

Állatorvostudományi Egyetem
Állatorvostudományi Doktori Iskola

Matriptáz modulátorok vizsgálata *in vitro*

PhD értekezés

Dr. Barna Réka Fanni

2022

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Jerzsele Ákos, PhD

Állatorvostudományi Egyetem,

Gyógyszertani és Méregtani Tanszék

témavezető

Dr. Mátis Gábor, PhD

Állatorvostudományi Egyetem,

Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály

témavezető

Készült 8 példányban. Ez a sz. példány.

.....

Dr. Barna Réka Fanni

Tartalomjegyzék

1	Rövidítések jegyzéke	6
2	Összefoglalás	9
3	Bevezetés és irodalmi áttekintés	12
3.1	A kettes típusú szerin-proteáz család	12
3.1.1	A matriptáz-1	13
3.1.1.1	A matriptáz-1 szintézise, aktiválása, gátlása	13
3.1.1.2	A matriptáz-1 élettani folyamatokban betöltött szerepe	17
3.1.1.3	A matriptáz-1 patológiás folyamatokban betöltött szerepe	21
3.1.1.3.1	A matriptáz-1 szerepe a tumor metasztázis képzésében	21
3.1.1.3.2	A matriptáz-1 szerepe oszteoarthritisz esetén	23
3.1.1.3.3	Vírus-sejt fúzió létrejötte matriptáz-1 segítségével	23
3.1.1.3.4	A matriptáz-1 szerepe a pulmonáris fibrózis kialakulásában	24
3.1.2	A matriptáz-2	24
3.1.2.1	A matriptáz-2 szintézise, aktiválása	24
3.1.2.2	A matriptáz-2 élettani folyamatokban betöltött szerepe	25
3.1.2.2.1	A matriptáz-2 szerepe a vasháztartásban	25
3.1.2.3	A matriptáz-2 patológiás folyamatokban betöltött szerepe	28
3.1.2.3.1	A matriptáz-2, az elhízás és kettes típusú diabétesz kapcsolata	28
3.1.2.3.2	A matriptáz-2 szerepe a tumorok fejlődésében	29
3.1.3	Matriptáz modulátorok	29
3.1.3.1	Szvingozin-1-foszfát matriptáz aktivátor	29
3.1.3.2	3-amidinofenilalanin alapvázú matriptázinhibitorok	30
3.1.3.2.1	3-amidinofenilalanin alapvázú matriptázinhibitorok fejlesztése	30
3.1.3.2.2	3-amidinofenilalanin inhibitor családdal végzett <i>in vitro</i> kísérletek	33
3.1.3.2.2.1	Matriptáz-1 gátlás vizsgálata uPA gátlóval és új, 3-amidinofenilalanin alapvázú inhibitorokkal	34
3.1.3.2.2.2	Matriptáz-2 gátlás vizsgálata hepatocita modellen	35
3.1.3.2.2.3	TMPRSS2 gátlás vizsgálata influenzavírus fertőzés esetén	36
3.1.3.2.3	3-amidinofenilalanin inhibitor családdal végzett <i>in vivo</i> kísérletek	36
4	Célkitűzés	38
5	Anyag és módszer	39
5.1	1. vizsgálat: matriptáz aktivátor vizsgálata patkány primer hepatocita mono-kultúrán	40
5.1.1	Patkány primer hepatocita mono-kultúra létrehozása és fenntartása	40

5.1.2	Sejtek kezelése és mintavételezése	40
5.1.3	Laboratóriumi mérések	41
5.1.3.1	Sejtéletképesség és metabolikus aktivitás mérése	41
5.1.3.2	Hidrogén-peroxid koncentráció meghatározása	41
5.1.3.3	Hepcidinkoncentráció meghatározása	42
5.2	2. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata csirke primer hepatikus mono- és ko-kultúrán.....	42
5.2.1	Csirke primer hepatikus mono- és ko-kultúrák létrehozása és fenntartása.....	42
5.2.1.1	Hepatociták és nem-parenchimális sejtek izolálása.....	42
5.2.1.2	Az izolált sejtek életképességének vizsgálata, sejtszám meghatározása, sejtek kiültetése, fenntartása	44
5.2.2	Sejtek kezelése és mintavételezése	44
5.2.3	Laboratóriumi mérések	45
5.2.3.1	Sejtéletképesség és metabolikus aktivitás mérése	45
5.2.3.2	IL-6, IL-8 citokinek koncentrációjának meghatározása.....	46
5.2.3.1	Hidrogén-peroxid koncentráció meghatározása	46
5.2.3.2	Malondialdehid-koncentráció meghatározása.....	46
5.2.3.3	Glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása sejtlyúzátumból	47
5.2.3.4	Összfehérje-koncentráció meghatározása	48
5.3	3. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata sertés IPEC-J2 bélhámsejtvonalon	48
5.3.1	IPEC-J2 sertés bélhámsejtvonal fenntartása	48
5.3.2	Sejtek kezelése és mintavételezése	49
5.3.3	Laboratóriumi mérések	49
5.3.3.1	Sejtéletképesség és metabolikus aktivitás mérése	49
5.3.3.2	Hidrogén-peroxid koncentráció meghatározása	50
5.3.3.3	Sejtréteg-integritás vizsgálata.....	50
5.3.3.4	Monolayer morfológiai vizsgálata	50
5.4	Statisztikai elemzés	50
6	Eredmények.....	51
6.1	1. vizsgálat: matriptáz aktivátor vizsgálata patkány primer hepatocita mono-kultúrán	51
6.1.1	Szfingozin-1-foszfát hatása a hepatociták életképességére.....	51
6.1.2	Szfingozin-1-foszfát hatása az extracelluláris H ₂ O ₂ koncentrációra	51
6.1.3	Szfingozin-1-foszfát közvetett hatása az extracelluláris hepcidinkoncentrációra	52
6.2	2. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata csirke primer hepatikus mono- és ko-kultúrán.....	53

6.2.1	Metabolikus aktivitás vizsgálata	53
6.2.2	Az inhibitorok IL-6, IL-8 citokinekre gyakorolt hatása	54
6.2.3	Az inhibitorok hatása az extracelluláris H ₂ O ₂ koncentrációra	57
6.2.4	Az inhibitorok hatása az extracelluláris malondialdehid-koncentrációra.....	58
6.2.5	Az inhibitorok hatása a glutation-peroxidáz aktivitására.....	59
6.3	3. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata IPEC-J2 bélhámsejtvonalon	59
6.3.1	Sejtmembrán integritásvizsgálat immunfluoreszcens technikával	59
6.3.2	Sejtéletképesség és metabolikus aktivitás vizsgálata.....	60
6.3.3	Az inhibitorok hatása a TER értékekre	61
6.3.4	Az inhibitorok hatása az extracelluláris H ₂ O ₂ koncentrációra	61
7	Megbeszélés	63
7.1	1. vizsgálat: matriptáz aktivátor vizsgálata patkány primer hepatocita mono-kultúrán	63
7.2	2. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata csirke primer hepatikus mono- és ko-kultúrán.....	65
7.3	3. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata sertés IPEC-J2 bélhámsejtvonalon	70
7.4	Konklúzió.....	73
8	Új tudományos eredmények	75
9	Irodalom	76
10	A doktori kutatás eredményeinek közlései	94
10.1	A doktori kutatás témájához kapcsolódó közlemények	94
10.1.1	Lektorált, impakt faktorialló bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk	94
10.1.2	Konferencia prezentációk.....	94
10.2	A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények	95
10.2.1	Lektorált, impakt faktorialló bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk	95
10.2.2	Konferencia prezentációk.....	96
11	Mellékletek	97
12	Köszönetnyilvánítás	101

1 Rövidítések jegyzéke

- 3-APhA: 3-amidinofenilalanin (3-amidinophenylalanine)
- 3-Cl-AHPC: 4- [3- (1-adamantil)- 4-hidroxifenil]- 3-klorokinnamiksav
- ADAMTS: (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs)
- AEBSF: 4-(2-aminoetil)-benzoszulfonil-fluorid
- BCA: bicinikinsav (Bicinchoninic Acid)
- BMP: csont morfogénikus fehérje (bone morphogenetic protein)
- BSA: szarvasmarha szérumalbumin (bovine serum albumin)
- c-Met: (mesenchymal-epithelial transition factor)
- CCK-8: (Cell Counting Kit-8)
- CK2: kazein kináz (casein kinase II)
- COX-2: ciklooxygenáz-2
- CUB: (Cis/ Clr, urchin embryonic growth factor, bone morphogenic protein-1)
- DAPI: 4,6- diamino-2-fenilindol
- DESC: (differentially expressed in squamous cell carcinoma)
- DMBA: 7,12-dimetilbenzantracén
- DMEM/F12: Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközeg és Ham's F-12 Nutrient Mixture 1:1 arányú keveréke
- DMSO: dimetil-szulfoxid
- DSS: dextrán-szulfát-nátrium (dextran sodium sulfate)
- E: prosztataandrogén receptor
- EGTA: etilén glikol-bisz(2-aminoetil éter)-tetraecetsav
- ELISA: enzimhez kötött ellenanyag-vizsgálat (enzyme-linked immunosorbent assay)
- ER: endoplazmatikus retikulum
- ERK: (extracellular signal-regulated kinase)
- FBS: főtális borjú szérum (fetal bovine serum)
- FD4: 4 kDa tömegű fluoreszcens izotiocianáttal jelölt dextrán molekula
- GPx: glutation peroxidáz
- HA: hemagglutinin
- HAI-1: hepatocita növekedési faktor aktivátor inhibitor-1 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1)
- HAT: (human airway trypsin-like protease)
- HFE: hemokromatózis protein

HGF: hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
HJV: hemojuvelin
HRP: tormaperoxidáz (horseradish peroxidase)
IL: interleukin
INF: interferon
IPEC-J2: újszülött sertés jejunális eredetű bélhámsejtvonal (intestinal porcine enterocytes–jejunum-2)
IPF: idopatikus pulmonáris fibrózis
IRIDA: vasrezisztens vashiányos anémia (iron-refractory iron deficiency anemia)
LDLRA: low density lipoprotein receptor A
M-PER: (Mammalian Protein Extraction Reagent)
MAM: (meprin/A5 antigen/receptor protein phosphatase mu)
MAPK: mitogén aktivált protein kináz
MDA: malondialdehid
MDCKII: Madin-Darby kutya vesehám-sejtvonal
MERS Co-V: közel-keleti légúti koronavírus (Middle East respiratory syndrome coronavirus)
MI: matriptázinhibitor
MMP: mátrix metalloproteináz (matrix metalloproteinase)
MCoTI-II: *Momordica cochinchinensis* trypsin inhibitor-II
MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazólium
mRNS: messengerRNS-ribonukleinsav
MSPL: (mosaic serine protease large- form)
NADP+: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NADPH+H+: redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát
NP: nem-parenchimális
NSAID: nem-szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszer (nonsteroidal anti-inflammatory drug)
PAR-2: proteáz aktivált receptor-2 (protease activated receptor 2)
PBS: foszfáttal pufferelt sóoldat (phosphate buffered saline)
PI3K: foszfatidil-inozitol-3-kináz (phosphoinositide 3-kinases)
PGE2: prosztaglandin E2
ROS: reaktív oxigén gyökök (reactive oxygen species)
S1P: szfingozin-1-foszfát (sphingosine-1-phosphate)
SARS-CoV-1: súlyos akut légzőszervi szindróma-koronavírus-1 (severe acute respiratory syndrome coronavirus-1)
SCBN: kutya jejunális epiteliális sejtvonal

SEA: (sea urchin sperm protein/enteropeptidase/agrin)
SEM: átlag standard hibája (standard error of the mean)
SFTI-1: (sunflower trypsin inhibitor-1)
SMAD: (similarity to the *Drosophila* gene Mothers Against Decapentaplegic)
SRC: (SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase)
ST14: (suppression of tumorigenicity 14)
TAGD-15: (Tumor-associated differentially expressed gene-15)
TBA: tiobarbiturát sav (thiobarbituric acid)
TER: transzepiteliális elektromos ellenállás (transepithelial electrical resistance)
TfR2: transzferrin receptor-2
TGF: transzformáló növekedési faktor (transforming growth factor)
TJ: szoros sejtkapcsoló struktúra (tight junction)
TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TMPRSS: (transmembrane protease/serine)
TNF: tumor nekrozis faktor
TTSP: kettes típusú transzmembrán szerin proteáz (type II transmembrane serine protease)
uPA: urokináz plazminogén aktivátor (urokinase plasminogen activator)
uPAR: urokináz plazminogén aktivátor receptor
WGA: búzacsíra agglutinin (wheat germ agglutinin)
WST-8: 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-diszulfófenil)-2H-tetrazólium

2 Összefoglalás

A kettős típusú transzmembrán szerin-proteázok (TTSP) sokféle élettani és patológiás folyamatban töltenek be fontos szerepet. Mivel a TTSP család számos tagját az elmúlt években igen széleskörűen tanulmányozták, azonban olyan szerteágazó és sokrétű hatásuk lehetséges, hogy vizsgálataink során a nem kutatott területek közül választottunk ki néhányat. Jelen disszertáció a TTSP család két tagja, a matriptáz-1 és matriptáz-2 élettani és patológiás jelentőségét foglalja össze, illetve egy matriptáz aktivátor és inhibitorcsoport különféle sejtípusokra kifejtett hatásának vizsgálatával foglalkozik. Olyan aktivátort és inhibitorcsoportot választottunk, amelyek e szerek gyógyszerként való alkalmazhatóságának igazolására az első lépéseket jelenthetik.

A matriptáz-1, a sejtkapcsoló struktúrák szabályozása révén szükséges a posztnatális túléléshez, megnövekedett aktivitása azonban elősegíti bizonyos epiteliális eredetű daganatok áttétképzését. Részt vesz az ízületi porc bontásában osteoarthritis esetén, szerepe van a tüdőfibrozis kialakulásában és segíti az influenzavírusok sejtbe jutását is. A matriptáz-2 a vasanyagcsere szabályozásában tölt be központi szerepet, illetve ezzel összefüggésben szerepe van az elhízás, inzulinrezisztencia, kettős típusú diabétesz kialakulásában. Számos daganatnál csökkenő mennyisége rosszabb kórjóslatot von maga után. Ezért funkciójuknak pontos megismerése számos patomechanizmus tisztázásában segíthet, szabályozásuk pedig a gyógyszerkutatás fejlesztés célpontja is lehet.

A TTSP családdal kapcsolatban leggyakrabban kutatott területek a daganatmarker és tumorterápia, illetve a vírusfertőzésekkel kapcsolatos vizsgálatok. A matriptáz-1 és matriptáz-2, illetve a már ma is ismert aktiváló és gátló molekulák hatásával kapcsolatos ismeretanyag áttekinthetősége érdekében igyekeztem összefoglalni a dolgozat elején az utóbbi években megjelent publikációkban fellelhető eredményeket, hozzátevé munkacsoportunk eddigi kutatásainak eredményeit is. Kutatásainkkal több irányba is szeretnénk volna bővíteni a matriptáz enzimekről elérhető információkat. Kísérleteink során egy ismert matriptáz-1 aktivátort, a szfingozin-1-foszfátot (S1P), illetve egy inhibitor családot, a 3-amidinofenilalanin (3-APhA) alapvázú gátlószereket teszteltünk *in vitro*. A 3-APhA alapvázú vegyületek már számos kutatásban *in vitro* és *in vivo* is hatékonyak bizonyultak az enzimek gátlásában, viszont a sejtekre gyakorolt egyéb hatásaikról kevés adat állt rendelkezésünkre. Mivel az eddigi kutatások főleg emlős eredetű sejteken, ill. egyedeken történtek, így más rendszertani kategóriába tartozó gerinces fajokról alig vannak ismereteink. A nagyon sokféle hatás, és a már létező, ill. a jövőben kifejlesztésre kerülő modulátor molekulák miatt is szükség van egy jól áttekinthető, *in vitro* tesztrendszerre, ahol a különféle fajokban és szervekben kialakuló, különféle aktiváló és gátló hatások jól összehasonlíthatók

lehetnének majd a jövőben. Ezért célunk volt faj- és szervspecifikus, *in vitro* vizsgálati rendszert kialakítani e molekulák hatásának és alkalmazhatóságának tesztelése érdekében.

A kísérleteket patkány és csirke primer májsejtkultúrákon, csirke primer máj eredetű ko-kultúrákon, valamint IPEC-J2 újszülött, sertés nem tumoros jejunális bélhám sejtvonalon végeztük. Kísérleteink során egy esetben (1. vizsgálat) a matriptáz-2 vasanyagcserében betöltött specifikus szerepét vizsgáltuk, a továbbiakban (2. és 3. vizsgálat) pedig arra kerestünk választ, hogy mely paraméterek sejtszintű vizsgálata szükséges egy matriptáz modulátor alkalmazhatóságának igazolásához.

Az 1. vizsgálatunkban tehát a matriptáz-2 vasanyagcserében betöltött élettani szerepét tanulmányoztuk. Újdonságként egy olyan aktiváló molekulát használtunk, amelyet eddig csak matriptáz-1 aktivátorként ismertek, s mint ilyen, nem tételezték fel vasanyagcserére kifejtett hatását. Ez a hatás, főként a vashiányos anémia állatorvosi jelentősége miatt több emlősfajban, így például sertés esetében kiemelkedő fontosságú lehet. Eredményeink szerint a S1P matriptáz-1 aktivátor patkány primer májsejtenyészetben csökkentette a hepcidin mennyiségét, ezáltal hatással lehet a vasanyagcserére. Mindemellett a molekula a hepatociták életképességét és a redox homeosztázist nem befolyásolta, amely szerint a jelen vizsgálatokban matriptáz-2 aktivátornak is bizonyuló S1P vasanyagcserét befolyásoló szereppel bír, ugyanakkor nem károsítja az igen érzékeny májsejtek alapvető életfolyamatait.

A 2. vizsgálatban néhány, korábban már vizsgált, és emlősfajokban hatásosnak bizonyult matriptáz-1 és -2 gátlószerek sejtekre gyakorolt alapvető hatását és a sejtek életképességére, metabolikus aktivitására gyakorolt befolyását kívántuk tanulmányozni. A vizsgált inhibitorok esetében a sejtm metabolizmus, redox homeosztázis és gyulladáscitokinszintek mérése csirkéből származó hepatocita mono- és hepatocita – nem-parenchimális (NP) sejt ko-kultúra modellben, a mi vizsgálatunkat megelőzően még nem történt meg, holott éppen baromfinál az igen gyakori vírusos megbetegedések megelőzésében, gyógyításában e szereknek igen nagy jelentősége lehetne. Eredményeink szerint a két vizsgált matriptázgátló molekula nem volt toxikus, de eltérő hatást fejtettek ki a gyulladáscitokinek termelésének mértékére, ezzel szemben a redox homeosztázisra nem gyakoroltak alapvető hatást. A vizsgálatok alapján megállapíthatjuk, hogy eltérő matriptázgátlók eltérő mértékben és módon befolyásolhatják a sejtek alapvető életfolyamatait, amely hatások csak részben egyeznek meg az emlősöknél tapasztaltakkal. Így levonható az a következtetés, hogy minden egyes vizsgálni kívánt gátlószerek esetében első lépésként fajspecifikus *in vitro* sejtmodellt érdemes alkalmazni, és az egyes molekulákat ebben az (pl. az általunk is alkalmazott) *in vitro* tesztrendszerben célszerű összehasonlítani. A kísérlet eredményei arra utalnak, hogy a matriptáz vélhetően a máj gyulladáscsökkentő

homeosztázisának szabályozásában is szerepet játszik, ugyanakkor nem tekinthető jelentős redox modulátornak csirkében.

A 3. vizsgálatunkban sertés bélhámsejtenyészetben vizsgáltuk két, általunk eddig még nem tanulmányozott matriptázgátló hatását. Citotoxikus befolyást nem tapasztaltunk, azonban mindkét gátlószer esetében egyes kezelési koncentrációknál TER csökkenést és antioxidáns hatást mértünk. A TER-t csökkentő hatás alapvető fontosságú lehet minden faj esetében a bélhám barrier funkciójának esetleges károsodása miatt.

Jelen vizsgálataink célja tehát nemcsak az volt, hogy egy bizonyos aktiváló vagy gátlószer hatását összegezzük, hanem egy olyan *in vitro*, lehetőség szerint faj- és szervspecifikus modell rendszert alakítsunk ki, mely alkalmas lehet ezután számos újonnan kifejlesztett, matriptáz gátló vagy aktiváló molekula vizsgálatára. Megállapítható, hogy a bél- és májsejtenyészetben végzett vizsgálatok alapvető fontosságúak, mivel a *per os* bejuttatott gyógyszerek e szervek sejtjeivel kerülnek elsődlegesen kapcsolatba, és akár az általunk itt ismertetett modellrendszerben végzett vizsgálatok alapján kiválaszthatók lesznek azok a molekulák, amelyek további *in vitro* és *in vivo* tesztelése gyakorlati jelentőséggel bírhat.

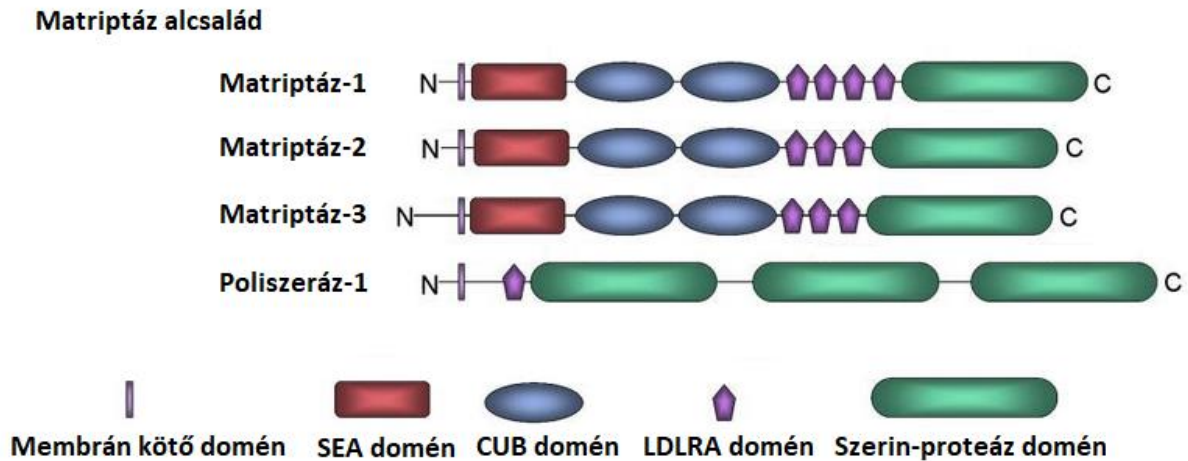
3 Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az irodalmi áttekintésben bemutatásra kerül a kettes típusú transzmembrán szerin-proteáz (TTSP) család, majd ebből kiemelten két tagjával, a matriptáz-1 és matriptáz-2 enzim szintézisével, élettani és patológiás szerepével foglalkozunk. A későbbi kísérletekhez kapcsolódóan a többféle matriptázgátló csoportok közül a 3-amidinofenilalanin inhibitorok és egy matriptáz-1 aktivátor, a szfingozin-1- foszfáttal kapcsolatos publikációkról készült összefoglaló a disszertáció jelen fejezetében.

3.1 A kettes típusú szerin-proteáz család

A szerin-proteázok az egyik legősibb és legnagyobb enzimcsalád a proteázok közül. Tagjai számos élettani és patológiás folyamatban vesznek részt, mint például az emésztés, véralvadás, sebgyógyulás, vérnyomás szabályozása vagy a vírus-sejt interakció. A szerin-proteázok közé soroljuk a TTSP családot, amelyhez négy alcsalád tartozik: a HAT/DESC (human airway trypsin-like protease/differentially expressed in squamous cell carcinoma) alcsalád, a hepszin/TMPRSS (transmembrane protease/serine) alcsalád, a matriptáz alcsalád és a korin (Szabo et al., 2003). Közös bennük, hogy egy N-terminális transzmembrán és egy C-terminális extracelluláris részből épülnek fel (Szabo et Bugge, 2008). Az N-terminális plazmamembránhoz kötött rész miatt a sejt felszínén helyezkednek el, így sokuk feladata a sejt és az extracelluláris környezet közötti jelátvitel közvetítése, a különféle sejtválaszok szabályozása, a szövetek morfogenezise, barrier funkció kialakítása, illetve víz és ion transzport (Szabo et Bugge, 2011). A C-terminális szakasz tartalmazza a katalitikus hisztidin-aszparaginsav-szerin részt és a „stem”, azaz törzsrégiót, amely többféle fehérjét tartalmazhat. A HAT/DESC alcsaládhoz tartozik a HAT, DESC1, TMPRSS11A, HAT-like 2, HAT-like 3, HAT-like 4, HAT-like 5. A törzsrégió itt egy SEA szakaszból áll (sea urchin sperm protein/enteropeptidase/agrin). A hepszin/TMPRSS alcsalád a hepszin, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4, TMPRSS5/spinesin, MSPL (mosaic serine protease large-form), enteropeptidáz enzimekből áll. Mindegyik enzim törzsrégiójában van egy LDLRA (low-density lipoprotein receptor class A) egység, de az enteropeptidáznál ez kiegészül sorrendben SEA, LDLRA, CUB (Cis/Clr, urchin embryonic growth factor, bone morphogenic protein-1), MAM (mepirin/A5 antigen/receptor protein phosphatase mu) résszel is (Szabo et Bugge, 2008; Bugge et al., 2009). A matriptáz alcsaládhoz a matriptáz-1 (Shi et al., 1993), matriptáz-2 (Hooper et al., 2003), matriptáz-3 (Szabo et al., 2005) és poliszeráz-1 (Cal et al., 2003) tartozik. A matriptázok törzsrégiója egy SEA, két CUB és három (matriptáz-2, -3) vagy 4 (matriptáz-1) LDLRA szakaszból épül fel (Szabo et Bugge, 2008; Bugge et al., 2009) (1. ábra). Habár számos gén kódolja a többféle TTSP enzimet, úgy tűnik, a kódoló régió elég

konzervatív, és az eddig vizsgált összes gerincesben sikerült kimutatni a genomból (Szabo et Bugge, 2008). Az összes TTSP inaktív, egyláncú proenzimként szintetizálódik, de a matriptáz, matriptáz-2, hepszin, TMPRSS2, TMPRSS3, TMPRSS4 *in vitro* képes autoaktivációra (Bugge et al., 2009). Jelen disszertációban a matriptáz alcsalád két tagjával, a matriptáz-1 és matriptáz-2 enzimvel foglalkozunk részleteiben.



1. ábra: A matriptáz alcsalád sematikus rajza, az ábrán az extracelluláris domének láthatóak (A kép forrása: Bugge et al., 2009).

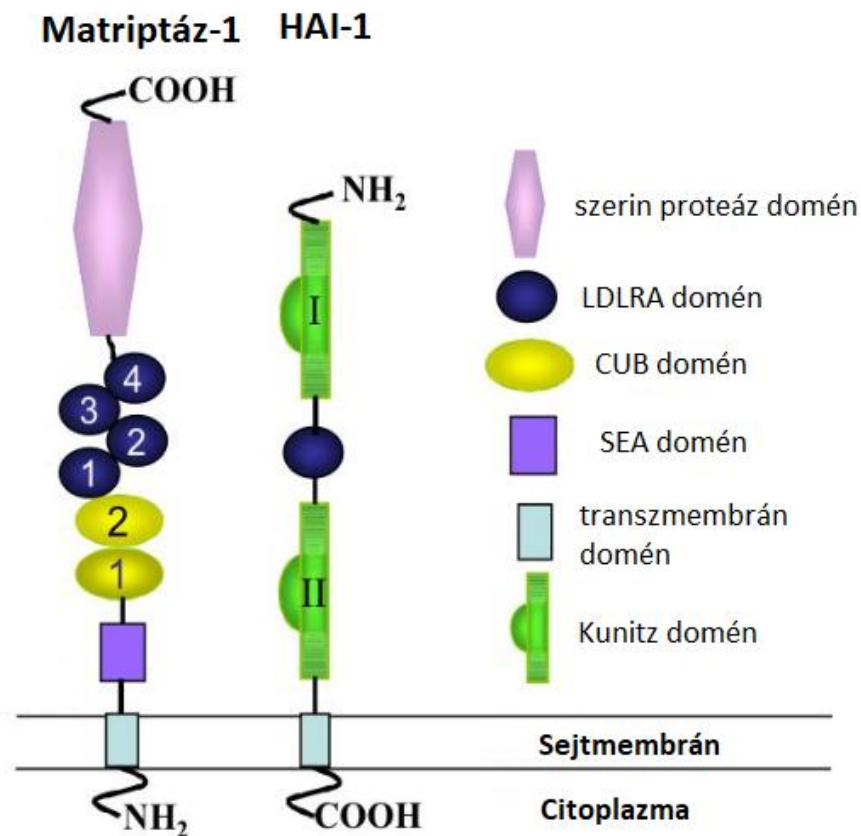
3.1.1 A matriptáz-1

A matriptáz-1 (más néven MT-S1P, TADG-15, epitin, vagy ST14) először emlőtumor sejtenyészetben került leírásra, mint zselatinbontó enzim (Shi et al., 1993). Ortológját számos gerinces fajban kimutatták, például zebradánió, egér, patkány, csirke, kutya, csimpánz és humán genomból is (Szabo és Bugge, nem publikált adat, List et al. 2006a összefoglaló cikke alapján). Az eddigi kutatások szerint széles spektrumú hasítási aktivitása hozzájárulhat az extracelluláris mátrix bontásához, más proteázok és faktorok aktiválásához, és elengedhetetlen a posztnatális túléléshez.

3.1.1.1 A matriptáz-1 szintézise, aktiválása, gátlása

A 80-95 kDa molekulásúlyú matriptáz-1 a sejtfelszínhez kötötten található (Takeuchi et al., 2000), az apikális kapcsolóstruktúra komplex területén (Buzza et al., 2010). Ahhoz, hogy elérje kétláncú, proteolitikusan aktív formáját, a szintézistől számítva számos szabályozó lépésre van szükség. A matriptáz egyláncú, inaktív zimogénként szintetizálódik az endoplazmatikus retikulumban (ER) (Lin et al., 1999). Autoaktivációra képes, de a folyamat részleteiben nem teljesen tisztázott. Szükség van két endoproteolitikus hasításra és

sejtfelszínre szállításra. A szintézishez, transzporthoz, endogén hasításhoz és a sejtfelszínre kerüléshez, így aktiválásához, majd a spontán autoaktiváció megakadályozásához és a szerin-proteáz régió gátláshoz is elengedhetetlen a hepatocita növekedési faktor-1 (HAI-1) (Oberst et al., 2005). A matriptáz-1 és HAI-1 felépítése a 2. ábrán látható (Lee, 2006).



