, a kristályrács entrópiáját, így könnyebben beépülnek, növelik annak stabilitását (Gibbs-Kelvin elve). Ennek alapján megkülönböztetünk *cariogén* (Al, Hg, Cd, Pb, Cu, Se) és *carioprotektív* (F, Sr, Sn, Mo, V) nyomelemeket. Ezenkívül egyéb, nagyobb méretű molekulák, például az amelogenezisben közvetlenül nem résztvevő fehérjék is bejuthatnak a mineralizációs térbe, ami zavart okozhat a zománcérésben. Ilyen lehet

például a szérum **albumin**, amiről leírták, hogy bizonyos fizikális traumák vagy néhány gyermekkori megbetegedés hatására jelentkező idiopátiás hypomaturációs zománcelváltozás (fehér opak hypoplázia) hátterében állhat (Tarjan és mtsai 2002). Ezen betegségekben, sérülésekben a hyperaemiás állapot az albumin beszivárgását okozhatja a zománctérbe, ami a kristálynövekedést megzavarhatja (Garnett és Dieppe 1990, Kirkham és mtsai 2000). Egy másik jól ismert példa a gyermekkorban szedett **tetraciklin** típusú antibiotikumok, amelyek a fejlődő fogak permanens sárgás-barnás-szürkés elszíneződését, horizontális csíkozottságát okozzák, és valószínűleg a csontok, fogak fejlődését is befolyásolják (lévén a tetraciklin fémionokkal, pl. a kalciummal oldhatatlan komplexet képez).

Egy másik, **moláris incisális hipomineralizáció (MIH)** néven leírt zománcfejlődési zavar hátterében szintén a korai életkorban szervezetet ért károsító környezeti faktorok hatásait feltételezik (Crombie és mtsai 2009, Weerheijm és mtsai 2001, William és mtsai 2006). Ez a kórkép a zománc fluorózis szisztémás jellegű, diffúz, összes fogat érintő defektusával ellentétben csak bizonyos fogakon jelentkező elváltozásokat okoz, ráadásul a rendellenesség nem is szimmetrikus, súlyossága foganként változhat. A MIH egy olyan kvalitatív zománceltérés, ami kifejezetten az első maradó moláris fogakat és sokszor a metszőfogakat is érinti. A MIH etiológiája még nem tisztázott, de valószínűsítik bizonyos környezeti szennyezőanyagok (például poliklórozott bifenil származékok és a dioxin), bizonyos pre- vagy neonatális komplikációk (pl. intubáció okozta trauma), gyermekkori légúti (pl. asztma) vagy krónikus betegségek (pl. coeliakia) vagy az ezekre szedett gyógyszerek, antibiotikumok szerepét (Crombie és mtsai 2009, Tapias-Ledesma és mtsai 2003, Wierink és mtsai 2007, William és mtsai 2006).

Ezzel szemben a **fluorid-ion** mint károsító faktor bizonyítottan ott áll a fluorózisok hátterében, a fluorid-ionok zománckárosodást okozó hatása jól ismert. Ez, az előzőekben már említett carioprotektív hatás fényében különösen érdekes jelenség, és a kétféle hatás nagyon kis dóziskülönbséggel való érvényesülésének közvetlen okaira mind a mai napig nincs kielégítő magyarázatunk. Jól ismert, hogy a fluorid beépülhet a fejlődő zománckristályokba, de a már érett zománcba is a zománcfelszín felől, így carioprotektív hatása pre-eruptív és poszteruptív módokon is jelentkezhet. Mindkét esetben a védő hatás annak köszönhető, hogy a keletkező fluorapatit stabilabb, jobban

ellenáll a savas oldódásnak (Fejerskov 2004, Ferguson és mtsai 1999, Rugg-Gunn és Banoczy 2013). Ez a tulajdonság nagy szerepet játszik a modern fogászati egészségmegőrzésben (Anusavice 2005, Horowitz 2004). Bár a legtöbb ivóvíz forrásban található valamennyi oldott fluorid-ion, így beépül a zománckristályokba fluorapatit formájában (a OH- ionok helyére), a fluorid nem esszenciális komponense a zománcnak, annak hiányában is normálisan mineralizált zománcszerkezet jön létre. A védő hatásúnál alig magasabb, illetve jóval magasabb dózisoknál különböző szisztémás elváltozások jelentkeznek: dentális fluorózis és skeletalis fluorózis. A fluorózis egy erősen dózis és expozíciós-idő függő jelenség (1 táblázat és 12.ábra). Az akut fluorid toxikózissal ellentétben krónikus expozíció esetén már igen kis koncentrációkban (1-8 ppm) is jelentkeznek ezek az elváltozások.

1. táblázat: A krónikus fluorid toxicitás hatásai: különböző betegségek formájában manifesztálódik a különböző dózisú és expozíciós idejű fluorid-bevitel hatása (Ferguson és mtsai 1999) és (Patil és mtsai 2018) nyomán.

Fluorid bevitel	Expozíciós idő	Élettani hatások
0,7-1,2 ppm	Élethosszig tartó	Carioprotektív hatás
1,5-3 ppm	5-10 év vagy több	Dentális fluorózis enyhébb formái
3-8 ppm	15-20 év vagy több	Súlyos dentális fluorózis és a skeletális fluorózis enyhébb formái
8 ppm fölött	5-10 év	Súlyos dentális és skeletális fluorózis

2.7 A zománc fluorózis kialakulásának lehetséges mechanizmusai

A dentális fluorózis gyermekkorban, a fogfejlődés során krónikusan magas fluorid koncentrációnak kitett fogak zománcfejlődési zavara. A fogzománcon gödrök vagy foltos (opálos) zománc, hipermineralizált réteggel fedett felszín alatti hipomineralizált, porózus léziók jönnek létre, melyek idővel elszíneződnek, és könnyen erodálódnak, károsodnak (Bronckers és mtsai 2009a). Az elváltozások komolysága az enyhétől az

igen súlyosig (12.ábra), dózistól függően igen tág határok között változik (besorolásukra szolgál pl. a Thylstrup és Fejerskov-féle fluorózis index).

12.ábra: ***A dentális fluorózis különböző súlyosságú megjelenései a fogakon.*** *forrás: CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) fluorózis információs weboldala (www.cdc.gov/fluoridation/faqs/dental_fluorosis/index.htm)*

A különböző típusú elváltozások az ameloblasztok (és a zománc) különböző érési stádiumaihoz köthetőek (Bronckers és mtsai 2009a). Más-más mechanizmusok állhatnak a különböző típusok mögött, de annak ellenére, hogy igen régóta kutatott jelenség, még csak különböző, nem kellőképp bizonyított hipotézisek állnak rendelkezésünkre 2017 (Lacruz és mtsai 2017). Bizonyos megfigyelések alapján a szekréciós fázisban a fő mechanizmus a mátrix proteinek (lebontásának) gátlása lehet. A leginkább érdekes, alacsony dózisú fluorid hatására leginkább az amelogenezis érési fázisában lévő zománc érzékeny. Mivel a fluorózisos zománcban nagyobb mennyiségű mátrixfehérje marad vissza (Bronckers és mtsai 2009a), ezért feltételezték, hogy a zománcproteináz enzimek (MMP20, KLK4) aktivitását, funkcióját gátolja (Aoba 1997, Bronckers és mtsai 2009a, Den Besten 1999). Az újabb kutatások nem igazolták ezt a feltevést, ugyanis a fluorid-ionok magas koncentrációja sem befolyásolta közvetlenül ezen proteázok enzimaktivitását *in vitro* (Gerlach és mtsai 2000, Tye és mtsai 2011). Egy *in vivo* patkány kísérletben azt találták, hogy fluorózis-releváns dózisú fluoridbevitel a TGF-β1 expressziót csökkentette a zománcsejtekben, ami gátolta a KLK4 expressziót (Suzuki és mtsai 2014a). Több aktuális kutatás is felveti a magas fluorid-szintek és az oxidatív, illetve ER stressz útvonalak aktiválódása közötti

összefüggést (Kubota és mtsai 2005, Sharma és mtsai 2008, Sierant és Bartlett 2012, Suzuki és Bartlett 2014), továbbá megfigyelték, hogy az ameloblaszt sejtek és más sejtvonalak mind oxidatív, mind ER stresszre adott válasza a fehérjeszintézis és szekréció általános csökkenését eredményezte (Hetz 2012, Kubota és mtsai 2005), ahogy a zománc-proteinázokét is (Sierant és Bartlett 2012). Ugyanakkor a szekréciós stádiumú zománcban az amelogenin szekréciója nem szenved zavart magas fluoridbevitel mellett sem (Bronckers és mtsai 2009a). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a fluoritikus zománcban a megnövekedett organikus mátrixtartalom az expresszált proteinázok kisebb mennyisége miatt maradhat vissza (Den Besten 1986, Denbesten és Heffernan 1989, Sierant és Bartlett 2012).

A megfigyelések relevanciájának értékelését nagyban nehezíti, hogy a leggyakrabban használt kísérleti állatok és az ember dentális fluorózist okozó dózisai igen különbözőek. Patkányok és egerek esetében legalább 25-30 ppm fluorid (ivóvízben) hosszú idejű expozíciója szükséges a legkisebb elváltozás detektálhatóságához (Angmar-Mansson és Whitford 1984, Denbesten és mtsai 1985), míg leggyakrabban 100 ppm-et szoktak használni fluorózis kiváltásához (Bronckers és mtsai 2009a, Suzuki és mtsai 2014b). Ezzel szemben emberben már 6 ppm nagyságú dózis is súlyos zománc-fluorózist okoz.

Még arról sem rendelkezünk információkkal, hogy pontosan milyen módon juthat át a fluorid az ameloblasztok rétegén. Baktériumokban, élesztőben, néhány növényi sejtben már írtak le ioncsatornákat (pl. bizonyos feszültség-függő klorid-csatornákat), amelyek a fluorid-ionok hatékony transzportjára képesek (Ji és mtsai 2014, Last és Miller 2015), azonban állati sejtekben a hasonló mechanizmusok még felderítésre várnak.

2.8 Funkcionális vizsgálatok szükségessége, a HAT-7 sejtes modell

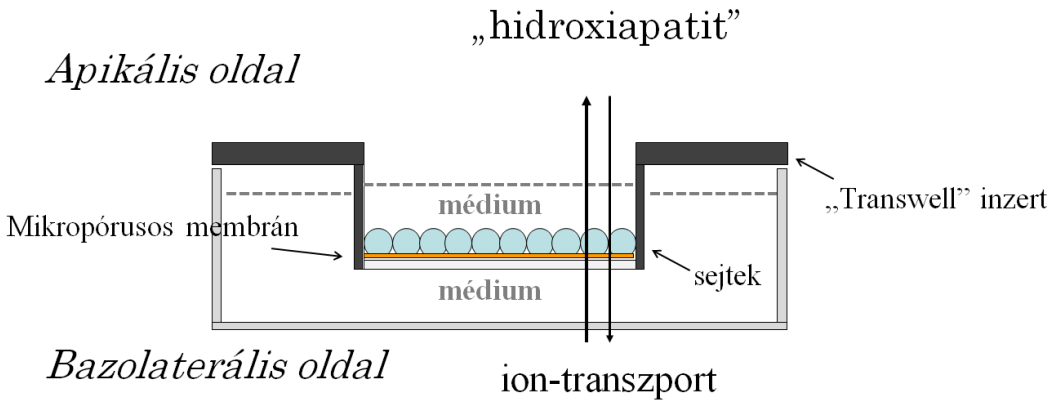
Az ameloblaszt sejtek a zománc kifejlődése és a fogak előtörése után elpusztulnak, ezért a zománc regenerációja emberben gátolt, az ameloblaszt sejtek izolálása, vizsgálata rendkívül nehéz. Az embriókori, illetve újszülöttkori fogcsírák izolálása, vizsgálata súlyos etikai problémákat vet fel. Éppen ezért az állatmodellek fontossága kiemelkedő a zománckutatások terén, a humán fogfejlődéssel nagy hasonlóságot mutató emlős fog modellek közül is kitűnnek a rágcsálók moláris és metszőfogainak vizsgálata a

laborállatok könnyű, gyors és olcsó tenyészthetősége, genetikai manipulálhatósága és az előző alfejezetekben már említett folytonos növekedés (metszőfogak) miatt. A vad típusú és knock-out egerek immunhisztokémiai és génexpressziós, ill. „microarray” vizsgálatai rendkívül sok új ismerettel gazdagították a zománcfejlődés molekuláris mechanizmusaival kapcsolatos tudásunkat. Mégis, az egyes membránfehérjék, adapter molekulák, citoszólikus és extracelluláris enzimek működésének és szabályozásának közvetlen vizsgálatához funkcionális modellekre is szükség lenne (Varga és mtsai 2018). Az ameloblaszt sejtek funkcionális vizsgálata *in vivo* nagy nehézségekbe ütközik, ugyanis azok egyetlen sejtréteget alkotnak (a mikrométeres tartományban) a kemény zománcréteghez tapadva. Ezért célul tűztük ki egy, az epithelialis transzport-folyamatokat jól modellező *in vitro* modell létrehozását. A konvencionális üveglemezre vagy szövettenyésztő plasztik felületre ültetett sejtkultúra modellek nem felelnek meg az irányított transzport-folyamatok feltételeül támasztott követelményeknek. Ezek a követelmények: a) konfluens egysejt réteg („monolayer”) kialakulása, b) megfelelő szoros sejtkapcsolatok („tight junctions”) kiépülése a sejtek között, c) a sejtek polarizált volta különböző fehérjeösszetételű apikális és bazolaterális membrán doménekkel, és d) az ekképpen létrejött „barrier” két oldala között a szabad ionáramlást nem engedő, de irányított iontranszport folyamatokat lehetővé tévő, ideális esetben több napig fenntartható sejtkultúra.

2.8.1 A HAT-7 sejtes modell

Ha a sejteket olyan, ún. Transwell membránok felületére ültetjük, amelyek a tápfolyadék oldott ion-és fehérje-alkotóit áteresztő, de a sejteket nem átengedő pórusokat tartalmaznak, akkor a membrán, illetve a sejtréteg két oldalán a táp- vagy mérőoldattal feltöltött (apikális és bazolaterális) térfél teljesen elkülönül, közöttük csak a sejtrétegen keresztül lehetséges „átjárás” (13.ábra). Ha ebben a sejtrétegben megfelelően kiépülő szoros kapcsolatokat tudunk létrehozni, akkor megszűnik a térfelek közötti szabad intercelluláris (paracelluláris) ionáramlás, ionmozgás mind paracelluláris, mind transzcelluláris módon csak a fehérjék által szabályozottan tud megvalósulni. Ez azt is jelenti, hogy a potenciális ionáramlás sebessége lecsökken, a sejtréteg rezisztenciája megnő (amely paraméter mérhető). A modell rendkívüli előnye, hogy a két térfél ionösszetétele általunk szabadon megválasztható, külön-külön

manipulálható (akár farmakológiai gátló- és stimuláló szerekkel), így sokféle vizsgálat elvégzésére ad lehetőséget.



13.ábra: ***A 2D in vitro modell sematikus képe*** *(saját ábra)*

A hasnyálmirigy esetében az ilyen sejtes modellek széleskörűen rendelkezésre állnak, és a múltban ezek felhasználásával meglehetősen kiterjedt kutatásokat végeztek (Hegyi és mtsai 2011, Pallagi és mtsai 2015, Steward és mtsai 2005). Kisebb mértékben, de a nyálmirigyek acináris és ductalis transzport-folyamatainak modellezésére szintén számos ehhez hasonló vizsgálat történt (Ferreira és Hoffman 2013, Proctor és Carpenter 2014, Varga 2015), míg az amelogenezis molekuláris transzport mechanizmusainak vizsgálatára korábban gyakorlatilag nem létezett funkcionális modell. Ez okból a közelmúltban kifejlesztettünk egy új, egyrétegű ameloblaszt modellt egy patkány eredetű sejtvonalat felhasználva (Bori és mtsai 2016, Racz és mtsai 2017).

Az ameloblaszt modell kialakításához egy hat napos patkány metszőfogának „cervikális hurok” régiójából (az ameloblaszt sejtek őssejt rezervoár-ja) izolált spontán immortalizált sejtvonalat, az ún. HAT-7 sejteket használtuk (Kawano és mtsai 2002). Sok szempontból tökéletesebb választás lenne a primer sejtek alkalmazása, de a vizsgálatokban való felhasználhatóságukat számos hátrányuk akadályozza. Az egyik nehézség, hogy ezek a sejtek csak korlátozott ideig fenntarthatók, ami a vizsgálatok időtartamát nagyon megnyújtja, és reprodukálhatóságát megnehezíti (mivel a kívánt mérési elemszámot nem lehet megspórólni). A másik, még nagyobb nehézség, hogy akár több különféle anyagú membránnal, illetve „bevonatolással” is próbálkozva, sokkal nehezebben tapadnak meg a sejtek a membránok felületén, és ha meg is tapadnak, csak kevésbé képesek benőni a teljes felületet, elérni a 100%-os konfluenciát.

Ezzel szemben a HAT-7 sejtek az ion-és fehérje-áteresztő Transwell membránok felületét könnyedén benőtték, valódi szoros kapcsolatokat kialakítva, több napig - vagy megfelelő médiumban akár hetekig – fenntarthatóan (Bori és mtsai 2016).

A HAT-7 sejtek számos ameloblaszt tulajdonságot mutatnak, mint például az ameloblasztin és amelogenin zománcmátrix fehérjék (Kawano és mtsai 2002), és érési stádiumú ameloblaszt markerek, például a kallikrein-4 expressziója (Harada és mtsai 2006, Matsumoto és mtsai 2011, Yoshizaki és mtsai 2008, Zheng és mtsai 2013). Vizsgálatainkban megállapítottuk, hogy a HAT-7 sejtek alkalmasak a pH-szabályozás és a vektoriális ion-transzport mechanizmusok funkcionális vizsgálatára (Bori és mtsai 2016). A sejtek konfluens, polarizált egyrétegű sejtréteget képeznek a permeábilis membránokon, és az idő függvényében kialakuló magas transzepitél elektromos rezisztenciát (TEER vagy TER) mutatnak, miután szoros sejtkapcsolatokat képeznek.

Ezután hasonló kísérleti stratégiákat alkalmaztunk, mint azt korábban a hasnyálmirigy és nyálmirigy bikarbonát- és proton-transzport folyamatait jellemző molekuláris élettani vizsgálatainkban leírtunk (Demeter és mtsai 2009a, Demeter és mtsai 2009b, Szucs és mtsai 2006, Varga 2015). Mikrofluorometriát alkalmaztunk az intracelluláris pH-változások mérésére, monitorozására, miután a sejteket előzetesen feltöltöttük a pH-érzékeny BCECF festékkel (Paulais és Turner 1992b). A sejten belüli pH-változásokat végig követtük, miközben különféle módon változtattuk a perfúziós oldatok komponenseit és különféle ioncsatorna/transzporter gátlószereket alkalmaztunk (a következő, „Módszerek” fejezetben részletezett módon).

2.8.2. Az intracelluláris pH mérésének lehetőségei sejtekben

Az **intracelluláris pH (pHi)** mérésére szolgáló legpontosabb technikák a H^+ permeábilis mikroelektródák használata, a noninvazív mágneses magrezonancia (NMR) analízis (például foszfátcsoportok ^{31}P-NMR spektroszkópiája) és bizonyos fluoreszcens festékek pH-függő emisszióját/excitációját kihasználó módszerek (Kotyk és mtsai 1989, Wray 1988). A fluoreszcens ion-szenzitív és ion-szelektív indikátorok lehetővé teszik egyrészt többféle, a sejtbiológiai folyamatok szempontjából fontos intracelluláris ion (pl. H^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, stb.) koncentrációjának valós időben való követését, kvantifikálását, másrészt mind az egyedi sejtek mikroszkópos képalkotó technikákkal

való megfigyelését („cell-imaging”), mind egész populációk, nagyobb sejtcsoportok viselkedésének monitorozását (fluoreszcens spektroszkópia és fluorimetria).

Az 1970-80-as évek óta, köszönhetően többek között Roger Tsien és munkatársainak (Tsien 1981), számos **fluorofór-tartalmú indikátor** és ezek különböző körülményekre (pH, gerjesztési hullámhossz, extra v. intracelluláris felhasználás) optimalizált módosított változata került forgalomba. Például az intracelluláris pH vizsgálatára, a fluorofór pKa értékének függvényében, különböző pH tartományokban való használatra szánt indikátorok léteznek (Loiselle és Casey 2010). A neutrális tartományban optimális BCECF pH 6,5-7,5 között, a citoszól vizsgálatára, a SNARF pH 6,0-8,0 között, a LysoSensor Green pH 4,5-6,0 között, az endoszómák/lizoszómák vizsgálatára használható (Molecular Probes kézikönyv).

Intracelluláris festésre ezen indikátorok membrán-permeábilis, **acetoxi-metil észter** (AM) változatát használjuk. Az észtercsoport a sejt észteráz enzimei hatására a sejtben lehasítódik, és a negatív töltésű festék (gyenge sav) nem fog tudni kijutni a sejtből, bennreked. Rendkívül hasznos sajátságuk, hogy ezeknek a pH indikátoroknak a többsége ún. **ratiometrikus** fluoreszcens festék, azaz két különböző gerjesztési hullámhosszra másféle ion-érzékenységet mutató spektrummal emittálnak, és így a két fluoreszcencia emissziós értéket elosztva számos a festék töltődéséből (pl. eltérő festék koncentráció, festék ürülése – „leaking”), a fluoreszcencia gyengüléséből („photobleaching”), illetve a sejtek egyenetlenségeiből, változásaiból (pl. kipukkadásuk) származó artefaktum kiküszöbölhető.