2. ábra: A matriptáz-1 és HAI-1 szerkezeti felépítése (a kép forrása: Lee, 2006).

Az első hasítás az N-terminális rész SEA doménjében történik a 149. számú glicin aminosav után az ER vagy a Golgi-készülék területén (1. táblázat). A hasító enzimet nem ismerjük, vagy lehetséges, hogy nem enzimatis hidrolízis történik. Bár így megszakad a kovalens kapcsolat a membránhoz kötő N-terminális résszel, a matriptáz-1 továbbra is szorosan kapcsolódik a membránhoz, valószínűleg nem kovalens kötések révén (Cho et al., 2001). Szükséges még egy proteolitikus hasítás már a sejtfelszínen, a katalitikus és nem katalitikus domén határán, a szerin-proteáz domén 614. pozíciójú arginin aminosav után (1. táblázat). A hasítás után a két részt diszulfid-hidak kötik össze. Ha ez a hasítás nem történik meg (például mutáció miatt), akkor nem lesz proteolitikusan aktív az enzim. Csak az aktív, kétláncú forma tud összekapcsolódni a HAI-1 faktoral. Az autoaktiváció szabályozásában részt vesz a matriptáz-1 több doménje is. Az autoaktivációhoz szükség van négy intakt LDLRA doménre. Ez azt jelenti, hogy az LDLRA osztályú domén fontos az enzim-fehérje kölcsönhatásokban a matriptáz-1 és az aktivációs folyamatban részt vevő

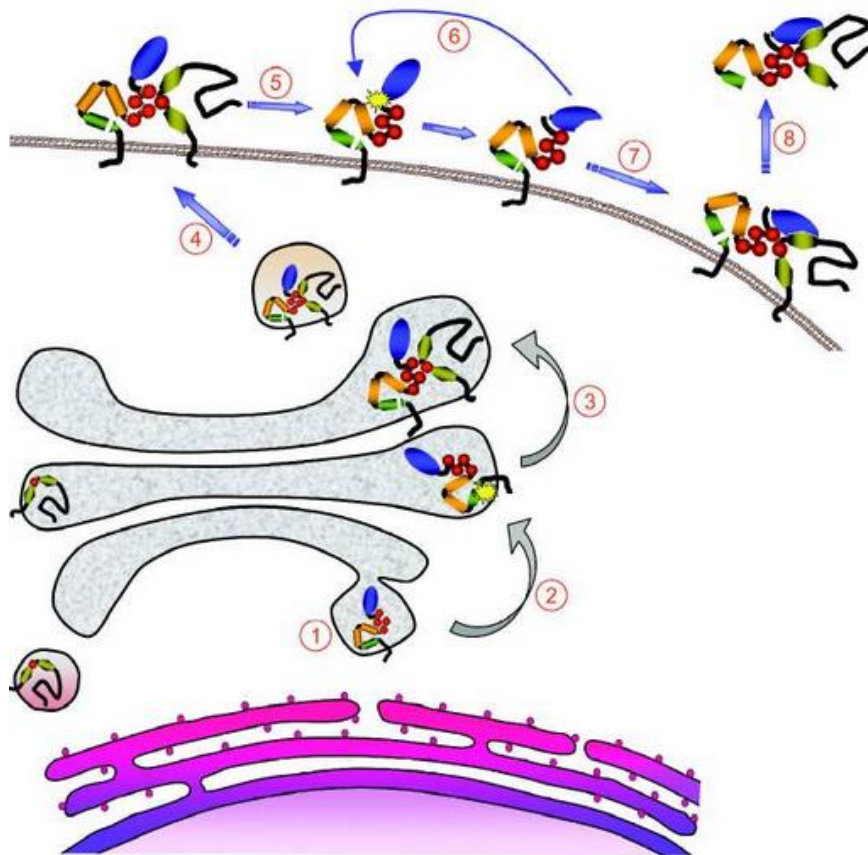
fehérjék között. A potenciális ligandumok, amelyek az LDLRA részen kötődnek, és aktiválják azt, még további jellemzésre várnak. LDLRA pontmutáció esetén az autoaktiváció nem működik, de ha mind a négy LDLRA szakasz hiányzik, akkor a nem sérült matriptáz-1 képes aktiválni az LDLRA hiányos matriptáz-1 enzimet. A domén valószínűleg kettős funkciót tölthet be: egyrészt kötőhelyként szolgálhat a matriptáz-1 aktivátoraihoz, másrészt autoinhibitív doménként szolgálhat, ha a proteáz aktivátorok nincsenek jelen. Szükséges még az első CUB domén glikolizációja a matriptáz-1 aktiválásához. A CUB domén deléciója megakadályozza a matriptáz-1 proteolitikus hasítását kisebb molekulatömegű formáikba, és ez a matriptáz-1 nem megfelelő aktiválódását is eredményezheti. Ha mindkét CUB domén egyidejűleg hiányzott, a vad típussal közel azonos matriptáz-1 aktiválást eredményezett. Ez hasonló ahhoz, mint amikor mind a négy LDLRA domén egyszerre törlődik: valószínűleg a CUB domének együttesen szintén autoinhibitorként funkcionálhatnak, ha nem vesznek részt az aktivációban (Oberst et al., 2003b). További kutatások szerint a sejtfelszínről való leváláshoz szükség van egy hasításra a SEA és CUB domén határán a 186. arginin aminosavnál (1. táblázat). A sejtfelszíni leválás szorosan kapcsolódik a zimogén aktiválásához, és leválva még az enzim aktív maradhat, hozzáférhet szubsztrátjaihoz, ha nem kapcsolódik a HAI-1 aktivátor inhibitorához (Tseng et al., 2017).

1. táblázat: A matriptáz-1 aktivációjához szükséges hasítások (forrás: Tseng et al., 2017)

	Szintézis/Érés	Zimogén aktiváció	Leválás
Sejtbeli elhelyezkedés	ER/Golgi	sejtmembrán	sejtmembrán
Hasítás helye	149. glicin-150. szerin SEA domén	614. arginin-615 valin szerin proteáz domén	186 arginin-187 szerin SEA-CUB domén határa
Hasítás típusa	konformációs stressz? önhasítás?	autoaktiváció (zimogén aktivitás)	aktív matriptáz enzimatikus hasítása
Funkció, termék	zimogén aktiváció	aktív matriptáz-1 létrejötté	matriptáz-1 lehasadás, elnyújtott aktivitás

Mindezek mellett szükség van az aktiváláshoz a már előbb említett HAI-1 faktorra is. A HAI-1 egy Kunitz-családba tartozó szerin-proteáz inhibitor, amely két Kunitz (1 és 2) típusú

domént és egy LDLRA részt tartalmaz (1. és 2. ábra) (Shimomura et al., 1997). A matriptáz-1 a sejtfelszínre szállítás közben is együtt található meg a HAI-1 faktoral egy vezikulában, ún. aktivációs központban, és együtt halmozódnak fel a sejtkapcsoló struktúráknál. HAI-1 hiányában, vagy ha sérül a Kunitz-1 domén, a matriptáz-1 az ER vagy Golgi-apparátusban marad. Ha gátolták siRNS technikával a HAI-1 expressziót, akkor több matriptáz-1 autoaktiváció következett be, így a HAI-1 matriptáz-1 spontán autoaktivációja ellen is véd. Mindezek mellett HAI-1 hiányában a matriptáz-1 szintézis alacsony szinten marad egy autoproteolitikus aktiváció miatt, amely valószínűleg a Golgi/ER területén történik. Ez negatívan hat a sejten belüli transzportra, valamint a további matriptáz-1 transzlációra (Oberst et al., 2005). Korábbi matriptáz-1 szerin-proteáz régió elemzés alapján (Friedrich et al., 2002) az aktivációs folyamat végén a HAI-1 (Benaud et al., 2001) Kunitz-1 doménja (Oberst et al., 2005) gátolja az enzim proteolitikus aktivitását. Ezek az eredmények azt mutatják, hogy a matriptáz-1 HAI-1 általi szabályozása több szinten is előfordulhat, beleértve a szintézisét, az intracelluláris transzportját, a spontán aktivációt, a szabályozott aktiválását, a szerin-proteáz régió gátlását és az ektodomén leválást is (Oberst et al., 2005). A szabályozás lépései a 3. számú ábrán láthatóak (List et al., 2006a).



3. ábra: A matriptáz-1 aktivációja. (1) A matriptáz-1 az ER területén szintetizálódik egyláncú zimogénként az N-terminálissal membránhoz kötve. (2) Endoproteolitikus hasítás a SEA domén területén az ER vagy a Golgi-apparátus területén. (3) A SEA

domén hasított matriptáz-1 a HAI-1 faktoral együtt található, együtt facilitált transzporttal (4) a sejtmembrán felé vándorolnak az aktivációs központ vezikulában, (5) ahol bekövetkezik a szerin-proteáz régió autokatalitikus hasítása, és (6) kialakul az aktív matriptáz-1, (7) amelyet szinte azonnal gátol a HAI-1. (8) A kialakult komplex az extracelluláris térbe válik le (A kép forrása: List et al., 2006a).

Vannak ismert aktivátorai is, mint pl. a vérplazmában is megtalálható szfingozin-1-foszfát (S1P) (Benaud et al., 2002), és van kémiai induktora is, mint a polianionos suramin (Lee et al., 2005).

3.1.1.2 A matriptáz-1 élettani folyamatokban betöltött szerepe

A matriptáz nagy mennyiségben megtalálható az egész szervezetben szinte az összes szerv esetén, de csak az epiteliális sejtekben (epidermisz, kornea, nyálmirigy, száj és orrüreg, pajzsmirigy, tímusz, nyelőcső, trachea, bronchiolák, alveolusok, gyomor, hasnyálmirigy, epehólyag, vékonybél, vastagbél, vese, mellékvese, húgyhólyag, ureter, prosztata, here, petefészkek, méh, vagina) (Oberst et al., 2003a). A matriptáz génkísérletes inaktiválása (ST14^{-/-}) esetén egerek epiteliális szöveteiben számos funkciózavart figyeltek meg. Jellemzően megnövekedett az epiteliális sejtrétegek áteresztőképessége a tight junction (TJ) fehérjék megváltozott elhelyezkedése következtében (List et al., 2009).

List és munkatársai (2002) által végzett kísérletben az ST14^{-/-} egerek 48 órán belül elpusztultak kiszáradás miatt. Az ST14^{-/-} egerek bőre száraz volt, illetve a szőrtüszők generalizált hipopláziája és a timociták megnövekedett apoptózisa volt megfigyelhető (List et al., 2002). További kísérletekben igazolták, hogy a szájüreg és tímusz epitélium keratinizált részében is a matriptáz-1 a felelős a barrier funkció kialakulásáért (List et al., 2006b). Molekuláris szinten matriptáz-1 hiányában a keratinocita differenciálódása sérült. A profilaggrin proprotein a végső differenciálódás során fehérjebontás hatására filaggrin monomerekre és NH₂-terminális filaggrin S-100 szabályozó fehérjére válna, matriptáz-1 hiányában viszont ez nem következik be (List et al., 2003). Korábbi kutatások szerint a matriptáz-1 a prosztazin zimogénjét hasítással aktiválja, amely egy kaszkárendszer elindításával járul hozzá a profilaggrin átalakulásához, a *stratum corneum* formálódásához, és az epidermisz barrier funkciójának kialakításához (Netzel- Arnett et al., 2006). Újabb genetikai és sejt alapú kutatások szerint viszont a prosztazinra van szükség a matriptáz-1 aktiválásához, és a prosztazin zimogén aktiválás nem matriptáz-1 aktivitásfüggő (Szabo et al., 2012). A matriptáz-1 aktiválásához a prosztazintól nem igényel zimogénből aktív prosztatin átalakulást vagy enzimátikus aktivitást, és a prosztazin zimogén aktív prosztazinná történő átalakulása a matriptáztól függ, de nem igényel matriptáz zimogén átalakulást. Tehát a matriptáz-1 és a prosztazin kölcsönös zimogén aktivációs komplexet képez, amelyben a

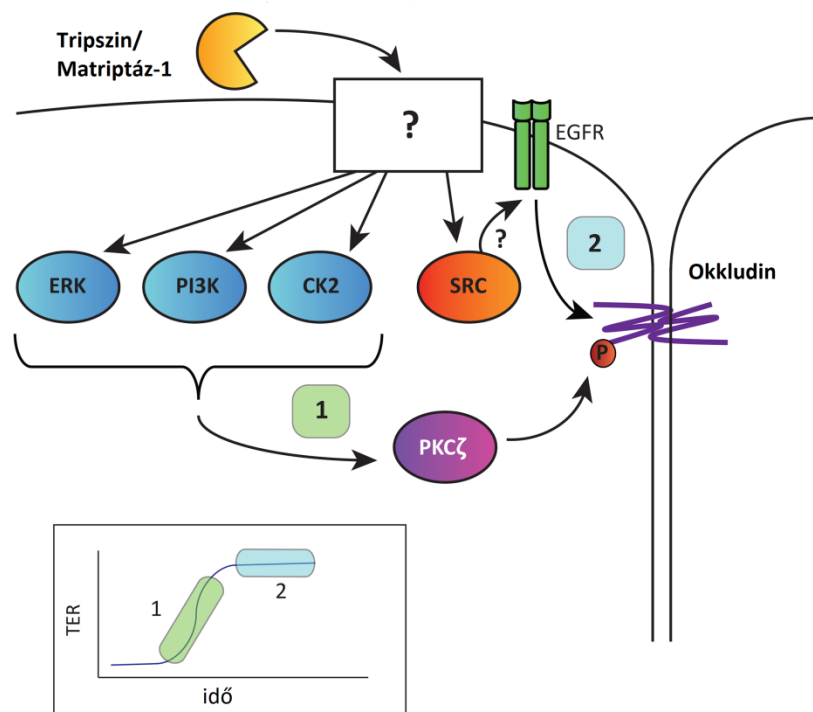
matriptáz aktivációt a prostazin indukálja. Azonban a prostazin képes indukálni a matriptáz-1 aktivációt, függetlenül a prostazin zimogén átalakulásától vagy katalitikus aktivitásától. Ezzel szemben a prostazin aktiválása matriptáz-1-től függ, de a matriptáz-1 általi aktiválás a matriptáz-1 zimogén által kiváltható (Friis et al., 2013). ST14^{-/-} egerek *stratum corneum* területén található intercelluláris lipidlemezek (a lamelláris testek) összetétele is megváltozott. A szabad zsírsavak aránya jelentősen csökkent, amíg a koleszterin és származékai, illetve a foszfolipidek aránya nőtt. Az ultrastrukturális vizsgálat eredménye alapján az abnormális lipid összetétel nem hagyta a lipid mátrixot összerendeződni, hanem rövid, töredezett, hullámos, rendezetlen lipidstruktúra volt látható, így nem tudott víztaszító védőréteget alkotni (List et al., 2003). A szőrtüszőknél a matriptáz-1 az anagén, növekedési fázisban expresszálódik nagy mennyiségben, a hajhagyma germinatív mátrixában levő hámsejtekben, a prekortex és cortex sejteiben (List et al., 2006b). ST^{hyp}^{-/-} transzgenikus egereknél, ahol a vad típus matriptáz-1 szintjének 1 %-a található, a profilaggrin rendellenes érése, akantózis, ortohiperkeratózis és CD4⁺ T-sejtek infiltrációja látható. A bőrön található baktériumok génszekvenciája alapján változik az egészséges bőrhöz képest a fajok aránya (*Pseudomonas* csökken, amíg *Corynebacterium* és *Streptococcus* fajok baktériumainak száma nő), így a genetikai állapot fontos szerepet tölt be a különböző bőrbetegségek kialakulásában is (Scharschmidt et al., 2009). Egy újabb kutatásnál olyan kísérleti egereket hoztak létre, amelyek csak olyan matriptáz-1 zimogént tudtak expresszálni, ahol a 614. arginint glutaminnal helyettesítik, így a mutáns matriptázon az aktivációs hely hasadása nem jön létre, ami az aktivációhoz szükséges lenne. Az ST14^{-/-} egerekkel szemben életképesek voltak, kifejlődött az epiteliális barrier és képes volt a sérült epitelium regenerációra. A bőr makroszkóposan megkülönböztethetetlen volt, de a vastagsága és a *stratum corneum* fejlettsége alacsonyabb volt, és több folyadékvesztést tett lehetővé a kontroll ST14^{+/+} egerekhez képest. A szőrzetben felnőtt korban nem volt különbség, de a fejlődés közben igen. Egyrészt késett a szőrzet megjelenése, illetve a vad típussal ellentétben nem volt látható a születés után a bajusz sem. A növekvő bajusz gyakran összehajlott, göndörödött. A zimogén a prostazint, és a proteáz aktivált receptor-2 (PAR-2) gyulladásozó jelátviteli utat is aktiválta. A tanulmány alapján a matriptáz-1 zimogén biológiailag aktív és képes végrehajtani a proteáz homeosztázisban betöltött funkcióit (Friis et al., 2017). Hasonló megfigyelést tettek humán autoszomális recesszíven öröklődő ichtyosis betegségénél hipotrichózis szindrómával társulva. Az ST14 génhelyen levő mutáció érintette a matriptáz-1 szerinproteáz régióját, amely testszerte halbőrűséghez vezetett. Az összes beteg haja göndör, ritka, törékeny, száraz és fénytelen volt, és lassú növekedést mutatott. Minden betegnél fényérzékenység volt tapasztalható, illetve volt, hogy a szem homályosodása is megfigyelhető volt. Szövettanilag a kontrollhoz képest nem volt látható különbség, de

elektronmikroszkóppal vizsgálva a *stratum corneum* területének felső rétegeiben a dezmoszómáknál rendellenességek látszódtak (Basel-Vanagaite et al., 2007).

Humán (Oberst et al., 2003a) és patkány (Satomi et al., 2001) emésztő szervrendszer epitéliumában sok matriptáz-1 található. A vékonybélben végig kimutatható, a kriptáktól egészen a bélbolyhok csúcsáig (kriptában kissé kevesebb, csúcsi résznél több enzimmel), illetve magas expresszió figyelhető meg a kolonban (Oberts et al., 2003a; Satomi et al., 2001). A matriptáz-1 a TJ fehérjék szabályozása révén alakítja ki és tartja fenn a bélhámréteg homeosztázisát (List et al., 2009). A bélhámréteg fontos gát („barrier”) funkcióval rendelkezik és szelektív permeabilitást biztosít a tápanyagok és folyadékok számára. A paracelluláris abszorpciós útvonalat TJ kapcsolóstruktúrák szabályozzák, amelyeket okkludin, klaudinok és junction adhézis fehérjék építenek fel (Laukoetter et al., 2008). Számos kutatás megerősíti a matriptáz-1 enzim kulcsszerepét a bélbarrier funkciójának fenntartásában. ST14^{-/-} egerek vastagbélben fokozott nyálkatermelődést tapasztaltak ödémás szubmukózával (List et al., 2009). További kísérletekben ST14 matriptáz hipomorf egereken, ahol az intesztinális matriptáz mRNS-szint századrészére csökkent, a bél átteresztővé vált: csökkent a transzepteliális elektromos ellenállás (TER), fokozódott a paracelluláris átjárhatóság, így a sejtréteg átteresztőképessége. Mindezek mellett azt találták, hogy a klaudin-2 TJ csatornát képző fehérje mennyisége is megnövekedett (Buzza et al., 2010; Netzel- Arnett et al., 2012). Ugyanezt tapasztalták humán kolon karcinóma (Caco-2) sejtvonalon 4-(2-aminoetil)-benzoeszulfonil-fluorid (AEBSF) szerin-proteáz inhibitor vagy matriptáz-1 siRNS alkalmazás hatására (Buzza et al., 2010). Crohn-betegség és ulceratív kolitisz esetén is szignifikánsan alacsonyabb matriptáz mRNS-szintet és megnövekedett klaudin-2 expressziót találtak a gyulladt kolon szövegeiben. Dextrán-szulfát-nátrium (DSS) kolitist indukáló molekula hatására az ST14 hipomorf egerek kisebb súlyúak lettek, nagyobb lett a mortalitás és súlyosabb klinikai tüneteket produkáltak az ugyanilyen kezeléssel átesett vad típusú társaikhoz képest. Ezen kívül a DSS kezelést követő regenerációs idő alatt magasabb tumor nekrozis faktor (TNF α), interleukin-6, -13 (IL-6, IL-13) szintet produkáltak a kezeléssel szintén átesett kontroll egerekhez képest (Netzel- Arnett et al., 2012). Az MI432 sorszámú matriptázinhibitor használatakor a TER csökkenését és a TJ szorosságáért felelős okkludin helyzetváltozását figyelték meg a kontroll sejtekhez képest IPEC-J2 sertés vékonybélhám-sejtvonalon (Pászti-Gere et al., 2015b). Nem tumoros kutya jejunális epiteliális sejtvonalon (SCBN) a sejtenyészethez apikálisan adagolt matriptáz-1 a TER növekedését vonta maga után. Kísérletesen létrehozott, okkludint előállítani nem képes SCBN sejtekhez matriptáz-1 enzimet adagolva viszont nem tapasztaltak TER növekedést. A matriptáz-1 nem tudta visszafordítani a TNF α és interferon (INF γ) okozta TJ károsodást (Ronaghan et al., 2016). A kutatócsoport további vizsgálataiban aktív szerin-proteáz domén esetén emelkedett a TER. A kutatócsoport

részben leírt egy jelátviteli utat, amelyet a tripszin/matriptáz-1 indít el, képes a TER megemelésére és fenntartására. Valószínűsíthető egy sejtfelszíni receptor/ligandum, amelyet hasítva kezdődik a bevezető fázis, gyors TER emelkedéssel, majd ennek fenntartásához szükséges, az ábrán is látható jelátviteli utak végül az okkludin foszforilálódásához vezetnek (4. ábra) (Lahey et al., 2017). Egy másik kísérletben, ahol transzgenikus egerekben a matriptáz-1 csak zimogén formájában expresszáldott, a bél bár szövettanilag nem különbözött, az áteresztőképessége megduplázódott a kontroll ST14^{+/+} egerekhez képest (Friis et al., 2017). A bőr mellett vizsgálták a prosztazin helyzetét Caco-2 sejtvonalon, és megállapították, hogy a barrier funkció kialakításához is szükség van a prosztazinra. A prosztazin itt sem enzimatikusan hat a matriptáz-1 aktiválásra, viszont aktív matriptáz-1 esetén már prosztazin hiányában is kialakul a megfelelő bélbarrier (Buzza et al., 2013).

Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a matriptáz-1 számos szabályozó funkciója által szükséges a posztnatális túléléshez, az epiteliális szövetek homeosztázisának kialakításához és fenntartásához, így például a tímuszsejtek túléléséhez, fejlődéséhez, szórtüszők, epidermisz fejlődéséhez, valamint a bélbarrier kialakításához. A matriptáz-1 mindezek mellett képes az extracelluláris mátrixot is bontani (Shi et al, 1999), ezért is különös fontos kifejeződésének szigorú szabályozása.



4. ábra: A tripszin/matriptáz-1 által indukált TER növekedés jelátviteli útja. A matriptáz hasít egy jelenleg még nem ismert sejtfelszíni molekulát/molekulákat, amely gyors TER növekedést von maga után. A bevezető fázisba (1) tartozik a ERK1/2, PI3K,

CK2 és SRC megjelenése. A fenntartó fázis (2) egyrészt részben az EGFR kötött tirozin kináz aktivitásától függ, amely pedig valószínűleg a SRC függő EGFR transzaktivitástól. Az ERK1/2, (MAPK3/1), PI3-K és CK2 kináz barrier funkció szabályozásában betöltött szerepétől már több publikáció született. A PKC fontos szerepet játszik a folyamatban, de pontos feladata még nem ismert. CK2: kazein kináz 2; PI-3K: foszfoinozítid-3-kináz; ERK1, ERK2: extracelluláris signal-regulated kinase; MAPK3, MAPK1: mitogén aktivált protein kináz, SRC: intracelluláris protein-tirozin kináz; PKC: protein kináz C (A kép forrása: Lahey et al., 2017).

3.1.1.3 A matriptáz-1 patológiás folyamatokban betöltött szerepe

A matriptáz-1 aktivitása szigorúan szabályozott. Ha a szabályozás sérül, akkor ismert szubsztrátjainak hasításán át képes aktiválni az urokináz plazminogén aktivátort (uPA), a hepatocita növekedési faktort (HGF) és a PAR-2-t (Förbs et al., 2005; Lee et al., 2000; Takeuchi et al., 2000). Ezek a szubsztrátok számos patológiás folyamat elindításáért felelősek, mint sejtproliferáció, sejtmigráció, gyulladásos citokinek termelésének serkentése, hiperplázia, fibrózis. Így a matriptáz-1 nem megfelelő működése számos gyulladásos és daganatos betegség esetén lehet kulcsfontosságú.

3.1.1.3.1 A matriptáz-1 szerepe a tumor metasztázis képzésében

Számos epiteliális eredetű daganattípusnál megnövekedett matriptáz-1 aktivitást, illetve csökkent HAI-1 mennyiséget találtak. Ha felborul az egyensúly a matriptáz-1 gátlás szabályozásakor, ez hatással lehet e daganatoknál tapasztalt matriptáz mediált proteolízisre (List et al, 2006a). A megnövekedett matriptáz-1 expresszió, illetve ha a matriptáz-1: HAI-1 arány nő, magyarul jelentősen csökkent a HAI-1 mennyisége, rosszabb kórjóslatot von maga után (Oberst et al., 2002; Saleem et al., 2006; Vogel et al., 2006; Zeng et al., 2005), mert nem szabályozott matriptáz-1 aktivitást tesz lehetővé (List et al., 2006a). Megnövekedett matriptáz-1 expresszió látható például petefészek karcinóma (Jin et al, 2006; Oberst et al., 2002), invazív ductális emlőkarcinóma (Oberst et al, 2001), méhnyak karcinóma (Santin et al, 2003), prosztata adenokarcinóma (Riddick et al., 2005; Saleem et al., 2006) esetén. Ezzel szemben gyomor karcinómák (Zeng et al., 2005) és kolorektális karcinóma (Vogel et al, 2006) vizsgálatakor mérsékelt matriptáz-1 aktivitást tapasztaltak a normális szöveti szinthez képest, megnövekedett matriptáz-1:HAI-1 aránnyal. Ezek alapján az aktív matriptáz-1 funkcionális tumor biomarker szerepe is felmerülhet (LeBeau et al., 2013). A matriptáz-1 túlzott mértékű expressziója a transzgenikus egerek bőrében spontán laphámsejtes karcinómát okozott, és drasztikusan fokozódott a 7,12-dimetilbenzantracén (DMBA) karcinogén-indukált daganatképződés is. A matriptáz-1 által indukált daganatképződést

progresszív interfollikuláris hiperplázia, diszplázia, follikuláris transzdifferentiáció, fibrózis és dermális gyulladás előzte meg. Ezen kívül a matriptáz-1 indukálta a pro-onkogén foszfatidil-3-inozitol-kináz (PI3K) – AKT jelátviteli utat. Viszont az epidermális HAI-1 expresszió teljesen megakadályozta a matriptáz-1 onkogén hatásait (List et al., 2005). Mindezen felül az aktivált matriptáz-1 önmaga is bontja az extracelluláris mátrixot (Ko et al., 2015; Satomi et al., 2001). A sejtfelszínről lehasadt matriptáz-1, ha nem kapcsolódik HAI-1 inhibitorral, akkor képes szubsztrátjai hasítására (Tseng et al., 2017). Vannak faktorok, mint a transzformáló növekedési faktor β (TGF β), amelyek képesek indukálni a matriptáz-1 sejtfelszíni leválását (Lee et al., 2014). A matriptáz-1 így aktiválhatja az uPA, HGF és a PAR-2-t is (Förbs et al., 2005; Lee et al., 2000; Takeuchi et al., 2000), amelyek fontos mediátor szerepet töltenek be a tumor növekedésében, a tumorsejtek túlélésében és inváziójában. A HGF kulcsszerepet tölt be az epiteliális sejtek migrációjában, proliferációjában, morfogenezisében és túlélésében (Nakamura et al., 1989; Weidner et al., 1991). A matriptáz-1 képes a pro-HGF hasításával aktiválni, majd kötődni az epiteliális daganatnál megtalálható c-Met (mesenchymal-epithelial transition factor) receptorhoz, és elindítani a karcinogenezissel összefüggő c-Met/HGF jelátviteli utat (Kang et al., 2003), és ezt követően még számos jelátvitel után, mint a már korábban is említett pro-onkogén PI3K-AKT jelátviteli utat (Zoratti et al., 2015). Az uPA szintén pro-uPA formájában expresszálódik, és a matriptáz-1 aktiválja (Lee et al., 2000). Ezután képes receptorához kötődni (uPAR), majd a plazminogén rendszer aktiválásán át segíteni a mátrixbontást, és más faktorokon át szabályozni a sejtadhéziót, sejt migrációt és proliferációt (Sideniusi and Blasi, 2003). Újabb kutatások során a matriptáz-1 nem bizonyult a pro-UPA faktor fő aktivátorának (Zoratti et al., 2015). A G-protein kapcsolt PAR-2 receptor nem szabályozott működése során gyulladásos citokinek szekrécióját (Schaffner and Ruf, 2008), és pro-tumorigenikus faktorok expresszióját segíti elő (Sales et al., 2015). Egy másik kutatás alapján prosztata adenokarcinóma sejtvonalak esetén pozitív korrelációt találtak az ciklooxygenáz-2 (COX-2) és aktív matriptáz-1 között, mennyiségük jelentősen megemelkedett más, benignus sejtvonalakéhoz képest. Prosztata adenokarcinóma mintákat négy tumor stádiumra osztva szignifikánsan növekedett a matriptáz-1 mRNS mennyisége az egyes csoportok esetén. A COX-2 valószínűleg kulcsszerepet játszik a matriptáz-1 aktiválásában, hiányában csökkent a matriptáz-1 mennyisége, és a sejt szóródás is. A matriptáz-1 indukálása a COX-2 által elindított (prostaglandin E2) PGE2 prostaglandin receptor (E) E1 és E2 jelátviteli úton történik. Egyes nem-szteroid gyulladáscsökkentők (NSAID), mint a celecoxib, vagy sulindac sulfid, képes megakadályozni a sejt migrációt, a matriptáz-1 aktiválását. Xenograft egérműsérletekben pedig csökkent a tumorméret, és a metasztázis képződés mértéke is a tüdőben (Ko et al., 2017). Ezek alapján a matriptáz-1 használható lehetne, mint diagnosztikai eszköz, segíthetne a kórjóslat felállításában és daganatellenes szer fejlesztés célpontja is lehetne.

3.1.1.3.2 A matriptáz-1 szerepe oszteoarthritis esetén

Az oszteoarthritis egy krónikus, degeneratív ízületi betegség, amely az ízületi porc és az alatta levő csont degradációjához, a szinóvium gyulladásához (synovitis), és az új csont és porc (oszteofiták) növekedéséhez vezethet, fájdalommal és funkcióvesztéssel is jár (Troeberg és Nagase, 2011). A porcban a kondrociták körül nagy mennyiségben extracelluláris mátrix található, amely kollagénrostokból, proteoglikánokból, hialuronsavból és glükoproteinekből épül fel (Röhlich, 2006). Nagyon lassan és nehezen regenerálódik, mivel avaszkuláris, így lassan jut el a sejtekhez az oxigén, tápanyagok (Maehara et al., 2021). Egészséges porcszövet esetén nem találunk kimutatható matriptáz-1 aktivitást (Oberst et al., 2003a), viszont oszteoarthritis esetén emelkedett matriptáz-1 expresszió detektálható, megnövekedett kollagénbontó aktivitással. Ezen felül serkenti a mátrix metalloproteinázok (MMP), pl. MMP-1, MMP-3 expresszióját, majd a későbbiekben aktiválja is az inaktív zimogéneket (Milner et al., 2010). Képes segíteni az MMP és az aggregán proteoglikánnak az ADAMTS (A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin motifs) mediálta bontását, míg maga nem képes hasítani azt (Wilkinson et al., 2017). Az MMP és ADAMTS család tagjai számos celluláris, extracelluláris és extracelluláris mátrix szubsztrátot képesek bontani, beleértve kollagént és prokollagént, proteoglikánokat, citokineket, kemokineket, elasztint (Flannery, 2006). Számos, porcbontásban résztvevő faktort is aktivál, mint a PAR-2-t is (Ferrel et al., 2010), amely növeli az MMP-1 és az MMP-13 expresszióját (Boileau, et al., 2007). Így a matriptáz-1 közvetlen és közvetett módon is részt vesz a porcbontás szabályozásában. Számos sebészi és konverzatív gyógy mód létezik a porcsérülés gyógykezelésére (Maehara et al., 2021), a matriptáz-1 gátlása is felmerülhet kiegészítő kezelésként.

3.1.1.3.3 Vírus-sejt fúzió létrejötte matriptáz-1 segítségével

Az influenzavírus replikációjának előfeltétele a vírus sejtbe jutása. Ehhez szükség van a vírus egyik legfontosabb sejt felszíni glükoproteinjére, a hemagglutininre (HA), amellyel kapcsolódni tud a célsejt membránjában levő szialinsav tartalmú receptorokhoz. A HA prekursor formában szintetizálódik, hasítással történő aktiválására a TTSP család számos tagja képes (Garten és Klenk, 2008). Az influenzavírus H1 szubtypusának HA-jét képes volt hasítani a matriptáz, amíg a H2 és H3 szubtypusét nem (Hamilton et al., 2012). Humán H1N1 (Beaulieu et al., 2013) és H7N9 (Whittaker és Straus, 2020) influenzavírus esetén is megfigyelték, hogy a matriptáz-1 képes befolyásolni a HA hasítás segítségével a vírus sejtbe jutását. H9N1 madár influenzavírus esetén is bizonyítást nyert, hogy a matriptáz-1 képes ugyanígy elősegíteni a vírus penetrációt (Baron et al., 2013).

Az influenzavírus HA hasításhoz hasonlóan a TTSP család számos tagja, mint a matriptáz-1 képes a koronavírusok S tüskefehérjéjének hasítására is, amely feltétele a vírus-sejt fúzió létrejöttének. A közel-keleti légúti koronavírus (MERS Co-V; Middle East respiratory syndrome coronavirus) tüskefehérjéjének hasítására képes a matriptáz-1 is, bár a hasítás során egy eddig még nem karakterizált 25 kDa méretű fragment jött létre (Whittaker és Millet, 2020).

Az eddigi vizsgálatok alapján viszont a matriptáz-3 nem képes a HA hasítására (Chaipan et al., 2009), a matriptáz-2 pedig nem segíti elő a vírus-sejt fúzió létrejöttét a súlyos akut légzőszervi tünetegyüttest okozó koronavírus (SARS-CoV-1; severe acute respiratory syndrome coronavirus) esetében (Bertram et al., 2011).

3.1.1.3.4 A matriptáz-1 szerepe a pulmonáris fibrózis kialakulásában

Idiopátikus pulmonáris fibrózis (IPF) esetén tüdő parenchima pusztulása és az extracelluláris mátrix lerakódása látható, amely kóros reparáló mechanizmusokból származik. Noha az IPF-et gyakran a felborult egyensúlyú proteázaktivitáshoz társítják, a javító mechanizmusok még nem teljes mértékben tisztázottak. Az IPF esetén a tüdő szöveteiben megemelkedett matriptáz-1 és PAR-2 expressziót tapasztaltak. A matriptáz-1 mennyisége és aktivitása is megemelkedett az epiteliális sejteken, makrofágokon, intersticiális mononukleáris sejteken, és a fibroblasztoknál is (utóbbinál normális esetben minimális az expresszió) (Bardou et al., 2016). A transzformáló növekedési faktor alfa (TGF α), amely az egyik fő elindító az IPF folyamatainak (Fernandez and Eickelberg, 2012), hatására nő meg a matriptáz-1 expresszió, amely a PAR-2 receptort aktiválja (Bardou et al., 2016), így segíti a miofibroblasztok differenciációját, proliferációját és migrációját, valamint a kollagén szintézist (Borensztajn et al., 2010).

3.1.2 A matriptáz-2

A matriptáz-1 enizmmel ellentétben, amely a szervezet minden epiteliális eredetű szervéből kimutatható, a matriptáz-2 (TMPRSS6) legnagyobb mennyiségben a májban található, de egerekben magas szinten detektálható a vese, méh, ornyálkahártya szöveteiben is. Kis mennyiségben kimutatható az agy, tüdő, szív, lép, izom, bél, tímusz és hasnyálmirigy szervekből is (Hooper et al., 2003).

3.1.2.1 A matriptáz-2 szintézise, aktiválása

A matriptáz-2 szintézisének szabályozása részleteiben kevésbé ismert. Az aktív matriptáz-2 kb 90 kDa molekulásúlyú. A matriptáz-1 enzimhez hasonlóan proenzim

formában szintetizálódik az endoplazmatikus retikulumban, majd a sejt felszínén, membránhoz kötötten helyezkedik el. Aktiválásához szükség van az 576. arginin és 577. izoleucin között egy hasításra (Hooper et al., 2003), és autoaktivációra is képes (Bugge et al., 2009). A matriptáz-2 egyláncú zimogénként kerül a sejt felszínére. Korábbi kutatás alapján azt hitték, hogy a kétláncú, aktív forma a membránról leválás után alakul ki (Stirnberg et al., 2010), de az újabb kutatások szerint az autoaktiváció a sejt felszínén történik, még mielőtt leválna a membránról (Jiang et al., 2014).

3.1.2.2 *A matriptáz-2 élettani folyamatokban betöltött szerepe*

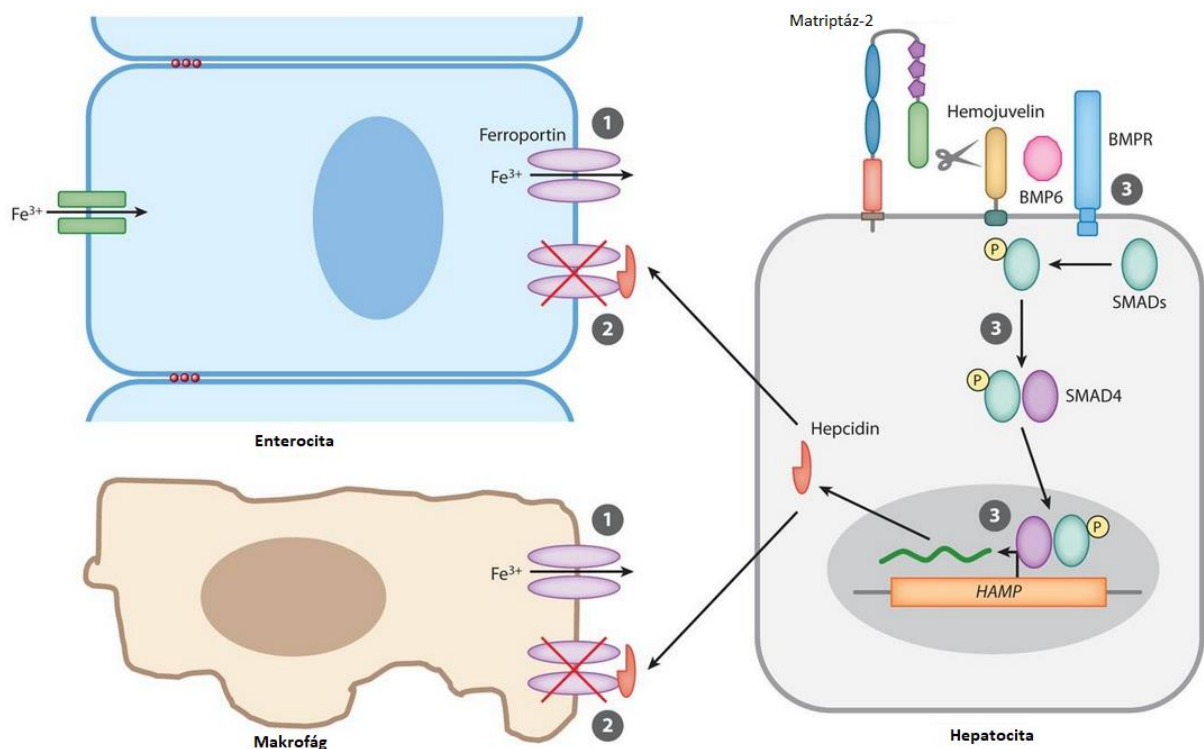
3.1.2.2.1 *A matriptáz-2 szerepe a vasháztartásban*

A vas létfontosságú a mikrobáknak és magasabbrendű szervezeteknek egyaránt, ugyanis alkotója a hemnek és számos redox enzimnek. A vas homeosztázisa, így a felszívódása, szállítása, raktározása és felszabadulása is szigorú szabályozás alatt áll. Erre azért is van szükség, mert a vas ionos formája reverzibilisen képes oxidálódni és redukálódni, így könnyen részt vehet reaktív oxigén gyökök (ROS) képzésében is (Swaminathan et al., 2007). A vészérum vas származhat a vas bélből való felszívódásából, az újrafelhasznált vas pedig a makrofágokból történő kiszabadulásból. A folyamatok egyik fő szabályozója a hepcidin (Nicolas et al., 2001; Nicolas et al., 2002a; Nemeth et al., 2004). Transzgenikus egereknél, ahol hepcidin túltermelődésként volt található, a megszületett egerek pár órán belül elpusztultak. A bőrük sápadt volt, a test vaskoncentrációja nagyon alacsonynak mutatkozott, és mikrociter, hipokróm anémia volt diagnosztizálható (Nicolas et al., 2002a). Ezzel ellentétben transzgenikus hepcidin hiányos egereknél a szervezet vastúltelítettsége, hemokromatózis volt látható (Nicolas et al., 2001). A hepcidin transzkripcióját több tényező befolyásolja. Indukálja a szövetek vas túltelítettsége, gyulladás, főleg az IL-6 citokin (Nemeth et al., 2003; Nemeth et al., 2004; Du et al., 2008), illetve a csont morfogénikus fehérje (BMP) BMP-2, BMP-4, BMP-9, SMAD-1 fehérje (Du et al., 2008). Viszont gátolja a vashiány, anémia, és hipoxia (Nicolas et al., 2002b; Nemeth et al., 2004). Számos kutatás alapján a hepcidin transzkripciójának egyik fő szabályozója a matriptáz-2 (Du et al., 2008; Folgueras et al., 2008, Silvestri et al., 2008).

Alacsony transzferrin szaturáció esetén, ha a szervezet vasraktárai kimerülnek, a hepcidin mRNS szint gyorsan csökken, viszont a matriptáz-2 vagy a hemojuvelin (HJV) mRNS mennyiségében nincs változás, de a matriptáz-2 fehérje koncentrációja nő (Zhang et al., 2011). Sem akut, sem krónikus vashiány nem befolyásolja a matriptáz-2 mRNS mennyiségét. Az eredmények azt sugallják, hogy az matriptáz-2 szabályozása a fehérjék lebomlásának szintjén történik, nem pedig a transzkripció vagy transzláció folyamatokban, és hogy a matriptáz-2 citoplazmatikus doménje szükséges annak szabályozásához. Tehát a

matriptáz-2 citoplazmatikus doménje intracelluláris vasérzékelőként is működik, és gátolja annak lebomlását vashiány esetén (Zhao et al., 2015).

Másrészt vizsgálták a matriptáz-2 extracelluláris doménjét is a vasanyagcserében. Egérkísérletben a matriptáz-2 szerin-proteáz régiójának kémiai inaktivációját követően (Mask mutáns) (Du et al., 2008), illetve matriptáz-2 kódoló génhianyos (TMPRSS6^{-/-}) egereknél (Folgueras et al., 2008) is abnormális szőrnövekedést, vashiányos anémiát és extrém magas hepcidinszintet találtak (Du et al., 2008, Folgueras et al., 2008). Humán vasrezisztens vashiányos anémia (IRIDA) esetén a TMPRSS6 kódoló gén mutációja során sérül a szerin-proteáz domén, a pácienseknél mért magas hepcidinszint miatt hipokróm, mikrociter anémia alakul ki nagyon alacsony vörös vérséjt mennyiséggel, alacsony transferrin telítettséggel, nem megfelelő vasszorbóval (Finberg et al., 2008). A matriptáz-2 expresszióját a vas negatívan szabályozza, nem mRNS transzláció és nem transzkripció szintjén (Zhang et al., 2011). A matriptáz-2 ugyanis képes gátolni a hepcidin transzkripcióját a membránhoz kötött HJV hasításával (Silvestri et al., 2008) (5. ábra). A hasítás igényel még egy neogenin nevű membránfehérjét, amely hármast képez a matriptáz-2-vel és HJV-nel a plazmamembránon. A komplex megkönnyíti a HJV hasítását és a szolubilis HJV felszabadulását (Enns et al., 2012). A membránhoz kötött HJV a hepcidin transzkripció egyik fő szabályozója, ugyanis a koreceptora a BMP-6 fehérjének. Hozzá kötődve képes indukálni a BMP/SMAD (SMAD1/4) jelátviteli úton át a hepcidin (Hamp gén) transzkripcióját (Babitt et al., 2006; Wang et al., 2005; Xia et al., 2008). Ugyanis a szolubilis, hasított BMP is kötődik a receptorhoz, de nem képes aktiválni a receptort, így kompetitív antagonistaként gátolja a hepcidin termelődését (Lin et al., 2005), növelve a vas felszorbóását. A hepcidin, amely nagyrészt a májban termelődő peptid hormon (Park et al., 2001), a vérárammal eljutva képes a ferroportin membrán vasexporter fehérjéhez kötődni, annak sejtbeli felvételét és lebomlását előidézni. Mivel a ferroportin az egyetlen ismert vasexporter fehérje, lebomlása megakadályozza a vas felszorbóását a vékonybélből, illetve a vas felszorbóását pl. a makrofágokból, így a szérumban a vas koncentrációja csökkenni fog (Nemeth et al., 2004).



5. ábra: A matriptáz-2 szerepe a vasanyagcsere szabályozásában. (1) Ferroporin receptor a bélhámsejtek bazális oldalán és a lép makrofágokon. A vas így jut be a táplálékból az emésztőrendszeren át, vagy a lép vasraktáraiból. (2) A hepcidin a ferroporinhoz kötődve annak felvételét és lebomlását idézi elő, így a vas nem tud kijutni az enterocitákból/makrofágokból. (3) A membránhoz kötött HJV a BMP receptorhoz kötődve a BMP-SMAD jelátviteli úton indukálja a hepcidin (Hamp) transzkripcióját. A matriptáz-2 a HJV hasításán át képes gátolni a hepcidin expressziót, így támogatva a vas felszabadulását. (A kép forrása: Szabo and Bugge, 2011.)

Újabb kutatások szerint nem csak a HJV az egyetlen faktor, amely hasítása szükséges a hepcidin termelődés gátlásához (Wahedi et al., 2017). A HJV-n kívül a hemokromatózis protein (HFE), transferrin receptor-2 (TfR2) mutációja vagy hiánya, illetve a neogenin hiánya is csökkent hepcidin expresszióhoz és hemokromatózishoz vezet (Schmidt et al., 2008; Gao et al., 2009; Lee et al., 2010). A TfR2 képes a vassal telített transferrinhez (holo-transzferrin) kötödni, így a vér vasellátottságáról információt szerezni. A TfR2, HFE és HJV a membránon komplexet alkotva képesek a hepcidin transzkripciót elindítani ugyanúgy a BMP-SMAD jelátviteli úton (D'Alessio et al., 2012). A matriptáz-2 képes hasítani számos BMP1 (ALK2, ALK3) és BMP2 típusú (ActRIIA, Bmpr2) receptort, és HFE, TfR2 receptort is, viszont a BMP6-ot nem. Ha a TfR2 holo-transzferrinhez kötődik, azaz a szervezet vastelítettsége megfelelő, akkor a matriptáz-2 nem hasítja azt, hagyja a hepcidin transzkripcióját (Wahedi et al., 2017).

3.1.2.3 A matriptáz-2 patológiás folyamatokban betöltött szerepe

3.1.2.3.1 A matriptáz-2, az elhízás és kettes típusú diabétesz kapcsolata

Több kutatás irányul a vas szerepére az elhízásban, a kettes típusú diabéteszben gyakorolt hatására. A szervezetben található vas hatással van az adipociták leptin termelésére. Az adipociták növekvő vastelítettsége gátolja a leptin termelődését, így a szervezet vastelítettsége közvetlenül befolyásolja a takarmányfelvételt, az étvágyat (Gao et al., 2015). Ugyanis a leptin fontos szerepet játszik a zsírsanyagcsere szabályozásában: minél kevesebb a leptin, annál nagyobb az étvágy. További kutatások szerint a megemelkedett szervezetbeli vaskoncentráció hozzájárulhat a kettes típusú diabétesz kialakulásához. Hepcidin szintézisre a májsejten kívül az adipociták is képesek (Bekri et al., 2006). A hepcidin szintézis zavara, melyet a HFE vagy HJV hiány okoz, gyakran társult a pácienseknél diabétesszel vagy inzulin intoleranciával (Dymock et al., 1972; Papanikolaou et al., 2004). Viszont a diabétesz nem képes hatni sem a máj, sem a zsírszövetek hepcidin szintézisére (Bekri et al., 2006). Magas vasbevitelű diéta esetén egereknél nőtt a szervezet vastelítettsége, magasabb hepcidinmennyiséget mértek. Az éhgyomri vércukorszint, a vér triglicerid-mennyisége is emelkedett. A zsigeri zsírmennyiség csökkent, a vasfelhalmozódással összefüggésben. A zsigeri zsírszövet génexpressziós elemzése kimutatta, hogy a vasban dúsított takarmány aktiválta a vasra reagáló géneket és az adipokineket, amelyek az inzulinrezisztenciát támogatták (Dongiovanni et al., 2013). Hemokromatózis egér modellen a hasnyálmirigyben is vasfelesleg lépett fel, ami miatt nőtt az oxidatív stressz a pankreász béta-sejtjeiben és csökkent az inzulinszekréció, ami a béta-sejtek apoptózisához és a glükóz-indukált inzulinszekréció deszenzitizációjához vezetett (Cooksey et al., 2004).

TMPRSS6^{-/-} egerek magas zsírtartalmú diéta mellett sem mutattak elhízást, a testzsír mennyiségük jelentősen csökkent. A vérplazma inzulin mennyisége csökkent, de fokozódott a sejtek glükóztoleranciája és inzulinérékenysége. Számos májbeli glükoneogenetikus és glikolitikus gén expressziója megnövekedett. Összességében a vércukorszint nem csökkent a vad típushoz képest. Védettebbek voltak májelzsírosodással szemben is, pedig nőtt a lipolízis mértéke. Vasinjekció hatására átmenetileg nőtt az inzulinszenzitizáció, de nem érte el a vad típus szintjét. Gátolva a HJV kapcsolt hepcidin expressziót a TMPRSS6^{-/-} egerek elhízást mutattak. Összességében ezek az eredmények azt mutatják, hogy a matriptáz-2 hiány, és az emiatt kialakult magas hepcidin és következményes alacsony vasmennyiség megvéd az étrend által okozott elhízástól és az ehhez kapcsolódó glükóztolerancia és inzulinrezisztencia kialakulásától. (Folgueras et al., 2018).

3.1.2.3.2 A matriptáz-2 szerepe a tumorok fejlődésében

Számos TTSP képes az extracelluláris mátrix bontására, és így részt vesz a tumor metasztázis képzésében. Ezen felül több kutatás is foglalkozik a vas tumornövekedésben betöltött szerepével. Daganatos esetekben a vas homeosztázis felborul: minél agresszívebb növekedésű volt az adott humán emlődaganat, annál kevesebb ferroportin csatornát és magasabb hepcidin expressziót tapasztaltak. Viszont a magas ferroportin- és alacsony hepcidin-gén expressziót olyan mellrákos betegeknél találtak, akiknek a 10 éves túlélés 90% feletti (Pinnix et al., 2010).

Ezek után a matriptáz-2 enzimet is vizsgálták, milyen funkciót tölthet be az egyes tumorok növekedésében, inváziójában. Humán máj és emlődaganatos sejtvonalaknál matriptáz-2 expressziót tapasztaltak. Megfigyelték, hogy a nagyon invazív daganatos sejtvonalaknál nincs matriptáz-2 expresszió. A matriptáz-2 csökkentette a vizsgált emlődaganatos sejtvonalakon a sejtek migrációját és egérkísérletben visszafogta a beültetett tüdő tumor sejtvonal eredetű tumor növekedését is. Humán emlődaganatos pácienseknél úgy tapasztalták, hogy szoros korreláció van a prognózis és a matriptáz-2 expresszió között, viszont fordítva, mint matriptáz-1 esetén. Ugyanis a magas matriptáz-2 koncentráció esetén volt jobb a prognózis (Parr et al., 2007). Prosztata daganatos sejtvonalakon a megnövekedett matriptáz-2 aktivitás csökkentette a daganatos sejtek túlélését, lassította a sejtmigrációt, a sejtinváziót, és a tumor növekedését is (Sanders et al., 2008). Hasonló eredményeket találtak szájüregi laphámsejtes karcinómánál: a jobban differenciálódott sejteket tartalmazó karcinómákban magasabb matriptáz-2 expressziót tapasztaltak, míg a csökkenő matriptáz-2 szint együtt járt a nagyobb tumormérettel, a nyirokcsomó áttétellel, távoli áttétek megjelenésével, a rosszabb túlélési eséllyel (Cheng et al., 2017). Vizsgálták az angiogenezisben betöltött szerepét is. Humán vaszkuláris endoteliális sejteknél a matriptáz-2 túltermelődés csökkentette a sejtek motilitását és a tubulusképződét, így anti-angiogenikus tulajdonságú volt (Webb et al., 2013).

3.1.3 Matriptáz modulátorok

3.1.3.1 Szfingozin-1-foszfát matriptáz aktivátor

A S1P, amely egy bioaktív szfingolipid metabolit, nagy mennyiségben megtalálható a vérplazmában (Yatomi et al., 1997). Szinte minden sejt képes a szintézisére, ugyanis egy intracelluláris másodlagos hírvivő és transzcelluláris mediátor molekula az emlős sejtek esetén (Yatomi et al., 2001). A továbbiakban azt találták, hogy a vérplazma egy összetevője képes volt a matriptáz-1 aktivációra, és ezt a hatást a vizsgált fajok vérplazmája mind kiváltotta (teknős, csirke, kacska, egér, patkány, nyúl, kecske, szarvasmarha, ló, humán)

(Benaud et al., 2001). Később azonosították, hogy ez az aktív komponens a S1P. Fontos továbbá, hogy hatását nem G-protein mediálta receptorokon, váltja ki, viszont a folyamat kalciumion (Ca^{2+}) függő (Benaud et al., 2002). A S1P hatására a matriptáz-1 zimogén és HAI-1 szubcellulárisan felhalmozódik az aktivációs központban a sejtkapcsoló struktúráknál (Lee et al., 2005). A S1P hatást követően az aktivált matriptáz-1 és HAI-1 megjelenik a sejt felszínén (Benaud et al., 2002), majd a HAI-1 szinte azonnal gátolja a matriptáz-1 enzim aktivitását (Lee et al., 2005). Kísérletesen csökkentett HAI-1 mennyiség a matriptáz-1 spontán aktiválódását és a matriptáz-1 S1P általi fokozott aktivációját okozta (Oberst et al., 2005). IPEC-J2 sejtvonalon vizsgálták a S1P hatását a matriptáz-1 aktiválására. A legmagasabb vizsgált (200 ng/ml) koncentrációban sem befolyásolta a sejtek életképességét, nem befolyásolta az extracelluláris hidrogén-peroxid mennyiségét, viszont nőtt a sejtréteg elektromos ellenállása és több okkludin volt kimutatható a TJ sejtkapcsoló struktúra területén (Pászti-Gere et al., 2016b).

3.1.3.2 3-amidinofenilalanin alapvázú matriptázinhibitorok

3.1.3.2.1 3-amidinofenilalanin alapvázú matriptázinhibitorok fejlesztése

A korábban leírtak alapján a matriptáz-1 és matriptáz-2 gátlása számos esetben felmerülhet, mint célpont például daganatterápia, vírusellenes szer vagy hemokromatózis kezelésre is. A proteáz inhibitorok tervezésénél az egyik legnagyobb kihívás a megfelelő szelektivitás. Ugyanis a széles spektrumú gátlószerek számos, előre nem megjósolható, jelátviteli útra is hathatnak. Ezért minél szelektívebb és célmolekulához magas affinitással rendelkező inhibitor létrehozására törekednek a kutatócsoportok, amelyhez elengedhetetlen a molekula szerkezeti struktúrájának pontos ismerete. A matriptáz-1 és matriptáz-2 katalitikus szerin proteáz doménja nagyon hasonlít más kimotripszin és tripszinszerű szerin proteázokéhoz, mint pl. trombin, Xa faktor. A szerin proteázok aktív részén 8 hurok található (Page és Cera, 2008). A legnagyobb különbség a második huroknál látható, amely tíz aminosavval hosszabb, mint a tripszinnél levő 2. hurok, így nagyobb kitüremkedést eredményez. Az első, harmadik és ötödik hurok különböző szekvenciákat tartalmaz, amely így kissé eltérő konformációt eredményez. A negyedik, hatodik és nyolcadik hurok nagyon hasonló mind a matriptáz-1-ben, mind a tripszinben. A matriptáz-1 aktív része negatívabb töltéssel rendelkezik (Quimbar et al, 2013). Az S1 kötőzseb matriptáz-1 (uPA és VIIa faktor) esetén tartalmaz egy szerint a 190. és egy aszparaginsavat a 189. pozícióban, amelyek hidrofilebbé és szűkebbé teszik a kötőzsebet más tripszinszerű proteázhoz képest, mint a trombin vagy a Xa faktor (Katz et al., 2001). Ez a rész bázikus aminosavakhoz kötődik, mint a lizin vagy az arginin, így sok argininszerű szintetikus inhibitorot használtak. Az S2 rész kis és közepes P2-aminosavakhoz illik, mint pl. a szerin, sőt a többi tripszinszerű proteázhoz

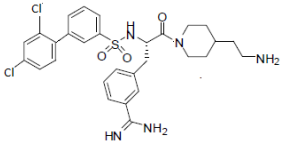
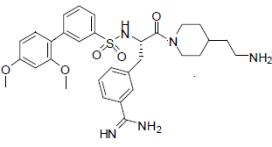
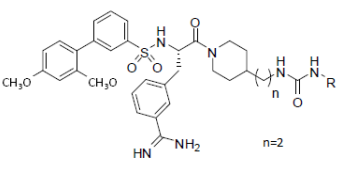
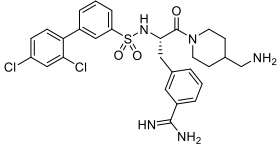
képest nagyobb P2-aminosavakat tartalmazó szubsztrátokat is hatékonyan hasít, mint a fenilalanin a pro-uPA és leucin a pro-HGF molekulákban. S3/4 kötőhelye emlékeztet a Xa faktor hasonló kötőhelyére, amely hidrofób rész kötésére képes, de matriptáz-1 esetén ez a terület kation kötésre is alkalmas. Az S2 kötőseb területén van egy hurok, amely csak a matriptáz és trombin esetén található meg. A matriptáznál viszont ez a kötőseb nyitottabb, a hurok a 60. pozícióban jobban el tud mozdulni. (Hammami, 2012). Matriptáz-1 esetén a 60. hurok 3 aminosavval hosszabb, mint a matriptáz-2 ugyanezen része, de szerkezetileg nagyon hasonló a két katalitikus domén (Sisay et al., 2010).