3. Célkitűzések

A HAT-7 patkány ameloblaszt sejtvonal felhasználásával létrehoztunk egy *in vitro* modellt, hogy tanulmányozhassuk az amelogenezishez kapcsolódó iontranszport folyamatokat (Bori és mtsai 2016). Igazoltuk, hogy a sejtek a jellemző ameloblaszt markereket expresszálják, membránra ültetve szoros kapcsolatokat alakítanak ki és funkcionális szempontból polarizáltak, továbbá vektoriális HCO_3^- szekrécióra képesek (Bori és mtsai 2016). A továbbiakban szerettük volna megvizsgálni, hogy az ameloblaszt sejtek milyen molekuláris mechanizmussal rendelkeznek a pH szabályozás és a HCO_3^- transzportjának végrehajtására.

3.1) Ezért célul tűztük ki a HAT-7 sejtekben az intracelluláris pH-szabályozást befolyásoló bazolaterális transzporterek funkcionális azonosítását:

- a) van-e a sejtek bazolaterális oldalán a bikarbonát intracelluláris akkumulációját biztosító nátrium-proton cserélő aktivitás
- b) detektálható-e bazolaterális oldalon a bikarbonát közvetlen transzportját ellátni képes elektrogén nátrium-bikarbonát kotranszporter aktivitása
- c) van-e a sejtekben a bikarbonát transzportjához nélkülözhetetlen klorid-ion utánpótlását biztosító nátrium-kálium-klorid kotranszporter aktivitás
- d) kimutatható-e a sejtekben a bikarbonát- és klorid-ionok elektroneutrális cseréjét végző anion-cserélő aktivitás

A HAT-7 sejtes *in vitro* modell alkalmas lehet a fluorózishoz köthető néhány mechanizmus vizsgálatához: a fluorid sejtpusztulást okozó közvetlen citotoxikus hatásai, hatás a zárt barrier kialakulásához szükséges szoros sejtkapcsolatok kialakulására, és a fluorid közvetlen gátló hatása a vektoriális kalcium- és/vagy bikarbonát-transzportra. Ezért célul tűztük ki annak felderítését, hogy

3.2) az akut fluorid expozíció zavarja-e a transzporterek bazolaterális-apikális irányú HCO_3^--transzportot lehetővé tevő képességét, és

3.3) hogy megvizsgáljuk a fluorid hatását a HAT-7 sejtek életképességére, továbbá

3.4) hogy van-e valamilyen hatása a fluoridnak a polarizált sejtek transzepiteliális rezisztenciájára, a szoros sejtkapcsolatok kialakulására és a szoros sejtkapcsolati fehérjék génexpressziójára.

4. Módszerek

4.1 Sejttenyésztés és a polarizált sejtmodell előállítása

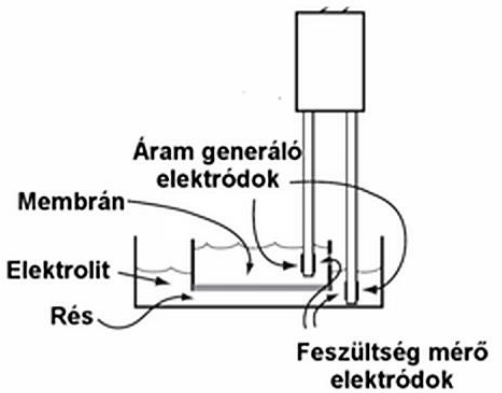
A HAT-7 sejtek egy dentalis epithelialis sejtvonal, amit 6 napos patkány metszőfog cervikális hurok („cervical loop”) régiójából, az ameloblaszt sejtek - rágcsálók metszőfoga esetén állandóan fenntartott - őssejt rezervoárjából izoláltak, és hoztak létre spontán immortalizációval Dr. Harada és munkatársai (Kawano és mtsai 2002). A sejteket Antonius Bronckers Professzor laborjából kaptuk, az amszterdami ACTA (Academic Center for Dentistry, University of Amsterdam and VU University Amsterdam) egyetemről.

A sejteket standard „szövetkultúra kezelt” 25 és 75cm^3 felületű sejttenyésztő flaskákban (Orange Scientific, Braine-L’Alleud, Belgium) tartottuk fenn tenyésztő (ún. C, azaz „kontroll”) tápoldatban, azaz 10% HyClone foetalis borjúszérummal (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), 100 U/ml penicillinnel, 10µg/ml streptomycinnel (Sigma) kiegészített DMEM/F12 Ham tápoldatban (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). A sejtek differenciáltatásához, Transwell membránokon való tenyésztéséhez is ezt az alap tápoldatot egészítettük ki $CaCl_2$-dal (2,1mM végkoncentrációban), és 10^{-5} mM dexametazonnal (Sigma) (differenciáló, azaz D-táp). (Arakaki és mtsai 2012, Woltgens és mtsai 1987) Az emelt kalcium koncentráció gátolja az ameloblaszt sejtek proliferációját és elősegíti *in vitro* differenciálódásukat (Chen és mtsai 2009, Woltgens és mtsai 1995), amely hatás közvetítésében részben a PI3K/AKT jelátviteli útvonal részvételét valószínűsítik egy mostanában megjelent, az ameloblaszt-szerű LS8 sejtekben végzett tanulmányban (Gao és mtsai 2020).

A sejteket 4 naponta passzáltuk, a kísérleteket a 3-16 közötti passzázs-számú tenyészetekkel végeztük. A mikrofluorimetriás funkcionális vizsgálatokra is alkalmas polarizált egysejt-réteg (monolayer) létrehozása érdekében a sejteket 4x10^4/ml sejtszámban 0,4 µm pórusméretű, 1,12 cm^2 felületű permeábilis poliészter Transwell membránokra (#3460, Costar, Corning, NY, USA) ültettük (13.ábra), és differenciáló (D) tápoldatban tenyésztettük. A sejteket inkubátorban (NuAire, Plymouth, MN, USA) 5% CO_2 és fenntartott páratartalom mellett, 37°C-on tartottuk.

4.2 A transzepitél elektromos rezisztencia követése

A szoros sejtkapcsolatok kialakulása, a sejt monolayer zártsága a sejtréteg transzepitél elektromos rezisztenciájának (TER) mérésével ellenőrizhető. A Transwell membránon növesztett (és 12-lyukú lemezekben inkubált) HAT-7 sejtek TER értékeit az epithelialis volt-ohm méter készülékkel (EVOM, World Precision Instruments, Hamden CT, USA) követtük (14.ábra), naponta mérve, 5 napon keresztül a mikrofluorometriás mérések előtt, illetve a nátrium-fluoridos (NaF) kezelések alatt.



14.ábra: ***Az EVOM készülék működési elve.*** *A két különböző folyadéktérbe érő, mindkét elektród kétoldalú, dupla funkciójú: egyik felén áram generáló, másik oldalán feszültségmérő elektródot tartalmaz. Az üzemmódok között a készüléken található kapcsoló segítségével válthatunk. Ionáramlás csak a membránon ülő sejtrétegen keresztül lehetséges, így jellemezhetjük a sejtréteg zártságát, elektrolitokkal (elsősorban* Na^+ *ionokkal) szembeni „átjárhatóságát". (A kép forrása: EVOM használati útmutató)*

A TER értékek időbeli követése végső soron a sejtréteg töltéssel rendelkező molekulákkal, elektrolitokkal szembeni paracelluláris permeabilitásáról, és az ezzel közvetlen összefüggésben lévő szoros kapcsolatok (tight-junction, TJ) kialakulásáról ad információt, amely sejtkapcsolatok a szekréciós és abszorpciós feladatokat ellátó epitélsejtek kulcsfontosságú struktúrája.

A többnapos fluorid expozíciós kísérletekben a sejtkiültetés után 24 órával a Transwell membránokon a médiumot lecseréltünk 0 (kontroll); 0,3; 0,6; illetve 1mM NaF-tartalmú médiumra. A TER értékek mérését a sejtek inkubátorból való kivétele után minél gyorsabban, azonos időtartam eltelte után (tehát azonos hőmérsékleten) végeztük el az

EVOM készülék ellenállás mérő üzemmódjában. A tényleges TER értéket a mért értékből számítottuk az alábbi képlet alapján (15.ábra).

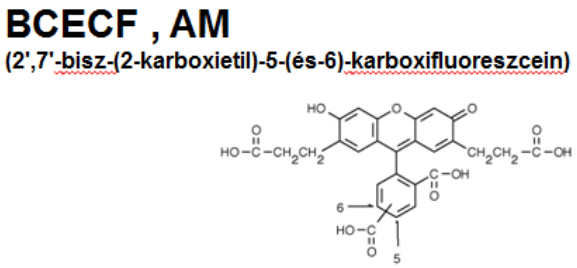
$$TER(\Omega cm^2) = (R_{total} - R_{blank}) \times A_{membran}$$

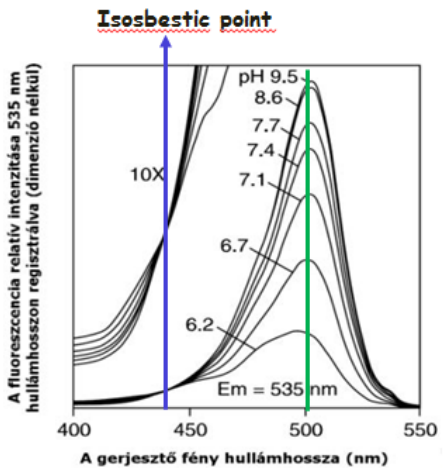
*15. ábra: **A TER számítása**: A tényleges TER érték a mért ellenállás (R_{total}) és a sejtnélküli „membrán" ellenállásának (R_{blank}) különbségéből adódik. Ha az értékeket különböző nagyságú membránok használata esetén össze akarjuk hasonlítani, akkor az egységnyi területre eső TER(Ωcm^2) értéket a képlet alapján számíthatjuk. A tényleges (mért) TER fordítottan arányos a membránfelület nagyságával ($A_{membran}$). (forrás: EVOM használati útmutató)*

A „kontroll" tápoldatban a 4-5. napon kialakult zárt sejtrétegre jellemző TER értékek a 200-300Ω (a „blank" levonása után 100-200 Ω) tartományban voltak, míg a differenciáló tápoldatban tenyésztett sejtréteg TER értékei jellemzően a 300-600 Ω (a „blank" levonása után 200-500 Ω) tartományban voltak a 4-5. napon a kiültetési sejtszámtól is függően.

4.3 Mikrofluorometria

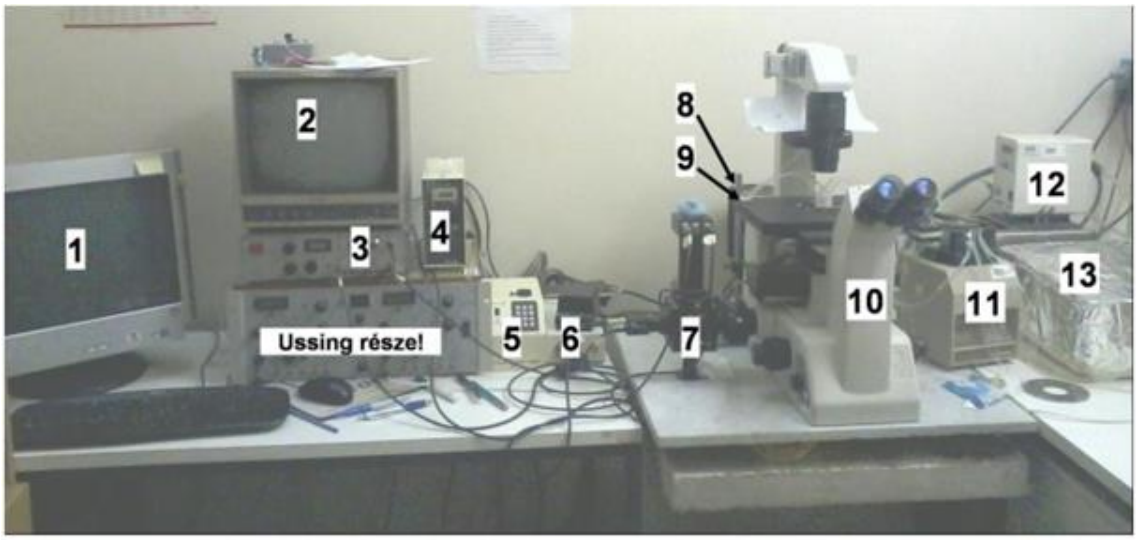
A HAT-7 sejtek valós időben történő intracelluláris pH (pH_i) változásait mikrofluorometriás módszerrel követtük, hasonlóan a tanszékünkön korábban nyálmirigy epitélsejtek funkcionális vizsgálata témakörben elvégzett mérésekhez (Szucs és mtsai 2006). Röviden, a sejteket a pH-érzékeny fluoreszcens indikátor festék **BCECF** (2′,7′−bis−(2−carboxyethyl)−5−(and−6)−carboxyfluorescein) acetoxi-metil (AM) észter formájával töltöttük fel (BCECF-AM, Molecular Probes). A festék tulajdonképpen 3, kicsit különböző oldhatóságú forma keveréke, amely formák pontos aránya festék batch-enként változik, külön molsúllyal rendelkeznek, ezért a töltési hatékonyságot, optimális időt batch-enként ellenőrizni szükséges. A sejtek festékkel való töltését szérummentes oldatban végeztük (észterázok!).





16.ábra: ***A BCECF pH-függő fluoreszcens excitációs spektruma.*** *490 nm hullámhossz körül maximális a pH-függő emittált fluoreszcencia intenzitás. Az ún.izoszbesztikus ponton (439 nm hullámhosszon) gerjesztve az emittált fény fluoreszcencia intenzitása nem függ a pH-tól (még a festék 10x koncentrációjánál sem). (A kép forrása: a termék használati útmutatója)*

A BCECF festett sejtek fluoreszcencia emissziós intenzitása 440nm hullámhosszú gerjesztésre nem függ a pH-tól (a spektrum ún. izoszbesztikus pontja), 490nm hullámhosszú gerjesztésre pH-függő módon változik az emittált fény fluoreszcencia intenzitása. Mindkét féle megvilágítás után 530nm-en detektáltuk az emittált fény fluoreszcencia intenzitását (16.ábra). A festék az intracelluláris pH mérésén keresztül képes a sejtmembránon keresztüli H^+ és/vagy HCO_3^- mozgások indirekt kimutatására. A bikarbonát transzportmechanizmusok egyes elemei azonosíthatóak az adott transzporter működéséhez szükséges ionok megvonásával vagy transzporter-specifikus gátlószerek alkalmazásával.



1 – Számítógép (benne van az A/D kártya)
2 – Monitor
3 – Erősítő (egyben a fotoelektronsokszorozó feszültségforrása)
4 – Xenon lámpa kapcsolója
5 – Hullámhossz váltó tárcsa vezérlőegysége
6 - Mikroszkóp lámpa kapcsolója
7 – Fotoelektron-sokszorozó8 – Xenon lámpa
9 – Hullámhossz váltó tárcsa
10 – Fluoreszcens mikroszkóp
11 – Perisztaltikus pumpa
12 – Kis vízfürdő
13 – Nagy vízfürdő

17.ábra: A mikrofluorometriás mérőrendszer eszközparkja (Bori Erzsébet fotója)

A HAT-7 sejteket tartalmazó Transwell membránt egy Nikon Eclipse TE200 invertált fluoreszcens mikroszkópra erősített, erre a célra készült kis mérőkamrába helyeztük és bilaterálisan különböző oldatokkal perfundáltuk 3 ml/perc áramlási sebességgel (Gilson Miniplus 3 perisztaltikus pumpa használatával). A nagy intenzitású megvilágításhoz xenon-ívlámpát (XBO 100W OFR xenon short arc, Osram Gmbh, Augsburg, Németország) használtunk (17.ábra). A mérés során váltakozó, 490 nm (pH függő) és 440 nm (pH független) hullámhosszúságú excitációs gerjesztési megvilágításokra adott 530 nm-es emissziós fluoreszcencia intenzitásokat detektáltuk fotoelektron sokszorozó és erősítő segítségével (Cairn Integra, Cairn Research, Faversham, Kent, Egyesült Királyság).

Az 5 másodpercenként felvett mérési adatpárok gyűjtését (Measurement Computing PCI-DAS 1000 analóg/digitális átalakító segítségével) grafikus ábrázolását, és a

hullámhosszváltó filter (Sutter Instruments Lamda 10-C, Novato, CA, USA) vezérlését a DASYLab szoftver (Measurement Computing, Norton, MA) segítségével végeztük.

Az intracelluláris pH-t a kétféle fluoreszcens jel hányadosából (F490/F440 ratio) számoltuk korrigálva a mérés végén Triton-X-100 expozícióval megállapított autofluoreszcenciával. A tényleges pH_i értékeket kalibrációval határoztuk meg (részletesen a következő alfejezetben).

4.3.1 Intracelluláris pH kalibráció

A tényleges pHi értékeket kalibrációval határoztuk meg a korrigált fluoreszcencia hányados (F490/F440 ratio) értékeket konvertálva a nigericin/magas-kálium módszerrel (Thomas és mtsai 1979) felvett kalibrációs egyenes segítségével. A nigericin egy ionofór, amely K^+ és H^+ ionokra áteresztővé teszi a sejtmembránt (K^+/H^+ antiport tulajdonság). Magas káliumtartalmú külső oldatot használva ($[K^+]_{in} = [K^+]_{out}$) a pH kiegyenlítődik az extracelluláris és intracelluláris tér között (pH equilibrium):

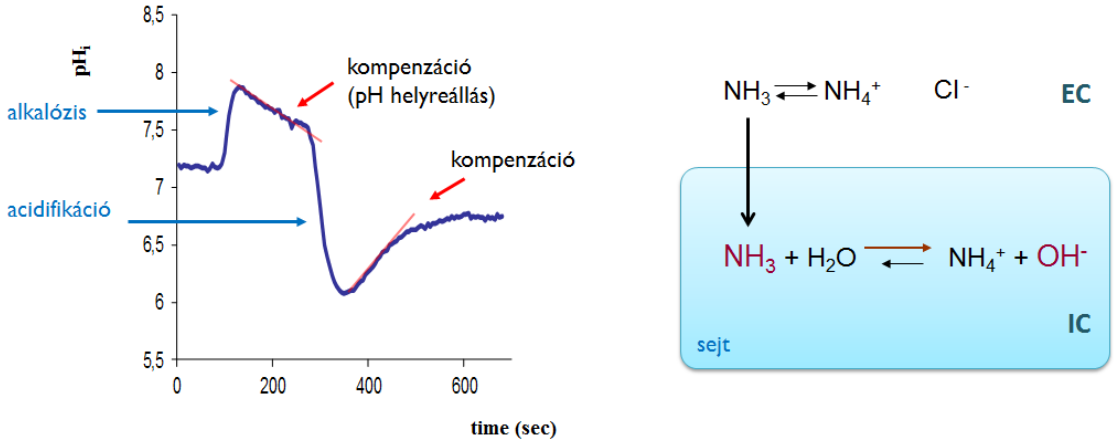
$$[K^+]_{in} / [K^+]_{out} = [H^+]_{in} / [H^+]_{out}$$

Ilyen módon, különböző pH értékekre beállított oldatokban mérve a sejtek BCECF fluoreszcenciáját (F490/F440 hányados) pH kalibrációs egyenes vehető fel, amely segítségével számolható a tényleges intracelluláris pH.

4.3.2 A mérésekhez használt technikai módszerek és oldatok, reagensek

A sejtek az intracelluláris pH-t szigorú keretek között szabályozzák, állandó értéken tartják, ezért a pH szabályozásért felelős transzporterek vizsgálatához egy, a pH homeosztázist drasztikusan megzavaró külső beavatkozást kell eszközölnünk, hogy így jelentős pH_i változást detektálhassuk, és a homeosztázis helyreállítására irányuló, beinduló kompenzációs mechanizmusok, transzporter aktivitások részvételét tanulmányozhassuk. A leggyakoribb módszerek a jelentős **intracelluláris savasodást/alkalizációt okozó reagensek alkalmazása** („acid/base loading”), vagy valamely, a transzportfolyamatok szempontjából fontos, gradienst meghatározó **ion**

(pl. Na^+, Cl^-) extracelluláris megvonása, ami az érintett transzporterek működését megakadályozza vagy transzport-irányukat megfordítja. Intracelluláris sav/bázis töltésre legtöbbször valamilyen magas szintű membrán permeabilitást mutató és vízben jól oldódó gázt (pl. NH_3 vagy CO_2), illetve az ezek vízben oldott és velük egyensúlyban levő formáit (NH_4Cl és $NaHCO_3$) használjuk (18.ábra). Ezek a citoszólba jutva gyenge savat/bázist képeznek, és kellően magas koncentrációban a citoszól hirtelen pH esését/emelkedését idézik elő (ammónium pulzus technika és HEPES/HCO_3^- váltás vagy prepulzus).



18.ábra: ***Az ammónium-pulzus technika során történő pHi változások szakaszai:*** *20mM NH_4Cl tartalmú külső oldat hatására jelentős intracelluláris alkalizáció, majd ennek megvonására savasodás történik a sejtekben az ammónia sejtmembránon keresztüli diffúziójának következtében. Az egyensúly kialakulása után lassú pHi kompenzációs szakaszok kezdődnek, melyek során a sejt transzporterei segítségével megpróbálja helyreállítani kibillent intracelluláris pH-ját. (saját ábra)*

A sejtek perfúziójához használt oldatok összetétele:

- **standard HEPES-pufferelt oldat** (mM): 137 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl2, 1 MgCl2, 10 D-glucose, és 10 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), egyensúlyba hozva, 100% O_2 gázzal buborékoltatva;
- **standard HCO_3^--tartalmú HEPES-pufferelt oldat** (mM): 116 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 5 KCl, 1 $CaCl_2$, 1 $MgCl_2$, 10 D-glucose, and 5 HEPES, egyensúlyba hozva egyensúlyba hozva, 5% CO_2 / 95% O_2 gázkeverékkel buborékoltatva.

- **Na^+ megvonáshoz** (5.1.1 és 5.1.2 alfejezetek) Na^+-mentes oldatot használtunk, ahol a megfelelő (bikarbonát-tartalmú vagy mentes) HEPES-pufferelt oldatban a Na^+-ot helyettesítettük ekvimoláris N-metil-D-glukaminnal (NMDG), amely szerves kation a sejtmembránra kvázi impermeábilis.
- **Cl^- megvonáshoz** (5.1.4 alfejezet) hasonlóan, a Cl^- -ot helyettesítettük ekvimoláris glukonáttal (Cl^--mentes oldat). Az összes oldat pH-ját 7,4-re (37°C-on) állítottuk be.