Számos inhibitor létezik a matriptáz-1 és matriptáz-2 gátlására. Az első szintetikus inhibitorok biszbenzamidin származékok voltak, de ezek számos más tripszinszerű proteázt is gátoltak, mint pl. a trombin (Enyedy et al., 2001). Számos természetes származékú és szintetizált szerin-proteáz gátlószer(csoport) is létezik, mint például a növényi eredetű sunflower trypsin inhibitor-1 (SFTI-1) (1. melléklet), vagy *Momordica cochinchinensis* trypsin inhibitor-II (MCoTI-II) (1. melléklet), amelyből elemezve a matriptáz-1 aktív részét hatékonyabb, szintetikus ciklikus peptid származékokat is előállítottak (Quimbar et al., 2013). Matriptáz gátló az *in vitro* és *in vivo* körülmények között is tumorelles hatású daganatellenes szerhez kötött aktív matriptáz-1 specifikus monoklonális ellenanyag M69 (Rather and al., 2018), illetve a HGF hasítását megakadályozó, matriptáz-1-HAI-1 komplex kialakulását indukáló 4- [3- (1-adamantil)- 4-hidroxifenil]- 3-klorokinnamiksav (3-Cl-AHPC) (1. melléklet) vegyület is (Ye et al., 2019). Jelen disszertáció csak a 3-amidinofenilalanin (3-APhA) alapvázú származékokkal foglalkozik. Az egyik első ilyen típusú inhibitor, a WX-UK1 eredetileg uPA gátlóként írták le, de későbbi kutatások alapján képes volt gátolni a matriptáz-1-t is (Stürzebecher et al., 1999). Kezdetben próbáltak a matriptázra minél szelektívebb (a fenilalanin bázikus szubsztitunsei által megjelenítetten) dibázikus, N-szulfonil-3-APhA származékokat előállítani, amelyek a matriptázra jellemző S3/S4 helyen tudnak kapcsolódni, és ezeknek az *in vivo* kísérletnek a során 2 inhibitor is csökkentette a xenograft egér modellen a prosztatatumor növekedését (Steinmetzer et al., 2006). Annak érdekében, hogy csökkentsék a molekulák erős bázikusságából eredő rossz, sejtbe történő penetrációs képességét, a 3-APhA származékokat bifenil-3-szulfonillal szubsztituálták az N-terminális részén (Steinmetzer et al., 2009), illetve a C-terminális rész 2-aminoetilpiperidin, erősen bázikus részét cserélték töltés nélküli semleges analógokra (Schweinitz et al., 2009). Sajnos ezek a változtatások csökkentették az inhibitorok matriptáz-1 szelektivitását (Hammami et al., 2012). Ezután újabb típusú analógokat szintetizáltak, optimalizálva mind az N-, mind C-terminális részét az inhibitoroknak. Az első széria N-terminális része terminális arilgyűrűt kapott, így bifenil-3-szulfonil részt tartalmazott, a C- terminálison pedig két különböző amidcsoport beépítését váltogatták. Az arilgyűrűn oxigén-tartalmú szubsztituenseket, klór- vagy fluor-szubsztituenseket tartalmazó

származékokat is előállítottak. Ebből a sorozatból a dibázikus 2-aminoetilpiperidin származékot tartalmazó inhibitorok sokkal hatékonyabb matriptázgátlók voltak, mint a monobázisos formáik. Ebben a sorozatban található meg az MI432, MI439, amelyeket későbbi kísérletekben saját kutatásunkban is használtunk (2. táblázat). A sorozatra jellemző, hogy nagyon jó trombininhibitorok is. Ezt kiküszöbölendő, a C-terminális részén egy kevésbé flexibilis és kevésbé bázikus szubsztituensként, karbamid részt tartalmazó sorozatot állítottak elő, ugyanis a matriptáz-1 S1 kötősebe a trombinhoz képest nyitottabb, és a 60. hurok is jobban el tud mozdulni, mint trombinnál. Hogy megfelelő maradjon az oldhatóság, és az S3/4 kötőhelyhez is illeszkedjen a molekula, az N-terminális részen fenilcsoportot építettek a molekulába, az oldhatóság érdekében b-alanilammal együtt. Az összes analóg kevésbé hatékonyak bizonyultak, mint az előző csoport tagjai, viszont sokkal szelektívebbé váltak matriptáz-1-re, mint trombinra, Xa faktorra, vagy matriptáz-2-re (két inhibitor esetén matriptáz-2 gátlás még látható). A harmadik sorozatban az N-terminális csoportjában a fenilcsoport helyett 2,4-dimetoxifenil- vagy diklórfenil-csoportot tartalmazó származékokat is szintetizáltak, amelyek sokkal hatékonyabb inhibitorok bizonyultak az előző sorozat tagjaihoz képest. Ebben a sorozatban található az MI460 inhibitor (2. táblázat), amelyet későbbi kísérletben használtunk (Hammami et al., 2012, Hammami, 2012).

Ezzel párhuzamosan a matriptáz-2 enzimre is elkezdtek 3-APhA inhibitorokat szintetizálni. Az eredeti inhibitorok, amelyek később továbbfejlesztésre kerültek 2 amidino-és 2 klór-szubsztituált benzilamid származékok voltak. Az ebben a cikkben 1 és 3 sorszámú inhibitor mind a matriptáz-1, mind a matriptáz-2 gátlásában hatékonyak bizonyultak, a 2 és 4 számú inhibitor pedig teljesen elvesztette a matriptáz-2 inhibitor szerepét (2. melléklet) (Sisay et al, 2010).

2. táblázat: A disszertációban használt 3-APhA inhibitorok szerkezeti képlete és K_i (disszociációs állandó) értékei. (forrás: Hammami et al, 2012; Sisay et al., 2010)

Inhibitor	Szerkezeti képlet	$K_{i\text{matriptáz-1}}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$K_{i\text{matriptáz-2}}$ ($\mu\text{mol/l}$)
MI432		0,002	0,11
MI439		0,001	0,31
MI460		0,0018	0,18
MI476		n.a.	0,07

3.1.3.2.2 3-amidinofenilalanin inhibitor családdal végzett *in vitro* kísérletek

A 3-APhA inhibitorokat tesztelték *in vitro* és *in vivo* kísérletekben is, mind matriptáz-1 és matriptáz-2 gátlásra is. Sok esetben csak a matriptázokra kifejtett gátlóképességét vizsgálták, illetve ennek következményeit, a molekula egyéb biológiai folyamatokra kifejtett hatásait kevésbé. Az *in vitro* és *in vivo* kísérletekben használt 3-APhA inhibitorok szerkezeti képlete és gátlóképessége a Mellékletek alfejezetben látható (2. melléklet).

3.1.3.2.2.1 Matriptáz-1 gátlás vizsgálata uPA gátlóval és új, 3-amidinofenilalanin alapvázú inhibitorokkal

FaDu tüdő karcinóma és HeLa méhnyak karcinóma sejtvonalakon vizsgálták az eredetileg uPA gátlásra kifejlesztett WX-UK1 L-és D enantiomerjét, képes-e gátolni a sejtek migrációját Matrigél és fibroblaszt szferoid modellen. FaDu sejtvonalon MTT teszttel 5 napig vizsgálták az inhibitor, amely 1 µg/ml koncentráció felett már citotoxikusnak bizonyult. HeLa és FaDu sejteken is csökkentette a migrációt a L-WX-UK-1 2 nap kezelési idő után, még a citotoxikus koncentrációval történő kezelés idején (Ertongur et al, 2004).

Több *in vitro* kísérletet is végeztek 3- APhA inhibitorokkal. Kolon (DLD-1) és prosztata (PC-3) karcinóma sejtvonalon vizsgáltak két 3- APhA-típusú inhibitor 1, 3 és 10 µmol/l koncentrációban (CJ-697 és CJ-730), 16 óra inkubációval. A kísérlet során mindkét inhibitor 10 µmol/l koncentrációban alkalmazva szignifikánsan csökkentette az extracelluláris mátrixban a sejtek szóródását (Förbs et al., 2005).

Egy másik kísérletben 6 különböző 3-APhA alapvázú inhibitor (CU-697, CU-1737, CU-988, CU-990, CU-1804, CU-1807, CU-1832) teszteltek humán pankreasz adenokarcinóma sejtvonalakon (AsPC-1, BxPC-3), 16 órán át inkubálva a sejteket. (Steinmetzer 2006-ban megjelent publikációjában CU-697=44, CU-1737=59 sorszámú inhibitorával, Förbs et al., 2005 cikkében pedig CJ-697=CU-697). 1 µmol/l koncentrációban használva az összes inhibitor szignifikánsan csökkentette az uPA aktivitást a matriptáz gátláson keresztül, ugyanis az inhibitorok önmagukban nem voltak képesek gátolni a tisztított rekombináns uPA enzimet (1 µmol/l), csak a matriptáz-1 enzim gátlása által. Az alkalmazott 1 µmol/l koncentrációban egyik inhibitor sem volt citotoxikus. Továbbá, a CU-1804 és a CU-1807 10 µmol/l koncentrációban AsPC-1 sejtvonalon csökkentette a sejtmigrációt, és ezek az inhibitorok sem bizonyultak citotoxikusnak (Uhland et al., 2009).

Csirke embrionális vesehámsajt-tenyészetben és Madin-Darby kutya vesehámsajtsejtvonalon (MDCKII) a H9N1 influenzavírus sejtbe jutását, így replikációját is sikerült csökkenteni két inhibitor, a MI021 és MI462 48 órán át tartó 50 µmol/l koncentrációban történő adagolása esetén (Baron et al., 2013).

Kutatócsoportunk nem daganatos, újszülött sertés jejunális IPEC-J2 sejtvonalon vizsgált egy szerin-proteáz gátlót, az AEBSF-et és több, 3-APhA alapvázú inhibitor: MI432, MI453, MI460, MI463, MI469. A sejteket AEBSF inhibitorral 25 µmol/l koncentrációban 3 napig kezelték, míg a 3-APhA inhibitorokkal 24 óráig. AEBSF esetén csak TER mérés történt, itt a kontrollhoz képest szignifikáns csökkenés volt látható. Az inhibitorok esetén TER mérésre 0,5; 1; 4; 24 óra után került sor, és csak az MI432 és MI460 esetén volt tapasztalható szignifikáns csökkenés. Ezzel párhuzamosan csak ennél a két inhibitornál volt tapasztalható, hogy jelentős mértékben megnövekedett a 4 kDa tömegű fluoreszcens

izotiocinaláttal jelölt dextrans (FD4) paracelluláris átjutása. Mindkét mérésnél az MI432 és MI460 csökkentette az enzim aktivitását. A kísérlet alapján elmondható, hogy MI432 és MI460 inhibitor képes volt a matriptáz gátlásán keresztül a bélhámréteg-integritását csökkenteni (Pászt-Gere et al., 2016a).

IPEC-J2 sejtvonalon vizsgálták továbbá az MI432 hatását 10, 25, 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 2, 24 és 48 óra inkubációt követően. Nem okozott szignifikáns változást a sejtek életképességében az 50 $\mu\text{mol/l}$ kezelési koncentráció sem, a 48 óra kezelési idő alatt. Western blot módszerrel vizsgálva az inhibitorok nem voltak hatással a matriptáz expresszióra. A sejtek a kísérlet közben differenciálódtak. 2, 24 óra inkubációt követően csak 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció esetén tapasztaltak szignifikáns TER csökkenés, ezzel szemben 48 órát követően már minden alkalmazott kezelési koncentráció esetében jelentős TER csökkenés volt mérhető. A differenciálódó sejtek kontrolljánál immunfluoreszcens festékkel vizsgálva, az okkludin egyre nagyobb mennyiségben jelent meg a sejtmembránban, viszont a kezelés hatására az a citoplazmában maradt. Ez a jelenség 48 órás inkubációt követően már 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációnál is megfigyelhető volt. Klaudin-4 esetén nem volt látható megoszlásváltozás az inhibitorok hatására. 2 órás kezelés után az intracelluláris ROS szignifikáns csökkenése volt tapasztalható minden koncentrációnál, amellyel párhuzamosan az extracelluláris H_2O_2 emelkedését detektálták, amely csak 50 $\mu\text{mol/l}$ esetén volt szignifikánsnak tekinthető. Az intracelluláris ROS értékeknél 24 és 48 órát követően szignifikáns emelkedés volt megfigyelhető 50 $\mu\text{mol/l}$ kezelési koncentráció esetén, míg az extracelluláris mérésnél nem adódott szignifikáns különbség. Mindezek alapján valószínűsíthető, hogy a matriptáz-1 kulcsszerepet tölt be a bélhámréteg barrier integritásában. Továbbá, az MI432 átmenetileg befolyásolta a ROS termelődést, de ez kiegyenlített a 48 órás kezelési idő végére (Pászt-Gere et al., 2015b).

3.1.3.2.2 Matriptáz-2 gátlás vizsgálata hepatocita modellen

Sertés eredetű primer gyulladáscsökkentő modellként szolgáló hepatocita – Kupffer-sejt kultúrán (1:2 és 1:6 Kupffer-sejt – hepatocita arányban), vizsgálták négy 3-APhA alapvázú inhibitor: MI432, MI441, MI460, MI461, hogy gyulladáscsökkentő esetben mennyire hatékonyak a matriptáz-2 gátlásában. Az inhibitorokat 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazták 2 (H_2O_2 mérés, IL-8 és hepcidin ELISA mérés) és 24 óra (MTS sejtleletképesség teszt) inkubációs idővel. A sejtleletképességet az inhibitorok nem befolyásolták. A MI441 megemelte az extracelluláris H_2O_2 szintet mindkét ko-kultúra esetén, a többi inhibitornál nem volt szignifikáns változás. Az IL-8 citokin szint a kontroll, nem kezelt tenyésztettel összehasonlítva nem mutatott eltérést a kezelt sejtek esetén egyik ko-kultúránál sem. A hepcidin expresszióra nem volt hatással egyik ko-kultúránál sem az MI432, MI461. A MI441

kezelésnek kitett sejteknél a hepcidinszint csökkenése, a MI460 kezelésnél pedig a hepcidinszint növekedése volt látható (Pomothy et al., 2016).

Ugyanezt a négy inhibitor használták 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban májsejt mono- és 1:6 Kupffer sejt – hepatocita ko-kultúrán, hidrogél bázisú mátrixközegben is. 24 óra inkubációt követően a kétdimenziós és hidrogél alapú hepatocita mono-kultúráknál a MI432, MI441 és MI461 esetén nőtt a hepcidin mennyisége a sejtfelülűszókban, míg ko-kultúra esetén nem tapasztaltak változást. A kísérlet további részében csak az MI461 inhibitorral foglalkoztak, mivel kisebb koncentrációban (30 $\mu\text{mol/l}$) csak ez az inhibitor növelte a hepcidin koncentrációját. Az MI461 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban nem befolyásolta az extracelluláris H_2O_2 , IL-6, IL-8 mennyiséget, sem mono-, sem ko-kultúrán, kétdimenziós és hidrogél rendszerben vizsgálva (Pásztai- Gere et al., 2020).

3.1.3.2.2.3 TMPRSS2 gátlás vizsgálata influenzavírus fertőzés esetén

Calu-3 humán bronchiális epiteliális sejteket inkubáltak H1N1 és H3N2 influenzavírusokkal 72 óráig. Ezt megelőzően a TMPRSS2 aktív részét vizsgálták már a különféle inhibitorokkal történő kezelés esetében, hogy a korábban másra fejlesztett molekulák, mennyire hatékonyak. (A publikációban 92. számú inhibitor ugyanaz, amelyre MI432 alatt hivatkozunk, míg a 111. sorszámú pedig a MI460) Először a sejtleletképességet vizsgálták a leghatékonyabbnak tűnő 92, 93, 113 és 114 sorszámú inhibitorokkal 10 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 48 óráig. A 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban történő kezelés során, s kimutatták, hogy egyik inhibitor sem volt toxikus, de a 93 és 113 sorszámú inhibitor 20 %-kal csökkentette a sejtek életképességét. Így a leghatékonyabbnak és nem citotoxikusnak bizonyult 92 számú inhibitorral (MI432) folytatták a kísérletet. A nyert eredmények szerint a 92 inhibitor képes volt a vírusaktivációt, és így a sejtbefutást a TMPRSS2 gátlásán keresztül megakadályozni (Meyer et al., 2013).

3.1.3.2.3 3-amidinofenilalanin inhibitor családdal végzett *in vivo* kísérletek

In vivo kutatások során egerekbe ültettek különböző daganatos sejtvonalakból származó sejteket. Sikerült két inhibitor előállítani (8 és 59 számú inhibitor), amelyek egerekbe ültetett PC-3 prosztata karcinóma sejtvonal modellben gátolták a tumor növekedését és a tumorsejtek szóródását. Az inhibitorokat 5 mg/kg dózisban 4 héten át kapták az állatok intraperitoneálisan. A tumor növekedését és a hasüregi áttéteket is csökkentette a két inhibitor: a tumor növekedését 17 és 40 %-kal csökkentette a kontrollhoz képest, továbbá, a kontrollcsoportban kb. 30 %-ban fordultak elő áttétek a mellkasban, míg az inhibitorokkal kezelt egyedeknél csak 14 és 20 %-ban. Végül, hasüregi áttétek a kontroll

egerek 50 %-nál voltak tapasztalhatóak, míg az inhibitorral kezelt egerek esetén nem voltak hasüregi áttétek (Steinmetzer et al, 2006).

Egy másik kutatás során AsPC-1 humán pankreasz adenokarcinóma sejteket ültettek egerekbe. *In vivo* vizsgálták a matriptáz aktivitását intravénásan befecskendezett tumor és matriptáz specifikus jelölt antitest és matriptáz specifikus jelölt szubsztrát segítségével. A tumor és a képződő áttétek esetén is proteolitikusan aktív matriptázt találtak. Intraperitoneálisan (5 mg/kg dózisban) a mérés előtt 24 órával adott CU-1737 (Steinmetzer et al, 2006 cikkben: 59. inhibitor), CU-1275 (más cikkben: WX-UK-1) és CU-1803 inhibitorok gátolták a matriptáz aktivitását (Napp et al., 2010).

Vizsgálták egy 3-APhA alapvázú inhibitor hatékonyságát oszteoarthritis esetén is. Oszteoartritist indukáltak egereknél, majd az ízületbe jutatták az 59. sorszámú (Steinmetzer et al., 2006) inhibitor. Az inhibitor csökkentette az aggregán veszteséget és a porckárosodás mértékét is, a hatás nem volt dóziszfüggő (Wilkinson et al., 2017).

4 Célkitűzés

Kutatásunk során több irányba szeretnénk volna bővíteni a matriptáz-1 és matriptáz-2 aktiválásáról és gátlószereiről rendelkezésre álló ismereteinket, így a különböző kísérleteinknél eltérő célkitűzéseink voltak.

Az első vizsgálat során a korábban matriptáz-1 aktivátornak leírt S1P-t vizsgáltuk. A szakirodalomban megtalálható kísérletek eddig csak a matriptáz-1 aktiválásban betöltött szerepét vizsgálták, matriptáz-2 aktiválást nem. Célunk az volt, hogy kiderítsük, a S1P képes-e hatni a májsejtek hepcidintermelésére, és így hepcidinkoncentráció-csökkenést generálni feltételezhetően a matriptáz-2 enzim serkentése révén. A vizsgálat fontos részét képezte, hogy az általunk választott S1P koncentrációk befolyásolják-e a sejtek életképességét, kiváltanak-e oxidatív stresszválaszt. Kísérleteinkhez patkány primer májsejt mono-kultúrát választottunk, hogy minél jobban tudjuk modellezni a fiziológiás *in vivo* körülményeket.

A második vizsgálatnál két, már több *in vitro* kísérletben matriptáz-1, matriptáz-2 és TMRSS2 gátlásra is tesztelt inhibitorot használtunk. Mivel az MI432 és MI460 inhibitorot eddig emlős sejtvonalakon és primer sejt kultúrákon vizsgálták, kutatásunkat madár, jelen esetben csirke primer hepatikus sejtmodellekre terveztük. Mivel ezek a vegyületek a szakirodalom alapján a későbbiekben felmerülhetnek, mint gyógyszerjelölt vegyületek, ezért a kísérletünkben az esetleges gyulladásszerű, ill. oxidatív stresszválasz kiváltásában betöltött szerepét vizsgáltuk májmodellen. Külön teszteltük egészséges májat modellező hepatocita mono-kultúrán és enyhébb gyulladást modellező NP sejt – hepatocita ko-kultúrán is. Kutatásunk során a különböző gyulladásszerű markereket és oxidatív stresszmarkereket, a sejt oxidatív védekezőrendszerének részeit vizsgáltuk, úgymint az extracelluláris hidrogén-peroxid mennyiséget, IL-6 és IL-8 gyulladásszerű citokineket, és egy lipidperoxidációs markert, a malondialdehidet. Teszteltük a sejtek glutation-peroxidáz aktivitását is, amellyel jól vizsgálható a sejtek peroxidok elleni védekezőképessége.

A harmadik vizsgálatban korábban sejtenyészetekben még nem alkalmazott matriptáz-1 inhibitorok vizsgálatát már jól működő modellrendszerben, sertés vékonybél eredetű IPEC-J2 sejtvonalon végeztük. Céljaink között szerepelt annak felderítése, hogy az általunk tesztelt inhibitorok hogyan befolyásolják a sejtek életképességét, csökkentik-e a sejtréteg integritását a matriptáz-1 gátláson keresztül, okoznak-e oxidatív stresszválaszt a bélhámsejtekben.

A meghatározott gátló vagy aktiváló molekula hatásának vizsgálatán felül célunk volt továbbá, hogy olyan *in vitro*, faj- és szervspecifikus modellrendszereket alakítsunk ki, amelyek majd alkalmasak lesznek a különféle aktiváló és gátlószerek hatásainak összevetésére a jövőben.

5 Anyag és módszer

Az alkalmazott sejt kultúrákat, módszereket vizsgálatonként csoportosítottuk. A kísérleti elrendezést a 3. táblázat mutatja be.

3. táblázat: Az elvégzett vizsgálatok összefoglaló táblázata

	1. vizsgálat	2. vizsgálat	3. vizsgálat
Sejtkultúra	patkány primer májsejt mono-kultúra	csirke primer hepatikus mono-kultúra és ko-kultúra	IPEC-J2 sertés bélhámsejtvonal
Aktívátor/inhibitor	S1P (50, 200, 1000 ng/ml)	MI432 MI460 (10, 25, 50 μ mol/l)	MI439 MI476 (10, 25, 50 μ mol/l)
Inkubációs (kezelési) idő	24 h 48 h 72 h	4 h 24 h	24 h
Vizsgálatok, mérések	MTS (24, 72 h) Amplex Red Hepcidin ELISA	CCK-8 Amplex Red IL-6 ELISA IL-8 ELISA MDA mérés GPx aktivitás mérés	MTS Amplex Red TER (+IF: WGA)

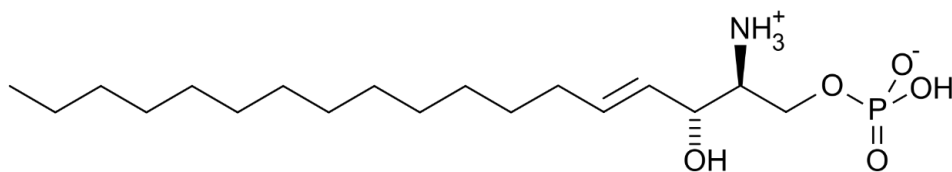
5.1 1. vizsgálat: matriptáz aktivátor vizsgálata patkány primer hepatocita mono-kultúráján

5.1.1 Patkány primer hepatocita mono-kultúra létrehozása és fenntartása

A patkány primer májsejteket kereskedelmi forgalomból szereztük be (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). A kriofagyasztott hepatocitákat a gyártó által megadott protokoll szerint felmelegítettük 37 °C-ra 2 percen belül, majd a sejtszuspenziót Hepatocytia Thaw Mediumba helyeztük (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). A sejteket 100 g centrifugálási erővel 10 perc alatt centrifugáltuk, a felülúszó elöntése után a sejtek reszuszendálásra kerültek Williams' E Mediumba. A májsejtek fenntartásához Williams' E Mediumot használtunk, 1% penicillin-sztreptomycin, 2 mmol/l glutamin, 5 µg/ml transferrin, 5 ng/ml szelén, 4 µg/l dexametazon, 20 IU/l inzulin, és 0,22% bikarbonát kiegészítéssel (a közeg és a hozzávalók is Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA). Az első hat órában 5 % főtális borjú szérum (FBS; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) kiegészítést is kapott a sejtenyészet. A májsejteket 6 lyukú Costar TC membráninzerter (pórusméret: 0,4 µm, felület: 4,62 cm²), illetve 96 lyukú mikroplate lemezen vizsgáltuk (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A sejtkültetést 0,9-1,1x10⁶ sejt/ml koncentrációban végeztük. A sejtek életképességét tripánkék festéssel ellenőriztük, mely 90 % feletti volt minden esetben. A májsejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ jelenlétében tartottuk fent.

5.1.2 Sejtek kezelése és mintavételezése

A kísérlet során egy természetes matriptáz-1 aktivátort, S1P-t vizsgáltuk, képes-e aktiválni a matriptáz-2 enzimet is. Vizsgáltuk, hogyan hat a S1P a patkány primer májsejtek életképességére (MTS), az extracelluláris hidrogén-peroxid termelésre (Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit), illetve a hepcidinszintre (szendvics ELISA). A sejtek életképességének nyomon követéséhez a sejteket 96-os tenyésztő lemezre, mintagyűjtéshez 6 lyukú inzerterre ültettük 3 párhuzamos kezelésnek megfelelő mennyiségben, a kezelés a sejtek lerakása után 6 órával kezdődött. A por halmazállapotú S1P-t (Bio-Techne, Minneapolis, Minnesota, USA) 4 mg/ml BSA-t tartalmazó foszfáttal pufferelt sóoldatban (PBS) oldottuk, így 0,5 mg/ml koncentrációjú törzsoldatot állítottunk elő. A kezelőoldatokat közvetlenül a kísérlet előtt készítettük el, a primer patkány májsejteknek megfelelő tápfolyadékkal hígítva a törzsoldatot. A S1P szerkezeti képlete a 6. ábrán látható. 72 órán át 50, 200, 1000 ng/ml koncentrációban adagoltuk a S1P-et a mono-kultúra apikális térrészehez, az apikális felülúszóból 24, 48 és 72 óra inkubációt követően mintavétel történt. Életképesség vizsgálatot 24 és 72 óra elteltével végeztünk (3. táblázat).



6. ábra: Szfingozin-1-foszfát szerkezeti képlete.

5.1.3 Laboratóriumi mérések

5.1.3.1 Sejtéletképesség és metabolikus aktivitás mérése

A sejtek életképességének, illetve metabolikus aktivitásának méréséhez a sejteket 96 lyukú sejtenyésző lemezre ültettük. A kezelőoldat eltávolítása után 3x PBS-ben mostuk a sejteket, majd 100 µl tápfolyadékhoz 20 µl CellTiter96 vizes oldatot (Promega, Bioscience, Magyarország) mértünk a sejtekre. A reagens 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboximetoxifenil)-2-(4-szulfofenil)-2H-tetrazóliumot (MTS) és fenazin-etoszulfátot tartalmazott. A barna színreakciót a formazánná átalakuló MTS (sárga) adja. Az átalakításhoz metabolikusan aktív sejtre, pontosabban működő NAD⁺ /NADP⁺ rendszerre van szükség, a keletkező formazán mennyisége arányos az élő sejtek számával. A festékkel együtt egy órán át inkubáltuk a sejteket 37 °C-on, 5 % CO₂ jelenlétében. A sejtek által átalakított formazán abszorbanciáját 490 nm hullámhosszon mértük EZ Read Biochrom 400 microplate olvasóval (Biochrom Ltd, UK).

5.1.3.2 Hidrogén-peroxid koncentráció meghatározása

Mindhárom kísérletben az extracelluláris H₂O₂ meghatározása Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) segítségével történt. A mérés során az Amplex Red reagens (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazin) 1:1 arányban, sztöchiomerikusan reagál a H₂O₂-dal tormaperoxidáz jelenlétében, miközben kialakul a fluoreszcens rezorufin, amelyet fluoriméterrel detektálhatunk. Az így kapott színintenzitás tehát arányos a felülűszóban található H₂O₂ mennyiséggel. A gyártó által megadott módon előkészítettük az Amplex Red munkaoldatot (50 µl-t kimértünk a DMSO-ban feloldott 10 mmol/l Amplex Red törzsoldatból, valamint 100 µl-t a 10 U/ml koncentrációjú tormaperoxidáz oldatból, és mindezt 4,85 ml 1x reakció pufferhez adtuk), majd ebből 50 µl-t 50 µl mintához pipettáztunk. 30 perces szobahőmérsékletű inkubációt követően, a mintákat 560 nm hullámhosszú excitációt követően 590 nm emissziós hullámhosszon detektáltuk Victor X2 2030 fluoriméterrel (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

5.1.3.3 Hepcidinkoncentráció meghatározása

A hepatociták felülúszójából 24, 48, 72 órát követően vettünk mintát és vizsgáltuk a S1P hatását a matriptáz-2 aktiválásán át a hepcidin termelésre. A szendvics ELISA módszer képes a fajspecifikus hepcidin minőségi és mennyiségi kimutatására. A gyártó a 96 lyukú lemez felületére előre antigénspecifikus antitestet adszorbeál, ehhez képesek kötődni a mintában található antigének. Mivel ez a kapcsolódás önmagában nem jár látható változással, ezért a mintában található antigének (hepcidin) bekötődése után, másodlagos színreakcióval járó technikával a jel felerősítésének céljából is további lépések szükségesek. Jelen esetben biotinnal jelölt antitest, majd avidinhez konjugált tormaperoxidáz került a plate lyukaiba. A tormaperoxidáz H_2O_2 jelenlétében az eredetileg színtelen kromogén szubsztrátot kékké oxidálja. A reakció a stop oldattal állítható le, vált sárga színűre. A színintenzitás arányos a mintában található hepcidin mennyiségével, amely ismert koncentrációjú standard sorozattal kiszámolható. A patkány hepcidin szendvics ELISA kit-et (Elabscience Biotechnology, USA) a gyártó által megadott leírás szerint alkalmaztuk. A 96 lyukú plate-et előzőleg patkány hepcidinre specifikus antitesttel vonták be. A standard sorozat és a minták bemérése, inkubálása (100 μ l, 90 perc, 37 °C), majd eltávolítása után hozzáadtuk a biotinnal megjelölt detektáló antitest munkaoldatot (100 μ l, 60 perc, 37 °C). Ennek eltávolítását mosás követte (3x350 μ l), majd bemértük az avidin-tormaperoxidáz konjugátumot tartalmazó munkaoldatot (100 μ l, 30 perc, 37 °C), és újabb mosás után (5x350 μ l) a lyukakba pipettáztuk a szubsztrátot tartalmazó reagenst (90 μ l, 37 °C, fénytől védve). A megfelelő kék szín elérését követően (maximum 15 perc) a stop oldat hozzáadása után a már sárga minta abszorbanciáját EZ Read Biochrom 400 microplate olvasóval (Biochrom, Ltd, USA) detektáltuk 450 nm hullámhosszon.

5.2 2. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata csirke primer hepatikus mono- és ko-kultúrán

5.2.1 Csirke primer hepatikus mono- és ko-kultúrák létrehozása és fenntartása

5.2.1.1 Hepatociták és nem-parenchimális sejtek izolálása

A jelen kutatásunkban használt sejtizolálási technikát, sejtfenntartást a Tanszék munkatársai által korábbi publikációban leírt módszerrel megegyezően végeztük (Mackei et al., 2020a). A sejtizoláláshoz, sejtkiültetéshez és fenntartáshoz a termékeket Merck KGaA cégtől szereztük be (Merck KGaA, Darmstadt, Németország), a kivételeknél a forgalmazó feltüntetésre került.