Az anion cserélők blokkolásához 100μM DIDS-et, a Na^+/H^+ cserélők gátlásához 300μM amiloridot, a Na^+- HCO^{3-} kotranszporter gátlásához 500μM H_2DIDS-et, és az NKCC gátlásához 100μM bumetanidot használtunk.

A **szekréciós transzportfolyamatok stimulálása** érdekében (5.2 alfejezet) 50μM ATP-t használtunk az intracelluláris kalcium-szint emelésére, míg 10μM forskolint és 500μM IBMX-et (3-isobutyl-1-methylxanthine) az intracelluláris cAMP-szint emelésére.

A reagenseket a Sigma (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) cégtől rendeltük, kívéve a H_2DIDS-et, a BCECF-AM indikátor festéket (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) és a nátrium-fluoridot (Molar Chemicals, Hungary).

4.4 Sejtéletképesség teszt

A sejtek életképességét a metabolikus aktivitásuk mérésével jellemeztük, amihez az alamarBlue reagenst (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) használtuk a gyártó protokolját figyelembe véve. A sejteket 96-lyukú (plate) sejttenyésztő lemezekre ültettük 10^4 sejt/lyuk („well”) sejtszámban, és a fluoridos kezeléseket 24 órával a kiültetés után kezdtük meg (5.3 alfejezet). Ekkor a médiumot a nátrium-fluorid különböző koncentrációival kiegészített médiumra cseréltük.

48 illetve 96 órás fluoridos kezelés után a sejtek metabolikus aktivitását az alamarBlue esszé segítségével teszteltük az (560 nm-es excitációra adott) 590 nm-en mért fluoreszcencia intenzitások egy Perkin-Elmer LS50B típusú lumineszcens spektrométerrel végeztük el. Mindegyik kezelést 6 paralell mérésben történt.

4.5 Kvantitatív RT-PCR vizsgálat

A szoros kapcsolati fehérjék expressziójának vizsgálatát kvantitatív real-time PCR módszerrel végeztük, hasonlóan a korábbiakban leírtakhoz (Bori és mtsai 2016, Hegyesi és mtsai 2015). Röviden leírva: teljes sejt RNS-t izoláltunk a kiültetés után 3 napon keresztül 0, 0,6, illetve 1 mM nátrium-fluorid tartalmú médiumban növesztett sejtekből a GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével, a gyári protokoll szerint. 1-2 µg teljes RNS-ből reverz transcripcióval cDNS-t írtunk a Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) felhasználásával, a mellékelt protokoll szerint.

A cDNS kvantitatív PCR amplifikációját az ABI StepOne készülékkel végeztük el a TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és előregyártott (predesigned) primer-ek (2. táblázat) felhasználásával.

Belső kontrollként az ún. acidic ribosomal protein P0-t (Rplpo) használtuk, és a ΔΔCt módszert használtuk a génexpresszió kvantifikálására az ABIPrism 2.3 szoftver segítségével. Mindegyik mintát 3 biológiai replikátum-ban/ párhuzamosban és 3 technikai paralellel/párhuzamosban mértünk le.

2. táblázat: A kvantitatív-PCR kísérlethez használt előregyártott primer-párok (forrás: Applied Biosystems, www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays.html)

Rövidítés	Fehérje	Katalógusszám (Applied Biosystems)
Tjp1	zonula okkludens-1	Rn02116071
Cldn1	klaudin-1	Rn00581740
Cldn4	klaudin-4	Rn01196224
Cldn8	klaudin-8	Rn01767199
Cldn16	klaudin-16	Rn00590884
Cldn19	klaudin-19	Rn01416537
Rplpo	acidic ribosomal protein P0	Rn00821065

4.6 Statisztikai analízis

A mérési adatokat mindenhol átlag ± SEM (az átlag standard hibája) formában adtuk meg. A vizsgálatok szignifikanciaszintjét 5%-ra választottuk ($\alpha = 0,05$). Statisztikai analízishez egyszempontos varianciaanalízist (one-way ANOVA) vagy ismételt méréses (összetartozó mintás) varianciaanalízist használtunk, Dunnett's post-hoc teszttel. Két csoport összehasonlításakor kétmintás t-próbát (unpaired) használtunk. Mivel transzepitél rezisztencia (TER) kísérletek SEM értékeiben nagy különbségek voltak, paraméteres eljárások használatát nem tette lehetővé, így a nem-parametrikus Kruskal-Wallis tesztet használtuk Dunn's post-hoc teszttel kiegészítve a TER értékek összehasonlításához.

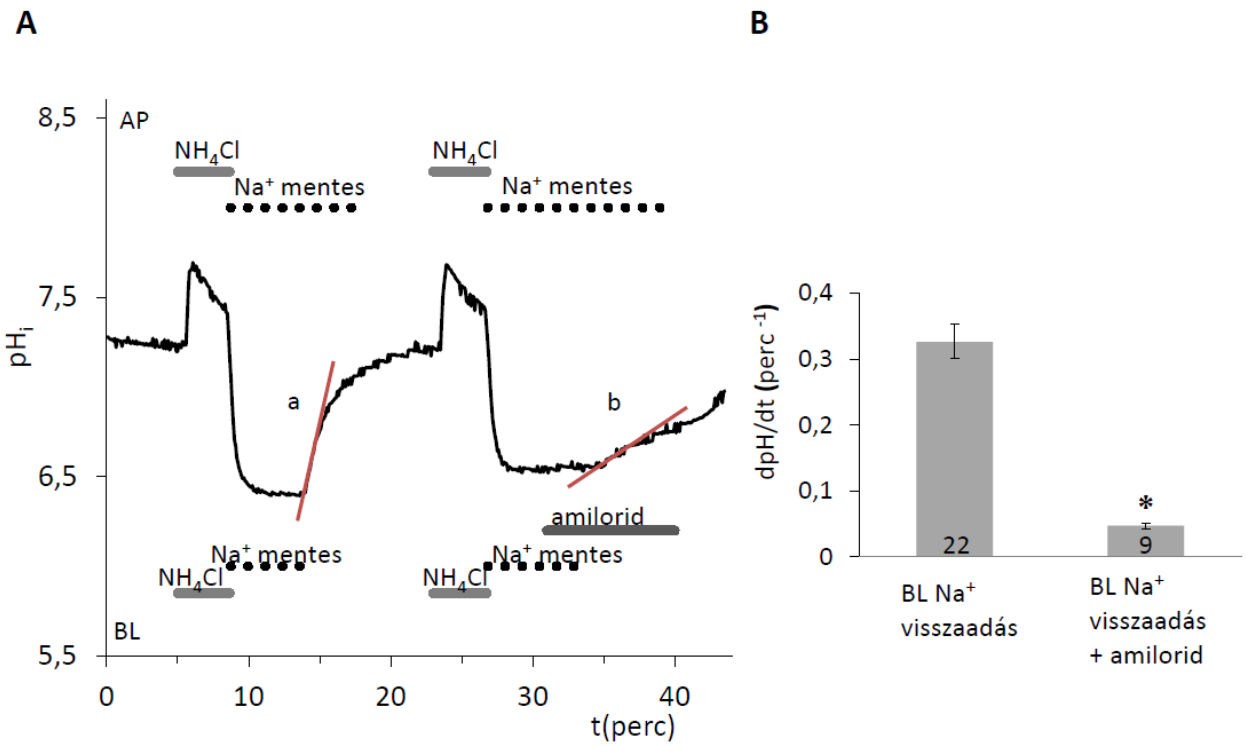
5. Eredmények

5.1 A HAT-7 sejtek intracelluláris pH szabályozásában szerepet játszó fő bazolaterális transzporterek aktivitása

2016-os közleményünkben bizonyítékkal szolgáltunk arra, hogy a Transwell membránon differenciált HAT-7 ameloblaszt sejtek polarizált, zárt sejtréteget alkotnak, és vektoriális, bazolaterális-apikális irányú bikarbonát transzportra képesek, de a pH szabályozásért felelős egyes transzporterek lokalizált aktivitását nem vizsgáltuk (Bori és mtsai 2016).

5.1.1 Nátrium-proton cserélő aktivitás

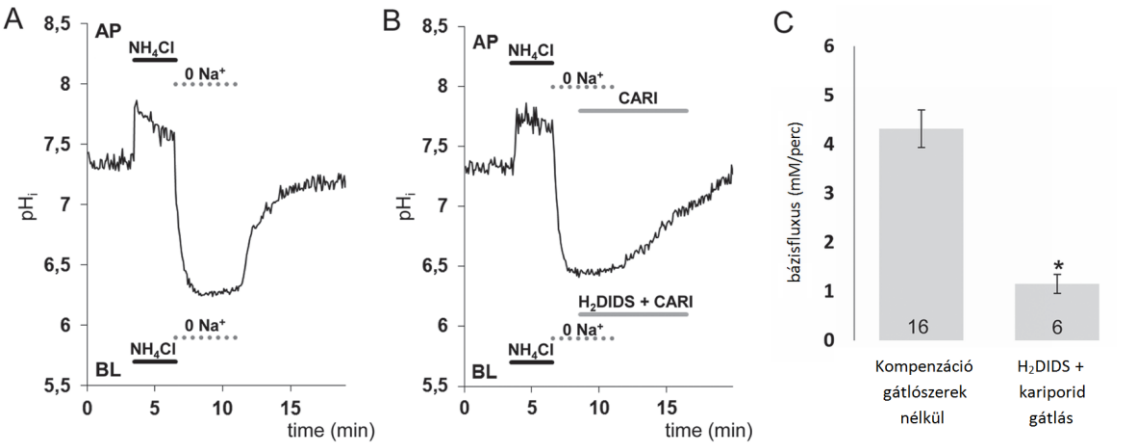
Az ammónium-pulzus technika (Boron és De Weer 1976), azaz 20mM NH_4Cl tartalmú mérőoldat rövid ideig tartó perfúziója segítségével jelentős intracelluláris acidifikációt érhetünk el a HAT-7 sejtekben, így a pH_i savterhelésből való helyreállásának sebességét mikrofluorimetriás módszerrel mérve vizsgálhatjuk a pH kompenzációban szerepet játszó transzportereket. **HCO_3^-/CO_2-mentes** HEPES oldatban vizsgálva, a külső Na^+ ionok mindkét oldali megvonása az ammónium pulzus után teljes mértékben blokkolta a sejtek pH_i helyreállítási képességét (19A ábra), ami arra utal, hogy Na-függő transzporterek felelősek az acidifikáció utáni pH emelkedésért. A Na^+ visszaadása a bazolaterális oldalon a pH_i gyors emelkedését, helyreállását okozta, ami 300µM amiloriddal nagymértékben gátolható volt (19A és 19B ábra), bazolaterális nátrium-proton cserélő aktivitásra utalva (nagy valószínűséggel a szekréciós epitélsejtek bazolaterális membránjában széleskörűen expresszálódó NHE1).



19. ábra ***A pH_i helyreállása HAT-7 sejtekben intracelluláris savterhelés után HCO_3^-/CO_2 hiányában. (A)*** *A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejteket bilaterálisan 20 mM NH_4Cl tartalmú oldattal, majd utána Na^+-mentes oldattal perfundáltuk (a Na^+ kationokat $NMDG^+$vel helyettesítettük). A külső Na^+ bazolaterális (BL) oldali visszaadását követően a pH_i teljes mértékű helyreállása (a) tapasztalható. A külső Na^+ bazolaterális (BL) oldali visszaadására a nátrium-proton cserélők gátlószere, az amilorid (300 µM) mellett a pH_i helyreállása (b) jelentősen gátolt marad.* ***(B)*** *Átlag dpH/dt ± SEM értékek, amelyek a Na^+ visszaadás utáni kezdeti pH_i emelkedés mértékéből lettek számolva, az inhibitor hiányában és jelenlétében (n = 9-22). *$p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva. (Racz és mtsai 2017)*

Az amilorid az NHE1 nem teljesen specifikus gátlószere, ráadásul több csatornát is gátolhat, többek között az ún. ENaC (epithelialis nátrium) csatornát (Masereel és mtsai 2003).

Az NHE1 izotípus jelenlétét erősíti, hogy egy erre az izotípusra nagyobb specifitással rendelkező inhibítor, a kariporid használatával szintén szignifikáns gátlást tudtunk kimutatni a Transwell membránon növesztett HAT-7 sejtek savterhelés utáni pH kompenzációs képességében (20.ábra).

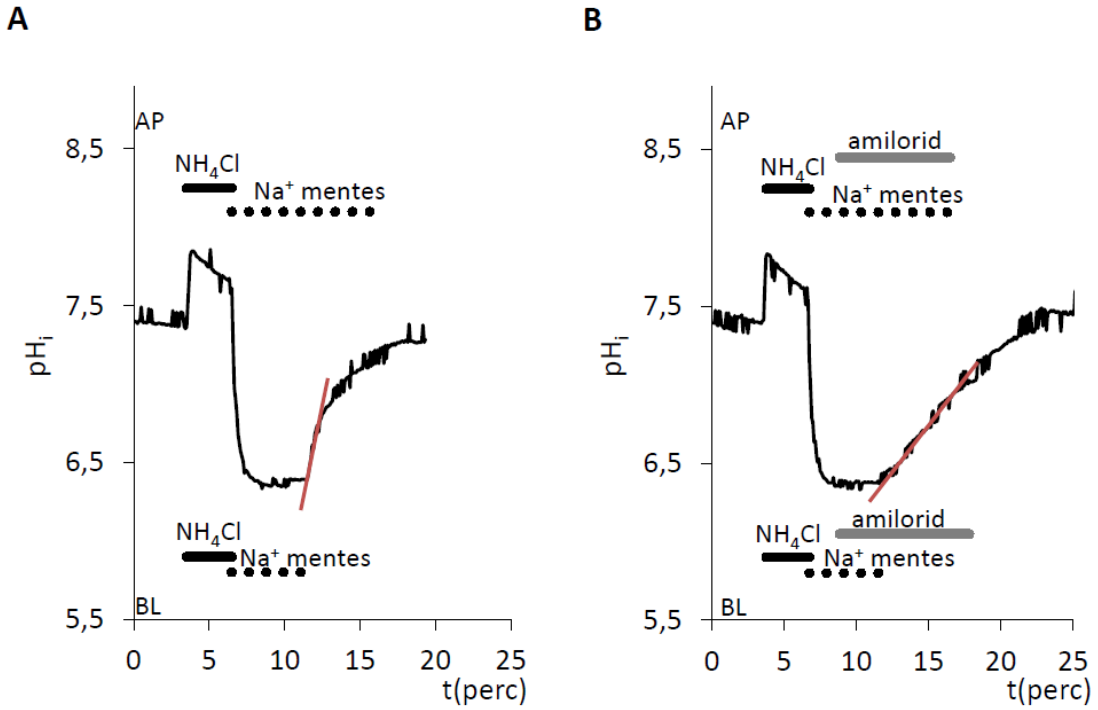


20. ábra ***A pH_i helyreállása HAT-7 sejtekben intracelluláris savterhelés után külső HCO_3^-/CO_2 jelenlétében.*** *A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejteket bilaterálisan 20 mM NH_4Cl tartalmú oldattal, majd utána Na^+-mentes oldattal perfundáltuk (a Na^+ kationokat $NMDG^+$-vel helyettesítettük).* ***(A)*** *A pH_i helyreállása a külső Na^+ bazolaterális visszaadására.* ***(B)*** *A külső Na^+ bazolaterális visszaadására a pH_i helyreállása jelentősen gátolt 10 µM kariporid mellett.* ***(C)*** *Átlag ± SEM értékek, amelyek a Na^+ visszaadás utáni kezdeti pH_i emelkedés mértékéből lettek számolva, az inhibitor hiányában és jelenlétében (n = 5-7). *$p < 0,05$ a kontrollhoz viszonyítva. (Bori és mtsai 2016)*

5.1.2 Nátrium-bikarbonát kotranszporter aktivitás

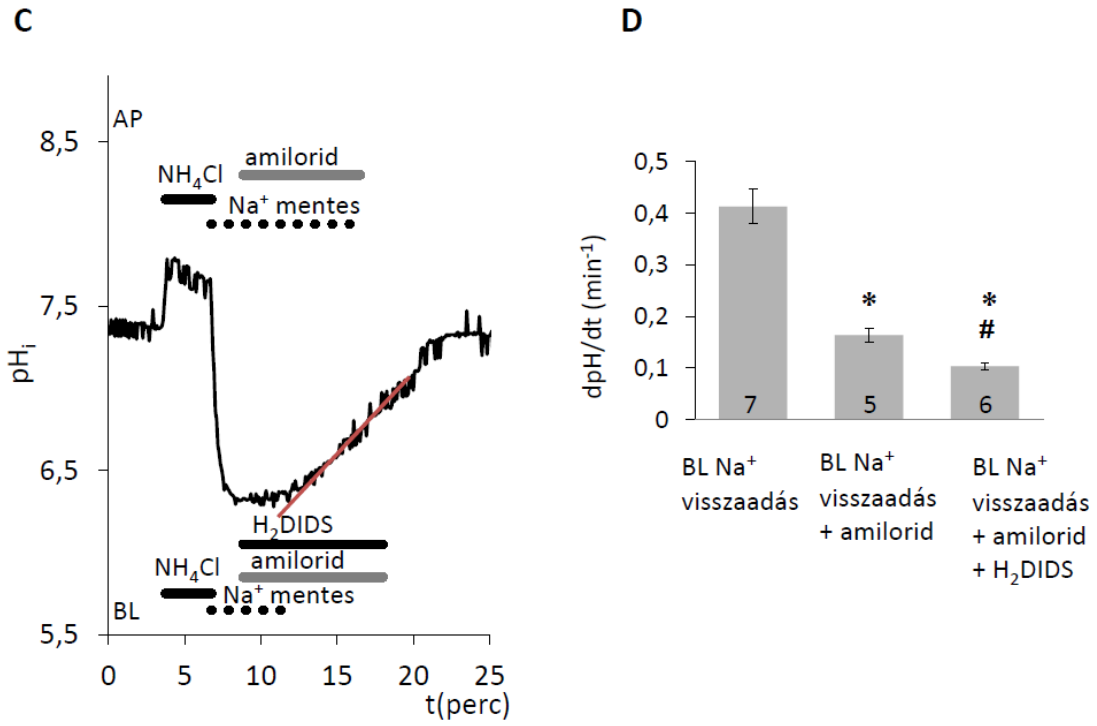
Az ammónium-pulzus technikát HCO_3^-/CO_2 tartalmú HEPES oldatban alkalmazva, az ammónium-pulzus (illetve savterhelés) utáni Na^+ kétoldali megvonása szintén gátolta a pH_i kompenzációját (21A ábra). Ez arra utal, hogy a pH szabályozásban résztvevő bikarbonát transzporterek Na-függőek, a nátrium-bikarbonát kotranszporter NBCe1. A bazolaterális oldali Na^+ visszaadására gyors pH_i emelkedés történt (az acidózis kompenzációja), ami részlegesen gátolható volt 300µM amiloriddal (21B és 22D ábrák, $p < 0,05$ vs. kontroll), az NHE1 részvételét valószínűsítve. Mivel a HCO_3^-/CO_2 tartalmú HEPES oldatban az ammónium-pulzus utáni pHi kompenzációja ismételt mérésre szignifikánsan különböző volt, ezért itt nem volt lehetőség önkontrollos kísérletek végzésére (ez a mérés itt nincs feltüntetve). A kísérletek során az NHE

specifikus gátlószert az apikális oldalon is (mindkét oldalon) alkalmaztuk annak céljából, hogy egy esetlegesen aktiválódó ellenkező oldali aktivitás ne tudja kompenzálni a bazolaterális oldali gátlást.



21. ábra ***A pH$_i$ helyreállása HAT-7 sejtekben intracelluláris savterhelés után külső HCO$_3^-$/CO$_2$ jelenlétében.*** *A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejteket bilaterálisan 20 mM NH$_4$Cl tartalmú oldattal, majd utána Na$^+$-mentes oldattal perfundáltuk (a Na$^+$ kationokat NMDG$^+$-vel helyettesítettük).* ***(A)*** *A pH$_i$ helyreállása a külső Na$^+$ bazolaterális (BL) oldali visszaadására.* ***(B)*** *A külső Na$^+$ bazolaterális (BL) oldali visszaadására a pH$_i$ helyreállása jelentősen gátolt 300 µM amilorid mellett. (Racz és mtsai 2017)*

A bazolaterálisan adott nátrium-bikarbonát kotranszporter inhibitor H$_2$DIDS (500µM) a kompenzáció további szignifikáns gátlását eredményezte (22C és 22D ábrák, $p < 0,05$ vs. amilorid egyedül), tehát HAT-7 sejtekben az intracelluláris acidifikációt kiegyenlítő pH szabályozó mechanizmusokban mind az NBCe1 által közvetített bikarbonát felvételnek, mind az NHE1 által közvetített H+ leadásnak szerepe lehet.