A májsejtek izolálásához 3 hetes Ross-308 brojlersírkét használtunk (Gallus Ltd; Devecser, Magyarország). Szén-dioxiddal történő kábításban a csirkét dekapitáltuk, és a testüreg aszeptikus feltárását követően kanüláltuk a *v. gastropancreaticoduodenalis*-t. Utóbbira a máj perfúziója miatt volt szükség, az elfolyó ágat a szíven át apró bemetszésen behelyezett üvegkanül segítségével alakítottuk ki. Az összes perfúzióhoz használt puffert előzőleg 40 °C-ra melegítettük, és oxigenizáltuk Carbogennel (95 % O₂, 5 % CO₂), a perfúzió sebessége 30 ml/perc volt minden puffer esetén. A három lépcsős perfúzióhoz először 150 ml etilén glikol-bisz(2-aminoetil éter)-tetraecetsav (EGTA, 0,5 mmol/l koncentrációban) tartalmú Hanks-féle puffert használtunk 0,035 % NaHCO₃-tal kiegészítve, hogy az EGTA a kalcium és magnézium ionok megkötésével segítse a későbbiekben a sejtkapcsoló struktúrák felszakadását. Ezt követte 150 ml EGTA-mentes Hanks-féle pufferrel történő mosás, majd végezetül az interstícium emésztése 100 ml Hanks-féle pufferben oldott 100 mg IV. típusú kollagenázzal (Normark, Uetersen, Németország) történt, kiegészítve még 7 mmol/l CaCl₂, és 7 mmol/l MgCl₂-dal. Az interstícium felbomlása után a máj eltávolításra került, jégen tartva steril körülmények között folyt a további feldolgozása. A burok felvágása és a máj mechanikai aprítása után háromrétegű steril gézen szűrtük át a primer sejtszuszpenziót, majd jégen inkubáltuk 2,5 %-os BSA tartalmú Hanks-féle pufferben 45 percig. A BSA segített megelőzni a sejtek szőlőfürtszerű összetapadását, amely a későbbiekben nehezítené az egyenletes, konfluens kultúra kialakítását.

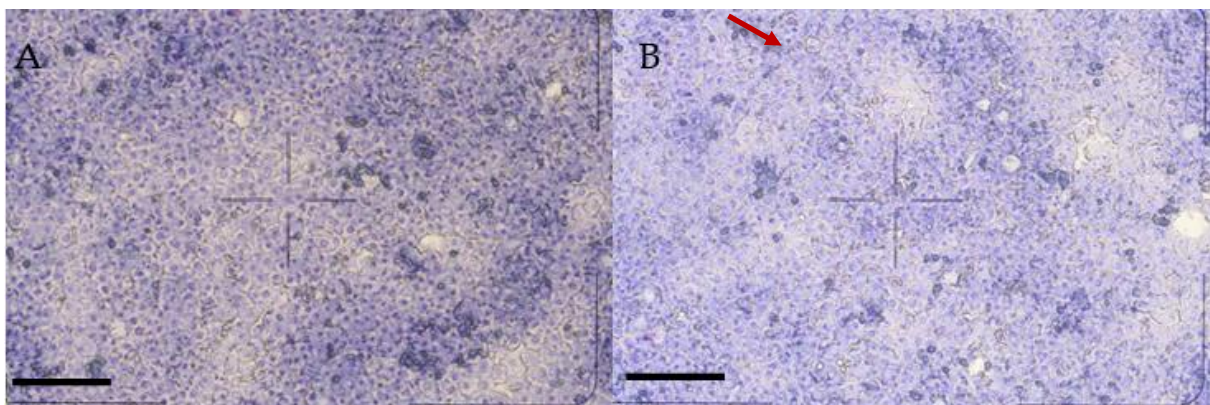
A hepatociták izolálása során háromszor 100 g centrifugálási erővel, 3 percig szükséges centrifugálni a sejtszuszpenziót. A hepatocitákban gazdag üledéket pedig korábban 0,22 % NaHCO₃, 50 mg/ml gentamicin, 2 mmol/l glutamin, 4 µg/l dexametazon, 20 IU/l inzulin és 5 % FBS kiegészítést kapott Williams' E Mediumban reszuszpendáltuk minden egyes centrifugálás után. Így végezetül kb. 20 ml, tömény hepatocitát tartalmazó sejtszuszpenziót kaptunk.

A NP sejtek izolálása (amely frakció főleg makrofágokat, elsősorban Kupffer-sejteket tartalmaz) a korábban kapott felülúszókból történt. A felülúszók centrifugálása 350 g centrifugálási erővel 10 percig zajlott, így az üledékbe került a kevés maradék hepatocita, illetve sejtörmelék, vörösvérsejt. Az így nyert felülúszóból 800 g fordulatszámra 10 percig centrifugálva az üledékben megkaptuk a NP sejteket, amelyeket a korábban leírt kiegészítéseket tartalmazó 5 ml Williams' E Mediumban reszuszpendáltuk.

5.2.1.2 Az izolált sejtek életképességének vizsgálata, sejtszám meghatározása, sejtek kiültetése, fenntartása

A hepatociták és NP sejtek életképességét is tripánkék festéssel vizsgáltuk. A festést 10x hígításban, 200 µl sejtuszpenzióhoz 800 µl Williams' E Medium hozzáadásával, majd ebből 200 µl sejtuszpenzió és 200 µl tripánkék bemérésével készítettük el, Bürker-kamrában fénymikroszkóp segítségével zajlott a sejtek vizsgálata, majd a számlálása is. A megfelelő koncentráció hepatocita mono-kultúrájánál 10^6 sejt/ml; ko-kultúrájánál $8,5 \times 10^5$ sejt/ml és $1,5 \times 10^5$ NP sejt/ml volt.

Hepatocita mono-kultúra esetén 1,5 ml sejtuszpenziót pipettáztunk a 6 lyukú, korábban kollagénnel felületkezelt lyukakba, illetve 100 µl-t adagoltunk szintén kollagénezett 96 lyukú mikroplate-re lyukanként. A hepatocita: Kupffer sejt ko-kultúrához a kollagénnel kezelt 6 lyukú plate minden lyukába 1,5 ml NP sejtuszpenziót pipettáztunk, majd 30 perc elteltével a felülúszót eltávolítottuk. Ezt követően pedig 1,5 ml hepatocita szuszpenziót pipettáztunk minden lyukba. A 96 lyukú kollagénezett mikroplate lyukaiba 100 µl szuszpenziót mértünk. A tápfolyadékot a kiültetés után 4 órával cseréltük, a hepatocita mono-kultúra (7.A ábra) és hepatocita- NP sejt ko-kultúra (7.B ábra) konfluens sejtréteget alkotott 24 órát követően. A kiültetett sejteket steril termosztátban 37 °C hőmérsékleten, 5 % légköri CO₂-koncentráció és közel 100% relatív páratartalom mellett tenyésztettük.



7. ábra: Giemsa festéssel festett hepatocita mono-kultúra (A) és hepatocita- NP sejt ko-kultúra (B) 24 óra után (200x nagyítás, bar=100 µm). Piros nyíllal megjelölve egy NP sejt látható.

5.2.2 Sejtek kezelése és mintavételezése

Korábban leírt matriptáz-1 és -2 inhibitorokat teszteltünk csirke primer hepatocita mono-kultúráján és hepatocita – NP sejt ko-kultúráján. A kísérlet során a vizsgálatok az inhibitorok esetleges gyulladáskeltő vagy oxidatív stresszkeltő hatásainak feltérképezésére irányultak. A 3-APhA alapvázú matriptázinhibitorokat Torstein Steinmetzer csoportja

szintetizálta (Philipps University Marburg, Faculty of Pharmacy, Institute of Pharmaceutical Chemistry, Marburg, Németország), és tőlük kaptuk meg kipróbálásra. A por formájú inhibitorokat dimetil-szulfoxidban (DMSO) oldottuk be, 1 mmol/l koncentrációjú törzsoldatokat hozva létre. A kísérletek előtt közvetlenül hígítottuk a tápoldatban az inhibitorokat. A kísérletben használt MI432 és MI460 inhibitorok szerkezeti képlete, gátlóképessége az irodalmi áttekintésben található (2. táblázat). A K_i értékek humán matriptáz katalitikus doménon alapuló kísérlet alapján kerültek megállapításra (Steinmetzer et al, 2006). Minden mintavételt 4 és 24 óra inkubáció után végeztünk el, az inhibitorokat 10, 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmaztuk, 3 párhuzamossal (kontroll tenyészeteknél 6 párhuzamossal). A sejtek metabolikus aktivitását Cell Counting Kit-8 (CCK-8) teszttel ellenőriztük. A felülűszóból IL-6 és IL-8 ELISA, malondialdehid (Lipid Peroxidation MDA Assay Kit) és H_2O_2 (Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit) mennyiségi meghatározása történt. A 24 órás mintavétel után a sejteket speciális lizáló puffer (M-PER) segítségével lizáltuk. Az eredmények standizálása céljából a sejtlizátumok összfehérje-koncentrációját Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay segítségével mértük. Végezetül a sejtlizátumból glutation-peroxidáz (Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit) aktivitás mérésére került sor. A CCK-8 vizsgálatot 96 lyukú sejtenyésztő lemezen végeztük, míg a mintavétel 6 lyukú sejtenyésztő edényekre kiültetett tenyészetekből történt (3. táblázat).

5.2.3 Laboratóriumi mérések

5.2.3.1 Sejtéletképesség és metabolikus aktivitás mérése

Csirke primer májsejt mono- és ko-kultúra esetén is az inhibitorok sejtéletképességre, így a metabolikus aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálatát CCK-8 módszer segítségével végeztük. A módszer lényege hasonló az MTS festékkal történő méréshez: a tetrazólium komponens $\text{NAD}^+ / \text{NADP}^+$ rendszer segítségével képes átalakulni formazánná, amely festéknek az abszorbanciája mérhető, és ez arányos lesz az élő sejtek mennyiségével. A festék a 2-(2-metoxi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-diszulfófenil)-2H-tetrazólium (WST-8). Az MTS módszerhez képest ez a módszer szenzitívebb. A sejteket itt is 96 lyukú sejtenyésztő edényekre helyeztük, majd 4 és 24 órás inhibitoros kezelés eltávolítását követően 100 μl Williams' E Medium és 10 μl reagens bemérése következett. 2 óra inkubáció után a minta abszorbanciáját 450 nm hullámhosszon detektáltuk Thermo Scientific Multiskan GO 3.2 reader (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finnország) segítségével.

5.2.3.2 IL-6, IL-8 citokinek koncentrációjának meghatározása

A csirke primer májsejt mono-és ko-kultúra felülúszóiból 4 és 24 óra után mintavétel történt, amelyből az IL-6 és IL-8 mennyiségi meghatározását fajspecifikus szendvics ELISA módszerrel végeztük (MyBiosource, San Diego, USA). A munkaidőket a gyártó által megadottak szerint készítettük elő. Előzetes mérések alapján IL-6 esetén a minták 50x, IL-8 esetén pedig 10x hígítása történt, hogy megfelelő mérési tartományba kerüljenek a kapott értékek.

IL-6 ELISA esetén az IL-6 monoklonális antitesttel előre bevont plate-re mértük a standard sorozatot és a mintákat (100 µl, 90 perc, 37 °C), majd eltávolításuk után kétszer 350 µl mosófolyadékkal mostuk. A biotinnal megjelölt IL-6 poliklonális antitestet tartalmazó oldatot a lyukakba mértük (100 µl, 60 perc, 37 °C), majd háromszori mosást követően (350 µl) bepipettáztuk az avidin-peroxidáz tartalmú oldatot (100 µl, 30 perc, 37 °C). Mosás után (5x350 µl) a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) színreagens tartalmú fényérzékeny reagens került a lyukakba (100 µl, maximum 30 perc, 37 °C, fénytől védve). A kék szín megjelenését követően a stop oldat hozzáadása után a most már sárga minta abszorbanciáját 450 nm hullámhosszon olvastuk le Thermo Scientific Multiskan GO 3.2 reader (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finnország) segítségével.

IL-8 ELISA mérésekor az IL-8 monoklonális antitesttel bevont lyukakra bemérésre került a standard sor és a minták (100 µl, 120 perc, 37 °C), majd a folyadék eltávolítása után, mosás nélkül került bemérésre a bitoninal jelölt IL-8 poliklonális antitest (100 µl, 60 perc, 37 °C). Az oldatok eltávolítása után 4x 400 µl mosópufferrel történő mosást követően a lyukakba pipettáztuk az avidin-peroxidáz tartalmú oldatot (100 µl, 60 perc, 37 °C). Ötször ismételt mosás után a színreagenst tartalmazó oldatot mértük be a lyukakba (90 µl, maximum 20 perc, 37 °C), majd a kék szín megjelenése után hozzáadtunk 50 µl stop oldatot. A sárgára színeződött mintákat 450 nm hullámhosszon detektáltuk Thermo Scientific Multiskan GO 3.2 reader (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finnország) segítségével. Az eredmények ábrázolása sejtek összfehérjére való korrigálás után történt.

5.2.3.1 Hidrogén-peroxid koncentráció meghatározása

Az extracelluláris H₂O₂ meghatározása a korábban leírt Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) segítségével történt.

5.2.3.2 Malondialdehid-koncentráció meghatározása

A 24 órás inhibitoros kezelést követően a sejtek felülúszójából végeztük el a lipidperoxidáció egyik végterméke, a malondialdehid (MDA) mennyiségi meghatározását,

amely szintén oxidatív stresszmarkernek tekinthető. A vizsgálatokat a Lipid Peroxidation (MDA) Assay Kit (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) segítségével végeztük; a gyártó által megadott protokollt adaptáltuk a sejtek felülszójából származó mintákra. A vizsgálat során a mintában található MDA reagál tiobarbitursavval (TBA), és jön létre egy kolorimetriásan és fluorimetriásan is mérhető, rózsaszín színű termék. PCR csövekbe 150 µl TBA oldatot és 100 µl mintát mértünk, majd 60 perc 95 °C-on történő inkubációt követően a csövekből 150 µl-t 96 lyukú sejtenyésző edényre pipettáztunk. A minta abszorbanciájának leolvasását 532 nm hullámhosszon végeztük Thermo Scientific Multiskan GO 3.2 reader (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finnország) segítségével.

5.2.3.3 Glutation-peroxidáz aktivitás meghatározása sejtlizátumból

GPx aktivitásmérés csirke primer májsejt mono-és ko-kultúra sejtlizátumaiból történt a 24 órás inkubációs időt követően Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit segítségével (Merck KGaA, Darmstadt, Németország). A mérés egy indirekt, kolorimetriás meghatározási módszeren alapul, amely során a GPx által katalizált reakcióban a glutation oxidálódik. Az oxidált glutation visszaalakítása kapcsolt reakcióban glutation-reduktáz enzim segítségével zajlik, melynek működése redukált nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfátot (NADPH+H⁺) igényel. A NADPH+H⁺ 340 nm-en mért abszorbancia csökkenése (mivel visszalakul NADP⁺-dá) a GPx aktivitását jelzi, mivel a GPx a kapcsolt reakciók sebességkorlátozó tényezője. A teszt során 15 µl sejtlizátumot adtunk 455 µl GPx Assay Buffer-hez, 25 µl NADPH Assay Reagenshez (1 fiolát 1,25 ml desztillált vízben oldottunk fel), majd közvetlenül a mérés előtt 5 µl 30 mmol/l koncentrációjú tert-butil hiperoxid oldatot (Luperox; 10, 75 µl Luperox oldatot hígítottunk összesen 2,5 ml-re desztillált vízzel) adagoltunk az elegyhez. A kvarcküvetát a mérőeszközbe helyezve az abszorbanciamérés 10 másodpercenként egy percen át 340 nm hullámhosszon történt. A mérési hőmérséklet 25 °C volt. A minta GPx aktivitását a gyártó által megadott képlet segítségével számoltuk ki (mmol/[másodperc*ml]= egység/ml):

$$\frac{\Delta A_{340} \times DF}{6.22 \times V}$$

ahol a

ΔA_{340} = másodpercenkénti abszorbanciaváltozás

6,22 = ϵ^{mM} (NADPH+H⁺)

DF = a minta hígítási tényezője a reakcióhoz való hozzáadás előtt

V = minta mennyisége (ml).

Az egység definíciója: 1 egység GPx 1,0 μmol NADP+ képződését idézi elő NADPH-ból percenként 8,0 pH-értéken, 25 °C-on, kapcsolt reakcióban redukált glutation, glutation-reduktáz és terc-butil-hidroperoxid jelenlétében.

Az eredmények értékelésére a sejtlizátum összfehérje-koncentrációjára való korrigálás után került sor.

5.2.3.4 Összfehérje-koncentráció meghatározása

A lizált sejtek összfehérje-koncentrációját Pierce BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével mértük. A BCA teszt egy kolorimetriás, kétkomponensű, nagy pontosságú, M-PER detergenssel kompatibilis módszer. Ennek során először biuretreakcióban a réz(II) ionok lúgos közegben komplexet képeznek a peptidkötés nitrogénatomján át a fehérjével, miközben réz(I) kation jön létre. Ehhez legalább három aminosavat kell tartalmazni a peptidnek, miközben világoskék színű lesz a reakcióelegy. Következő lépésben a BCA reagál az előző lépésben keletkezett réz(I) ionokkal, amely során két molekula BCA kelátot képez egy réz(I) ionnal. Az így keletkezett vízdoldható, intenzív lila komplex erős lineáris abszorbanciát mutat 562 nm hullámhosszon. A zöld színű BCA munkaoldatot az A és B reakcióoldatok összekeverésével nyertük (50:1 arányban). Ezután a 96 lyukú edény lyukaiba 25 μl mintát és 200 μl BCA munkaoldatot tettünk. Az oldatok finom összekeverése után 30 percen át 37 °C-on való inkubálást követően 562 nm hullámhosszon mértük a mintákat Thermo Scientific Multiskan GO 3.2 reader (Thermo Fisher Scientific Oy, Vantaa, Finnország) segítségével.

5.3 3. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata sertés IPEC-J2 bélhámsejtvonalon

5.3.1 IPEC-J2 sertés bélhámsejtvonal fenntartása

Az IPEC-J2 nem daganatos, újszülött sertés jejunális bélhámsejtvonalat a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék ajándékba kapta Dr. Jody Gookintól (Department of Clinical Sciences, College of Veterinary Medicine, North Carolina State University, Raleigh, NC, USA). A sejtenyészetek növekedéséhez és fenntartásához Dulbecco-féle módosított Eagle tápközeg (DMEM) és Ham's F-12 Nutrient Mixture (DMEM/F12) 1:1 arányú tápfolyadékát használtuk (Merck, USA). Ehhez adtunk hozzá 5 % FBS-t, 5 $\mu\text{g/ml}$ inzulint, 5 $\mu\text{g/ml}$ transferrint, 5 ng/ml szelént, 5 ng/ml epidermális növekedési faktort és 1 % penicillin- sztreptomocint (a felhasznált vegyszerek mind Merck KGaA, Darmstadt,

Németország; és Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA forgalmazóktól származtak) (Pásztai- Gere et al., 2014). A kutatás során 45-55 passzázsszám közötti sejteket használtunk. A sejteket 37°C-on, 5 %-os CO₂ szinten tenyésztettük, naponta cserélve a tápfolyadékot. A kísérleteket 6 lyukú sejtenyésző edényekben, Costar TC poliészter membrán inzerten (pórusméret 0,4 µm, a felület nagysága 4,67 cm²) végeztük (Merck, KGaA, Darmstadt, Németország). A sejtenyésző edény apikális részére 1,5 ml, a bazolaterális részére 2,5 ml tápfolyadék került a gyártó ajánlása alapján. Az IPEC-J2 sejtek összefüggő, egyrétegű sejtréteggé nőttek a membrán inzerten, miközben differenciálódtak (egy membrán inzert átlagosan 1,5x10⁵ sejt/ml-t tartalmaz). A sejtek differenciálódását a tápfolyadékcseréje alkalmával, TER méréssel ellenőriztük.

5.3.2 Sejtek kezelése és mintavételezése

A vizsgálat során az MI439 és MI476 sorszámú inhibitorokat teszteltük IPEC-J2 nem daganatos, újszülött sertés jejunális bélhámsejtvonalon. Korábbi kísérletek alapján kíváncsiak voltunk, hogy az inhibitorok *in vitro* hogyan befolyásolják a sejtek életképességét (MTS), a sejtek közötti kapcsolatok integritását (TER), és az extracelluláris redox státuszt (Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit). Ehhez a kísérlethez az MI439 és MI476 3-APhA alapvázú matriptázinhibitorokat használtuk, a fent leírt módon előkészítve. Az inhibitorok szerkezeti képlete, gátlóképesége az irodalmi részben található (2. táblázat). A Ki értékek ez esteben is humán matriptáz katalitikus doménon alapuló kísérlet alapján kerültek megállapításra (Steinmetzer et al, 2006). A vizsgálatokat 24 óra inkubációt követően végeztük, 10, 25, 50 µmol/l koncentrációban. Az életképesség vizsgálatához a sejteket 96 lyukú tenyésztőedényre ültettük, minden más kísérlethez 6 lyukú membrán inzertet használtunk. Az apikális és bazolaterális térrészből is mintavétel történt. Az egyrétegű sejtréteg épségének ellenőrzésére elvégeztük a sejtmembrán immunfluoreszcens festését (WGA) (3. táblázat).

5.3.3 Laboratóriumi mérések

5.3.3.1 Sejtéletképesség és metabolikus aktivitás mérése

A sejtek életképességét, illetve metabolikus aktivitását a korábban ismertetett CellTiter96 MTS Promega, Bioscience, Magyarország) vizsgálattal végeztük el.

5.3.3.2 *Hidrogén-peroxid koncentráció meghatározása*

Az extracelluláris H₂O₂ meghatározása a korábban leírt Amplex Red Hydrogen Peroxidase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA USA) segítségével történt,

5.3.3.3 *Sejtréteg-integritás vizsgálata*

A TER mérést két folyadéktér között végezhetjük, ahol eltérő az ionok mennyisége a két folyadéktérben; jelen esetben egy egyrétegű, membrán inzerten tenyésztett sejtrétegen. A sejtek polarizáltságának és a sejtréteg integritásának mértéke mérhető vele: minél polarizáltabb egy sejtréteg, annál magasabb a TER értéke. Ha sérül a sejtréteg-integritása, úgy csökkeni fog a sejtréteg-ellenállása, így a TER értéke is. A vizsgálat során TER mérést végeztünk 6 lyukú, poliészter membrán inzerten tenyésztett egyrétegű sejtenyészeten 10, 25, 50 µmol/l koncentrációjú MI439, MI476 kezelés esetén az inhibitor hozzáadása után 24, 48 óra elteltével. A TER méréseket EVOM Epithelial Tissue Volt/ Ohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) segítségével végeztük.

5.3.3.4 *Monolayer morfológiai vizsgálata*

Első lépésként az IPEC-J2 sejteket tartalmazó membrán inzertet metanollal fixáltuk 5 percig. A sejtmembránban található szíálsav maradékot immunfluoreszcens festékekkel jelölt búzacsíra agglutininnel (WGA, 1:200 hígítás PBS-ben, WGA Alexa Fluor 488, Thermo Fisher Scientific, USA) festettük meg (30 perc). A sejtmagokat 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) festékekkel jelöltük meg (1:500 hígítás PBS-ben; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Végezetül a rögzítéshez ragasztóanyagot (DAKO) használtunk.

5.4 *Statisztikai elemzés*

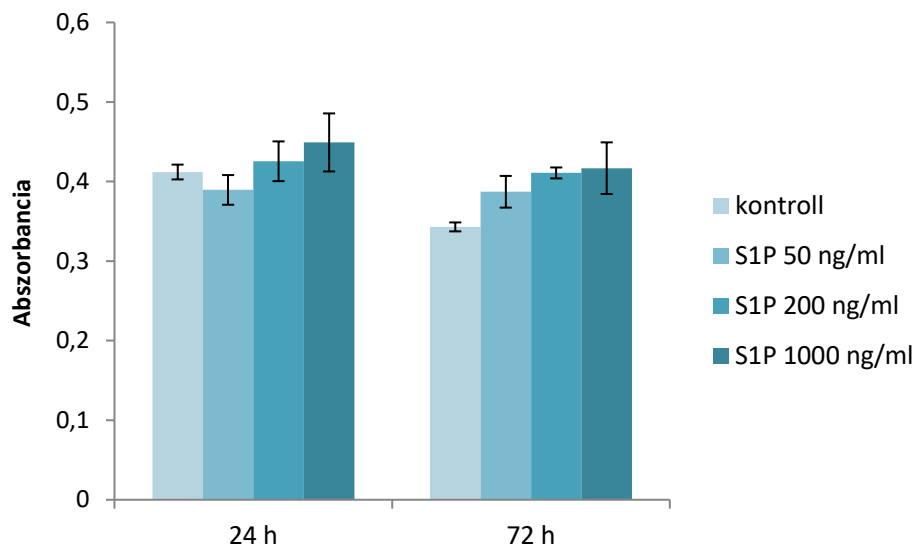
Az eredmények statisztikai elemzéséhez az R 3.6.1 szoftvert alkalmaztunk. Szignifikánsnak akkor tekintettük a kapott eredmények közti különbséget, ha a p értéke 0,05-nél kisebb volt. Ha $p < 0,001$, az ábrán ***, ha $p < 0,01$, az ábrán **, ha $p < 0,05$, az ábrán * jelölés látható. A normál eloszlású minták esetén a vizsgált csoportok közötti különbségek megállapítására egytényezős varianciaanalízist (one-way ANOVA) és post-hoc Tukey tesztet, illetve Spearman-féle korrelációt végeztünk el. A kísérletek során mért adatok átlag standard hibájaként (SEM) történt kísérlettől függően 3, 4 vagy 6 párhuzamos használatával.

6 Eredmények

6.1 1. vizsgálat: matriptáz aktivátor vizsgálata patkány primer hepatocita mono-kultúrán

6.1.1 Szingozin-1-foszfát hatása a hepatociták életképességére

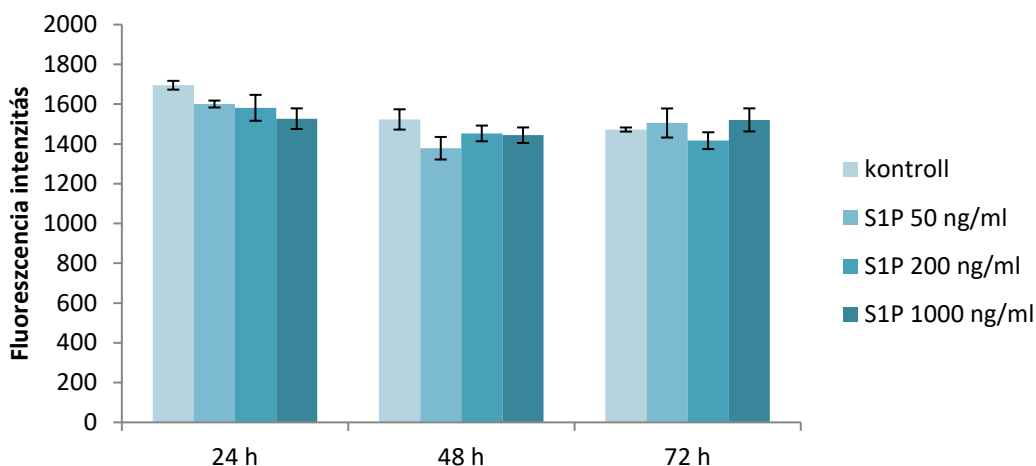
A kísérlet alapján a vizsgált inkubációs idő alatt az általunk használt legmagasabb S1P koncentráció (1000 ng/ml) sem okozott szignifikáns különbséget a kontroll májsejt mono-kultúrához képest (mindkét esetben $p > 0,05$). Az eredmény alapján a S1P használata 1000 ng/ml koncentrációban, 72 óra inkubációs időt alkalmazva biztonságosnak tűnik patkány primer májsejt mono-kultúrán (8. ábra).



8. ábra. A szfingozin-1-foszfát (S1P) sejtéletképességre gyakorolt hatása patkány primer hepatocita mono-kultúrán 24 és 72 óra inkubációt követően MTS módszerrel vizsgálva. Átlag \pm SEM; $n=3$ /csoport.

6.1.2 Szingozin-1-foszfát hatása az extracelluláris H_2O_2 koncentrációra

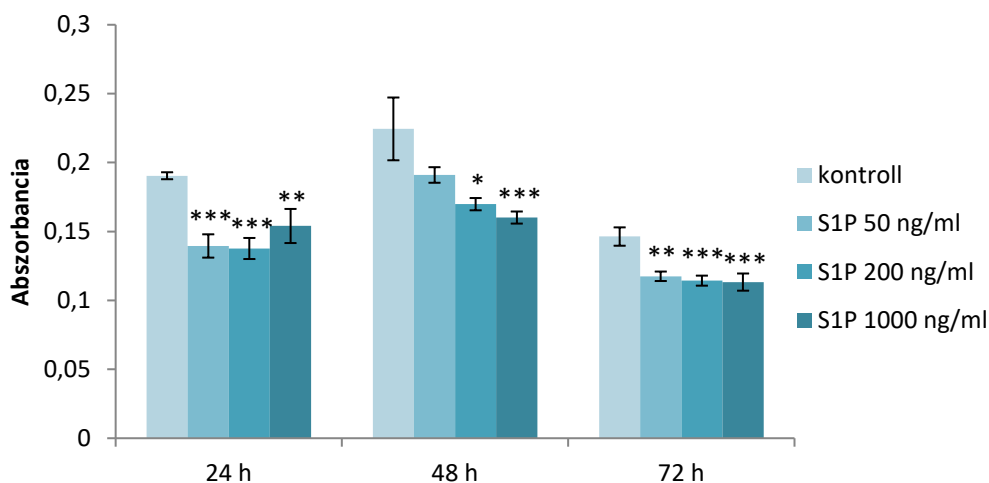
A 72 órás vizsgálati idő alatt nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a kontroll és kezelt májsejt mono-kultúra felülúszóinak H_2O_2 koncentrációja között egyik vizsgált S1P koncentráció esetén sem (minden esetben $p > 0,05$; 9. ábra).



9. ábra. A szfingozin-1-foszfát (S1P) extracelluláris H₂O₂-koncentrációra gyakorolt hatása patkány primer hepatocita mono-kultúrán 24, 48 és 72 óra inkubációt követően Amplex Red módszerrel vizsgálva. Átlag ± SEM; n=3/csoport.

6.1.3 Szfingozin-1-foszfát közvetett hatása az extracelluláris hepcidinkoncentrációra

A kísérlet során különböző koncentrációkban alkalmazva az S1P aktivátort szignifikáns különbségeket kaptunk a kontroll és kezelt sejtenyészetek tápfolyadékának hepcidinkoncentrációi között. 24 óra inkubációt követően a felülúszóból vett mintákban csökkent abszorbanciát tapasztaltunk mindhárom vizsgált koncentráció esetén ($p_{50\text{ng/ml}} < 0,001$; $p_{200\text{ng/ml}} < 0,001$; $p_{1000\text{ng/ml}} < 0,01$). A felülúszót 48 órás kezelést követően vizsgálva az extracelluláris hepcidinkoncentráció szignifikánsan csökkent 200 ng/ml ($p = 0,0206$) és 1000 ng/ml ($p < 0,01$) koncentrációjú S1P kezelés esetén. 72 óra S1P inkubációs idő után az összes vizsgált mintában csökkent hepcidinkoncentrációt detektáltunk ($p_{50\text{ng/ml}} = 0,0012$; $p_{200\text{ng/ml}} < 0,001$; $p_{1000\text{ng/ml}} < 0,001$; 10. ábra).

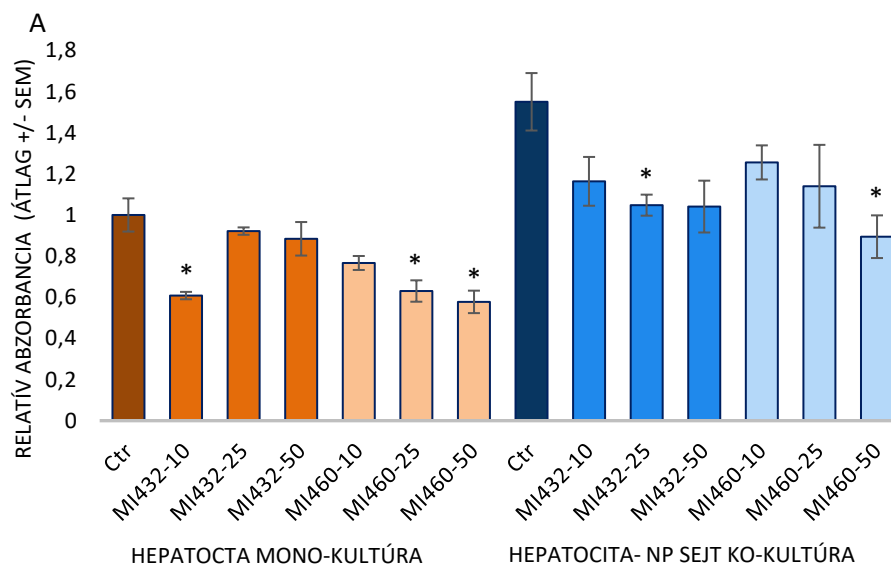


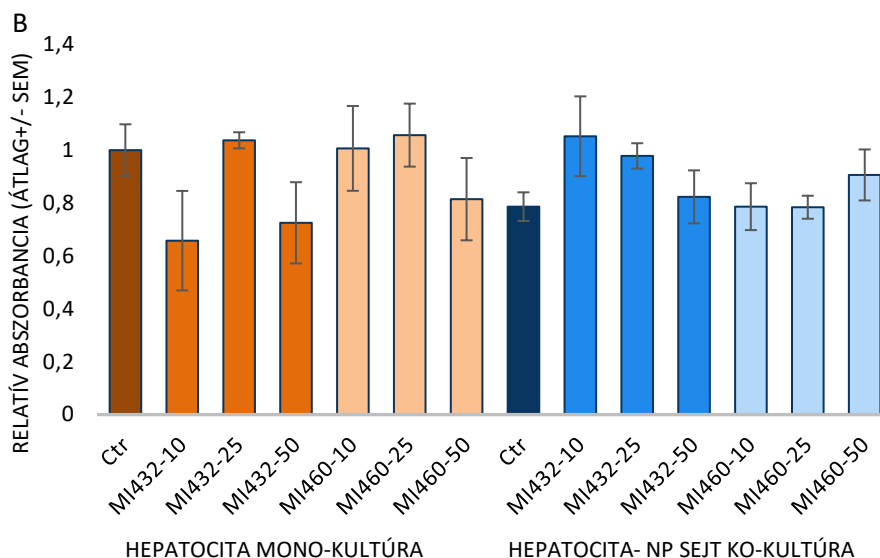
10. ábra. A szfingozin-1-foszfát (S1P) extracelluláris hepcidinkoncentrációra gyakorolt hatása patkány primer hepatocita mono-kultúrán 24, 48 és 72 óra inkubációt követően ELISA módszerrel vizsgálva. Átlag \pm SEM; n=3/csoport; *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

6.2 2. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata csirke primer hepatikus mono- és ko-kultúrán

6.2.1 Metabolikus aktivitás vizsgálata

A 4 órás inkubációs időt követően mind a MI432, mind a MI460 szignifikánsan csökkentette a mono-kultúra és ko-kultúra sejteinek metabolikus aktivitását (mono-kultúrán $p_{MI432\ 10\ \mu mol/l}=0,0131$; $p_{MI460\ 25\ \mu mol/l}=0,0197$; $p_{MI460\ 50\ \mu mol/l}=0,0111$; ko-kultúrán: $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}=0,0457$; $p_{MI460\ 50\ \mu mol/l}=0,0187$) (11. ábra A). Ezzel ellentétben a hosszabb, 24 óra inkubációt követően nem volt megfigyelhető változás sem a mono-kultúra, sem a ko-kultúra metabolikus aktivitásában (minden esetben $p>0,05$) (11. ábra B).

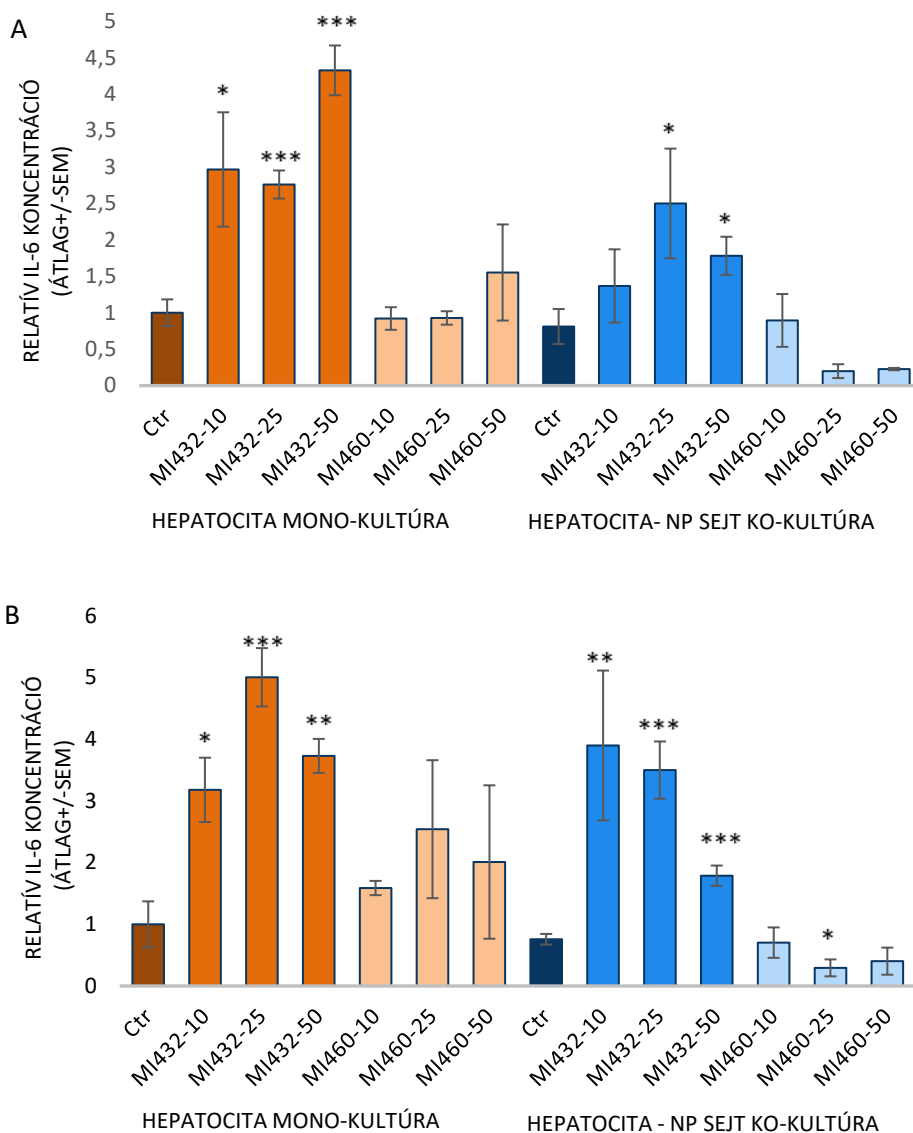




11. ábra: Az MI432 és MI460 inhibitorok metabolikus aktivitásra gyakorolt hatása csirke primer hepatocita mono-kultúrán és hepatocita – NP sejt ko-kultúrán 4 (A) és 24 (B) óra inkubációt követően CCK-8 módszerrel vizsgálva. Átlag ± SEM; $n_{ctr}=6$, $n_{MI}=3$ /csoport; * $p<0.05$. A relatív abszorbancia értékeket úgy számítottuk ki, hogy a kontroll hepatocita mono-kultúrák abszorbanciájának átlagát 1-nek tekintettük.

6.2.2 Az inhibitorok IL-6, IL-8 citokinekre gyakorolt hatása

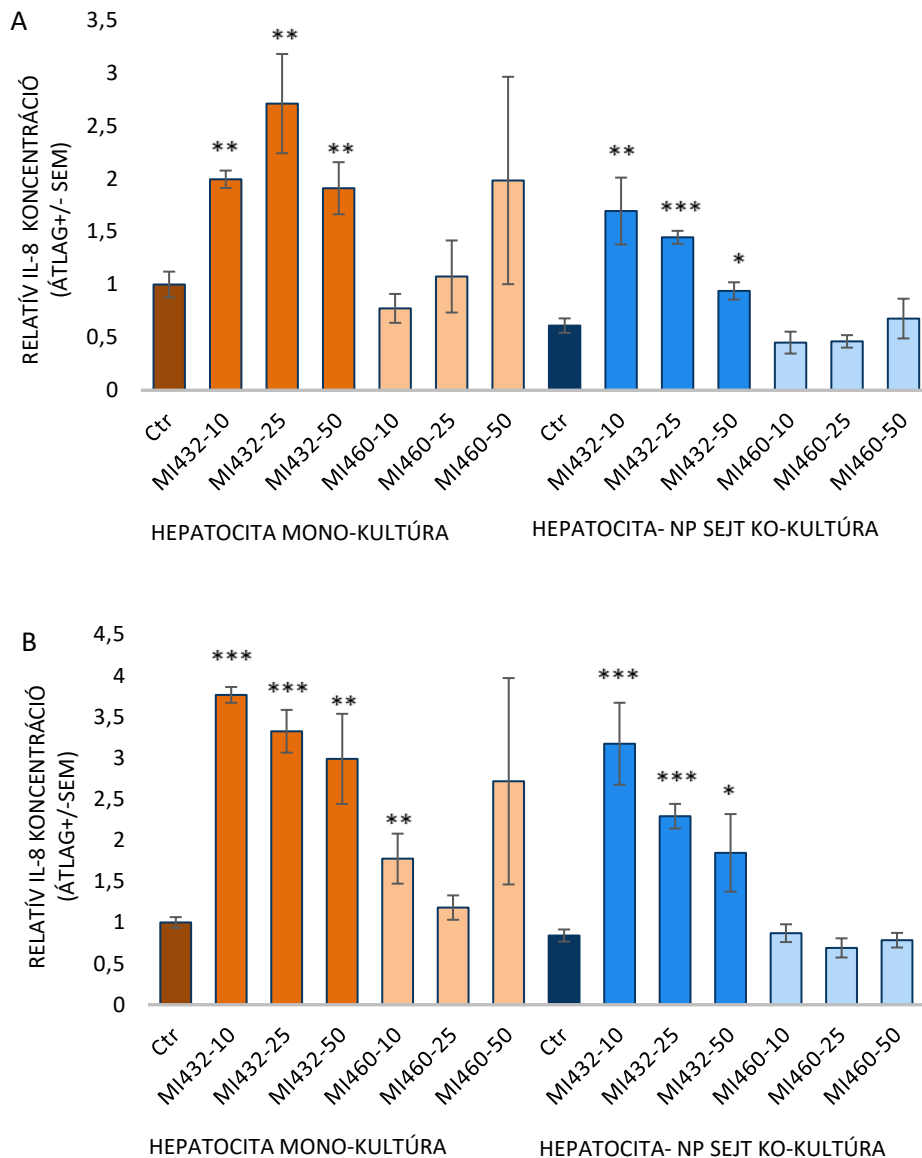
A sejtek felülűszóját vizsgálva az IL-6 gyulladáscsökkentő citokin koncentrációjára eltérő hatást gyakorolt a két inhibitor. Amíg az MI432 inhibitor szignifikánsan megemelte az IL-6 koncentrációt mind a két sejt kultúrán 4 (12. ábra A) (mono-kultúrán: $p_{MI432\ 10\ \mu mol/l}=0,0115$; $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}=0,0006$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}<0,0001$; ko-kultúrán: $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}=0,0269$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}=0,0421$) és 24 óra (B ábra) inkubációs idő után is (mono-kultúrán: $p_{MI432\ 10\ \mu mol/l}=0,0116$; $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}=0,0004$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}=0,0021$; ko-kultúrán: $p_{MI432\ 10\ \mu mol/l}=0,0018$; $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}<0,0001$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}=0,0004$), addig MI460 inhibitornál nem figyelhető meg jelentős változás az IL-6 koncentrációjában (kivéve a 24 óra inkubációt követő koncentrációcsökkentő hatást ko-kultúrán, 25 $\mu mol/l$ esetén; $p=0,0346$). Az IL-6 koncentráció növekedés kifejezettebbnek bizonyult 4 óra MI432 kezelést követően mono-kultúra esetén, mint ko-kultúrán, míg 24 óra inkubáció után nem tapasztaltunk jelentős különbséget a két típusú sejt kultúra IL-6 koncentráció értékei között (12. ábra B).



12. ábra: Az MI432 és MI460 inhibitorok IL-6 termelésére gyakorolt hatása csirke primer hepatocita mono-kultúrán és hepatocita – NP sejt ko-kultúrán 4 (A) és 24 (B) óra inkubációt követően ELISA módszerrel vizsgálva. Átlag ± SEM; $n_{ctr}=6$, $n_{MI}=3$ /csoport; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. A relatív koncentráció értékeket úgy számítottuk ki, hogy a kontroll hepatocita mono-kultúrák koncentrációinak átlagát 1-nek tekintettük.

Az IL-6 vizsgálat eredményéhez hasonlóan az MI432 szignifikánsan megemelte 4 (13. ábra A) és 24 órát (13. ábra B) követően is az IL-8 gyulladásgátló citokin extracelluláris koncentrációját mindkét típusú sejt kultúrán (mono-kultúrán, 4 óra kezelés után $p_{MI432\ 10\ \mu mol/l}=0,0011$; $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}=0,0019$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}=0,0068$; ko-kultúrán, 4 óra kezelés után: $p_{MI432\ 10\ \mu mol/l}=0,0022$; $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}=0,0001$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}=0,0231$; mono-kultúrán, 24 óra kezelés után: $p_{MI432\ 10\ \mu mol/l}<0,0001$; $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}<0,0001$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}=0,0010$; $p_{MI460\ 10\ \mu mol/l}=0,0097$; ko-kultúrán, 24 óra kezelés után: $p_{MI432\ 10\ \mu mol/l}=0,0003$; $p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}<0,0001$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}=0,0003$).

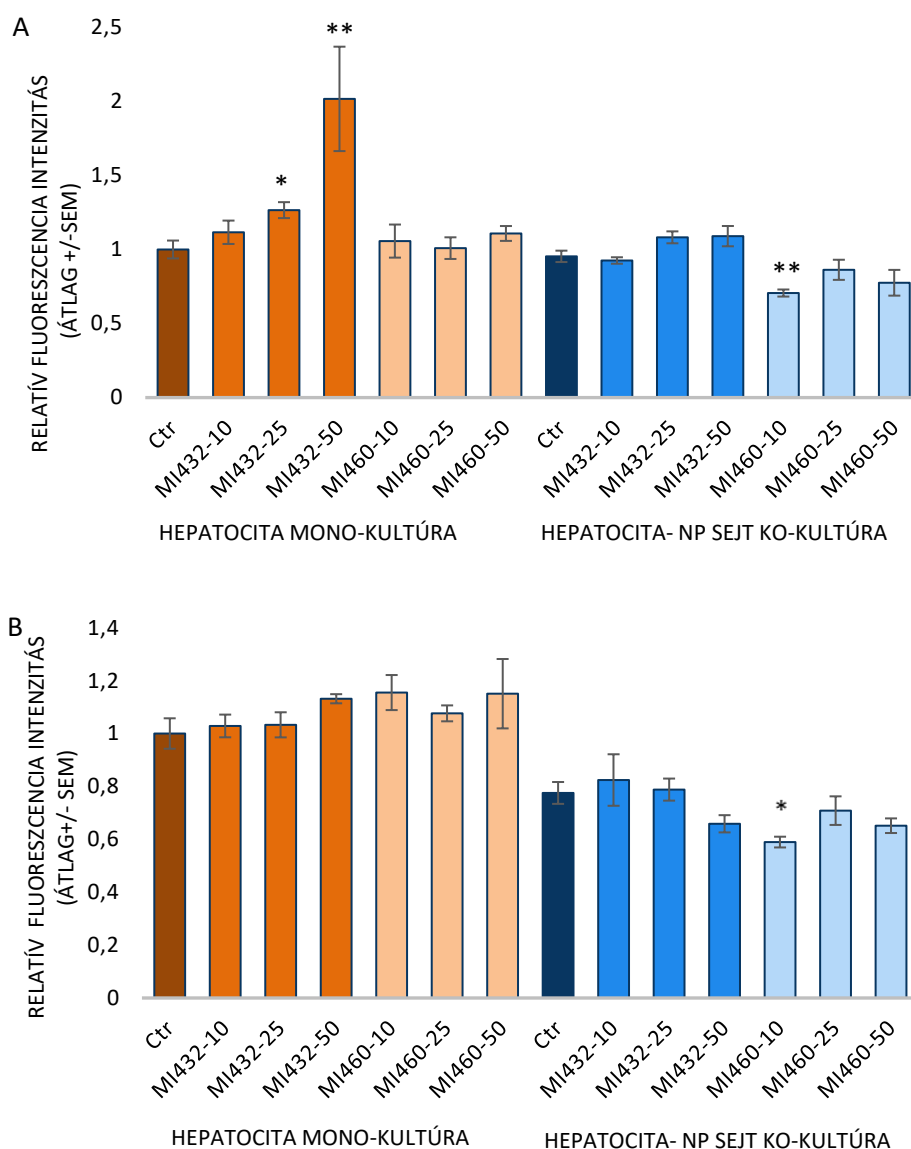
$\mu\text{mol/l}=0,0179$). Ezzel szemben az MI460 nem volt hatással a sejtek IL-8 termelésére (kivéve mono- kultúrán, 24 óra kezelést követően $p_{\text{MI460 } 10 \mu\text{mol/l}}=0,0097$).



13. ábra: Az MI432 és MI460 inhibitorok IL-8 termelésére gyakorolt hatása csirke primer hepatocita mono-kultúrán és hepatocita – NP sejt ko-kultúrán 4 (A) és 24 (B) óra inkubációt követően ELISA módszerrel vizsgálva. Átlag ± SEM; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3$ /csoport; * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$. A relatív koncentráció értékeket úgy számítottuk ki, hogy a kontroll hepatocita mono-kultúrák koncentrációinak átlagát 1-nek tekintettük.

6.2.3 Az inhibitorok hatása az extracelluláris H₂O₂ koncentrációra

Az esetek többségében nem tapasztaltunk szignifikáns változást egyik inhibitor alkalmazásánál sem az extracelluláris H₂O₂ mennyiségében. Az MI432 25 és 50 µmol/l koncentrációban 4 óra kezelést követően megemelte az extracelluláris H₂O₂ mennyiséget a májsejt mono-kultúrán (14. ábra A) ($p_{MI432\ 25\ \mu mol/l}=0,0268$; $p_{MI432\ 50\ \mu mol/l}=0,0045$). Ezzel ellentétben MI460 esetén 10 µmol/l koncentrációban szignifikáns csökkenést tapasztaltunk 4 és 24 óra inkubációs idő után ko-kultúrán (14. ábra A és B) (4 óra kezelés után: $p_{460\ 10\ \mu mol/l}=0,0048$; 24 óra kezelés után: $p_{460\ 10\ \mu mol/l}=0,0199$). A H₂O₂ és IL-8 szint között szignifikáns pozitív korrelációt találtunk mono-kultúrán ($p=0.019$).

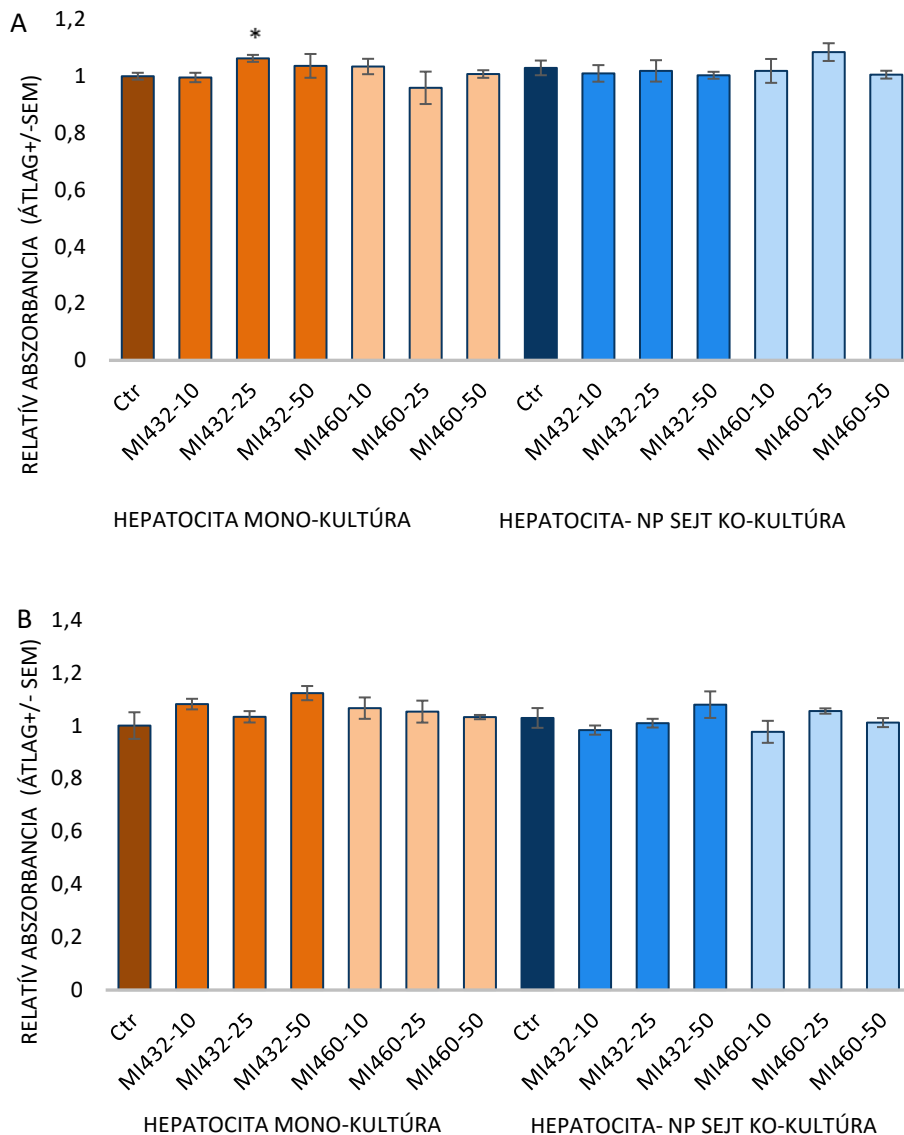


14. ábra: Az MI432 és MI460 inhibitorok extracelluláris H₂O₂ termelésére gyakorolt hatása csirke primer hepatocita mono-kultúrán és hepatocita – NP sejt ko-kultúrán 4 (A) és 24 (B) óra inkubációt követően Amplex red módszerrel vizsgálva. Átlag ± SEM;

$n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3$ /csoport; * $p<0,05$; ** $p<0,01$. A relatív fluoreszcencia intenzitás értékeit úgy számítottuk ki, hogy a kontroll hepatocita mono-kultúrák fluoreszcencia intenzitásának átlagát 1-nek tekintettük.

6.2.4 Az inhibitorok hatása az extracelluláris malondialdehid-koncentrációra

Az MI432 és MI460 sorszámú inhibitor sem okozott szignifikáns változást sem mono- vagy ko-kultúrán, 4 (15. ábra A), 24 óra (15. ábra B) kezelést követően sem, egy esetet leszámítva: az MI432 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 4 óra inkubációt követően mono-kultúrán kissé megemelte az MDA mennyiségét ($p_{\text{MI432 } 25 \mu\text{mol/l}}=0,0146$).

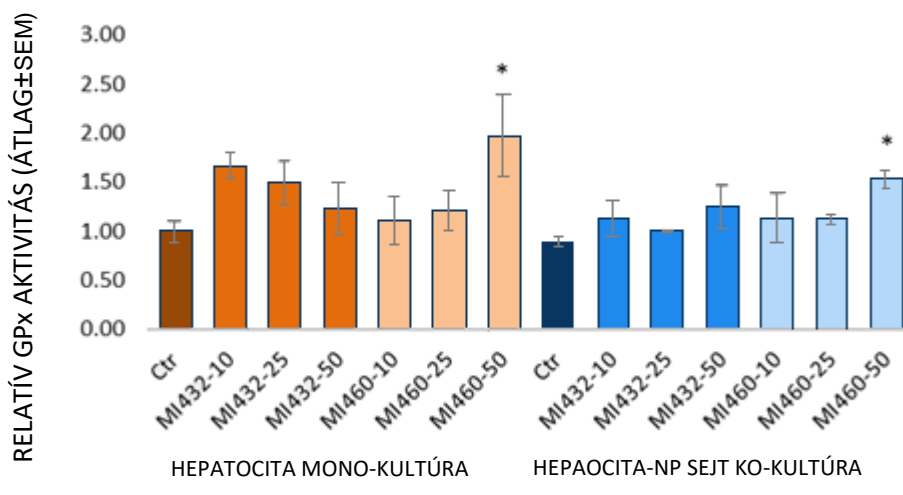


15. ábra: Az MI432 és MI460 inhibitorok malondialdehid termelésére gyakorolt hatása csirke primer hepatocita mono-kultúrán és hepatocita – NP sejt ko-kultúrán 4 (A) és

24 (B) óra inkubációt követően specifikus kolorimetriás eljárással vizsgálva. Átlag \pm SEM; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3$ /csoport; $*p<0,05$. A relatív koncentráció értékeket úgy számítottuk ki, hogy a kontroll hepatocita mono-kultúrák koncentrációjának átlagát 1-nek tekintettük.

6.2.5 Az inhibitorok hatása a glutation-peroxidáz aktivitására

Az inhibitorok közül az MI460 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazva 24 órás kezelést követően szignifikánsan megemelte a sejtek GPx aktivitását mind májsejt mono-, mind májsejt NP sejt ko-kultúrán (mono-kultúrán $p_{\text{MI460 } 50 \mu\text{mol/l}}=0,0446$, ko-kultúrán: $p_{\text{MI460 } 50 \mu\text{mol/l}}=0,0273$) (16. ábra).



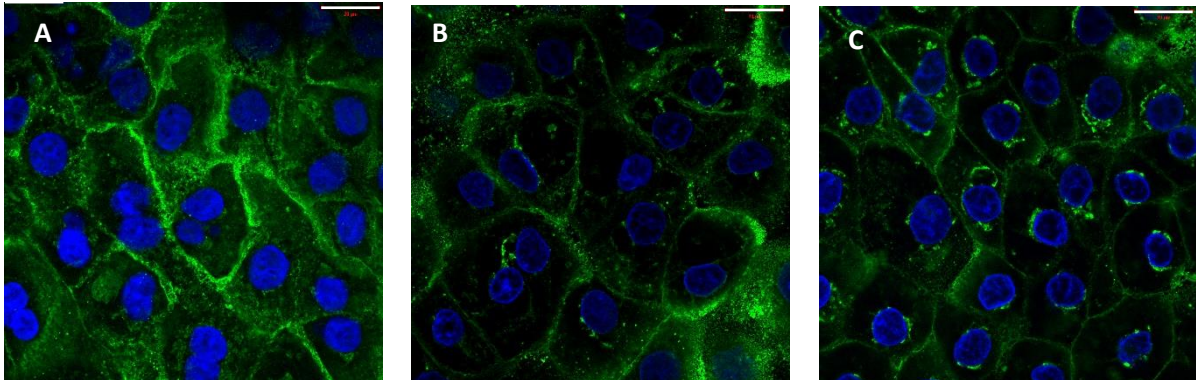
16. ábra: Az MI432 és MI460 inhibitorok GPx aktivitásra gyakorolt hatása csirke primer hepatocita mono-kultúrán és hepatocita- NP sejt ko-kultúrán 24 óra inkubációt követően specifikus kolorimetriás eljárással vizsgálva. Átlag \pm SEM; $n_{\text{ctr}}=6$, $n_{\text{MI}}=3$ /csoport; $*p<0,05$. A relatív GPx aktivitás értékeket úgy számítottuk ki, hogy a kontroll hepatocita mono-kultúrák aktivitás átlagát 1-nek tekintettük.