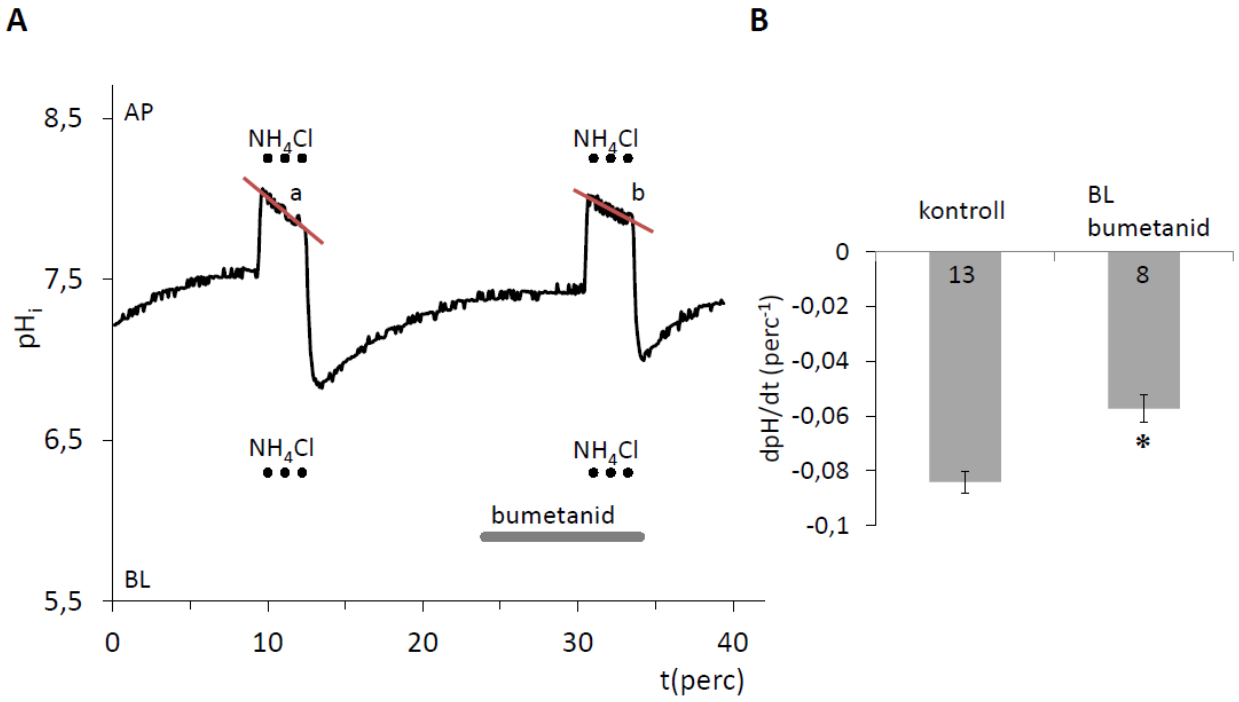


22. ábra ***A pH$_i$ helyreállása HAT-7 sejtekben intracelluláris savterhelés után külső HCO$_3^-$/CO$_2$ jelenlétében.*** *A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejteket bilaterálisan 20 mM NH$_4$Cl tartalmú oldattal, majd utána Na$^+$-mentes oldattal perfundáltuk (a Na$^+$ kationokat NMDG$^+$-vel helyettesítettük).* ***(C)*** *A bazolaterális (BL) Na$^+$ visszaadására történő pHi helyreállás további gátlódása, ha az amilorid mellett nátrium-bikarbonát kotranszporter gátló H$_2$DIDS (500 µM) is jelen van.* ***(D)*** *Átlag dpH/dt ± SEM értékek, amelyek a Na+ visszaadás utáni kezdeti pH$_i$ emelkedés mértékéből lettek számolva, az inhibitor hiányában és jelenlétében (n = 5-7). *p < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva, #p<0,05 a tisztán amiloridos gátláshoz viszonyítva. (Racz és mtsai 2017)*

5.1.3 Nátrium-kálium-klorid kotranszporter aktivitás

Az ammónium-pulzus technika alkalinizációs szakasza, azaz a 20 mM NH$_4$Cl-dal való expozíció alatt szintén megindul a sejtekben egy pH kompenzációs mechanizmus, amely pH$_i$ helyreállítódási folyamatért részlegesen az NH$_4^+$ felvétele, befelé irányuló transzportja is potenciálisan felelős lehet. Az NH$_4^+$ a sejtbe jutva egy H$^+$ ion leadásával így kismértékű pH csökkenéshez vezethet. Korábban leírták, hogy a nátrium-kálium-

klorid kotranszporter (NKCC1) a K^+ helyén képes NH_4^+ transzportjára is (Paulais és Turner 1992b). HCO_3^-/CO_2-mentes HEPES oldatban HAT-7 sejtekben az NKKC inhibitor bumetanid (100µM) bazolaterális alkalmazása (Shumaker és Soleimani 1999), szignifikánsan csökkentette az ammónium expozíció alatti lassú acidifikáció (pH_i kompenzáció) sebességét ($p < 0,05$, 23A-B ábra). Ez a NKCC1 jelenlétére utal HAT-7 sejtekben, ami konzisztens korábbi RT-PCR adatainkkal (Bori és mtsai 2016).



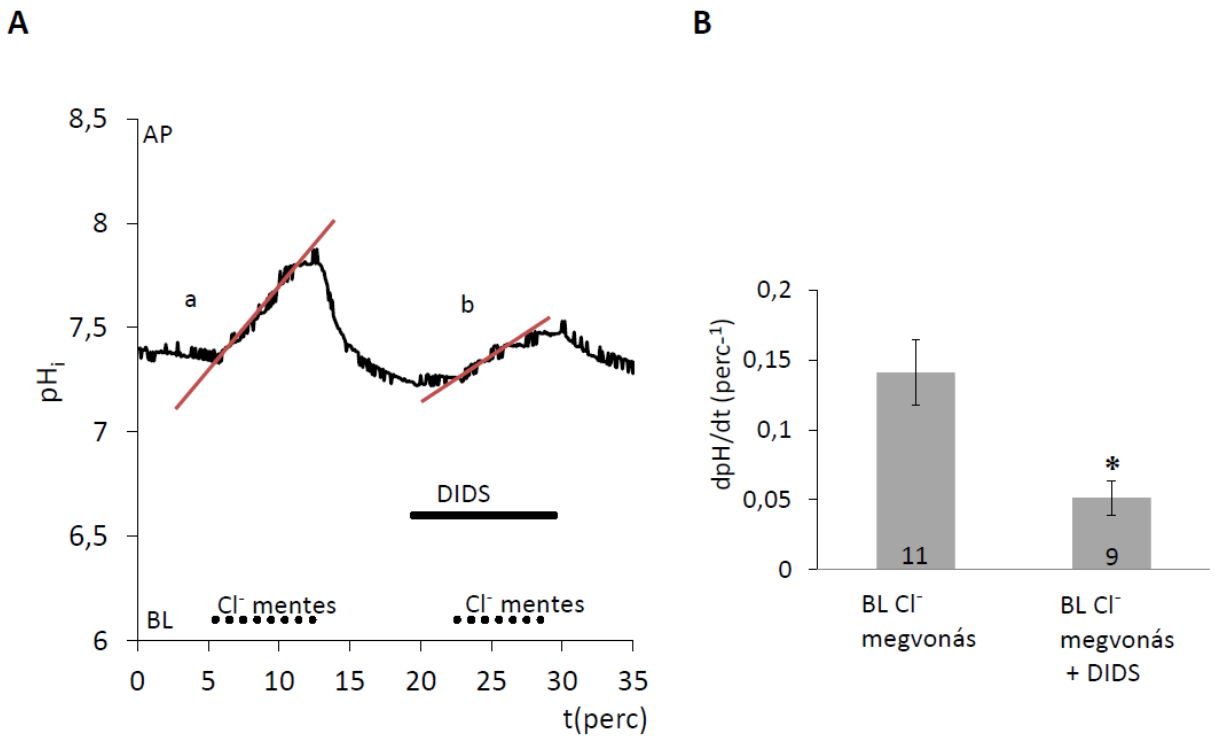
23. ábra ***A pH_i változás kompenzációja HAT-7 sejtekben intracelluláris alkalikus terhelés alatt HCO3-/CO2 hiányában. (A)*** *A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejteket bilaterálisan 20 mM NH_4Cl tartalmú oldattal perfundáltuk, aminek hatására jelentős intracelluláris alkalinizáció történt, majd egy lassú pH-kompenzációs folyamat (a) indult be. A pH_i kompenzáció gátlódása (b) figyelhető meg 100 µM bumetanid, az NKCC kotranszporter szelektív inhibitora bazolaterális (BL) adása mellett.* ***(B)*** *Átlag dpH/dt ± SEM értékek, amelyek a NH_4Cl expozíció és alkalinizáció utáni kezdeti pH_i csökkenés mértékéből lettek számolva, az inhibitor hiányában és jelenlétében (n = 8-13) *p < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva. (Racz és mtsai 2017)*

5.1.4 Anion-cserélő aktivitás

A közelmúltban napvilágot látott irodalmi adatok arra utalnak, hogy a zománc érése során fontos szerepe lehet az ameloblaszt sejtekben a bazolaterális oldali Cl^-/ HCO_3^- csere folyamatoknak (Lyaruu és mtsai 2008) feltehetően a pH szabályozásban és az anion szekrécióban betöltött funkciójuk nyomán. Ennek okán a bazolaterális anion cserélő aktivitást is vizsgáltuk HAT-7 sejtekben.

Extracelluláris Cl^- ionokat helyettesítve egy nem transzportált anionnal, a glukonáttal, a Cl^- ion megvonás okozta pHi változás monitorozásával jelentős emelkedést tapasztaltunk HAT-7 sejtekben (24A ábra).

A Cl^- ionok megvonása megfordítja a normál fiziológiás koncentráció gradienst a Cl^- -ra, így az Cl^-/ HCO_3^- cserélők (antiport) transzport iránya is megfordul (reverz módú működés). Tehát ha anion cserélők jelen vannak, a megfordult gradiens irányába történő Cl^- efflux egy gyors HCO_3^- beáramlással (felvétellel) párosul, ami egy mérhető pHi emelkedést eredményez. Ennek megfelelően a bazolaterális Cl^- megvonás HCO_3^-/CO_2 tartalmú HEPES oldatban egy szignifikáns pHi emelkedést okozott a HAT-7 sejtekben, ami szignifikánsan gátolhatónak bizonyult az anion cserélő inhibítor DIDS (100µM) ($p < 0.05$ vs. kontroll) alkalmazásával (24A-B ábra). Ez egy DIDS-érzékeny anion cserélő transzporter, valószínűleg az AE2 aktivitására, bazolaterális membránban való jelenlétére utal a HAT-7 ameloblaszt sejtekben.



24. ábra ***pH_i emelkedés HAT-7 sejtekben Cl^- ion megvonás folyamán külső HCO_3^-/CO_2 jelenlétében.*** *A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejteket bilaterálisan Cl^--mentes HCO_3^--tartalmú HEPES oldattal perfundáltuk (a Cl^- anionokat glutamát $^-$ -tal helyettesítettük).* ***(A)*** *A pH_i növekedése (a) nagy valószínűséggel külső HCO_3^- -beáramlásnak köszönhető. A külső Cl^- bazolaterális (BL) oldali visszaadására a pH_i helyreállása tapasztalható, azaz a pH_i visszatérése az alap szintre. A másodszori bazolaterális (BL) Cl^- visszaadásra történő pHi emelkedés jelentősen gátolt (b) a klorid-bikarbonát cserélő gátlószer DIDS (100 µM) jelenlétében.* ***(B)*** *Átlag dpH/dt ± SEM értékek, amelyek a Cl^- megvonás utáni kezdeti pH_i emelkedés mértékéből lettek számolva, az inhibitor hiányában és jelenlétében (n = 9-11). *p < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva. (Racz és mtsai 2017)*

5.2 Az akut fluorid expozíció hatása a HAT-7 sejtek bikarbonát szekréciójára

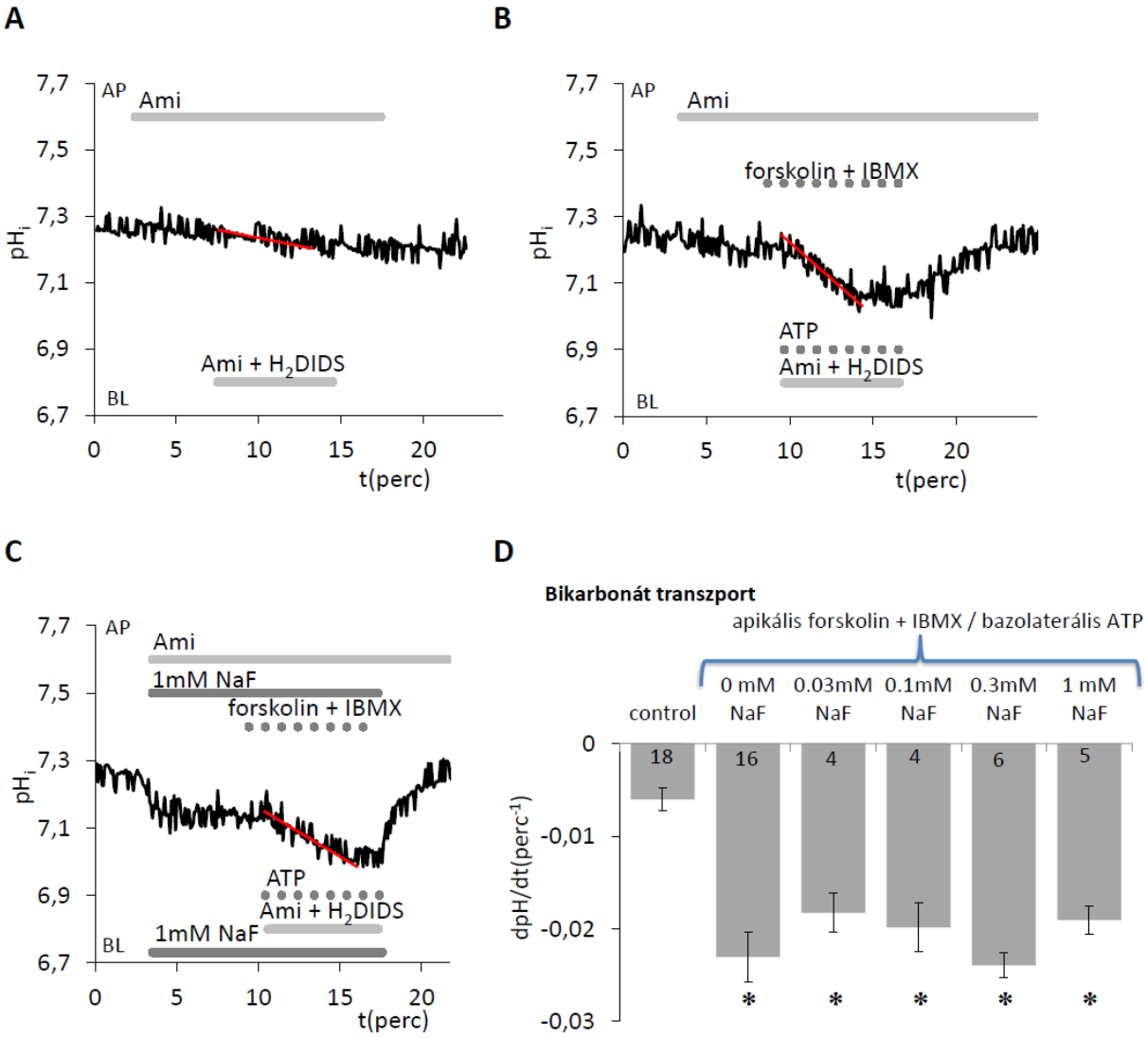
A sejtek szekréciójához elengedhetetlenek a bikarbonát intracelluláris akkumulációját eredményező folyamatok. Ezt alapvetően két fontos mechanizmus láthatja el: a bazolaterális membránon keresztüli direkt bikarbonát felvétel (az NBCe1 által megvalósított szimporton, mint a Na^+ gradiens hajtóerejét felhasználó másodlagosan aktív transzportfolyamaton keresztül), illetve a CO2 diffúziója a sejtekbe majd a szénsavanhidrázok katalizálta szénsav disszociációja HCO_3^- és H^+ ionokra, és ezt kísérően a H^+ ionok extrúziója (elsődlegesen a nátrium-proton cserélő NHE1 által megvalósított antiport folyamaton keresztül), amely szintén a bikarbonát ionok intracelluláris növekedését okozza.

A HAT-7 modellt leíró közleményünkben (Bori és mtsai 2016) leírtuk, hogy (egy bazális bikarbonát szekréciós folyamat megléte esetén,) ha a HCO_3^- felvételt a bazolaterális oldalon gátoljuk az NBCe1 és NHE1 transzporterek inhibítoraival a HAT-7 ameloblaszt sejtekben, a folytatódó apikális HCO_3^- efflux egy lassú intracelluláris acidifikációhoz (H^+ többlet) vezet.

Ez az alap szekréció jelentősen fokozható Ca^{2+}- és cAMP-mobilizáló stimulátorokkal; ATP, forskolin és IBMX szimultán alkalmazásával az intracelluláris acidifikáció nagyfokú növekedését tapasztaltuk a Transwell membránon növesztett HAT-7 sejtekben (Bori és mtsai 2016).

Ezt a stimulált HCO_3^- szekréciót jellemző kezdeti acidifikációs rátát használtuk annak tesztelésére, hogy vajon az akut fluorid expozíció közvetve vagy közvetlenül hatással van-e a vektoriális bikarbonát transzportra HAT-7 sejtekben.

Eredményeink azt mutatják, hogy a fluorid, a 0,03–1 mM koncentráció tartományban akut módon adva nem volt hatással az 50μM ATP, 10μM forskolin, és 500μM IBMX együttes adásával stimulált bikarbonát szekrécióra. (25A-D ábra).



25. ábra ***A fluorid hatása az ATP- és forskolin-stimulált HCO_3^- szekrécióra a HAT-7 sejtes modellben*** *A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejtek bazolaterális HCO_3^- felvételét 500 µM H_2DIDS és 300 µM amilorid (Ami) szimultán bazolaterális (BL) adásával gátoltuk. Az (esetleges) apikális NHE aktivitás gátlására az amilorid inhibítort apikálisan (AP) is alkalmaztuk. Reprezentatív pH_i görbék* ***(A)*** *nem-stimulált kontroll körülmények között,* ***(B)*** *ATP (50 µM), forskolin (10 µM) és IBMX (500 µM) által stimulált sejtekben, és* ***(C)*** *1 mM nátrium-fluoriddal előkezelt ATP-forskolin-IBMX stimulált sejtekben.* ***(D)*** *Átlag dpH/dt ± SEM értékek, amelyek a inhibitorok adása utáni kezdeti pH_i esés mértékéből lettek számolva, nem-stimulált (kontroll) sejtekben, ATP-forskolin-IBMX stimulált és különböző koncentrációjú nátrium-fluoriddal előkezelt sejtekben (n = 4-18). *p < 0,05 a kontrollhoz viszonyítva. (Racz és mtsai 2017)*

5.3 A fluorid hatása a HAT-7 sejtek életképességére, transzepitél rezisztenciája és a szoros kapcsolati fehérjék génkifejeződésére

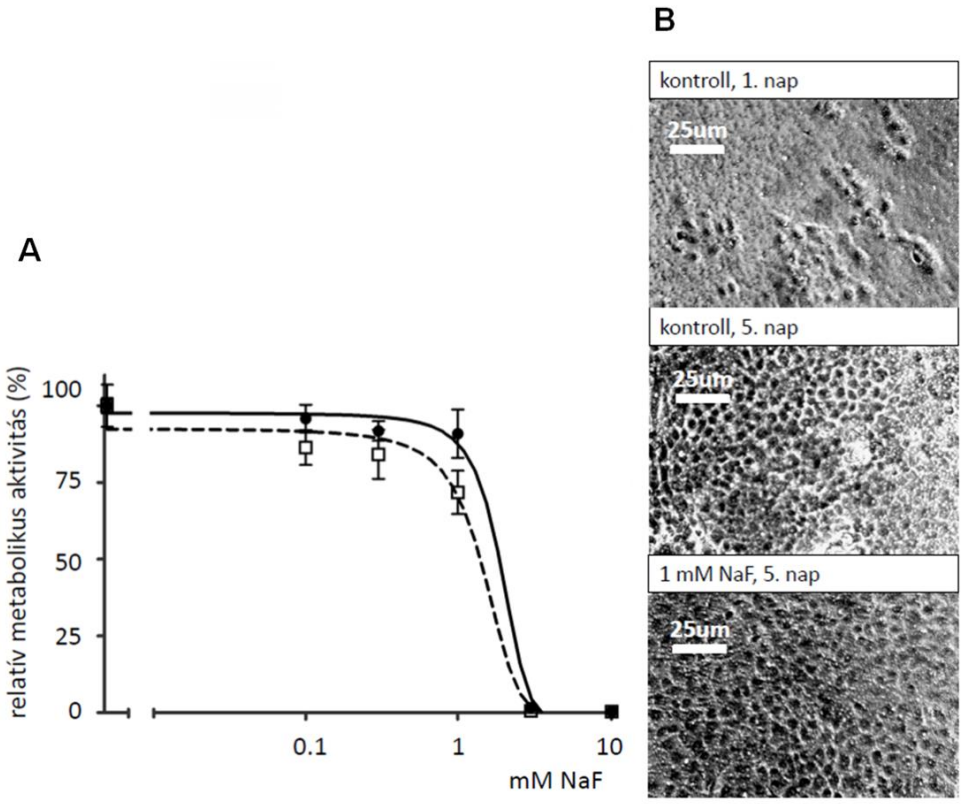
A nátrium-fluorid citotoxikus hatásait az AlamarBlue életképesség teszttel vizsgáltuk. A vizsgálatok azt mutatták, hogy a fluorid a HAT-7 sejtek metabolikus aktivitását nem zavarta 0,6 mM koncentrációig (26A ábra), míg 1 mM fluorid kezelés kis mértékben csökkentette, de nem bizonyult citotoxikusnak (nem akadályozta a sejtek növekedését). A sejtek 1 mM fluoridkoncentráció mellett is benőtték a membránok felületét. Ezzel szemben 3 mM fluorid toxikusnak bizonyult, már 48 óra után elpusztítva a sejteket.

A szoros sejtkapcsolatok (tight junctions, TJ) megfelelő kialakulása elengedhetetlen a szekréciós epitélsejtek, és ugyanúgy az ameloblaszt sejtek polarizációjához és differenciálódásához is (Bartlett és Smith 2013), ami az apikális és bazolaterális térfelek elválasztásával egy intercelluláris barriert képezve lehetővé teszi a transzepiteliális iongradiens kialakulását.

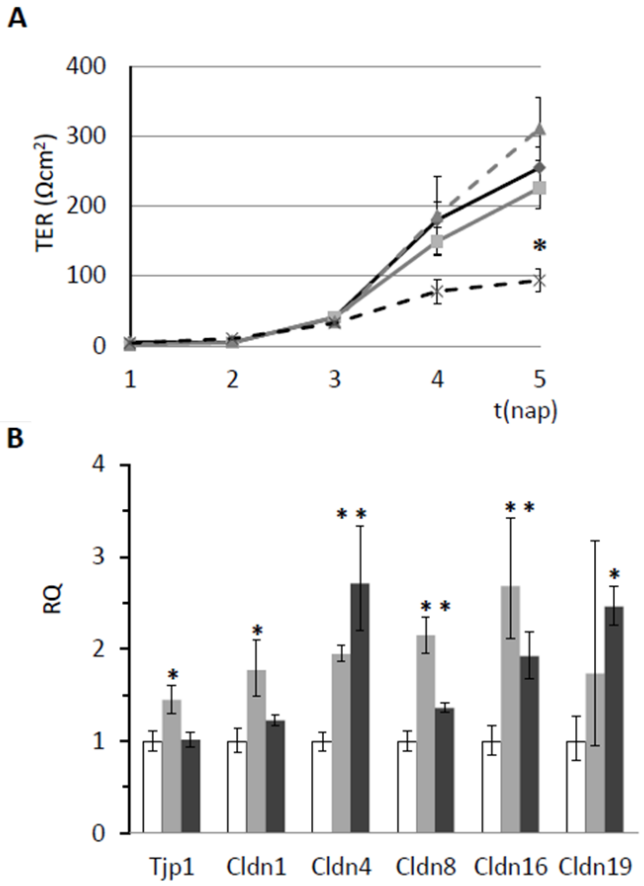
A szoros kapcsolatok kialakulását és a sejtek polarizációját folyamatosan követtük 5 napon át, naponta mérve a Transwell membránon tenyésztett HAT-7 sejtek transzepitél elektromos rezisztenciáját (TER) mialatt különböző koncentrációjú nátrium-fluorid tartalmú médiumokban differenciáltattuk őket. 3-5 nap után a sejtek konfluens módon a membránok teljes felületét benőtték mind a kontroll, mind a nátrium-fluoriddal kezelt sejtek esetében 1 mM fluorid koncentrációig (fáziskontrasztos képek, 26B ábra).

Ez alatt a TER értékek elkezdtek emelkedni a TJ-k kialakulásának köszönhetően. Az 5 napos időszak alatt a TER növekedését nem befolyásolta szignifikánsan a 0,3-0,6 mM nátrium-fluoridos kezelés a kontrollhoz viszonyítva, míg 1 mM hatására a TER fejlődése jelentősen gátlódott ($p < 0,05$ vs. fluoridmentes kontroll, 27A ábra).

A szoros kapcsolati fehérjék expresszióját kvantitatív PCR módszerrel vizsgáltuk. Meglepetésre, a fluorid expozíció nem csökkentette a TJ-komplex legfontosabb tagjainak génkifejeződését, sőt egy kismértékű, de szignifikáns növekedés volt tapasztalható (27B ábra). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a fluorid nem a szoros kapcsolati fehérjék kifejeződését gátolja, mint inkább az összeszerelődésüket zavarja, vagy kikerülésüket akadályozza a sejtmembránba.



26. ábra ***A fluorid hatása a polarizált HAT-7 sejtréteg kialakulására és a sejtek életképességére. (A)*** *A nátrium-fluorid koncentráció-függő hatása a HAT-7 sejtek metabolikus aktivitására 48 órás (folyamatos vonal) és 96 órás (szaggatott vonal) kezelés után (n=6 mindegyik NaF koncentráció esetében).* ***(B)*** *Fáziskontraszt mikroszkópos képek a Transwell membránon kontroll médiumban növesztett 1 és 5 napos HAT-7 sejtekről, és az 1 mM nátrium-fluoridot is tartalmazó médiumban növesztett 5 napos HAT-7 sejtekről. (Racz és mtsai 2017)*



27. ábra ***A fluorid hatása a HAT-7 sejtréteg transzepitél rezisztenciájára és a szoros-kapcsolati fehérjék kifejeződésére. (A)*** *Az 5 napig Transwell membránon növesztett sejtek transzepitél elektromos rezisztenciájának (TER) változása nátrium-fluorid hiányában (telt fekete), illetve 0,3 mM (telt szürke), 0,6 mM (szürke szaggatott), 1 mM NaF (fekete szaggatott vonal) jelenlétében. Az 5 nap után 1 mM NaF tartalmú médiumban tenyésztett sejtek TER értékeiben szignifikáns különbség tapasztalható a kontrollhoz viszonyítva: *p < 0,05.* ***(B)*** *Kvantitativ RT-PCR mérések a szoros-kapcsolati (tight-junction) fehérjék Tjp1, Cldn1, Cldn4, Cldn8, Cldn16 and Cldn19 génjeinek kifejeződésének vizsgálatára, a mitokondriális Rplpo gén expressziójára normalizálva HAT-7 sejtekben, a fentiekben leírt kezelések után (n = 3 génenként). A génexpressziós változások 0,6 mM (szürke) és 1 mM (fekete) NaF kezelés után a kontrollhoz (fehér) viszonyítva: *p < 0,05; a hibakorlátok a 95% konfidencia intervallumokat jelzik. (Racz és mtsai 2017)*

6. Megbeszélés

6.1 A pH szabályozásában szerepet játszó fő bazolaterális transzporterek

A CO_2/HCO_3^- egyensúly fenntartásáért felelős fehérjéknek központi szerepe van az ameloblaszt sejtek egy nagyon fontos funkciójában; nevezetesen abban, hogy az extracelluláris pH-t megfelelően szabályozzák, ami a zománc mineralizációja során egy kiemelt jelentőséggel bíró feladatuk (Bronckers és mtsai 2016, Lacruz és mtsai 2010a, Lacruz és mtsai 2013b, Lacruz és mtsai 2012b). 2016-ban publikált tanulmányunk egyik fő megállapítása az volt, hogy a Transwell membránokon egyrétegben növesztett sejtek képesek az apikális-bazolaterális HCO_3^- szekrécióra (Bori és mtsai 2016). A továbbiakban szerettük volna megállapítani, hogy ehhez a sejtek milyen transzporter fehérjéket alkalmaznak.

A bikarbonát szekréciójához szükség van előzetesen a HCO_3^- citoszolikus felhalmozására különböző transzport mechanizmusok útján. Az ebben feltehetően kulcsszerepet játszó bazolaterális oldali sav/bázis transzporterek azonosítása céljából először megvizsgáltuk a sejtekben az intracelluláris pH helyreállási képességét savas terhelés után külső HCO_3^-/CO_2 hiányában.

Eredményeink szerint (19.ábra) a bazolaterális kompenzációs pH_i emelkedés Na^+-tól függő volt, és szinte teljesen blokkolta a bazolaterálisan adott amilorid, ami nátrium-proton cserélő jelenlétére utal a bazolaterális membránban. Az NHE1-specifikus kariporiddal elvégezve a mérést, hasonló mértékű gátlást kaptunk (20.ábra), ami az NHE1 transzporter jelenlétére utal. Ez összhangban áll azzal a megfigyeléssel, hogy a gasztrointesztinális rendszer (gyomor-bél traktus) különféle hámsejtjeinek szinte egyetemes tulajdonsága egy bazolaterálisan megjelenő **Na^+/H^+ cserélő** (általában az NHE1).

Fiziológiás körülmények között (HCO_3^-/ CO_2 jelenlétében) az NHE1 transzporter hozzájárul a bikarbonát felhalmozódásához a sejtekben, mivel elmozdítja a szénsav-anhidrázok által katalizált reakciót a HCO_3^- -ionok képződése felé azáltal, hogy a H^+-ionokat eltávolítja a sejtből (19.ábra). Ennek a mechanizmusnak a fontossága egyértelműen felismerhető más HCO_3^- szekretáló hámban, például a nyálmirigyekben és a hasnyálmirigyben (Steward és mtsai 2005).

A H^+ leadás mechanizmusa mellett a **Na^+-HCO_3^--kotranszporterek (NBC-k)** szintén hozzájárulhatnak a HCO_3^- citoszolikus akkumulációjához a sejtekben a HCO_3^- közvetlen felvételével. HAT-7 sejtes vizsgálatainkban a bazolaterális Na^+-HCO_3^--kotranszporter jelenlétét HCO_3^-/ CO_2 jelenlétében végzett savas terheléses kísérletekben mutattuk ki (21.és 22.ábra).

A pH_i helyreállása savterhelés után Na^+-tól függő volt, és csak részben gátolta az amilorid (21.ábra). Az amilorid és a H_2DIDS inhibitorok egyidejű alkalmazása szignifikánsan nagyobb gátlást eredményezett, ami arra utal, hogy egy bazolaterális NBC transzporter is hozzájárul az intracelluláris HCO_3^- utánpótláshoz (22.ábra).

Továbbá, amikor az NHE aktivitást HCO_3^--mentes (HEPES-pufferelt) közegben mértük, a pH_i visszatérés sebessége az acidózisból (kontroll) és annak NHE-inhibitorral való gátlása lényegesen alacsonyabb volt, mint a HCO_3^- -tartalmú közegben mért visszatérés és gátlása, utalva egy NHE-független mechanizmus létezésére (19. vs 21.ábra).

Ezek az adatok összhangban állnak a HAT-7 sejtekben végzett RT-PCR-vizsgálataink eredményeivel az NBCe1 expressziójára vonatkozóan (Bori és mtsai 2016), és a szakirodalomban megjelent, a közép stádiumú érési fázisú ameloblaszt sejtekre vonatkozó szövettani adatokkal is (Jalali és mtsai 2015). Az NBCe1 bazolaterális lokalizációja ezekben az ameloblaszt sejtekben hasonló, mint amit patkány (Zhao és mtsai 1994) és tengerimalac hasnyálmirigy-duktusz sejtekben (Ishiguro és mtsai 2000), valamint patkány (Gresz és mtsai 2002) és tengerimalac nyálmirigyek szekréciós hámsejtjeiben leírtak (Li és mtsai 2006).

Szekréciós hámokban a HCO_3^- transzport folyamatok végrehajtásához általában a **klorid-ionok** megfelelő transzportjára, szabályozására is szükség van (Demeter és mtsai 2009a), és ezek nagy valószínűséggel a zománcképződés során is hasonlóan fontos szerepet játszanak - minden jel szerint nélkülözhetetlenek az pH-modulációban is (Bronckers 2017). Egy erős, pozitív korreláció mutatható ki a zománcmátrix állomány kalcium- és a klorid-tartalom változásai között a zománcérés és az ameloblaszt moduláció ciklikus folyamatai alatt. A normál értéknél alacsonyabb Cl^- tartalom hypomineralizációhoz vezet (Bronckers és mtsai 2015). Az a megfigyelés is

sokatmondó, hogy a CFTR-null és az AE2-null egerek zománcszerkezetükben erősen zavart fenotípusokat mutatnak (Bronckers és mtsai 2015, Sui és mtsai 2003).

Igen lényeges kritérium, hogy a Cl^- ionoknak először intracellulárisan kell felhalmozódniuk a sejtekben, annak érdekében, hogy az apikális membránon keresztül szekretálódhassanak. A Cl^- ionok felvételét biztosítani képes transzportfehérjék egy csoportja a nátrium-kálium-klorid kotranszporterek (NKCC-k).

Az **NKCC**-k olyan elektroneutrális szimporterek, amelyek a Na, K és Cl^- ionokat a sejtbe juttatják szekunder aktív transzport útján. Az NKCC aktivitás mikrofluorometriával (az ammónium-pulzus technikával) kimutatható, mivel a transzporter képes a K^+ helyett NH_4^+-ionokat bejuttatni a sejtbe (Paulais és Turner 1992b), és a gyengén savas NH_4^+ ionok mozgása pH változást okoz (proton donor), így detektálható. Kísérleteink során a polarizált HAT-7 sejtek NH_4Cl expozíciója alatt egy szignifikáns bazolaterális bumetanid-érzékeny pH_i csökkenést figyeltünk meg (23.ábra).

Ezért a transzporter (valószínűleg az NKCC1) feltehetően fontos szerepet játszik az ameloblaszt sejtek bazolaterális oldali Cl^- felvételében, hasonlóan ahogy számos más szekréciós epitéliumban is leírták, például a hasnyálmirigy ductalis Capan1 és a HPAF sejtvonalban (Demeter és mtsai 2009a, Szucs és mtsai 2006), valamint nyálmirigy acinaris sejtvonalban, a ParC10-ben (Demeter és mtsai 2009b), ahol a Cl^- -szekréció nagyban függ a bazolaterális NKCC1 aktivitástól (Melvin és mtsai 2005, Paulais és Turner 1992a). Eredményünk az első funkcionális bizonyíték arra, hogy az NKCC1 szerepet játszhat az ameloblasztok Cl^- akkumulációjában. Ez azonkívül azzal az újabb immunhisztokémiai megfigyeléssel is összecseng, mely szerint a papilláris sejtekben kifejeződik az NKCC1 az amilogenezis során (Jalali és mtsai 2017).

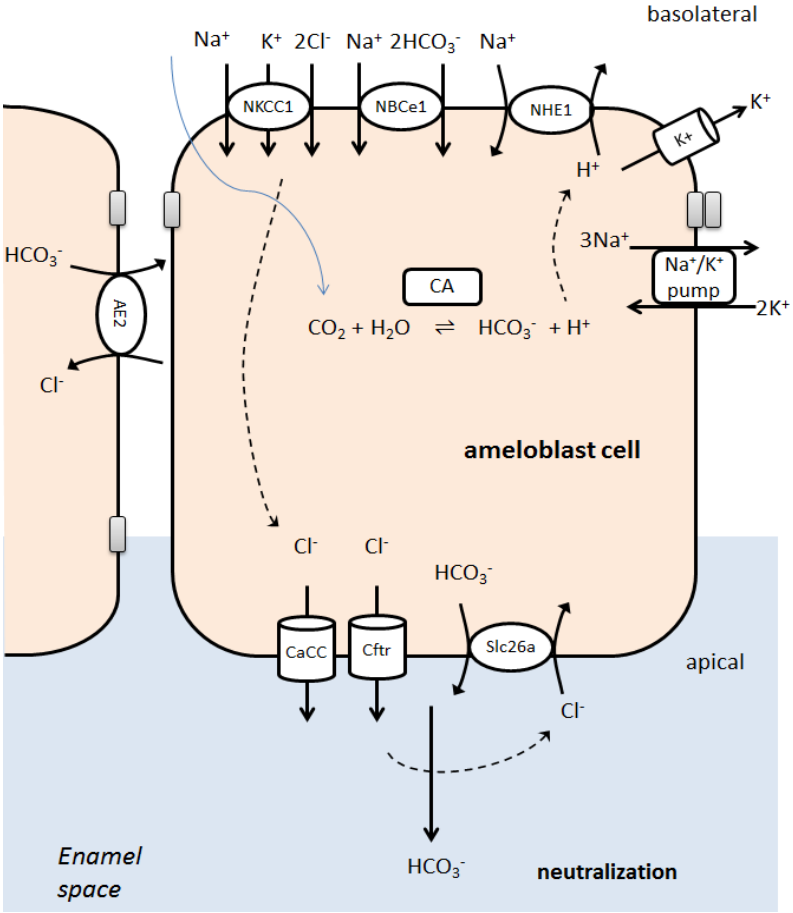
A bikarbonát transzporterek másik fő csoportja **az anion-cserélők (AE)**. Az Slc4 fehérjecsalád Na^+-független anion-cserélő tagjai a Cl^- és HCO_3^- ionok elektroneutrális cseréjét valósítják meg a citoszól és extracelluláris tér között.

Cl^- ion szubsztitúciós kísérleteink szerint a HAT-7 sejtek bazolaterális membránjában funkcionális Cl^-/HCO_3^- -cserélő aktivitás detektálható, amit a DIDS inhibitor gátló hatása is megerősített (24.ábra). Ez az ioncserélő valószínűleg az AE2 transzporter, amelynek expresszióját polarizált HAT-7 sejtjeinkben immunocitokémiával is

detektáltuk (Bori és mtsai 2016), és amely transzporter a legtöbb epithelialis sejt bazolaterális membránjában valóban expresszálódik (Romero és mtsai 2004).

A nyálmirigy acinus sejtekben például a bazolaterális Cl^-/HCO_3^-–cserélő az iontranszport-mechanizmusok egy lényeges eleme, amely egy fontos kiegészítő útvonalat biztosít a Cl^- ionok elektrokémiai gradienssel szemben történő intracelluláris akkumulációjához (Demeter és mtsai 2009b, Melvin és mtsai 2005).

Az AE transzporterek ilyen bazolaterális elhelyezkedése a patkány eredetű HAT-7 sejtekben összhangban van korábbi irodalmi adatokkal is, melyekben immunhisztokémiai vizsgálatokkal kimutatták az AE2 bazolaterális kifejeződését egerek érési fázisú ameloblaszt sejtjeiben (Lyaruu és mtsai 2008, Lyaruu és mtsai 2014).



28. ábra: Az eredményeink alapján feltételezett modell az ameloblaszt sejtek pH szabályozását befolyásoló és bikarbonát szekrécióját lehetővé tevő transzport folyamatokról (magyarázat a szövegben). (saját ábra)

6.2 Akut nátrium-fluorid hatása a bikarbonát szekrécióra

Jól ismert jelenség, hogy bizonyos, nagy dózisú **fluorid-expozíció** a fogfejlődés alatt gátolja a zománcképződést, és hipomineralizált zománc kialakulásához vezet (Bronckers és mtsai 2009a, Denbesten és mtsai 1985, Smith és mtsai 1993). A pontos mechanizmus nagyrészt még ismeretlen, valószínűleg a dózistól és az ameloblasztok érési stádiumától függően egyszerre több tényező is hozzájárulhat a jelenség kialakulásához. A fluorid befolyásolhatja az ameloblaszt sejtek ionszekrécióját, illetve az ameloblasztok olyan különböző fejlődési és funkcionális állapotait, amelyek nincsenek közvetlen összefüggésben az ionszekrécióval, továbbá a fluorid közvetlenül is hatással lehet a mineralizáció egyes fizikai eseményeire/történéseire.

Az első lehetőség teszteléséhez azt vizsgáltuk, hogy a fluorid expozíció befolyásolja-e a HAT-7 sejtek transzcelluláris HCO_3^- szekrécióját. 2016-os közleményünkben (Bori és mtsai 2016) kimutattuk, hogy a HAT-7 sejtek képesek HCO_3^- ionokat felvenni a bazolaterális membránon keresztül, majd ezután apikálisan szekretálni. Jelenlegi adataink egyértelműen azt mutatják, hogy a fluorid egy széles koncentráció-tartományban való akut expozíciója nem okoz változást a HAT-7 sejteknek a bazolaterális HCO_3^- felvétel blokkolásával kiváltott acidifikációjának sebességében (25.ábra). Ezek az adatok arra utalnak, hogy a fluoridnak nincsen akut gátló hatása az HCO_3^- szekrécióra, mely folyamat a mineralizáció zavartalan teljesülésében kulcsfontosságú lehet, annak egyik alapvető követelménye (Varga és mtsai 2018).

6.3 A nátrium-fluorid hatása a HAT-7 sejtek szoros kapcsolatainak kialakulására

A fluorid ameloblaszt sejtek szorosan zárt egysejt-rétegének kialakulására és funkciójára gyakorolt hatásának vizsgálata érdekes, nem várt eredményeket hozott. Az alacsony koncentrációktól 1 mM-ig terjedő mennyiségű fluorid alkalmazása nem okozott változást vagy csak nagyon kis változást eredményezett a HAT-7 sejtek életképességében (26A.ábra). 1 mM koncentráció még nem bizonyult citotoxikusnak, azaz a sejtek 1 mM fluoridkoncentráció mellett is benőtték a membránok felületét (26B.ábra). A fluoridkoncentráció 3 mM-ra történő növelése azonban a sejtek szinte teljes pusztulását eredményezte (26A.ábra), függetlenül az expozíció idejétől (2-5 nap). Eredményeink összhangban állnak a HAT-7 sejteken (Zhang és mtsai 2016) és egér

LS8 ameloblaszt sejtvonalakon más csoportok által végzett legutóbbi megfigyelésekkel (Kubota és mtsai 2005, Sharma és mtsai 2008, Zhang és mtsai 2006).

Ezek a vizsgálatok együttesen arra utalnak, hogy az ameloblasztok túlélését a mikromoláris tartományban alkalmazott fluorid nem érinti komolyan egészen a millimoláris koncentrációig, de a fluoridkoncentráció további növelése gyors sejtpusztulást eredményez már egy nagyon szűk koncentrációs tartományban is.

A sejtréteg elektrolitokkal szemben mutatott permeabilitását vizsgálva azt az érdekes eredményt kaptuk, hogy a fluorid a transzepitél rezisztencia kialakulását késleltette a polarizált HAT-7 sejtekben a citotoxikus szint alatti dózisban (27A.ábra). Ez a megfigyelés a szoros sejtkapcsolatok kiépülésének gátlódására utal modellünkben. Feltételeztük, hogy a szoros kapcsolatok kialakulásának késése a szoros kapcsolati fehérjék expresszió változásának következménye lehet. Így a **Tjp1, Cldn1, Cldn4, Cldn8** fehérjék génexpressziós változásait is megvizsgáltuk, ugyanis korábban kimutattuk, hogy ezeknek a fehérjéknek az expressziós profiljai bizonyos kapcsolatot mutatnak a TER fejlődésével normál körülmények között a HAT-7 sejtekben (Bori és mtsai 2016). Megvizsgáltuk a **Cldn16** és **Cldn19** fehérjék expresszióját is, mivel a közelmúltban kimutatták ezen fehérjéknek a fontos szerepét az ameloblaszt sejtek szoros kapcsolatainak kialakulásában. A Cldn16 és Cldn19 fehérjék mutációja hypercalciuriával és nephrocalcinosissal társuló familiáris hypomagnesaemiát és amelogenesis imperfectát okoz (Bardet és mtsai 2016, Yamaguti és mtsai 2017). Meglepetésünkre a fluorid expozíció egyáltalán nem gátolta a Tjp1, Cldn1, Cldn4, Cldn8, Cldn16 és Cldn19 junctionális komplex fehérje gének expresszióját (27B.ábra). Ehelyett mérsékelt, de szinifikáns növekedést figyeltünk meg kifejeződésükben. Ezek az adatok arra utalnak, hogy a fluorid strukturális szinten (sejtmembránba kerülésükben, összeszerelődésükben) akadályozza a szoros sejtkapcsolatok kialakulását, nem pedig fehérje alkotórészeinek expresszióján keresztül.