6.3 3. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata IPEC-J2 bélhámsejtvonalon

6.3.1 Sejtmembrán integritásvizsgálat immunfluoreszcens technikával

Immunfluoreszcens festékekkel (Alexa Fluor 488, zöld színű fluoreszcencia) jelölt, a sejtmembránban található szialinsavhoz specifikusan kötődő WGA segítségével vizsgáltuk az egyrétegű sejtenyészlet integritását a membrán inzerteken. Azt tapasztaltuk, hogy

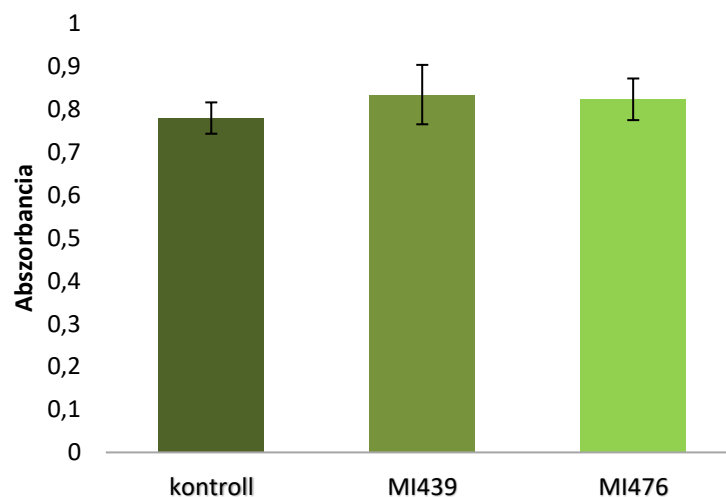
összefüggő sejtréteg látható mind a kontroll, mind a kezelt sejttenyészetben. A sejtmagokat kék fluoreszcenciát mutató DAPI felhasználásával jelöltük (17. ábra).



17. ábra: Az IPEC-J2 sejtek jellemzése immunfluoreszcens festékekkel jelölt búzacsíra agglutinin segítségével (WGA, Alexa Fluor 488, zöld), valamint a sejtmagok jelölése diamidino-fenilindol (DAPI) festékekkel (kék). A képen a kontroll (A) és inhibitorral kezelt sejtek láthatóak (MI439: B, MI476: C; mind 50 $\mu\text{mol/l}$). Bar=20 μm .

6.3.2 Sejtéletképesség és metabolikus aktivitás vizsgálata

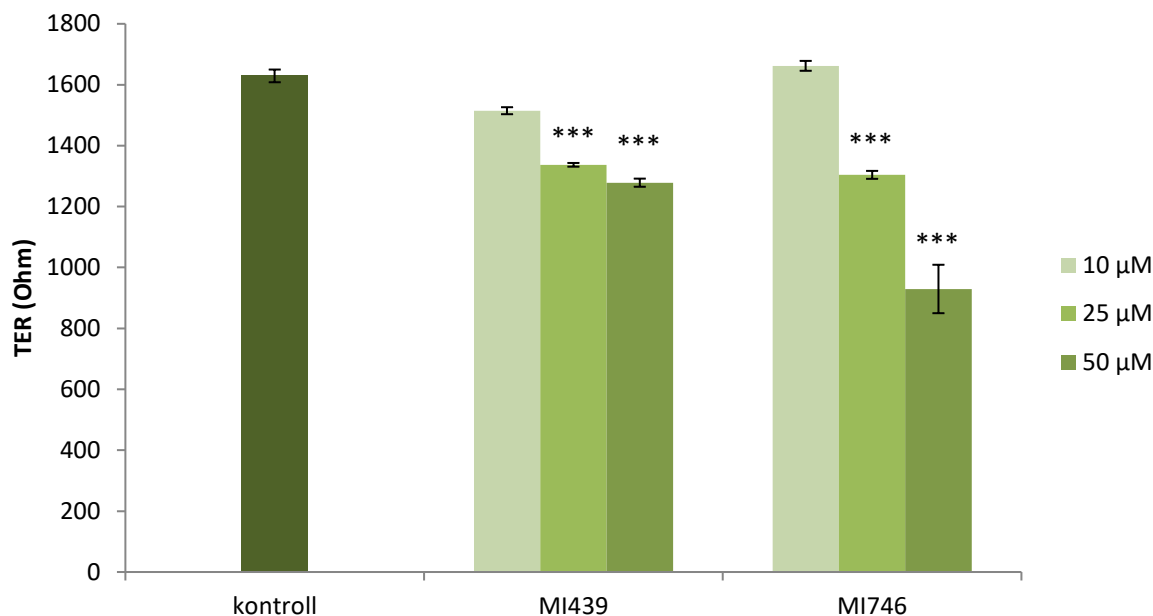
A sejtek életképességét nem befolyásolta egyik inhibitor sem 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazva 24 óra inkubációt követően ($p_{\text{MI439}}=0,997$, $p_{\text{MI476}}=0,999$) (18. ábra).



18. ábra: Az MI439 és MI476 inhibitorok metabolikus aktivitásra gyakorolt hatása IPEC-J2 sejt kultúrán 24 óra inkubációt követően MTS módszerrel vizsgálva. Átlag \pm SEM; n=4/csoport.

6.3.3 Az inhibitorok hatása a TER értékekre

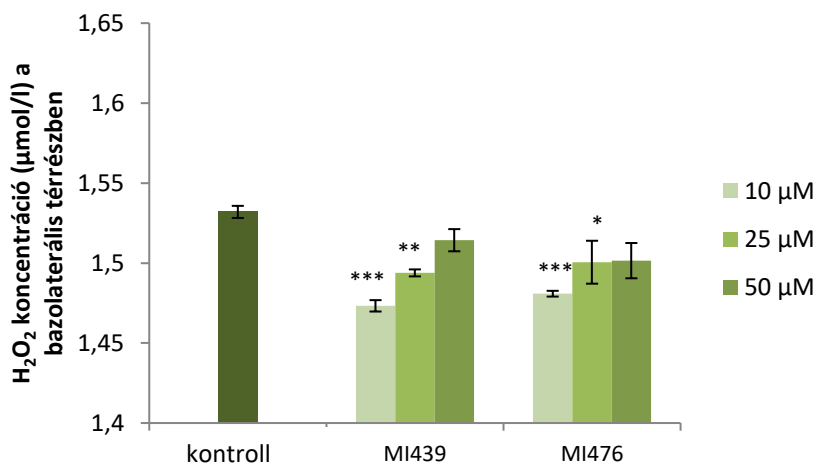
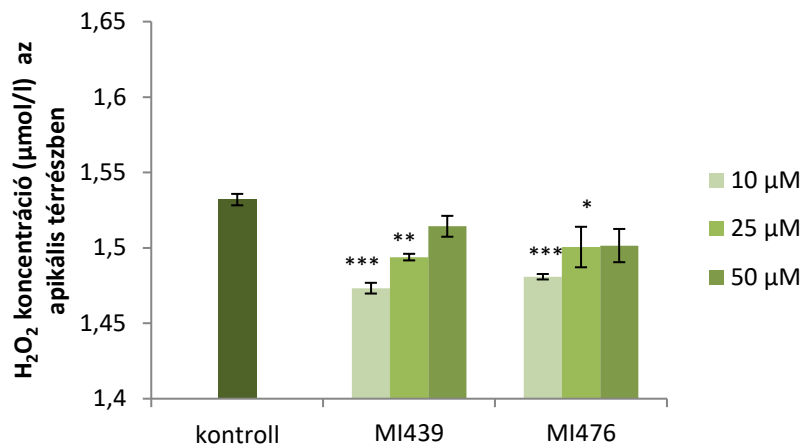
Az MI439 és MI476 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 24 óra inkubációs idő alatt nem okozott szignifikáns változást a TER értékekben ($p_{\text{MI439}}=0,1612$; $p_{\text{MI476}}=1,0000$), amíg 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációkban alkalmazva szignifikáns TER csökkenés volt látható ($p<0,001$) (19. ábra).



19. ábra: Az MI439 és MI476 inhibitorok sejtréteg-integritásra gyakorolt hatása IPEC-J2 sejtkultúrára 24 óra inkubációt követően TER méréssel vizsgálva. Átlag \pm SEM; *** $p<0,001$, $n=3$ /csoport.

6.3.4 Az inhibitorok hatása az extracelluláris H_2O_2 koncentrációra

Az extracelluláris H_2O_2 koncentrációt mind az apikális (20. ábra A), mind a bazolaterális (20. ábra B) térrészből mértük a membrán inzertekről származó mintákból 24 óra inhibitoros kezelés után, az inhibitorokat 10, 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazva. Mindkét inhibitor enyhén (kb 3-6 %-kal), de szignifikánsan csökkentette az extracelluláris H_2O_2 mennyiségét apikálisan és bazolaterálisan (apikálisan, 25 $\mu\text{mol/l}$: $p_{\text{MI439}}=0,6514$, $p_{\text{MI476}}=0,0594$; minden más esetben $p<0,001$) (20. ábra A és B).



20. ábra: Az MI439 és MI476 inhibitorok extracelluláris H₂O₂ termelésére gyakorolt hatása az apikális (A) és bazolaterális (B) térrészben IPEC-J2 sejt kultúrán 24 óra inkubációt követően Amplex red módszerrel vizsgálva. Átlag ± SEM; n=3/csoport; *p<0,05; **p<0,01;***p<0,001.

7 Megbeszélés

7.1 1. vizsgálat: matriptáz aktivátor vizsgálata patkány primer hepatocita mono-kultúrán

A matriptáz-1 fontos szerepet játszik a sejtek közötti TJ szabályozása révén, így működése szükségszerű a posztnatális túléléshez (List et al, 2002). Korábban bizonyításra került, hogy a S1P extracelluláris szabályozóként és intracelluláris másodlagos hírvivőként is képes nanomólos mennyiségben aktiválni a matriptáz-1 enzimet (Benaud et al., 2002). Ezt támasztotta alá az IPEC-J2 nem tumoros bélhámsejtvonalon munkacsoportunk által végzett korábbi kísérlet is, ugyanis a S1P hatására erősödött a sejtréteg barrier funkciója: nőtt a transzepiteliális elektromos ellenállás, és nagyobb mennyiségű okkludin jelent meg a TJ területén (Pászti-Gere et al., 2016b). Mivel a matriptáz-1 és matriptáz-2 szerkezetileg nagyon hasonlóak, a S1P pedig mindenhol megtalálható a szervezetben, ahol sokféle szabályozó feladatot lát el, így felmerült a kérdés, hogy a matriptáz-1 enzimen kívül képes-e a matriptáz-2 aktiválására is. A matriptáz-2 túlnyomórészt a májban termelődik, így kutatásunkat hepatocita mono-kultúrára terveztük. Jelen kutatásban a S1P matriptáz-2 enzimre gyakorolt hatását vizsgáltuk indirekt módon, a hepcidin mennyiségi változását vizsgálva patkány primer hepatocita mono-kultúrán.

A matriptáz-2 a membránhoz kötött HJV hasításával képes megakadályozni a hepcidin transzkripcióját (Silvestri et al., 2008). Ha a matriptáz-2-t kódoló TMPRSS6 gén hibás vagy a matriptáz-2 proteolitikusan nem aktív, akkor a vér extrém magas hepcidinkoncentrációja és a bélhámsejtek következményesen csökkent ferroportin expressziója révén vashiányos vérszegénység alakul ki (Du et al., 2008; Folgueras et al., 2008). Ezek alapján a matriptáz-2 aktiváció alternatív terápiás lehetőséget jelenthet krónikus gyulladások esetén kialakuló vashiányos, nemregeneratív anémia esetén. Eredményeink alapján a S1P expozíció hatására csökkent hepcidinszintet találtunk 24, 48 és 72 óra után is.

A kísérlet során a 24, 48 és 72 órás mérésénél sem találtunk szignifikánsan emelkedett extracelluláris H_2O_2 mennyiséget egyik koncentráció esetén sem. Hasonló eredményeket tapasztaltak IPEC-J2 sejtvonalon, ahol a 48 órás kezelési idő alatt szintén nem volt mérhető extracelluláris H_2O_2 -koncentráció emelkedés (Pászti-Gere et al., 2016b). Ezzel ellentétben patkány, nem tumoros FRTL-5 pajzsmirigy sejtvonalon a hozzáadott S1P megnövekedett H_2O_2 koncentrációt eredményezett (Okajima et al., 1997).

Vizsgáltuk továbbá, hogy az általunk használt patkány primer hepatocitákhoz 50, 200, 1000 ng/ml koncentrációkban hozzáadott S1P megváltoztatja-e a sejtek metabolikus aktivitását, életképességét. A 72 órás kezelési idő alatt a legmagasabb alkalmazott

koncentrációban sem volt tapasztalható szignifikáns különbség a kontroll és egyik kezelt csoport között sem. Ez összhangban van a szakirodalommal, ugyanis a S1P széles körben megtalálható a szervezetben, általánosságban segíti a sejtek túlélését, növekedését, fejlődését (Hait et al., 2006). Az eredetileg intracelluláris hírvívő molekulaként leírt S1P, az 5 ismert G-protein kapcsolt receptora segítségével rengeteg szabályozó feladatot lát el (Hait et al., 2006). S1PR1-3 receptorok testszerte megtalálhatóak, a máj területén is (Kleuser, 2018). Korábban a Gyógyszertani és Méregtani Tanszéken végzett kísérletben, ahol 200 ng/ml koncentrációban 48 órán át adagolva a S1P biztonságosnak bizonyult IPEC-J2 bélhámsejteken (Pásztai-Gere et al., 2016b).

Több fiziológiás és patológiás, májat is érintő folyamatban kutatták a S1P szerepét. Korábbi kutatásokban egyrészt vizsgálták a máj funkcióját a plazma S1P szabályozásában (Christoffersen et al., 2011; Wilkerson et al., 2012). Másrészt számos patológiás folyamatban kutatták a S1P szabályozó szerepét. Hepatocelluláris karcinómában szenvedő betegeknél megemelkedett a plazmában található S1P koncentrációja, és erős korrelációt találtak a magasabb S1P koncentráció és a daganat növekedése között is a cirrózisban szenvedő betegekkel összehasonlítva (Grammatikos et al., 2016). Mindemellett a S1P 10-30 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban HuH7 humán hepatocelluláris karcinóma sejtvonalon csökkentette a sejtmigrációt (Matsushima-Nishiwaki et al., 2018). Egereken végzett kísérlet során a S1P és S1PR3 expressziója megemelkedett epepangás okozta májfibrózisban (Li et al., 2009). Az 1-es típusú cukorbetegséget modellező egereken emelkedettebb S1P mennyiséget találtak a kontroll egerekkel összehasonlítva (Fox et al., 2011). A S1P májműködési zavarokban betöltött szerepe azonban még nem tisztázott.

Összességében, az általunk választott 50, 200, 1000 ng/ml koncentrációban alkalmazott S1P biztonságosan alkalmazható patkány primer májsejt mono-kultúrán 72 óra inkubációs időt használva, mivel nem befolyásolta sem a sejtek metabolikus aktivitását, sem életképességét, sem a sejtek extracelluláris redox státuszát. A kezelés hatására csökkent a hepcidinkoncentráció a sejtek felülúszójában, amelyet feltehetően a matriptáz-2 aktiválása révén következhetett be. Az eredmények alapján úgy feltételezhető, hogy a S1P a matriptáz-2 aktivátoraként a májban is szabályozó szereppel bír, ugyanis a hepcidinszint változtatásán át a vasanyagcserére is hatást gyakorolhat.

7.2 2. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata csirke primer hepatikus mono- és ko-kultúrán

A kutatómunka keretében a matriptázgátlás hatásait vizsgáltuk csirke eredetű egészséges és gyulladós májsejtmodelleken, kiemelten tanulmányozva a matriptáz a sejtek metabolikus, gyulladós és redox folyamataiban betöltött potenciális szabályozó szerepét. Az alkalmazott hepatocita mono-kultúra és a hepatocita – NP sejt ko-kultúra Mackei és mtsai. publikációja alapján megfelelő modellnek tekinthető a madarak hepatocelluláris gyulladós és stresszorokra adott válaszreakcióinak vizsgálatára (Mackei et al., 2020a). Ezért ezek a sejtenyészetek jó modellként szolgálhatnak a madarakban történő matriptázgátlás következményeinek kutatásához is.

A különböző állatfajok matriptáz-1 és matriptáz-2 enzimjeiről korlátozott mennyiségű információ áll rendelkezésünkre. A matriptáz-1 ortológját számos állatfaj genomjából sikerült már kimutatni, a kísérletekben használt csirkénél is (List et al., 2006a), de a különböző állatfajok fehérjeszerkezetéről nem elérhetőek információk. Matriptáz-2 fehérjekimutatás egér (Hooper et al, 2003) és ember (Velasco et al., 2002) esetében történt először, e fehérje szerkezeti jellemzői viszonylag konzerváltak, ember, makákó, kutya, szarvasmarha, egér és patkány között, az emberi fehérjével összehasonlítva 95,6%, 91,1%, 85,6%, 80,1% és 80,4% azonosság mutatható ki az aminosav-szekvenciában (Ramsay et al, 2008).

A matriptáz-1 teljes genomja elérhető számos fajban, mint ember, patkány, egér illetve közönséges makákó (Entrez Gene azonosító: 6768 (humán); 19143 (egér); 114093 (patkány); 102117178 (közönséges makákó), matriptáz-2 genomja ember, egér és patkány esetén került leírásra (164656 (humán); 71753 (egér); 315388 (patkány)). A humán matriptáz-1 katalitikus doménjének (Friedrich et al, 2002), és egészének (Zhao et al., 2013) a struktúrája, kristályszerkezete már leírásra került, de ez még más fajok esetén eddig nem történt meg. Matriptáz-2 esetén humán katalitikus domén kristályszerkezetének modellezése számítógépen 3D modellezőrendszerrel történt meg (Velasco et al., 2002, Sisay et al, 2010), illetve rekombináns katalitikus domén került szintetizálásra (Sisay et al, 2010). Számos kísérletben csak a matriptázok mRNS-ének vagy fehérjéjének kimutatása történik meg, például Madin-Darby kutya vesehám sejtvonalon a matriptáz-1 expresszióját mutatták ki (Godiksen et al, 2008), IPEC-J2 sejteken enzimaktivitás vizsgálatot végeztek (Pászti-Gere, 2015), csirke embrionális vesehámsejt-tenyészetben csirkespecifikus primerrel teljes matriptáz mRNS-t detektáltak (Baron et al, 2013). Humán szövetekből a fehérje és az mRNS kimutatása is megtörtént (Oberst et al, 2013). Nem került még megállapításra a csirke és humán enzimek szerkezeti hasonlóságának mértéke, és nem ismert a csirke enzim szubsztrátum- és inhibitor-specificitása sem. A szakirodalomban fellelhető 3-APhA

inhibitorokkal különböző állatfajok sejtenyészetein végzett kísérletek mind Steinmetzer által meghatározott, humán szerin-proteáz doménon megállapított K_i értékeket veszik alapul (Steinmetzer et al, 2006; Sisay et al, 2010, Hammami et al., 2012). Mindazonáltal kérdéses, hogy a kiválasztott inhibitorok kvantitatív enzimgátló hatásuk és szelektivitásuk (legalább nagyságrendileg) azonos-e humán és csirke modelleken.

A modell érzékenységét nem vizsgáltuk az inhibitorok fizikai-kémiai tulajdonságaival és egyéb, nem gyulladáshoz vagy oxidatív stresszválaszt érintő biológiai hatásaival szemben. A CCK-8 vizsgálat eredményei alapján mind az MI432, mind az MI460 inhibitorok bizonyos koncentrációi mérsékelten csökkentették mindkét típusú sejtenyészet aerob katabolikus aktivitását a 4 órás inkubációs időt követően. A redukció mértéke azonban azt mutatta, hogy az inhibitorok nem voltak citotoxikusak. Ez összhangban van egy korábbi tanulmánnyal, ahol a T-2-toxin hasonló csökkenést okozott ugyanilyen csirke májsejt mono- és hepatocita – NP sejt ko-kultúra metabolikus aktivitásában anélkül, hogy citotoxikusnak bizonyult volna (Mackei et al, 2020b). A hosszabb, 24 órás inkubációt követően a kontroll és a matriptázinhibitorokkal kezelt sejtek között már nem volt szignifikáns különbség, ami arra utal, hogy a májsejtek metabolikusan gyorsan alkalmazkodnak a használt inhibitorokhoz. Sertés hepatocita – Kupffer-sejt ko-kultúrában az MI432, MI441, MI460, MI461 inhibitorok 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 24 órán át vizsgálva nem indukáltak sejthalált (Pomothy et al., 2016).

A gyulladáshoz kapcsolódó citokinek extracelluláris koncentrációját tekintve, a sejtmentes felülszók IL-6 és IL-8 koncentrációja jelentősen megnőtt az MI432 inhibitorral kezelt mono- és ko-kultúrában, mind 4, mind 24 órás inkubációs időt követően (kivéve IL-6-ot MI432 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 4 órán át kezelt ko-kultúráknál). Az inhibitorok által kiváltott interleukin-felszabadulás nagyobb mértékűnek bizonyult a mono-kultúrán, mint a ko-kultúrán 4 óra elteltével, ezzel ellentétben megközelítőleg azonos volt 24 órás expozíció után mindkét sejtmódelen. A mono-kultúrák MI432 kiváltotta fokozott citokintermelése is megerősíti, hogy a hepatociták számos gyulladáshoz vezető citokint képesek előállítani, mint például az IL-6-ot és az IL-8-at, amelyek kulcsszerepet játszanak a gyulladásban és stresszválaszban (Dong et al., 1998; Rowell et al, 1997). Mivel a H_2O_2 , mint redox szignálmolekula, hepatocelluláris IL-8 termelést indukálhat (Dong et al., 1998), az emelkedett IL-8 szintet részben okozhatja a megnövekedett extracelluláris ROS koncentráció MI432 kezelés esetén 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ 4 órás inkubáció után mono-kultúrán. Ezt támasztja alá a H_2O_2 és IL-8 szintje között megfigyelt pozitív korreláció is. Eredményeink alapján az MI432 inhibitor jelentősen befolyásolta a gyulladáshoz vezető folyamatokat, amit az emelkedett IL-6 és IL-8 koncentráció jelzett, és a matriptáz hepatikus oxidatív és gyulladáshoz vezető homeosztázis fenntartásában betöltött feltételezett szerepére utalhat. Az MI432 inhibitorral ellentétben az MI460 nem bizonyult gyulladáshoz vezető hatásúnak az IL-6 és IL-8 koncentrációk alapján (kivéve mono-kultúrán, IL-8

esetében 10 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazva 24 órán át). Annak ellenére, hogy az MI432 és az MI460 egyaránt hasonló struktúrájú 3-APhA alapvázú inhibitorok, eredményeink megerősítik, hogy nagyban eltérő hatást gyakorolhatnak a sejtek működésére, valószínűleg eltérő K_i értékeik miatt (Hammami, 2012). Mivel a matriptáz MI432 inhibitorral történő gátlása intenzív IL-6 és IL-8 felszabadulást váltott ki, ezen eredményeink azt sugallják, hogy a fiziológiásan szabályozott matriptáznak kulcsszerepe lehet a homeosztázis fenntartásában csirke májban, kerülve a túlzott gyulladáskeltő citokin felszabadulást. Továbbá, mivel az MI432 inhibitorral kezelt csirke májsejt mono- és ko-kultúrák megemelkedett interleukin szintje 24 órás inkubáció után sem csökkent, felmerül, hogy a májsejtek inhibitorokhoz való gyors metabolikus adaptációja nem járt együtt a fiziológiás gyulladással homeosztázis helyreállításával.

A matriptáz sokféle funkcióját a gyulladással válaszban többféle emlős sejttípuson már vizsgálták, de korábban ezt nem kutatták még madár eredetű modelleken. Az MI432 és MI460 hatásait a gyulladáskeltő citokintermelésre Pomothy és mtsai sertés eredetű primer mono- és ko-kultúrán tanulmányozták. Megállapításaik szerint a rövid távú, 2 órás kezelés matriptázinhibitorokkal nem befolyásolta az extracelluláris IL-6 és IL-8 szintet sertés hepatocita – Kupffer-sejt (NP sejtek fő frakciója) ko-kultúrán (Pomothy et al., 2016). Egyrétegű és hidrogél vázú 3D sertés primer hepatocita mono-kultúrán és hepatocita – Kupffer-sejt ko-kultúrán egy másik 3-APhA típusú inhibitor, az MI461 24 óra inkubáció után sem befolyásolta az extracelluláris IL-6 és IL-8 koncentrációt (Pásztai-Gere et al., 2020). Emberekben a matriptáz aktivációja számos gyulladással bőrbetegségnél megfigyelhető volt (Chen et al., 2011). Leírták, hogy a matriptáz a PAR-2 által közvetített gyulladással úton indukálta az endoteliális sejtek IL-6 és IL-8 termelését (Seitz et al., 2007). A nem megfelelően szabályozott matriptáz a PAR-2 útvonal aktiválásán át jelentősen részt vesz a humorális és sejtes gyulladással válaszban, illetve számos betegség, köztük epidermális daganatok kialakulásában is szerepet játszik (Oberst et al., 2003a; Sales et al., 2015). Másrészt azonban más betegségeknel, mint a fekélyes vastagbélgyulladás, a matriptáz védő szereppel bírt a bélbarrier funkció helyreállításával (Netzel-Arnett et al., 2012). Az emlőssejteken végzett kutatásokból nyert adatok és a jelen, csirke májsejttenyészetben végzett kísérletekből nyert adatok közötti különbségek rávilágítanak a matriptáz-aktivitás fajfüggő különbségeinek fontosságára. Ezen felül pedig tükrözik a matriptáz-aktivitás és a gyulladással válasz összetett kölcsönhatását is.

Eredményeink alapján a sejtek redox állapotát az alkalmazott inhibitorok többnyire nem befolyásolták, mivel az extracelluláris H_2O_2 és MDA koncentrációkban, valamint az intracelluláris GPx aktivitásban nem találtunk szignifikáns változást. Azonban az MI432 inhibitor 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 4 órán át inkubálva mono-kultúrán szignifikánsan megemelkedett H_2O_2 -koncentrációt mértünk, 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentráció esetén fokozott

lipidperoxidációt jelző MDA mennyiséggel kombinálva. Ezzel szemben 10 $\mu\text{mol/l}$ MI460 inhibitor antioxidáns hatásának bizonyult ko-kultúrán mindkét vizsgált inkubációs idő alatt. Az MI460 inhibitorok kitétt sejtek GPx-aktivitása jelentősen csak akkor emelkedett meg, ha az inhibitor a legnagyobb koncentrációban alkalmaztuk mindkét sejtmodellen. Ezek az adatok arra utalnak, hogy az alkalmazott 3-APhA típusú inhibitorok a legtöbb koncentrációban nem befolyásolják jelentősen a csirke májsejtek redox homeosztázisát, bizonyos körülmények között azonban redox modulátorokként működhetnek. Hasonlóképpen, a sertés hepatocita – NP sejt ko-kultúrán végzett korábbi kísérletek eredményei szerint az MI432 és MI460 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban történő rövid távú (2 órás) alkalmazása nem befolyásolta az extracelluláris ROS szintet, viszont a hasonló 3-AphA típusú MI441 jelentősen stimulálta a ROS felszabadulását (Pomothy et al., 2016). Sertés eredetű 3D májsejtmodelleken a H_2O_2 -termelés nem változott az MI461 inhibitor 24 órás expozíciója után sem (Pásztai-Gere et al., 2020). A matriptáz-modulált hepatociták redox homeosztázisának stabilitása összhangban van az 1. számú vizsgálat patkány hepatocita mono-kultúrákon végzett kísérleti eredményeinkkel, mivel a S1P mint matriptáz aktivátor nem befolyásolta a sejtek oxidatív állapotát. Az extrahepatikus sejtípusok esetében, mint a sertés vékonybél eredetű IPEC-J2 sejtvonalon az MI432 inhibitor 2 órán át 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazva átmeneti növekedést okozott a sejtek ROS-termelésében, de hosszabb expozíciós idő alatt a H_2O_2 szint normalizálódott (Pásztai-Gere et al., 2015b). Ezzel szemben a 3. vizsgálatban az MI439 és MI476 inhibitorok 24 órán keresztül alkalmazva jelentős antioxidáns hatást váltottak ki az extracelluláris H_2O_2 koncentráció csökkentésével egyrétegű IPEC-J2 sejtenyészeten, amely hatás a legkisebb alkalmazott koncentrációnál (10 $\mu\text{mol/l}$) volt a legkifejezettebb, hasonlóan az MI460 májsejtekre gyakorolt hatásához. Ezen adatok alapján a matriptáz gátlás bizonyos esetekben kis mértékben befolyásolhatja a ROS termelést és a sejt oxidatív védekező mechanizmusait, de nem tekinthető a redox homeosztázis jelentős modulátorának. Az GPx – mint központi szerepű antioxidáns enzim - MI460 kiváltotta aktivációja hozzájárulhat a celluláris ROS felszabadulás káros hatásainak mérsékléséhez, így a hepatikus oxidatív distressz elkerüléséhez. Ezért eredményeink alapján felvethető, hogy ezek az inhibitorok nem befolyásolják nagymértékben a csirke eredetű májsejtek oxidatív állapotát, így biztonságosan alkalmazhatók anélkül, hogy oxidatív stresszt és lipidperoxidációt okoznának.

Az általunk használt matriptáz inhibitorok által kiváltott változások tekintetében nem találtunk számottevő eltérést a hepatocita mono-kultúra és hepatocita – Kupffer-sejt (NP) ko-kultúra között, összhangban Pásztai-Gere és mtsai 2020-ban sertés hepatocita mono-és hepatocita – Kupffer-sejt (NP) ko-kultúrán végzett tanulmányával (Pásztai-Gere et al., 2020). Ez a megállapítás arra utalhat, hogy a máj NP sejtjeinek jelenléte nem kritikus tényező a matriptáz-gátlás hatásainak meghatározásában. Mivel a jelenleg alkalmazott ko-kultúra 6: 1 sejtaránnyal (hepatocita: NP sejtek) az enyhe fokú, mérsékelt makrofág infiltrációval járó

májgyulladás modelljeként szolgálhat (Mackei et al., 2020a), felmerül, hogy a 3-AphA alapvázú matriptázinhibitorok hasonlóan működhetnek fiziológiás és enyhén gyulladt körülmények között a csirke eredetű májsejteken. Az MI432 gyulladáskeltő hatása azonban mindkét sejt kultúra modellen kiemeli, hogy a matriptáz a csirke májában zajló gyulladási folyamatok fontos szabályozója is lehet.

Mindezt összefoglalva eredményeink alapján az MI432 által kiváltott matriptázgátlás jelentős IL-6 és IL-8 gyulladáskeltő citokintermelést váltott ki, amely nem járt együtt fokozott oxidatív stresszel és lipidperoxidációval (amelyeket a H_2O_2 és MDA mérése támasztott alá). Az MI432 és MI460 inhibitor sem bizonyult citotoxikusnak, de 4 órás expozíciót követően átmeneti, mérsékelt metabolikus aktivitáscsökkenést figyelhettünk meg mindkét sejtmodellen, amely 24 óra után visszaállt, jelezve a májsejtek gyors metabolikus adaptációs folyamatait. Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy a fiziológiás matriptázaktivitásnak kulcsfontosságú szerepe lehet a máj metabolikus és gyulladási homeosztázisának megőrzésében csirkemájban, anélkül, hogy a hepatocelluláris redox állapot fő szabályozója lenne.