A szoros sejtkapcsolatok kialakulásának összetett mechanizmusát illetően bizonyos jelátviteli útvonalak és jelátviteli fehérjék több típusának fontos szerepét is valószínűsítik. A fluorid-érzékeny RhoA-ROCK jelátviteli útvonal például

kulcsszerepet játszik az epithelialis sejtpolarizáció kialakulásában, annak szabályozásában az ameloblaszt sejtekben, illetve az ameloblasztok sejtkapcsolati struktúráinak és adhéziójának kialakulásában (Otsu és Harada 2016). A RhoA-ROCK jelpálya közvetlen szabályozni képes az E-cadherin expressziót (Xue és mtsai 2013), amely egy alapvető eleme a szoros sejtkapcsolatok kialakulásának (Matter és Balda 2003). A közeljövő tanulmányainak kell még tisztáznia, hogy ezek a mechanizmusok valóban összekapcsolódnak-e egymással. Ez az irányvonal különösen fontos, mivel jelen dolgozatunk egyik fő korlátozása annak pontos tudásának a hiánya, hogy az általunk használt polarizált HAT-7 modell melyik amelogenezis stádiumot írja le leginkább. Ennek alaposabb jellemezése, különös tekintettel a szoros sejtkapcsolatok elhelyezkedésére, összetételére fehérje szinten, feltétlenül szükséges a jövőben.

A szoros sejtkapcsolatok késleltetett összeszerelődésére vonatkozó jelenlegi megállapításaink a dentális fluorózis kialakulásának egy alternatív vagy az eddigiek egy további kiegészítő magyarázatát adhatják. Adataink nem csökkentik az eddig feltételezett mechanizmusok fontosságát; mint például a mátrixfehérjék késleltetett eltávolítása a fluorózisos érési fázisú zománcban (Denbesten és mtsai 1985, Smith és mtsai 1993), az amelogeninek fokozott kötődése a magasabb fluorid-tartalmú hidroxiapatit kristályokhoz (Tanimoto és mtsai 2008), az ameloblaszt sejtek csökkent KLK4 expressziója (Suzuki és mtsai 2014a), a megnövekedett SATB1 tartalom és fokozott Gαq aktivitás (Zhang és mtsai 2014), továbbá az NCKX4 Ca^{2+}-transzporter csökkent kijutása az apikális membránfelszínre (Bronckers és mtsai 2017).

Bizonyos mértékig e mechanizmusok közül több is, vagy akár mindegyikük hozzájárulhat a hypomineralizációhoz a fluorid tényleges helyi koncentrációitól függően. Mindazonáltal a fluorid szoros sejtkapcsolatok kialakulásának késleltetésében feltételezett szerepe is nagy jelentőséggel bírhat, ha figyelembe vesszük az ameloblasztok szerkezeti és funkcionális változásainak ciklusait a zománcérés során. A fodros felszínű ameloblasztok ciklikusan sima végű ameloblasztokká alakulnak az amelogenezis érési folyamata során, és viszont. Patkányokban ez a ciklus körülbelül 8 óráig tart (Lacruz és mtsai 2017), amelynek során a sejtek kb. 4 óráig a fodros felszínű állapotban vannak, miután hirtelen a sima felszínű fenotípusra váltanak (kb. 2 óra

időtartamra). Ezután fokozatosan visszaépül a zománctér felé néző sejtmembrán fodros szegélye, és a szoros sejtkapcsolatok is áthelyeződnek proximális elhelyezkedésből disztálisra, azaz az apikális membrán közelében újra összeszerelődnek.

Ha a szoros sejtkapcsolatok szétszerelődése és összeszerelődése valóban olyan fontos, mint azt modellünk sugallja, „turnoverének" késedelme komoly következményekkel járhat az amelogenezis folyamatára. Mivel a jelen megfigyeléseket *in vitro* sejtmodellben nyertük, hipotézisünk csak előzetes, de úgy véljük, hogy a jelenség további vizsgálatokra érdemes. Meg kell azonban állapítanunk, hogy a polarizált HAT-7 sejtes modell további jellemezése is szükséges, és más sejtmodelleket, köztük humán ameloblaszt modelleket kell kidolgozni a fenti hipotézis érvényességének támogatására.

7. Következtetések

1) A Transwell membránon polarizált módon, egysejt-rétegben növesztett, ameloblaszt-jellegű HAT-7 sejtekben az intracelluláris pH-szabályozást befolyásoló, funkcionálisan aktív bazolaterális transzporterek azonosíthatóak.
   a) A sejtek bazolaterális oldalán Na^+-tól függő nátrium-proton cserélő aktivitás mutatható ki. A transzporter a protonok bazolaterális oldali leadásával a bikarbonát intracelluláris akkumulációját biztosíthatja az ameloblaszt sejtekben. Ez az aktivitás az izotípus-specifikus, szelektívebb kariporid gátlószerre is érzékeny, ami az NHE-1 izotípus funkcionális jelenlétére utal.
   b) Külső bikarbonát jelenléte mellett, az elektrogén nátrium-bikarbonát kotranszporter bazolaterális aktivitása is detektálható, amely mechanizmus a bikarbonát-ionok közvetlen transzportjához járulhat hozzá az ameloblaszt sejtekben.
   c) A sejtek bazolaterális oldalán a nátrium-kálium-klorid kotranszporter aktivitása is kimutatható, amely a klorid-ionok utánpótlását biztosíthatja az ameloblasztokban.
   d) Szignifikáns bazolaterális anion-cserélő aktivitása van a sejteknek, amely mechanizmus fontos eleme lehet az ameloblaszt sejtek pH szabályozásának.

2) A Transwell membránon növesztett HAT-7 sejtekben a fluorid akut expozíciója (egy széles koncentráció tartományban) nem befolyásolja szignifikánsan a sejtek stimulált bazolaterális-apikális irányú HCO_3^--szekrécióját, tehát a fluoridnak a szekrécióra feltehetően közvetlen nincs hatása.

3) A fluorid a mikromoláris tartományban (egészen 1 mM-ig) nincs komoly hatással a HAT-7 sejtek életképességére, de 3 mM koncentrációban már toxikusnak bizonyul. Ezek az adatok összhangban vannak más típusú ameloblaszt sejtek irodalmi adataival.

4) A még nem toxikus 1 mM fluorid késlelteti a Transwell membránon differenciált HAT-7 sejtek magas transzepiteliális elektromos rezisztenciájának kialakulását. Ez a szoros sejtkapcsolatok kialakulásának fluorid általi gátlódását jelzi. Ezzel ellentétben az 1 mM fluorid nem csökkenti (inkább kicsit növeli) a Tjp1, Cldn1, Cldn4, Cldn8, Cldn16 és Cldn19 szoros sejtkapcsolati fehérjék génexpresszióját HAT-7 sejtekben. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a fehérjekifejeződés helyett a fluorid összeszerelődésükben és/vagy membránba való transzlokációjukban akadályozhatja a szoros sejtkapcsolatok kialakulását, így munkánk további érdekes vizsgálati irányokat nyit a zománc fluorózissal kapcsolatos kutatásokban.

8. Összefoglalás

A zománcérés folyamatai hisztomorfológiai szinten jól ismertek, de a kristályképződés szabályozása, a háttérben álló molekuláris mechanizmusok még jórészt ismeretlenek. A magasan specializált ameloblaszt sejtek irányítják a zománcérést. A mátrixfehérjék szekrécióján és a zománcalkotó ásványi anyagok transzportján kívül a pH szabályozásnak is központi jelentősége van a zománcérés során, ugyanis a kristályképződés nagy mennyiségű H^+ felszabadulásával jár, amely semlegesítéséhez HCO_3^- szekréciója szükséges. Az érési fázis alatt kiemelt fontosságú a pH moduláció jelensége, amely során a szoros sejtkapcsolatok átrendeződése figyelhető meg. A transzport- és szabályozó folyamatok genetikai vagy környezeti sérülése (pl. dentális fluorózis) zománcfejlődési defektusok kialakulásához vezet. Ezen folyamatok felderítése céljából hoztunk létre egy funkcionális vizsgálatokra alkalmas 2D *in vitro* modellt. Ennek központi eleme a permeábilis membránra ültetett, differenciáltatott HAT-7 sejtek, egy patkány metszőfogból izolált sejtvonal. Az elmúlt években igazoltuk, hogy a sejtek a jellemző ameloblaszt markereket expresszálják, membránra ültetve szoros kapcsolatokat alakítanak ki, funkcionális szempontból polarizáltak, és vektoriális HCO_3^- szekrécióra képesek. Célul tűztük ki annak vizsgálatát, hogy az ameloblaszt sejtek milyen molekuláris mechanizmussal rendelkeznek a pH szabályozás és HCO_3^- transzport végrehajtására. Célul tűztük ki a fluorózishoz köthető néhány mechanizmus vizsgálatát is modellünkben: a fluorid közvetlen citotoxikus hatásait, hatását a szoros sejtkapcsolatok kialakulására, és közvetlen gátló hatását a vektoriális HCO_3^- transzportra.

pH mikrofluorometriával meghatároztuk a kulcsfontosságú, pH-szabályozást befolyásoló, a vektoriális HCO_3^- és Cl^- transzportot biztosító transzporterek aktivitását ezeken a sejteken. A nátrium-proton cserélő (NHE1), a nátrium-bikarbonát kotranszporter (NBCe1), a nátrium-kálium-klorid kotranszporter (NKCC), és az anion-cserélő (AE) bazolaterális aktivitását mutattuk ki a polarizált HAT-7 sejteken. Ezenkívül bizonyítékot szolgáltattunk arra, hogy akut módon a sejtek stimulált HCO_3^- szekrécióját nem befolyásolja a fluoridkoncentrációk széles skálája. A szoros kapcsolatok kialakulását azonban jelentősen késleltette 1 mM fluorid alkalmazása, amely koncentráció még nem rendelkezik jelentős citotoxikus hatással. Ellenben az 1 mM fluorid nem csökkenti (inkább kicsit növeli) a Tjp1, Cldn-1, Cldn4, Cldn8, Cldn16 és Cldn19 szoros sejtkapcsolati fehérjék expresszióját HAT-7 sejtekben, ami arra utal, hogy a fehérjekifejeződés helyett összeszerelődésükben vagy membránba való kihelyeződésükben akadályozhatja a szoros sejtkapcsolatok kialakulását. A fluorid ezen, eddig ismeretlen hatása az ameloblasztok egyik alapvető funkciójára fontos tényező lehet a dentális fluorózis kialakulásában.

9. Summary

The process of amelogenesis is well understood at the histomorphological level, but the regulation of crystal formation and the underlying molecular mechanisms are still largely unknown. Highly specialized ameloblast cells direct enamel maturation. In addition to the secretion of matrix proteins and the transport of minerals, pH regulation is also essential as the formation of hydroxyapatite crystals generates large quantities of H^+ ions, which must be neutralized by the secretion of HCO_3^-. During the maturation phase, the phenomenon of pH modulation is of paramount importance, during which a rearrangement of tight-junctions can be observed. Genetic or environmental impairment of transport and regulatory processes (e.g. dental fluorosis) leads to the development of enamel defects such as hypomineralized enamel. To explore these processes, we have developed a 2D *in vitro* model suitable for functional studies. Central to this model is the HAT-7 cell line, isolated from a rat incisor, which can be cultured to confluence on permeable supports. In recent years, we have demonstrated that HAT-7 cells express characteristic ameloblast markers, form tight junctions, are functionally polarized when grown on permeable supports, and are capable of vectorial HCO_3^- secretion. Our objective has been to use this model to investigate the molecular mechanisms responsible for pH regulation and HCO_3^- transport. We have also investigated some of the mechanisms associated with fluorosis in our model: the direct cytotoxic effects of fluoride, its effect on the formation of tight junctions, and its direct inhibitory effect on vectorial HCO_3^- transport. The localized activity of the key transporters mediating pH regulation and vectorial HCO_3^- and Cl^- transport were determined in HAT-7 cells by pH microfluorometry. Basolateral activities of a sodium-proton exchanger (NHE1), a sodium-bicarbonate cotransporter (NBCe1), a sodium-potassium-chloride cotransporter (NKCC1), and an anion exchanger (AE2) were detected in polarized HAT-7 cells. In addition, we obtained evidence that stimulated HCO_3^- secretion is not affected by an acute exposure to fluoride over a wide range of concentrations. However, the formation of tight junctions was significantly delayed by 1 mM fluoride, a concentration that does not itself have a cytotoxic effect. In contrast, 1 mM fluoride did not decrease (rather slightly increased) the expression of the tight-junction protein genes Tjp1, Cldn1, Cldn4, Cldn8, Cldn16 és Cldn19, suggesting that fluoride may impede the assembly of tight junctions or their translocation to the membrane rather than their expression. This hitherto unknown effect of fluoride on one of the essential features of ameloblasts may be an important factor in the development of dental fluorosis.

10. Irodalomjegyzék

Angmar-Mansson B, Whitford GM. (1984) Enamel fluorosis related to plasma F levels in the rat. Caries Res, 18(1): 25-32.

Anusavice KJ. (2005) Present and future approaches for the control of caries. J Dent Educ, 69(5): 538-554.

Aoba T. (1997) The effect of fluoride on apatite structure and growth. Crit Rev Oral Biol Med, 8(2): 136-153.

Arakaki M, Ishikawa M, Nakamura T, Iwamoto T, Yamada A, Fukumoto E, Saito M, Otsu K, Harada H, Yamada Y, Fukumoto S. (2012) Role of epithelial-stem cell interactions during dental cell differentiation. J Biol Chem, 287(13): 10590-10601.

Arquitt CK, Boyd C, Wright JT. (2002) Cystic fibrosis transmembrane regulator gene (CFTR) is associated with abnormal enamel formation. J Dent Res, 81(7): 492-496.

Babajko S, Jedeon K, Houari S, Loiodice S, Berdal A. (2017) Disruption of Steroid Axis, a New Paradigm for Molar Incisor Hypomineralization (MIH). Front Physiol, 8(343): 1-5.

Baggaley E, McLarnon S, Demeter I, Varga G, Bruce JI. (2007) Differential regulation of the apical plasma membrane Ca(2+) -ATPase by protein kinase A in parotid acinar cells. J Biol Chem, 282(52): 37678-37693.

Bardet C, Courson F, Wu Y, Khaddam M, Salmon B, Ribes S, Thumfart J, Yamaguti PM, Rochefort GY, Figueres ML, Breiderhoff T, Garcia-Castano A, Vallee B, Le Denmat D, Baroukh B, Guilbert T, Schmitt A, Masse JM, Bazin D, Lorenz G, Morawietz M, Hou J, Carvalho-Lobato P, Manzanares MC, Fricain JC, Talmud D, Demontis R, Neves F, Zenaty D, Berdal A, Kiesow A, Petzold M, Menashi S, Linglart A, Acevedo AC, Vargas-Poussou R, Muller D, Houillier P, Chaussain C. (2016) Claudin-16 Deficiency Impairs Tight Junction Function in Ameloblasts, Leading to Abnormal Enamel Formation. J Bone Miner Res, 31(3): 498-513.

Bartlett JD, Smith CE. (2013) Modulation of cell-cell junctional complexes by matrix metalloproteinases. J Dent Res, 92(1): 10-17.

Bazzoun D, Lelievre S, Talhouk R. (2013) Polarity proteins as regulators of cell junction complexes: implications for breast cancer. Pharmacol Ther, 138(3): 418-427.

Bello IO, Soini Y, Slootweg PJ, Salo T. (2007) Claudins 1, 4, 5, 7 and occludin in ameloblastomas and developing human teeth. J Oral Pathol Med, 36(1): 48-54.

Bori E, Guo J, Racz R, Burghardt B, Foldes A, Keremi B, Harada H, Steward MC, Den Besten P, Bronckers AL, Varga G. (2016) Evidence for Bicarbonate Secretion by Ameloblasts in a Novel Cellular Model. J Dent Res, 95(5): 588-596.

Boron WF, De Weer P. (1976) Intracellular pH transients in squid giant axons caused by CO2, NH3, and metabolic inhibitors. J Gen Physiol, 67(1): 91-112.

Bronckers A, Kalogeraki L, Jorna HJ, Wilke M, Bervoets TJ, Lyaruu DM, Zandieh-Doulabi B, Denbesten P, de Jonge H. (2010) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) is expressed in maturation stage ameloblasts, odontoblasts and bone cells. Bone, 46(4): 1188-1196.

Bronckers AL. (2017) Ion Transport by Ameloblasts during Amelogenesis. J Dent Res, 96(3): 243-253.

Bronckers AL, Guo J, Zandieh-Doulabi B, Bervoets TJ, Lyaruu DM, Li X, Wangemann P, DenBesten P. (2011) Developmental expression of solute carrier family 26A member 4 (SLC26A4/pendrin) during amelogenesis in developing rodent teeth. Eur J Oral Sci, 119 (Suppl 1): 185-192.

Bronckers AL, Jalali R, Lytton J. (2017) Reduced Protein Expression of the Na+/Ca2++K+-Exchanger (SLC24A4) in Apical Plasma Membranes of Maturation Ameloblasts of Fluorotic Mice. Calcif Tissue Int, 100(1): 80-86.

Bronckers AL, Lyaruu DM, Bervoets TJ, Medina JF, DenBesten P, Richter J, Everts V. (2012) Murine ameloblasts are immunonegative for Tcirg1, the v-H-ATPase subunit essential for the osteoclast plasma proton pump. Bone, 50(4): 901-908.

Bronckers AL, Lyaruu DM, DenBesten PK. (2009a) The impact of fluoride on ameloblasts and the mechanisms of enamel fluorosis. J Dent Res, 88(10): 877-893.

Bronckers AL, Lyaruu DM, Guo J, Bijvelds MJ, Bervoets TJ, Zandieh-Doulabi B, Medina JF, Li Z, Zhang Y, DenBesten PK. (2015) Composition of mineralizing incisor enamel in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator-deficient mice. Eur J Oral Sci, 123(1): 9-16.

Bronckers AL, Lyaruu DM, Jalali R, DenBesten PK. (2016) Buffering of protons released by mineral formation during amelogenesis in mice. Eur J Oral Sci, 124(5): 415-425.

Bronckers AL, Lyaruu DM, Jansen ID, Medina JF, Kellokumpu S, Hoeben KA, Gawenis LR, Oude-Elferink RP, Everts V. (2009b) Localization and function of the anion exchanger Ae2 in developing teeth and orofacial bone in rodents. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 312B(4): 375-387.

Brown D, Wagner CA. (2012) Molecular mechanisms of acid-base sensing by the kidney. J Am Soc Nephrol, 23(5): 774-780.

Burghardt B, Wenger C, Barabas K, Racz G, Olah A, Flautner L, Coy DH, Gress TM, Varga G. (2001) GRP-receptor-mediated signal transduction, gene expression and DNA synthesis in the human pancreatic adenocarcinoma cell line HPAF. Peptides, 22(7): 1119-1128.

Burnstock G. (2018) Purine and purinergic receptors. Brain Neurosci Adv, 2(2398212818817494): 1-10.

Chavez MG, Hu J, Seidel K, Li C, Jheon A, Naveau A, Horst O, Klein OD. (2014) Isolation and culture of dental epithelial stem cells from the adult mouse incisor. J Vis Exp, May 2014(87): 1-7.

Chen J, Zhang Y, Mendoza J, Denbesten P. (2009) Calcium-mediated differentiation of ameloblast lineage cells in vitro. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 312B(5): 458-464.

Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. (2008) Transmembrane proteins of tight junctions. Biochim Biophys Acta, 1778(3): 588-600.

Clague MJ, Urbe S, Aniento F, Gruenberg J. (1994) Vacuolar ATPase activity is required for endosomal carrier vesicle formation. J Biol Chem, 269(1): 21-24.

Crombie F, Manton D, Kilpatrick N. (2009) Aetiology of molar-incisor hypomineralization: a critical review. Int J Paediatr Dent, 19(2): 73-83.

Damkier HH, Josephsen K, Takano Y, Zahn D, Fejerskov O, Frische S. (2014) Fluctuations in surface pH of maturing rat incisor enamel are a result of cycles of H(+)-secretion by ameloblasts and variations in enamel buffer characteristics. Bone, 60(227-234.

de Valliere C, Vidal S, Clay I, Jurisic G, Tcymbarevich I, Lang S, Ludwig MG, Okoniewski M, Eloranta JJ, Kullak-Ublick GA, Wagner CA, Rogler G, Seuwen K. (2015) The pH-sensing receptor OGR1 improves barrier function of epithelial cells and inhibits migration in an acidic environment. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 309(6): G475-490.

Demeter I, Hegyesi O, Nagy AK, Case MR, Steward MC, Varga G, Burghardt B. (2009a) Bicarbonate transport by the human pancreatic ductal cell line HPAF. Pancreas, 38(8): 913-920.

Demeter I, Szucs A, Hegyesi O, Foldes A, Racz GZ, Burghardt B, Steward MC, Varga G. (2009b) Vectorial bicarbonate transport by Par-C10 salivary cells. J Physiol Pharmacol, 60 Suppl 7(197-204.

Den Besten PK. (1986) Effects of fluoride on protein secretion and removal during enamel development in the rat. J Dent Res, 65(10): 1272-1277.

Den Besten PK. (1999) Mechanism and timing of fluoride effects on developing enamel. J Public Health Dent, 59(4): 247-251.

Denbesten PK, Crenshaw MA, Wilson MH. (1985) Changes in the fluoride-induced modulation of maturation stage ameloblasts of rats. J Dent Res, 64(12): 1365-1370.

DenBesten PK, Heffernan LM. (1989) Enamel proteases in secretory and maturation enamel of rats ingesting 0 and 100 PPM fluoride in drinking water. Adv Dent Res, 3(2): 199-202.

Dobay O, Laub K, Stercz B, Keri A, Balazs B, Tothpal A, Kardos S, Jaikumpun P, Ruksakiet K, Quinton PM, Zsembery A. (2018) Bicarbonate Inhibits Bacterial Growth and Biofilm Formation of Prevalent Cystic Fibrosis Pathogens. Front Microbiol, 9(2245): 1-12.

Duan X. (2014) Ion channels, channelopathies, and tooth formation. J Dent Res, 93(2): 117-125.

Eckstein M, Aulestia FJ, Nurbaeva MK, Lacruz RS. (2018) Altered Ca(2+) signaling in enamelopathies. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 1865(11 Pt B): 1778-1785.

Eckstein M, Vaeth M, Aulestia FJ, Costiniti V, Kassam SN, Bromage TG, Pedersen P, Issekutz T, Idaghdour Y, Moursi AM, Feske S, Lacruz RS. (2019) Differential regulation of Ca(2+) influx by ORAI channels mediates enamel mineralization. Sci Signal, 12(578): 1-12.

Eckstein M, Vaeth M, Fornai C, Vinu M, Bromage TG, Nurbaeva MK, Sorge JL, Coelho PG, Idaghdour Y, Feske S, Lacruz RS. (2017) Store-operated Ca(2+) entry controls ameloblast cell function and enamel development. JCI Insight, 2(6): 1-15.

Faouzi M, Kilch T, Horgen FD, Fleig A, Penner R. (2017) The TRPM7 channel kinase regulates store-operated calcium entry. J Physiol, 595(10): 3165-3180.

Fejerskov O. (2004) Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. Caries Res, 38(3): 182-191.

Ferguson DB, Shuttleworth A, Whittaker DK. Oral Bioscience. Churchill Livingstone, London, 1999.

Ferreira JN, Hoffman MP. (2013) Interactions between developing nerves and salivary glands. Organogenesis, 9(3): 199-205.

Fulop BD, Sandor B, Szentleleky E, Karanyicz E, Reglodi D, Gaszner B, Zakany R, Hashimoto H, Juhasz T, Tamas A. (2019) Altered Notch Signaling in Developing Molar Teeth of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP)-Deficient Mice. J Mol Neurosci, 68(3): 377-388.

Gao J, Gao Z, Dang F, Li X, Liu H, Liu X, Gao M, Ruan J. (2020) Calcium promotes differentiation in ameloblast-like LS8 cells by downregulation of phosphatidylinositol 3 kinase /protein kinase B pathway. Arch Oral Biol, 109(104579): 1-7.

Garnett J, Dieppe P. (1990) The effects of serum and human albumin on calcium hydroxyapatite crystal growth. Biochem J, 266(3): 863-868.

Gawande PV, LoVetri K, Yakandawala N, Romeo T, Zhanel GG, Cvitkovitch DG, Madhyastha S. (2008) Antibiofilm activity of sodium bicarbonate, sodium metaperiodate and SDS combination against dental unit waterline-associated bacteria and yeast. J Appl Microbiol, 105(4): 986-992.

Gerlach RF, de Souza AP, Cury JA, Line SR. (2000) Fluoride effect on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. Eur J Oral Sci, 108(1): 48-53.

Gresz V, Kwon TH, Vorum H, Zelles T, Kurtz I, Steward MC, Aalkjaer C, Nielsen S. (2002) Immunolocalization of electroneutral Na(+)-HCO cotransporters in human and rat salivary glands. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 283(2): G473-480.

Gunzel D, Yu AS. (2013) Claudins and the modulation of tight junction permeability. Physiol Rev, 93(2): 525-569.

Gutierrez-Huante M, Martinez H, Bustamante VH, Puente JL, Sanchez J. (2015) Bicarbonate enhances the in vitro antibiotic activity of kanamycin in Escherichia coli. Lett Appl Microbiol, 60(5): 440-446.

Harada H, Ichimori Y, Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Kawano S, Katsube K, Wakisaka S. (2006) Stratum intermedium lineage diverges from ameloblast lineage via Notch signaling. Biochem Biophys Res Commun, 340(2): 611-616.

Hata M, Kawamoto T, Kawai M, Yamamoto T. (2010) Differential expression patterns of the tight junction-associated proteins occludin and claudins in secretory and mature ameloblasts in mouse incisor. Med Mol Morphol, 43(2): 102-106.

Hegyesi O, Foldes A, Bori E, Nemeth Z, Barabas J, Steward MC, Varga G. (2015) Evidence for Active Electrolyte Transport by Two-Dimensional Monolayers of Human Salivary Epithelial Cells. Tissue Eng Part C Methods, 21(12): 1226-1236.

Hegyi P, Maleth J, Venglovecz V, Rakonczay Z, Jr. (2011) Pancreatic ductal bicarbonate secretion: challenge of the acinar Acid load. Front Physiol, 2(36): 1-3.

Hetz C. (2012) The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. Nat Rev Mol Cell Biol, 13(2): 89-102.

Horowitz AM. (2004) A report on the NIH Consensus Development Conference on Diagnosis and Management of Dental Caries Throughout Life. J Dent Res, 83 (Spec No C): C15-17.

Houari S, Loiodice S, Jedeon K, Berdal A, Babajko S. (2016) Expression of Steroid Receptors in Ameloblasts during Amelogenesis in Rat Incisors. Front Physiol, 7(503): 1-9.

Hu P, Lacruz RS, Smith CE, Smith SM, Kurtz I, Paine ML. (2012) Expression of the sodium/calcium/potassium exchanger, NCKX4, in ameloblasts. Cells Tissues Organs, 196(6): 501-509.

Inai T, Nakamura K, Kurisu K, Shibata Y. (1997) Immunohistochemical localization of connexin43 in the enamel organ of the rat upper incisor during ameloblast development. Arch Histol Cytol, 60(3): 297-306.

Inai T, Sengoku A, Hirose E, Iida H, Shibata Y. (2008) Differential expression of the tight junction proteins, claudin-1, claudin-4, occludin, ZO-1, and PAR3, in the ameloblasts of rat upper incisors. Anat Rec (Hoboken), 291(5): 577-585.

Inatomi J, Horita S, Braverman N, Sekine T, Yamada H, Suzuki Y, Kawahara K, Moriyama N, Kudo A, Kawakami H, Shimadzu M, Endou H, Fujita T, Seki G, Igarashi

T. (2004) Mutational and functional analysis of SLC4A4 in a patient with proximal renal tubular acidosis. Pflugers Arch, 448(4): 438-444.

Ishiguro H, Naruse S, Kitagawa M, Suzuki A, Yamamoto A, Hayakawa T, Case RM, Steward MC. (2000) CO2 permeability and bicarbonate transport in microperfused interlobular ducts isolated from guinea-pig pancreas. J Physiol, 528 (Pt 2): 305-315.

Ishiguro H, Steward MC, Naruse S, Ko SB, Goto H, Case RM, Kondo T, Yamamoto A. (2009) CFTR functions as a bicarbonate channel in pancreatic duct cells. J Gen Physiol, 133(3): 315-326.

Jalali R, Guo J, Zandieh-Doulabi B, Bervoets TJ, Paine ML, Boron WF, Parker MD, Bijvelds MJ, Medina JF, DenBesten PK, Bronckers AL. (2014) NBCe1 (SLC4A4) a potential pH regulator in enamel organ cells during enamel development in the mouse. Cell Tissue Res, 358(2): 433-442.

Jalali R, Lodder JC, Zandieh-Doulabi B, Micha D, Melvin JE, Catalan MA, Mansvelder HD, DenBesten P, Bronckers A. (2017) The Role of Na:K:2Cl Cotransporter 1 (NKCC1/SLC12A2) in Dental Epithelium during Enamel Formation in Mice. Front Physiol, 8(924): 1-13.

Jalali R, Zandieh-Doulabi B, DenBesten PK, Seidler U, Riederer B, Wedenoja S, Micha D, Bronckers AL. (2015) Slc26a3/Dra and Slc26a6 in Murine Ameloblasts. J Dent Res, 94(12): 1732-1739.

Jedeon K, Loiodice S, Marciano C, Vinel A, Canivenc Lavier MC, Berdal A, Babajko S. (2014a) Estrogen and bisphenol A affect male rat enamel formation and promote ameloblast proliferation. Endocrinology, 155(9): 3365-3375.

Jedeon K, Loiodice S, Salhi K, Le Normand M, Houari S, Chaloyard J, Berdal A, Babajko S. (2016) Androgen Receptor Involvement in Rat Amelogenesis: An Additional Way for Endocrine-Disrupting Chemicals to Affect Enamel Synthesis. Endocrinology, 157(11): 4287-4296.

Jedeon K, Marciano C, Loiodice S, Boudalia S, Canivenc Lavier MC, Berdal A, Babajko S. (2014b) Enamel hypomineralization due to endocrine disruptors. Connect Tissue Res, 55 (Suppl 1): 43-47.

Jernvall J, Thesleff I. (2012) Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. Development, 139(19): 3487-3497.

Ji C, Stockbridge RB, Miller C. (2014) Bacterial fluoride resistance, Fluc channels, and the weak acid accumulation effect. J Gen Physiol, 144(3): 257-261.

Josephsen K, Takano Y, Frische S, Praetorius J, Nielsen S, Aoba T, Fejerskov O. (2010) Ion transporters in secretory and cyclically modulating ameloblasts: a new hypothesis for cellular control of preeruptive enamel maturation. Am J Physiol Cell Physiol, 299(6): C1299-1307.

Jung J, Nam JH, Park HW, Oh U, Yoon JH, Lee MG. (2013) Dynamic modulation of ANO1/TMEM16A HCO3(-) permeability by Ca2+/calmodulin. Proc Natl Acad Sci U S A, 110(1): 360-365.

Jussila M, Thesleff I. (2012) Signaling networks regulating tooth organogenesis and regeneration, and the specification of dental mesenchymal and epithelial cell lineages. Cold Spring Harb Perspect Biol, 4(4): 1-13.

Kallenbach E. (1978) Fine structure of the stratum intermedium, stellate reticulum, and outer enamel epithelium in the enamel organ of the kitten. J Anat, 126(Pt 2): 247-260.

Kawano S, Morotomi T, Toyono T, Nakamura N, Uchida T, Ohishi M, Toyoshima K, Harada H. (2002) Establishment of dental epithelial cell line (HAT-7) and the cell differentiation dependent on Notch signaling pathway. Connect Tissue Res, 43(2-3): 409-412.

Kirkham J, Robinson C, Strafford SM, Shore RC, Bonass WA, Brookes SJ, Wright JT. (2000) The chemical composition of tooth enamel in junctional epidermolysis bullosa. Arch Oral Biol, 45(5): 377-386.

Koestler BJ, Waters CM. (2014) Bile acids and bicarbonate inversely regulate intracellular cyclic di-GMP in Vibrio cholerae. Infect Immun, 82(7): 3002-3014.

Koles L, Gerevich Z, Oliveira JF, Zadori ZS, Wirkner K, Illes P. (2008) Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 377(1): 1-33.

Kordas KS, Sperlagh B, Tihanyi T, Topa L, Steward MC, Varga G, Kittel A. (2004) ATP and ATPase secretion by exocrine pancreas in rat, guinea pig, and human. Pancreas, 29(1): 53-60.

Kotyk JJ, Rust RS, Ackerman JJ, Deuel RK. (1989) Simultaneous in vivo monitoring of cerebral deoxyglucose and deoxyglucose-6-phosphate by 13C[1H] nuclear magnetic resonances spectroscopy. J Neurochem, 53(5): 1620-1628.

Kubota K, Lee DH, Tsuchiya M, Young CS, Everett ET, Martinez-Mier EA, Snead ML, Nguyen L, Urano F, Bartlett JD. (2005) Fluoride induces endoplasmic reticulum stress in ameloblasts responsible for dental enamel formation. J Biol Chem, 280(24): 23194-23202.

Lacruz RS. (2017) Enamel: Molecular identity of its transepithelial ion transport system. Cell Calcium, 65(Epub): 1-7.

Lacruz RS, Brookes SJ, Wen X, Jimenez JM, Vikman S, Hu P, White SN, Lyngstadaas SP, Okamoto CT, Smith CE, Paine ML. (2013a) Adaptor protein complex 2-mediated, clathrin-dependent endocytosis, and related gene activities, are a prominent feature during maturation stage amelogenesis. J Bone Miner Res, 28(3): 672-687.

Lacruz RS, Feske S. (2015) Diseases caused by mutations in ORAI1 and STIM1. Ann N Y Acad Sci, 1356(.): 45-79.

Lacruz RS, Habelitz S, Wright JT, Paine ML. (2017) Dental Enamel Formation and Implications for Oral Health and Disease. Physiol Rev, 97(3): 939-993.

Lacruz RS, Nanci A, Kurtz I, Wright JT, Paine ML. (2010a) Regulation of pH During Amelogenesis. Calcif Tissue Int, 86(2): 91-103.

Lacruz RS, Nanci A, White SN, Wen X, Wang H, Zalzal SF, Luong VQ, Schuetter VL, Conti PS, Kurtz I, Paine ML. (2010b) The sodium bicarbonate cotransporter (NBCe1) is essential for normal development of mouse dentition. J Biol Chem, 285(32): 24432-24438.

Lacruz RS, Smith CE, Bringas P, Jr., Chen YB, Smith SM, Snead ML, Kurtz I, Hacia JG, Hubbard MJ, Paine ML. (2012a) Identification of novel candidate genes involved in mineralization of dental enamel by genome-wide transcript profiling. J Cell Physiol, 227(5): 2264-2275.

Lacruz RS, Smith CE, Chen YB, Hubbard MJ, Hacia JG, Paine ML. (2011) Gene-expression analysis of early- and late-maturation-stage rat enamel organ. Eur J Oral Sci, 119 (Suppl 1): 149-157.

Lacruz RS, Smith CE, Kurtz I, Hubbard MJ, Paine ML. (2013b) New Paradigms on the Transport Functions of Maturation-stage Ameloblasts. J Dent Res, 92(2): 122-129.

Lacruz RS, Smith CE, Moffatt P, Chang EH, Bromage TG, Bringas P, Jr., Nanci A, Baniwal SK, Zabner J, Welsh MJ, Kurtz I, Paine ML. (2012b) Requirements for ion and solute transport, and pH regulation during enamel maturation. J Cell Physiol, 227(4): 1776-1785.

Last NB, Miller C. (2015) Functional Monomerization of a ClC-Type Fluoride Transporter. J Mol Biol, 427(22): 3607-3612.

Lee DJ, Jin C, Kim EJ, Lee JM, Jung HS. (2015) Gastrin-releasing peptide expression and its effect on the calcification of developing mouse incisor. Histochem Cell Biol, 144(3): 273-279.

Li J, Koo NY, Cho IH, Kwon TH, Choi SY, Lee SJ, Oh SB, Kim JS, Park K. (2006) Expression of the Na+-HCO3- cotransporter and its role in pHi regulation in guinea pig salivary glands. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 291(6): G1031-1040.

Loiselle FB, Casey JR. (2010) Measurement of Intracellular pH. Methods Mol Biol, 637(Vol): 311-331.

Ludwig MG, Vanek M, Guerini D, Gasser JA, Jones CE, Junker U, Hofstetter H, Wolf RM, Seuwen K. (2003) Proton-sensing G-protein-coupled receptors. Nature, 425(6953): 93-98.

Lyaruu DM, Bronckers AL, Mulder L, Mardones P, Medina JF, Kellokumpu S, Oude Elferink RP, Everts V. (2008) The anion exchanger Ae2 is required for enamel maturation in mouse teeth. Matrix Biol, 27(2): 119-127.

Lyaruu DM, Medina JF, Sarvide S, Bervoets TJ, Everts V, Denbesten P, Smith CE, Bronckers AL. (2014) Barrier formation: potential molecular mechanism of enamel fluorosis. J Dent Res, 93(1): 96-102.

Masereel B, Pochet L, Laeckmann D. (2003) An overview of inhibitors of Na(+)/H(+) exchanger. Eur J Med Chem, 38(6): 547-554.

Mathias RS, Mathews CH, Machule C, Gao D, Li W, Denbesten PK. (2001) Identification of the calcium-sensing receptor in the developing tooth organ. J Bone Miner Res, 16(12): 2238-2244.

Matsumoto A, Harada H, Saito M, Taniguchi A. (2011) Induction of enamel matrix protein expression in an ameloblast cell line co-cultured with a mesenchymal cell line in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 47(1): 39-44.

Matter K, Balda MS. (2003) Signalling to and from tight junctions. Nat Rev Mol Cell Biol, 4(3): 225-236.

McLarnon JG. (2005) Purinergic mediated changes in Ca2+ mobilization and functional responses in microglia: effects of low levels of ATP. J Neurosci Res, 81(3): 349-356.

Melvin JE, Yule D, Shuttleworth T, Begenisich T. (2005) Regulation of fluid and electrolyte secretion in salivary gland acinar cells. Annu Rev Physiol, 67(.): 445-469.

Miletich I, Sharpe PT. (2004) Neural crest contribution to mammalian tooth formation. Birth Defects Res C Embryo Today, 72(2): 200-212.

Milusheva EA, Kortezova NI, Mizhorkova ZN, Papasova M, Coy DH, Balint A, Vizi ES, Varga G. (1998) Role of different bombesin receptor subtypes mediating contractile activity in cat upper gastrointestinal tract. Peptides, 19(3): 549-556.

Mohebbi N, Benabbas C, Vidal S, Daryadel A, Bourgeois S, Velic A, Ludwig MG, Seuwen K, Wagner CA. (2012) The proton-activated G protein coupled receptor OGR1 acutely regulates the activity of epithelial proton transport proteins. Cell Physiol Biochem, 29(3-4): 313-324.

Monteiro MP, Batterham RL. (2017) The Importance of the Gastrointestinal Tract in Controlling Food Intake and Regulating Energy Balance. Gastroenterology, 152(7): 1707-1717.

Moran O. (2017) The gating of the CFTR channel. Cell Mol Life Sci, 74(1): 85-92.

Nakamoto T, Brown DA, Catalan MA, Gonzalez-Begne M, Romanenko VG, Melvin JE. (2009) Purinergic P2X7 receptors mediate ATP-induced saliva secretion by the mouse submandibular gland. J Biol Chem, 284(8): 4815-4822.

Nakano Y, Le MH, Abduweli D, Ho SP, Ryazanova LV, Hu Z, Ryazanov AG, Den Besten PK, Zhang Y. (2016) A Critical Role of TRPM7 As an Ion Channel Protein in Mediating the Mineralization of the Craniofacial Hard Tissues. Front Physiol, 7(258): 1-11.

Nanci A. Ten Cate's Oral Histology : development, structure, and function. Elsevier, St. Louis, Missouri, 2018.

Nishikawa S, Abe M. (2010) Immunocytochemical localization of claudin-1 in the maturation ameloblasts of rat incisors. Front Physiol, 1(150): 1-5.

Novak I. (2011) Purinergic signalling in epithelial ion transport: regulation of secretion and absorption. Acta Physiol (Oxf), 202(3): 501-522.

Novak I, Jans IM, Wohlfahrt L. (2010) Effect of P2X(7) receptor knockout on exocrine secretion of pancreas, salivary glands and lacrimal glands. J Physiol, 588(Pt 18): 3615-3627.

Nurbaeva MK, Eckstein M, Concepcion AR, Smith CE, Srikanth S, Paine ML, Gwack Y, Hubbard MJ, Feske S, Lacruz RS. (2015a) Dental enamel cells express functional SOCE channels. Sci Rep, 5(15803): 1-10.

Nurbaeva MK, Eckstein M, Devotta A, Saint-Jeannet JP, Yule DI, Hubbard MJ, Lacruz RS. (2018) Evidence That Calcium Entry Into Calcium-Transporting Dental Enamel Cells Is Regulated by Cholecystokinin, Acetylcholine and ATP. Front Physiol, 9(801): 1-11.

Nurbaeva MK, Eckstein M, Feske S, Lacruz RS. (2017) Ca(2+) transport and signalling in enamel cells. J Physiol, 595(10): 3015-3039.

Nurbaeva MK, Eckstein M, Snead ML, Feske S, Lacruz RS. (2015b) Store-operated Ca2+ Entry Modulates the Expression of Enamel Genes. J Dent Res, 94(10): 1471-1477.

Ohazama A, Sharpe PT. (2007) Expression of claudins in murine tooth development. Dev Dyn, 236(1): 290-294.

Okumura R, Shibukawa Y, Muramatsu T, Hashimoto S, Nakagawa K, Tazaki M, Shimono M. (2010) Sodium-calcium exchangers in rat ameloblasts. J Pharmacol Sci, 112(2): 223-230.

Otsu K, Harada H. (2016) Rho GTPases in ameloblast differentiation. Jpn Dent Sci Rev, 52(2): 32-40.

Paine ML, Snead ML, Wang HJ, Abuladze N, Pushkin A, Liu W, Kao LY, Wall SM, Kim YH, Kurtz I. (2008) Role of NBCe1 and AE2 in secretory ameloblasts. J Dent Res, 87(4): 391-395.

Pallagi P, Hegyi P, Rakonczay Z, Jr. (2015) The Physiology and Pathophysiology of Pancreatic Ductal Secretion: The Background for Clinicians. Pancreas, 44(8): 1211-1233.

Parry DA, Poulter JA, Logan CV, Brookes SJ, Jafri H, Ferguson CH, Anwari BM, Rashid Y, Zhao H, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ. (2013) Identification of

mutations in SLC24A4, encoding a potassium-dependent sodium/calcium exchanger, as a cause of amelogenesis imperfecta. Am J Hum Genet, 92(2): 307-312.

Parry DA, Smith CE, El-Sayed W, Poulter JA, Shore RC, Logan CV, Mogi C, Sato K, Okajima F, Harada A, Zhang H, Koruyucu M, Seymen F, Hu JC, Simmer JP, Ahmed M, Jafri H, Johnson CA, Inglehearn CF, Mighell AJ. (2016) Mutations in the pH-Sensing G-protein-Coupled Receptor GPR68 Cause Amelogenesis Imperfecta. Am J Hum Genet, 99(4): 984-990.

Patil MM, Lakhkar BB, Patil SS. (2018) Curse of Fluorosis. Indian J Pediatr, 85(5): 375-383.

Paulais M, Turner RJ. (1992a) Activation of the Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter in rat parotid acinar cells by aluminum fluoride and phosphatase inhibitors. J Biol Chem, 267(30): 21558-21563.

Paulais M, Turner RJ. (1992b) Beta-adrenergic upregulation of the Na(+)-K(+)-2Cl- cotransporter in rat parotid acinar cells. J Clin Invest, 89(4): 1142-1147.

Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP, van Eijk M, Banfi B, Horswill AR, Stoltz DA, McCray PB, Jr., Welsh MJ, Zabner J. (2012) Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. Nature, 487(7405): 109-113.

Phattarataratip E, Sappayatosok K. (2020) The Significance of Relative Claudin Expression in Odontogenic Tumors. Head Neck Pathol, 14(2): 480-488.

Proctor GB, Carpenter GH. (2014) Salivary secretion: mechanism and neural regulation. Monogr Oral Sci, 24(.): 14-29.

Prot-Bertoye C, Houillier P. (2020) Claudins in Renal Physiology and Pathology. Genes (Basel), 11(3): 1-30.

Quinton PM. (2010) Role of epithelial HCO3(-) transport in mucin secretion: lessons from cystic fibrosis. Am J Physiol Cell Physiol, 299(6): C1222-1233.

Racz GZ, Kittel A, Riccardi D, Case RM, Elliott AC, Varga G. (2002) Extracellular calcium sensing receptor in human pancreatic cells. Gut, 51(5): 705-711.

Racz GZ, Szucs A, Szlavik V, Vag J, Burghardt B, Elliott AC, Varga G. (2006) Possible role of duration of PKC-induced ERK activation in the effects of agonists and phorbol esters on DNA synthesis in Panc-1 cells. J Cell Biochem, 98(6): 1667-1680.

Racz R, Foldes A, Bori E, Zsembery A, Harada H, Steward MC, DenBesten P, Bronckers ALJJ, Gerber G, Varga G. (2017) No Change in Bicarbonate Transport but Tight-Junction Formation Is Delayed by Fluoride in a Novel Ameloblast Model. Front Physiol, 8(940): 1-12.

Racz R, Nagy A, Rakonczay Z, Dunavari EK, Gerber G, Varga G. (2018) Defense Mechanisms Against Acid Exposure by Dental Enamel Formation, Saliva and Pancreatic Juice Production. Curr Pharm Des, 24(18): 2012-2022.

Rahman N, Buck J, Levin LR. (2013) pH sensing via bicarbonate-regulated "soluble" adenylyl cyclase (sAC). Front Physiol, 4(343): 1-5.

Riccardi D, Valenti G. (2016) Localization and function of the renal calcium-sensing receptor. Nat Rev Nephrol, 12(7): 414-425.

Robinson C. (2014) Enamel maturation: a brief background with implications for some enamel dysplasias. Front Physiol, 5(388): 1-6.

Rodriguez-Boulan E, Macara IG. (2014) Organization and execution of the epithelial polarity programme. Nat Rev Mol Cell Biol, 15(4): 225-242.

Romero MF, Fulton CM, Boron WF. (2004) The SLC4 family of HCO 3 - transporters. Pflugers Arch, 447(5): 495-509.

Rugg-Gunn A, Banoczy J. (2013) Fluoride toothpastes and fluoride mouthrinses for home use. Acta Med Acad, 42(2): 168-178.

Sandor B, Fintor K, Felszeghy S, Juhasz T, Reglodi D, Mark L, Kiss P, Jungling A, Fulop BD, Nagy AD, Hashimoto H, Zakany R, Nagy A, Tamas A. (2014) Structural

and morphometric comparison of the molar teeth in pre-eruptive developmental stage of PACAP-deficient and wild-type mice. J Mol Neurosci, 54(3): 331-341.

Sandor B, Fintor K, Reglodi D, Fulop DB, Helyes Z, Szanto I, Nagy P, Hashimoto H, Tamas A. (2016) Structural and Morphometric Comparison of Lower Incisors in PACAP-Deficient and Wild-Type Mice. J Mol Neurosci, 59(2): 300-308.

Schmid A, Meili D, Salathe M. (2014) Soluble adenylyl cyclase in health and disease. Biochim Biophys Acta, 1842(12 Pt B): 2584-2592.

Schwiebert EM, Zsembery A. (2003) Extracellular ATP as a signaling molecule for epithelial cells. Biochim Biophys Acta, 1615(1-2): 7-32.

Sharma R, Tsuchiya M, Bartlett JD. (2008) Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. Environ Health Perspect, 116(9): 1142-1146.

Shumaker H, Soleimani M. (1999) CFTR upregulates the expression of the basolateral Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter in cultured pancreatic duct cells. Am J Physiol, 277(6 Pt 1): C1100-1110.

Sierant ML, Bartlett JD. (2012) Stress response pathways in ameloblasts: implications for amelogenesis and dental fluorosis. Cells, 1(3): 631-645.

Smith CE. (1998) Cellular and chemical events during enamel maturation. Crit Rev Oral Biol Med, 9(2): 128-161.

Smith CE, Nanci A, Denbesten PK. (1993) Effects of chronic fluoride exposure on morphometric parameters defining the stages of amelogenesis and ameloblast modulation in rat incisors. Anat Rec, 237(2): 243-258.

Smith CEL, Poulter JA, Antanaviciute A, Kirkham J, Brookes SJ, Inglehearn CF, Mighell AJ. (2017) Amelogenesis Imperfecta; Genes, Proteins, and Pathways. Front Physiol, 8(435): 1-22.

Somogyi-Ganss E, Nakayama Y, Iwasaki K, Nakano Y, Stolf D, McKee MD, Ganss B. (2012) Comparative temporospatial expression profiling of murine amelotin protein during amelogenesis. Cells Tissues Organs, 195(6): 535-549.

Souza Bomfim GH, Costiniti V, Li Y, Idaghdour Y, Lacruz RS. (2020) TRPM7 activation potentiates SOCE in enamel cells but requires ORAI. Cell Calcium, 87(102187): 1-9.

Steed E, Balda MS, Matter K. (2010) Dynamics and functions of tight junctions. Trends Cell Biol, 20(3): 142-149.

Steward MC, Ishiguro H, Case RM. (2005) Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. Annu Rev Physiol, 67(.): 377-409.

Sui W, Boyd C, Wright JT. (2003) Altered pH regulation during enamel development in the cystic fibrosis mouse incisor. J Dent Res, 82(5): 388-392.

Sun F, Qu F, Ling Y, Mao P, Xia P, Chen H, Zhou D. (2013) Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. Future Microbiol, 8(7): 877-886.

Suzuki M, Bartlett JD. (2014) Sirtuin1 and autophagy protect cells from fluoride-induced cell stress. Biochim Biophys Acta, 1842(2): 245-255.

Suzuki M, Shin M, Simmer JP, Bartlett JD. (2014a) Fluoride affects enamel protein content via TGF-beta1-mediated KLK4 inhibition. J Dent Res, 93(10): 1022-1027.

Suzuki M, Sierant ML, Antone JV, Everett ET, Whitford GM, Bartlett JD. (2014b) Uncoupling protein-2 is an antioxidant that is up-regulated in the enamel organ of fluoride-treated rats. Connect Tissue Res, 55 (Suppl 1): 25-28.

Szalmay G, Varga G, Kajiyama F, Yang XS, Lang TF, Case RM, Steward MC. (2001) Bicarbonate and fluid secretion evoked by cholecystokinin, bombesin and acetylcholine in isolated guinea-pig pancreatic ducts. J Physiol, 535(Pt 3): 795-807.

Szucs A, Demeter I, Burghardt B, Ovari G, Case RM, Steward MC, Varga G. (2006) Vectorial bicarbonate transport by Capan-1 cells: a model for human pancreatic ductal secretion. Cell Physiol Biochem, 18(4-5): 253-264.

Takagi T, Ogasawara T, Tagami J, Akao M, Kuboki Y, Nagai N, LeGeros RZ. (1998) pH and carbonate levels in developing enamel. Connect Tissue Res, 38(1-4): 181-187; discussion 201-185.

Takano Y. (1995) Enamel mineralization and the role of ameloblasts in calcium transport. Connect Tissue Res, 33(1-3): 127-137.

Tanimoto K, Le T, Zhu L, Chen J, Featherstone JD, Li W, DenBesten P. (2008) Effects of fluoride on the interactions between amelogenin and apatite crystals. J Dent Res, 87(1): 39-44.

Tapias-Ledesma MA, Jimenez R, Lamas F, Gonzalez A, Carrasco P, Gil de Miguel A. (2003) Factors associated with first molar dental enamel defects: a multivariate epidemiological approach. J Dent Child (Chic), 70(3): 215-220.

Tarjan I, Rozsa N, Tanikawa Y, Wakamatsu N, Tanase S. (2002) The influx of serum albumin to enamel matrix in rat incisors after trauma. Calcif Tissue Int, 71(4): 349-355.

Thesleff I, Tummers M. Tooth organogenesis and regeneration. In: CA Cowan (szerk.), StemBook. Cambridge (MA), 2008.

Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, Racker E. (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. Biochemistry, 18(11): 2210-2218.

Tompkins K. (2006) Molecular mechanisms of cytodifferentiation in mammalian tooth development. Connect Tissue Res, 47(3): 111-118.

Tsien RY. (1981) A non-disruptive technique for loading calcium buffers and indicators into cells. Nature, 290(5806): 527-528.

Tummers M, Thesleff I. (2008) Observations on continuously growing roots of the sloth and the K14-Eda transgenic mice indicate that epithelial stem cells can give rise to both the ameloblast and root epithelium cell lineage creating distinct tooth patterns. Evol Dev, 10(2): 187-195.

Tye CE, Antone JV, Bartlett JD. (2011) Fluoride does not inhibit enamel protease activity. J Dent Res, 90(4): 489-494.

Varga G. (2015) Physiology of the salivary glands. Surgery (United Kingdom), 33(12): 581–586.

Varga G, Balint A, Burghardt B, D'Amato M. (2004) Involvement of endogenous CCK and CCK1 receptors in colonic motor function. Br J Pharmacol, 141(8): 1275-1284.

Varga G, DenBesten P, Racz R, Zsembery A. (2018) Importance of bicarbonate transport in pH control during amelogenesis - need for functional studies. Oral Dis, 24(6): 879-890.

Varga G, Kerémi B, Bori E, Földes A. (2015) Function and repair of dental enamel - potential role of epithelial transport processes of ameloblasts. Pancreatology, 15(4 Suppl): S55-60.

Ward DT, Riccardi D. (2002) Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor. Pflugers Arch, 445(2): 169-176.

Weerheijm KL. (2003) Molar incisor hypomineralisation (MIH). Eur J Paediatr Dent, 4(3): 114-120.

Weerheijm KL, Jalevik B, Alaluusua S. (2001) Molar-incisor hypomineralisation. Caries Res, 35(5): 390-391.

Wierink CD, van Diermen DE, Aartman IH, Heymans HS. (2007) Dental enamel defects in children with coeliac disease. Int J Paediatr Dent, 17(3): 163-168.

Wiggins SV, Steegborn C, Levin LR, Buck J. (2018) Pharmacological modulation of the CO2/HCO3(-)/pH-, calcium-, and ATP-sensing soluble adenylyl cyclase. Pharmacol Ther, 190(Epub): 173-186.

William V, Messer LB, Burrow MF. (2006) Molar incisor hypomineralization: review and recommendations for clinical management. Pediatr Dent, 28(3): 224-232.

Woltgens JH, Lyaruu DM, Bervoets TJ, Bronckers AL. (1987) Effects of calcium and phosphate on secretion of enamel matrix and its subsequent mineralization in vitro. Adv Dent Res, 1(2): 196-201.

Woltgens JH, Lyaruu DM, Bronckers AL, Bervoets TJ, Van Duin M. (1995) Biomineralization during early stages of the developing tooth in vitro with special reference to secretory stage of amelogenesis. Int J Dev Biol, 39(1): 203-212.

Wray S. (1988) Smooth muscle intracellular pH: measurement, regulation, and function. Am J Physiol, 254(2 Pt 1): C213-225.

Wright JT, Carrion IA, Morris C. (2015) The molecular basis of hereditary enamel defects in humans. J Dent Res, 94(1): 52-61.

Wright JT, Hall KI, Grubb BR. (1996a) Enamel mineral composition of normal and cystic fibrosis transgenic mice. Adv Dent Res, 10(2): 270-274; discussion 275.

Wright JT, Kiefer CL, Hall KI, Grubb BR. (1996b) Abnormal enamel development in a cystic fibrosis transgenic mouse model. J Dent Res, 75(4): 966-973.

Xue H, Li Y, Everett ET, Ryan K, Peng L, Porecha R, Yan Y, Lucchese AM, Kuehl MA, Pugach MK, Bouchard J, Gibson CW. (2013) Ameloblasts require active RhoA to generate normal dental enamel. Eur J Oral Sci, 121(4): 293-302.

Yamaguti PM, Neves FA, Hotton D, Bardet C, de La Dure-Molla M, Castro LC, Scher MD, Barbosa ME, Ditsch C, Fricain JC, de La Faille R, Figueres ML, Vargas-Poussou R, Houiller P, Chaussain C, Babajko S, Berdal A, Acevedo AC. (2017) Amelogenesis imperfecta in familial hypomagnesaemia and hypercalciuria with nephrocalcinosis caused by CLDN19 gene mutations. J Med Genet, 54(1): 26-37.

Yin K, Lei Y, Wen X, Lacruz RS, Soleimani M, Kurtz I, Snead ML, White SN, Paine ML. (2015) SLC26A Gene Family Participate in pH Regulation during Enamel Maturation. PLoS One, 10(12): 1-23.

Yoshizaki K, Yamamoto S, Yamada A, Yuasa K, Iwamoto T, Fukumoto E, Harada H, Saito M, Nakasima A, Nonaka K, Yamada Y, Fukumoto S. (2008) Neurotrophic factor neurotrophin-4 regulates ameloblastin expression via full-length TrkB. J Biol Chem, 283(6): 3385-3391.

Zaki AE, Hand AR, Mednieks MI, Eisenmann DR, Borke JL. (1996) Quantitative immunocytochemistry of Ca(2+)-Mg2+ ATPase in ameloblasts associated with enamel secretion and maturation in the rat incisor. Adv Dent Res, 10(2): 245-251.

Zhang Y, Kim JY, Horst O, Nakano Y, Zhu L, Radlanski RJ, Ho S, Den Besten PK. (2014) Fluorosed mouse ameloblasts have increased SATB1 retention and Galphaq activity. PLoS One, 9(8): 1-11.

Zhang Y, Yan Q, Li W, DenBesten PK. (2006) Fluoride down-regulates the expression of matrix metalloproteinase-20 in human fetal tooth ameloblast-lineage cells in vitro. Eur J Oral Sci, 114 (Suppl 1): 105-110; discussion 127-109, 380.

Zhang Y, Zhang K, Ma L, Gu H, Li J, Lei S. (2016) Fluoride induced endoplasmic reticulum stress and calcium overload in ameloblasts. Arch Oral Biol, 69(.): 95-101.

Zhao H, Star RA, Muallem S. (1994) Membrane localization of H+ and HCO3- transporters in the rat pancreatic duct. J Gen Physiol, 104(1): 57-85.

Zheng LW, Linthicum L, DenBesten PK, Zhang Y. (2013) The similarity between human embryonic stem cell-derived epithelial cells and ameloblast-lineage cells. Int J Oral Sci, 5(1): 1-6.

Zhu L, Liu H, Witkowska HE, Huang Y, Tanimoto K, Li W. (2014) Preferential and selective degradation and removal of amelogenin adsorbed on hydroxyapatites by MMP20 and KLK4 in vitro. Front Physiol, 5(268): 1-8.

Zsembery A, Strazzabosco M, Graf J. (2000) Ca2+-activated Cl- channels can substitute for CFTR in stimulation of pancreatic duct bicarbonate secretion. FASEB J, 14(14): 2345-2356.

11. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények:

1. **Racz R**, Nagy A, Rakonczay Z, Dunavari EK, Gerber G, Varga, G. *Defense mechanisms against acid exposure by dental enamel formation, saliva and pancreatic juice production.* CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN 24 : 18 pp. 2012-2022. (2018) IF: 2,412

2. Varga G, DenBesten P, **Racz R**, Zsembery A. *Importance of bicarbonate transport in pH control during amelogenesis - need for functional studies.* ORAL DISEASES 24 : 6 pp. 879-890. (2018) IF: 2,625

3. **Racz R**, Foldes A, Bori E, Zsembery A, Harada H, Steward MC, DenBesten P, Bronckers ALJJ, Gerber G, Varga, G. *No Change in Bicarbonate Transport but Tight-Junction Formation Is Delayed by Fluoride in a Novel Ameloblast Model.* FRONTIERS IN PHYSIOLOGY 8 : 940. pp 1-12. (2017) IF: 3,394

4. Bori E, Guo J, **Rácz R**, Burghardt B, Földes A, Kerémi B, Harada H, Steward MC, DenBesten P, Bronckers ALJJ, Varga G. *Evidence for Bicarbonate Secretion by Ameloblasts in a Novel Cellular Model.* JOURNAL OF DENTAL RESEARCH 95 : 5 pp. 588-596. (2016) IF: 4,755

Egyéb közlemények:

1. Farkasdi S, Pammer D, **Rácz R,** Hriczó-Koperdák G, Szabó BT, Dobó-Nagy Cs, Kerémi B, Blazsek J, Cuisinier F, Wu G, Varga G. *Development of a quantitative preclinical screening model for implant osseointegration in rat tail vertebra.* CLINICAL ORAL INVESTIGATIONS 23: 7 pp. 2959-2973. (2019) IF: 2,453

12. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Varga Gábor Professzor Úrnak a szakmai irányítását és segítségét. Hálás vagyok azért is, mert lehetőséget biztosított, hogy a Tanszéken folyó kutatásokban részt vehessek, és hogy általa megismerkedhettem a zománcéréssel kapcsolatos nyitott kérdésekkel. Köszönöm Dr. Kerémi Beátának, másik témavezetőmnek mind az értekezés megírásában, mind a Tanszéken folytatott munkám során nyújtott hasznos tanácsait, és hogy mindvégig számíthattam segítségére.

Kiemelten köszönöm Dr. Bori Erzsébetnek és Dr. Földes Annának a rengeteg szakmai segítséget, hogy átadták tudásukat, és hogy folytathattam az általuk megkezdett ameloblaszt sejtes kutatásokat. Dr. Földes Annának külön is szeretném megköszönni az évek során nyújtott folyamatos támogatását, iránymutatását abban, hogy a lényegre fókuszáljak PhD munkám elkészítésében. Hálával tartozom Martin C. Stewardnak felbecsülhetetlen módszertani tanácsaiért és szakmai útmutatásaiért, és azért, hogy gyakori személyes jelenlétével is segítette a Tanszéken folytatott kutatásokat. Köszönöm Pamela DenBestennek és Antonius Bronckersnek, a Tanszékünkkel való együttműködésüket – nélkülük az amelogenezishez kapcsolódó témában elért eredményeink nem valósulhattak volna meg. Szintén köszönettel tartozom Dr. Burghardt Beátának a mikrofluorometriás, és Dr. Rácz Gábornak, számos más laboratóriumi kísérleti módszer elsajátításában nyújtott segítségéért. Külön is szeretném megköszönni Dr. Kádár Kristófnak sok technikai probléma megoldásában és a statisztikai kiértékelésben nyújtott segítségét, kritikus megjegyzéseit, és praktikus ötleteit. Nagyon köszönöm Dr. Zsembery Ákos emberi támogatását, és hogy megosztotta velem szakmai tapasztalatait, tudását, valamint köszönöm az Orálbiológiai Tanszék alapítója, Dr. Zelles Tivadar Professzor Úr mindig bíztató szavait is. Szeretném köszönetemet kifejezni Dr. Blazsek József Tanár Úrnak, Dr. Farkasdi Sándornak és Dr. Czumbel László Márknak baráti támogatásukért és az évek során eltöltött jó hangulatú közös munkáért.

Hálával emlékezem Dr. Simon György Tanár Úrra és Kálló Karolára, és köszönettel tartozom nekik azért, hogy kedvességükkel segítették a tanszéki csoportba való beilleszkedésemet, és hogy megismerhettem pozitív, nyitott személyiségüket. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm a közös munkát az Orálbiológiai Tanszék minden jelenlegi és korábbi munkatársának, PhD hallgatójának: Márczis Anitának, Szlivka Ágnesnek, Sovák Józsefnek, Dr. Nagy Krisztinának, Dr. Hegyesi Orsolyának, Dr. Beck Anitának, Dr. Borbély Zoltánnak, Dr.

Csomó Bencének, Dr. Stiedl Péternek, Dr. Perczel-Kovách Katalinnak, Dr. Hriczó-Koperdák Gergőnek, Juhász Viktóriának és Kálmán Eszternek.

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

Mellékletek

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények másolata:

1. Bori és és mtsai 2016, JOURNAL OF DENTAL RESEARCH 95 : 5 pp. 588-596.

2. Racz és mtsai 2017, FRONTIERS IN PHYSIOLOGY 8 : 940. pp 1-12.

3. Varga és mtsai 2018, ORAL DISEASES 24 : 6 pp. 879-890.

4. Racz és mtsai 2018, CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN 24 : 18 pp. 2012-2022.