7.3 3. vizsgálat: matriptázinhibitorok vizsgálata sertés IPEC-J2 bélhámsejtvonalon

A matriptáz-1 és matriptáz-2 gátlását intenzíven kutatják a potenciális terápiás felhasználásra összpontosítva. Ugyanakkor jelenleg csak meglehetősen korlátozott adatok állnak rendelkezésre a 3-APhA alapvázú inhibitorokról, hogy milyen hatással vannak a sejtek redox státuszára, oxidatív stresszválaszra, a sejtréteg integritására, illetve toxikus voltára nézve. A harmadik kísérletben olyan inhibitorokat használtunk, amelyeket még korábban nem teszteltünk sejtes közegben. Jelen kísérletben IPEC-J2 nem tumoros sertés jejunum eredetű bélhámsejtvonalat alkalmaztunk, mivel sokkal jobban hasonlít a fiziológias bélhámhoz, mint bármely daganatos eredetű sejtvonal (Brosnahan et al., 2012). Az inhibitorok gátlóképességét itt is korábban humán tisztított, rekombináns aktív matriptáz doménon vizsgálták. Itt is felmerül, mennyi lehet a hasonlóság humán és sertés matriptáz-1 szerkezete között, mennyire hasonló az inhibitorok szelektivitása, gátlóképessége, bár valószínűleg több a hasonlóság, mint a második vizsgálat humán-csirke matriptáz gátlóképessége esetén.

Eredményeink alapján az MI439 és MI476 nem volt hatással a sejtek életképességére a vizsgált 24 óra inkubációs idő alatt, megerősítve, hogy ezek az inhibitorok biztonságosan alkalmazhatóak 50 $\mu\text{mol/l}$ 24 órán át IPEC-J2 bélhámsejteken. Ez összhangban áll a korábban tesztelt más inhibitoroknál tapasztaltakkal. Ugyanígy IPEC-J2 sejtvonalon az MI432 sorszámú inhibitor sem befolyásolta a sejtek életképességét 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 48 óra kezelési időt követően (Pásztai-Gere et al., 2015b). A legtöbb 3-APhA típusú inhibitorral végzett kísérletre azonban többnyire daganatos sejtvonalakon került sor (Uhland et al., 2009; Meyer et al., 2013), így az ott kapott eredmények kevésbé relevánsak nem daganatos sejteken végzett kísérletekkel összehasonlítva.

A 3. vizsgálatunk során azt tapasztaltuk, hogy az MI439 és az MI476 is szignifikánsan csökkentette a TER értéket 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 24 óra kezelési időt alkalmazva. Korábbi kísérletekben a differenciált IPEC-J2 egyrétegű sejteken az AEBSF szerin-proteáz inhibitor 25 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban szignifikánsan csökkentette a TER értékeket háromnapos expozíció alatt, illetve a 3-APhA típusú inhibitor MI432 és MI460 pedig szignifikánsan csökkentette a TER-t a 24 órás inkubációs idő után, amíg az MI453 és MI463 sorszámú inhibitor nem befolyásolta a sejtréteg TER értékét (Pásztai-Gere et al., 2016a). Az inhibitorok gátlóképességét vizsgálva a MI432 és MI460 membrán áteresztőképességet növelő enzim $K_{i\text{matriptáz-1}}$ állandója volt a legkisebb (2. táblázat), amíg a többi (MI453, MI463, MI469) inhibitornál ez többszöröse volt (3. táblázat). Ennek fényében érthetőbb, miért ez a két inhibitor gátolta a matriptáz-1 enzimet, ugyanis minél kisebb az állandó, annál nagyobb a kötődési affinitás. Így valószínűleg csak magasabb koncentrációban alkalmazva sikerülhetett

volna hatást elérni a többi inhibitorral. A disszertációban alkalmazott MI439 $K_{i\text{matriptáz-1}}$ értéke ismert (0,001 $\mu\text{mol/l}$), a korábban IPEC-J2 sejtenyészeten alkalmazott, matriptáz-1 gátlást okozó inhibitorok K_i értékével közel azonos. Az MI476 $K_{i\text{matriptáz-1}}$ értéke nem ismert, de az eredményünk alapján valószínűsíthető, hogy nagyságrendileg 0,001-0,002 között kell lennie. Más, IPEC-J2 sejteken végzett kutatások során az MI432 10, 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 48 órás alkalmazás esetén csökkentette a TER-értékeket (Pászt-Gere et al., 2015b), arra utalva, hogy a matriptázinhibitorok befolyásolhatják a sertések bélintegritását. Megnövekedett paracelluláris permeabilitást és csökkent a matriptáz-1 enzimaktivitást okozhatna a sejtréteg sérülése, sejtek pusztulása is. A TER ellenőrzése viszont alátámasztja, hogy nem a sejtek pusztulása okozza a látható eltéréseket. Ugyanis a TER az MI432 és MI460 inhibitorral kezelt sejtenyészeti edényekben is növekedett, csak kisebb mértékben a kontrollhoz képest, ami azt jelenti, hogy a sejtek differenciálódtak, fejlődtek a kezelés alatt is (Pászt-Gere et al., 2016a).

Az IPEC-J2 sejtréteg integritását WGA festéssel ellenőriztük. A vizsgálat alapján mindkét inhibitorral kezelt és a kontroll mono-kultúra is konfluens sejtréteget alkotott. A festés alapján az inhibitorokkal kezelt sejteknél intenzív perinukleáris fluoreszcencia volt látható. A WGA pozitív Golgi-apparátus részeként látható vakuólumok egyik legfontosabb feladata a membránhoz kötött fehérjék szintézise és transzportja (Wang és Seemann, 2011). A matriptázinhibitorok egy lehetséges közvetett visszacsatolási mechanizmuson át eredményezhetik, hogy matriptáz intermedierek halmozódnak fel és tárolódnak a gátolt szintézis vagy zimogén aktiváció miatt.

Úgy tűnik, hogy a celluláris redox státusz megzavarása egyes mechanizmusok révén - például a TMPRSS enzimek megváltozott eloszlási mintázatán keresztül - ronthatja a bélhámréteg integritását. Ez arra utalhat, hogy kapcsolat áll fenn a bizonyos TTSP enzimaktivitás és a bélhám redox homeosztázisa között (Pászt-Gere et al., 2015a). A matriptáz gátlásnak a redox állapotra gyakorolt hatását illetően korábban kutatócsoportunk leírta, hogy az MI432 inhibitorral történt kezelés nem okozott zavart az extracelluláris H_2O_2 szintben 10, 25 és 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban alkalmazva 24 és 48 óra inkubációt követően, azonban rövid, 2 órás expozíció után átmenetileg megnőtt a H_2O_2 termelés, ha az MI432 50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban került alkalmazásra IPEC-J2 sejteken (Pászt-Gere et al., 2015b). Másrészt, IPEC-J2 sejteken a matriptáz aktivátor S1P alkalmazása nem befolyásolta az extracelluláris H_2O_2 szintet, ezzel egyidejűleg viszont növelte a TER-t és stimulálva az okkludin felhalmozódását a TJ területén (Pászt-Gere et al., 2016b). Ugyanezt tapasztaltuk az 1. vizsgálat keretében patkány primer hepatocita mono-kultúráján végzett kísérletben, hogy a sejtek redox státuszát nem befolyásolta a S1P adagolás a vizsgált 72 órás időszak alatt.

Az IPEC-J2 sejteken végzett jelen vizsgálatban az MI439 és az MI476 egyaránt képesek voltak szignifikánsan csökkenteni az extracelluláris H_2O_2 mennyiséget, 10, 25 és

50 $\mu\text{mol/l}$ koncentrációban 24 órán keresztül adagolva (50 $\mu\text{mol/l}$ esetén csak a bazolaterális térrészben). Ezek az adatok a matriptázgátlás új jótékony hatására mutathatnak rá a bélhám redox állapotának javításával. A korábbi vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy a 3-APhA típusú inhibitorok rövid távú (2 órás) alkalmazása növelheti az extracelluláris H_2O_2 szintet azáltal, hogy megzavarja a ROS egyensúlyát a sejtmembrán két oldalán, de ezt a hatást kompenzálódik és az élettani redox paraméterek helyreállnak a hosszabb inkubációs időt követően (24 és 48 óra) (Pászt-Gere et al., 2015b). A 3. vizsgálat eredménye azonban arra utal, hogy bizonyos matriptázgátlók antioxidatív képességgel is rendelkezhetnek, így csökkenthetik a bélhámsejtek extracelluláris ROS-felszabadulását, hozzájárulva ezáltal a bél egészségéhez. Mivel az oxidatív stressz sokrétű hatásmód révén kulcsszerepet játszik számos bélbetegség patogenezisében (Pászt-Gere et al., 2015a), az alkalmazott 3-APhA-gátlók (MI439 és MI476) feltételezett potenciálja a bél ROS-képződésének enyhítésében nagy jelentőséggel bír a gasztrointesztinális rendellenességeket célzó új terápiákban.

Mindent összegezve, a vizsgált 3-APhA típusú MI439 és MI476 inhibitor is ígéretes jelölteknek tekinthetők a redox homeosztázis és a bél egészségének kialakításában és fenntartásában, mivel jelentősen csökkentették az extracelluláris H_2O_2 szintet 24 órás expozíciót követően IPEC-J2 sejtrétegen. A jelen eredmények, a korábbi vizsgálatokkal összefüggésben kiemelik a matriptáz-1 enzim kulcsfontosságú funkcióját a bélbarrier funkció szabályozásában, és arra is utalnak, hogy a megfelelő matriptázgátlás hasznos eszköz lehet a bél egészségének javításában a fiziológias oxidatív egyensúly fenntartása révén.

7.4 Konklúzió

A doktori kutatás keretében különféle matriptáz modulátorok sejtszintű hatásait vizsgáltuk patkány, csirke és sertés eredetű hepatikus, ill. enterális *in vitro* modellrendszerekben. Vizsgálataink számos új adattal szolgáltak a matriptáz aktivátorként használt S1P, valamint különböző 3-APhA alapvázú gátlószerek sejtmetsabolizmusra, gyulladáson és redox homeosztázisra gyakorolt befolyásolásával, valamint a matriptáz enzimek élettani szerepével kapcsolatban egyaránt.

A S1P esetében általános emlős modellként szolgáló patkány primer hepatocita monokultúrán igazoltuk, hogy a matriptáz-2 hatékony aktivátorként csökkenti a májsejtek hepcidintermelését, anélkül, hogy citotoxikus vagy prooxidáns hatással bírna. A S1P ezáltal hozzájárulhat a vas felszívódásának és raktározó sejtekből történő leadásának elősegítéséhez, így ígéretes jelölt lehet a krónikus gyulladáson folyamatok esetén megfigyelt, fokozott hepcidintermelés mediálta nemregeneratív anaemiák gyógykezelésében.

Kutatómunkánk során elsőként vizsgáltuk egyes matriptázgátlók hatásait csirkében, amely faj a matriptáz modulátorok esetleges későbbi terápiás alkalmazása tekintetében célállatfajként, valamint a madarak modellállatfajaként is nagy jelentőséggel bír. A csirke eredetű hepatikus mono- és ko-kultúrákon az MI432 hatására fokozott IL-6 és IL-8 termelést tapasztaltunk, ami arra utal, hogy a matriptáz vélhetően szerepet játszik a máj gyulladáson homeosztázisának szabályozásában. Mivel azonban egyik gátlószert sem befolyásolta a sejtek oxidatív státuszát és a lipidperoxidáció mértékét, a matriptáz vélhetően nem tekinthető a redox homeosztázis modulátorának csirkében. Mindkét inhibitor (MI432 és MI460) rövid idejű, 4 órán keresztül történő alkalmazása kismértékű metabolikus depressziót idézett elő, de 24 órás inkubációt követően a máj anyagcseréjének gyors adaptációja révén ez a hatás már nem volt megfigyelhető. Kísérletünk alapján tehát egyik vizsgált 3-APhA típusú gátlószert *in vitro* hepatikus alkalmazása sem járt sejtkárosító hatással csirkében, a gyulladáson folyamatok befolyásolása révén egyes matriptázgátlók azonban hozzájárulhatnak a májsejtekben kialakuló gyulladáson válasz fokozódásához.

Az IPEC-J2 sertés bélhámsejtvonalon végzett kísérletünk igazolta, hogy az MI439 és MI476 gátlószerek – más, 3-APhA típusú inhibitorokhoz hasonlóan – befolyásolhatják a bélhám integritását, valamint antioxidáns hatásuk révén a sejtek redox állapotát is, amely megerősíti a matriptáz élettani szerepét a bél barrier funkciójának fenntartásában, és lényeges limitáló szempontot jelent a matriptázinhibitorok esetleges későbbi alkalmazása szempontjából is.

Eredményeinket összegezve, a kutatómunkánk során felhasznált sejttenyészetek megfelelő faj- és szervspecifikus modellnek bizonyultak a matriptáz modulátorok hatásainak vizsgálatára. A vizsgált aktiváló és gátló hatású vegyületek különböző állatfajok máj és bél

eredetű sejt kultúráiban kifejtett sejtszintű hatásainak leírása hozzájárulhat a kezelőanyagok esetleges jövőbeli farmakológiai irányú fejlesztéséhez, tekintettel a felmerülő terápiás célokra, valamint az alkalmazás biztonságosságára is.

8 Új tudományos eredmények

1. A szfingozin-1-foszfát matriptáz-2 aktivátorként csökkenti az extracelluláris hepcidinkoncentrációt patkány primer hepatocita mono-kultúrán, ezáltal vélhetően részt vesz a vasanyagcsere szabályozásában.
2. Elsőként teszteltünk 3-APhA alapvázú matriptázinhibitorokat (MI432, MI460) csirke primer hepaticus mono-és ko-kultúrán, vizsgálva a matriptáz metabolikus, gyulladásszerű és redox folyamatokban betöltött szerepét. Az MI432 ugyan jelentős gyulladáskeltő citokintermelődést váltott ki, de ez nem járt együtt oxidatív stresszel és lipidperoxidációval, és egyik inhibitor sem csökkentette a sejtek metabolikus aktivitását. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a fiziológiai matriptázaktivitás fontos szerepet tölt be a máj metabolikus és gyulladásszerű homeosztázisának fenntartásában madarakban.
3. Sejt-kultúrán még nem tesztelt matriptáz inhibitorok (MI439, MI476) új hatásait írtuk le sertés IPEC-J2 bélhámsejt-tenyészetben. Az MI439 és MI476 inhibitorok a sejtek életképességét nem csökkentették, magasabb koncentrációkban azonban TER csökkentő hatás volt megfigyelhető, illetve az extracelluláris H₂O₂ mennyisége is csökkent. Ezen eredmények alapján a bélbarrier befolyásolásán kívül bizonyos matriptázgátlók antioxidáns képességgel is rendelkezhetnek, így mérsékelve a H₂O₂ bélhámsejtekből történő felszabadulását, hozzájárulva ezáltal a bél egészségéhez.

9 Irodalom

Babitt, J.L., Huang, F.W., Wrighting, D.M., Xia, Y., Sidis, Y., Samad, T.A., Campagna, J.A., Chung, R.T., Schneyer, A.L., Woolf, C.J., Andrews, N.C., Lin, H.Y.: **Bone morphogenetic protein signaling by hemojuvelin regulates hepcidin expression**, *Nat. Genet.*, 38. 531-539, 2006.

Bardou, O., Menou, A., François, C., Duitman, J.W., von der Thüsen, J.H., Borie, R., Sales, K.U., Mutze, K., Castier, Y., Sage, E., Liu, L., Bugge, T.H., Fairlie, D.P., Königshoff, M., Crestani, B., Borensztajn, K.S.: **Membrane-anchored Serine Protease Matriptase Is a Trigger of Pulmonary Fibrogenesis**, *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.*, 193, 847-860, 2016.

Baron, J., Tarnow, C., Mayoli-Nüssle, D., Schilling, E., Meyer, D., Hammami, M., Schwalm, F., Steinmetzer, T., Guan, Y., Garten, W., Klenk, H.D., Böttcher-Friebertshäuser, E.: **Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses**, *J. Virol.*, 87. 1811-1820, 2013.

Basel-Vanagaite, L., Attia, R., Ishida-Yamamoto, A., Rainshtein, L., Ben Amitai, D., Lurie, R., Pasmanik-Chor, M., Indelman, M., Zvulunov, A., Saban, S., Magal, N., Sprecher, E., Shohat, M.: **Autosomal recessive ichthyosis with hypotrichosis caused by a mutation in ST14, encoding type II transmembrane serine protease matriptase**, *Am. J. Hum. Genet.*, 80. 467-477, 2007.

Beaulieu, A., Gravel, É., Cloutier, A., Marois, I., Colombo, É., Désilets, A., Verreault, C., Leduc, R., Marsault, É., Richter, M.V.: **Matriptase proteolytically activates influenza virus and promotes multicycle replication in the human airway epithelium**, *J. Virol.* 87. 4237-4251, 2013.

Bekri, S., Gual, P., Anty, R., Luciani, N., Dahman, M., Ramesh, B., Iannelli, A., Staccini-Myx, A., Casanova, D., Ben Amor, I., Saint-Paul, M.C., Huet, P.M., Sadoul, J.L., Gugenheim, J., Srai, S.K., Tran, A., Le Marchand-Brustel, Y.: **Increased adipose tissue expression of hepcidin in severe obesity is independent from diabetes and NASH**, *Gastroenterology.*, 131. 788-796, 2006.

Benaud, C., Dickson, R.B., Lin, C.Y.: **Regulation of the activity of matriptase on epithelial cell surfaces by a blood-derived factor**, *Eur. J. Biochem.*, 268. 1439-1447, 2001.

Benaud, C., Oberst, M., Hobson, J.P., Spiegel, S., Dickson, R.B., Lin, C.Y.: **Sphingosine 1-phosphate, present in serum-derived lipoproteins, activates matriptase**, J. Biol. Chem. 277. 10539-10546, 2002.

Bertram, S., Glowacka, I., Müller, M.A., Lavender, H., Gnirss, K., Nehlmeier, I., Niemeyer, D., He, Y., Simmons, G., Drosten, C., Soilleux, E.J., Jahn, O., Steffen, I., Pöhlmann, S.: **Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human airway trypsin-like protease**. J Virol., 85. 13363-13372. 2011.

Boileau, C., Amiable, N., Martel-Pelletier, J., Fahmi, H., Duval, N., Pelletier, J.P.: **Activation of proteinase-activated receptor 2 in human osteoarthritic cartilage upregulates catabolic and proinflammatory pathways capable of inducing cartilage degradation: a basic science study**, Arthritis. Res. Ther., 9. R121, 2007.

Borensztajn, K., Bresser, P., van der Loos, C., Bot, I., van den Blink, B., den Bakker, M.A., Daalhuisen, J., Groot, A.P., Peppelenbosch, M.P., von der Thüsen, J.H., Spek, C.A.: **Protease-activated receptor-2 induces myofibroblast differentiation and tissue factor up-regulation during bleomycin-induced lung injury: potential role in pulmonary fibrosis**, Am. J. Pathol., 177. 2753-2764, 2010.

Brosnahan, A.J., Brown, D.R.: **Porcine IPEC-J2 intestinal epithelial cells in microbiological investigations**, Vet. Microbiol., 156, 229-237, 2012.

Bugge, T.H., Antalis, T.M., Wu, Q.: **Type II transmembrane serine proteases**, J. Biol. Chem., 284. 23177-23181, 2009.

Buzza, M.S., Martin, E.W., Driesbaugh, K.H., Désilets, A., Leduc, R., Antalis, T.M.: **Prostasin is required for matriptase activation in intestinal epithelial cells to regulate closure of the paracellular pathway**, J. Biol. Chem., 288. 10328-10337, 2013.

Buzza, M.S., Netzel-Arnett, S., Shea-Donohue, T., Zhao, A., Lin, C.Y., List, K., Szabo, R., Fasano, A., Bugge, T.H., Antalis, T.M.: **Membrane-anchored serine protease matriptase regulates epithelial barrier formation and permeability in the intestine**, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 107. 4200-4205, 2010.

Cal, S., Quesada, V., Garabaya, C., Lopez-Otin, C.: **Polyserase-I, a human polyprotease with the ability to generate independent serine protease domains from a single translation product**, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 100. 9185-9190, 2003.

Chaipan, C., Kobasa, D., Bertram, S., Glowacka, I., Steffen, I., Tsegaye, T.S., Takeda, M., Bugge, T.H., Kim, S., Park, Y., Marzi, A., Pöhlmann, S.: **Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin**, J. Virol., 83. 3200-3211, 2009.

- Chen, C.J., Wu, B.Y., Tsao, P.I., Chen, C.Y., Wu, M.H., Chan, Y.L., Lee, H.S., Johnson, M.D., Eckert, R.L., Chen, Y.W., Chou, F., Wang, J.K., Lin, C.Y.: **Increased matriptase zymogen activation in inflammatory skin disorders**, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 300. 406–415, 2011.
- Cheng, M.F., Lin, L.H., Huang, M.S., Lee, H.S., Ji, D.D., Lin, C.S., Hsia, K.T.: **Downexpression of Matriptase-2 Correlates With Tumor Progression and Clinical Prognosis in Oral Squamous-Cell Carcinoma**, *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.*, 25. 481-488, 2017.
- Cho, E.G., Kim, M.G., Kim, C., Kim, S.R., Seong, I.S., Chung, C., Schwartz, R.H., Park, D.: **N-terminal processing is essential for release of epithin, a mouse type II membrane serine protease**, *J. Biol. Chem.* 276. 44581-44589, 2001.
- Christoffersen, C., Obinata, H., Kumaraswamy, S.B., Galvani, S., Ahnström, J., Sevana, M., Egerer-Sieber, C., Muller, Y.A., Hla, T., Nielsen, L.B., Dahlbäck B.: **Endothelium-protective sphingosine-1-phosphate provided by HDL-associated apolipoprotein M**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 108. 9613-9618, 2011.
- Cooksey, R.C., Jouihan, H.A., Ajioka, R.S., Hazel, M.W., Jones, D.L., Kushner, J.P., McClain, D.A.: **Oxidative stress, beta-cell apoptosis, and decreased insulin secretory capacity in mouse models of hemochromatosis**, *Endocrinology.*, 145. 5305-5312, 2004.
- D'Alessio, F., Hentze, M.W., Muckenthaler, M.U.: **The hemochromatosis proteins HFE, TfR2, and HJV form a membrane-associated protein complex for hepcidin regulation**, *J. Hepatol.*, 57. 1052-1060, 2012.
- Dongiovanni, P., Ruscica, M., Rametta, R., Recalcati, S., Steffani, L., Gatti, S., Girelli, D., Cairo, G., Magni, P., Fargion, S., Valenti, L.: **Dietary iron overload induces visceral adipose tissue insulin resistance**, *Am. J. Pathol.*, 182. 2254-2263, 2013.
- Dong, W., Simeonova, P. P., Gallucci, R., Matheson, J., Fannin, R., Montuschi, P., Flood, L., Luster, M. I.: **Cytokine expression in hepatocytes: Role of oxidant stress**, *J. Interf. Cytok. Res.*, 18. 629–638, 1998.
- Du, X., She, E., Gelbart, T., Truksa, J., Lee, P., Xia, Y., Khovananth, K., Mudd, S., Mann, N., Moresco, E.M., Beutler, E., Beutler, B.: **The serine protease TMPRSS6 is required to sense iron deficiency**, *Science.*, 320. 1088-1092, 2008.

Dymock, I.W., Cassar, J., Pyke, D.A., Oakley, W.G., Williams, R.: **Observations on the pathogenesis, complications and treatment of diabetes in 115 cases of haemochromatosis**, Am. J. Med., 52. 203-210, 1972.

Enns, C.A., Ahmed, R., Zhang, A.S.: **Neogenin interacts with matriptase-2 to facilitate hemojuvelin cleavage**, J. Biol. Chem., 287. 35104-35117, 2012.

Enyedy, I.J., Lee, S.L., Kuo, A.H., Dickson, R.B., Lin, C.Y., Wang, S.: **Structure-based approach for the discovery of bis-benzamidines as novel inhibitors of matriptase**, J Med. Chem., 44, 1349-1355, 2001.

Ertongur, S., Lang, S., Mack, B., Wosikowski, K., Muehlenweg, B., Gires, O.: **Inhibition of the invasion capacity of carcinoma cells by WX-UK1, a novel synthetic inhibitor of the urokinase-type plasminogen activator system**, Int. J. Cancer., 110. 815-824, 2004.

Fernandez, I.E., Eickelberg, O.: **The impact of TGF- β on lung fibrosis: from targeting to biomarkers**, Proc. Am. Thorac. Soc., 9. 111-116, 2012.

Ferrell, W.R., Kelso, E.B., Lockhart, J.C., Plevin, R., McInnes, I.B.: **Protease-activated receptor 2: a novel pathogenic pathway in a murine model of osteoarthritis**, Ann. Rheum. Dis., 69. 2051-2054, 2010.

Finberg, K.E., Heeney, M.M., Campagna, D.R., Aydinok, Y., Pearson, H.A., Hartman, K.R., Mayo, M.M., Samuel, S.M., Strouse, J.J., Markianos, K., Andrews, N.C., Fleming, M.D.: **Mutations in TMPRSS6 cause iron-refractory iron deficiency anemia (IRIDA)**, Nat. Genet., 40. 569-571, 2008.

Flannery, C.R.: **MMPs and ADAMTSs: functional studies**, Front. Biosci., 11. 544-569, 2006.

Folgueras, A.R., de Lara, F.M., Pendás, A.M., Garabaya, C., Rodríguez, F., Astudillo, A., Bernal, T., Cabanillas, R., López-Otín, C., Velasco, G.: **Membrane-bound serine protease matriptase-2 (Tmprss6) is an essential regulator of iron homeostasis**, Blood., 112. 2539-2545, 2008.

Folgueras, A.R., Freitas-Rodríguez, S., Ramsay, A.J., Garabaya, C., Rodríguez, F., Velasco, G., López-Otín, C.: **Matriptase-2 deficiency protects from obesity by modulating iron homeostasis**, Nat. Commun., 9. 1350, 2018.

Förbs, D., Thiel, S., Stella, M.C., Stürzebecher, A., Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Stürzebecher, J., Uhland, K.: **In vitro inhibition of matriptase prevents invasive**

growth of cell lines of prostate and colon carcinoma, *Int. J. Oncol.*, 27. 1061-1070, 2005.

Fox, T.E., Bewley, M.C., Unrath, K.A., Pedersen, M.M., Anderson, R.E., Jung, D.Y., Jefferson, L.S., Kim, J.K., Bronson, S.K., Flanagan, J.M., Kester, M.: **Circulating sphingolipid biomarkers in models of type 1 diabetes**, *J. Lipid Res.*, 52. 509–517, 2011.

Friedrich, R., Fuentes-Prior, P., Ong, E., Coombs, G., Hunter, M., Oehler, R., Pierson, D., Gonzalez, R., Huber, R., Bode, W., Madison, E.L.: **Catalytic domain structures of MT-SP1/matriptase, a matrix-degrading transmembrane serine proteinase**, *J. Biol. Chem.*, 277. 2160-2168, 2002.

Friis, S., Tadeo, D., Le-Gall, S.M., Jürgensen, H.J., Sales, K.U., Camerer, E., Bugge, T.H.: **Matriptase zymogen supports epithelial development, homeostasis and regeneration**, *BMC. Biol.*, 15. 46., 2017.

Friis, S., Uzzun Sales, K., Godiksen, S., Peters, D.E., Lin, C.Y., Vogel, L.K., Bugge, T.H.: **A matriptase-prostasin reciprocal zymogen activation complex with unique features: prostasin as a non-enzymatic co-factor for matriptase activation**, *J. Biol. Chem.*, 288. 19028-19039, 2013.

Gao, J., Chen, J., Kramer, M., Tsukamoto, H., Zhang, A.S., Enns, C.A.: **Interaction of the hereditary hemochromatosis protein HFE with transferrin receptor 2 is required for transferrin-induced hepcidin expression**, *Cell Metab.*, 9. 217-227, 2009.

Gao, Y., Li, Z., Gabrielsen, J.S., Simcox, J.A., Lee, S.H., Jones, D., Cooksey, B., Stoddard, G., Cefalu, W.T., McClain, D.A.: **Adipocyte iron regulates leptin and food intake**. *J Clin Invest.*, 125. 3681-3691, 2015.

Garten, W., Klenk, H.: **Cleavage activation of the influenza virus hemagglutinin and its role in pathogenesis**, *Avian Influenza Monogr. Virol. Basel. Karger.*, 27. 156–167, 2008.

Grammatikos, G., Schoell, N., Ferreirós, N., Bon, D., Herrmann, E., Farnik, H., Köberle, V., Piiper, A., Zeuzem, S., Kronenberger, B., Waidmann, O., Pfeilschifter, J.: **Serum sphingolipidomic analyses reveal an upregulation of C16-ceramide and sphingosine-1-phosphate in hepatocellular carcinoma**, *Oncotarget.*, 7. 18095-18105, 2016.

Godiksen, S., Selzer-Plon, J., Pedersen, E.D., Abell, K., Rasmussen, H.B., Szabo, R., Bugge, T.H., Vogel, L.K.: **Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 has a complex subcellular itinerary**, *Biochem. J.*, 413. 251-259, 2008.

Hait, N.C., Oskeritzian, C.A., Paugh, S.W., Milstien, S., Spiegel, S.: **Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases**, *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1758. 2016-2026, 2006.

Hammami M.: **Development of new inhibitors for the type II transmembrane serine protease matriptase**. PhD disszertáció, 2012.

Hammami, M., Rühmann, E., Maurer, E., Heine, A., Gütschow, M., Klebe, .G, Steinmetzer, T.: **New 3-amidinophenylalanine-derived inhibitors of matriptase**, *Med.Chem.Comm.*, 3. 807-813, 2012.

Hamilton, B.S., Gludish, D.W., Whittaker, G.R.: **Cleavage activation of the human-adapted influenza virus subtypes by matriptase reveals both subtype and strain specificities**. *J Virol.*, 86. 10579-10586. 2012.

Hooper, J.D., Campagnolo, L., Goodarzi, G., Truong, T.N., Stuhlmann, H., Quigley, J.P.: **Mouse matriptase-2: identification, characterization and comparative mRNA expression analysis with mouse hepsin in adult and embryonic tissues**, *Biochem. J.*, 373. 689-702. 2003.

Jiang, J., Yang, J., Feng, P., Zuo, B., Dong, N., Wu, Q., He, Y.: **N-glycosylation is required for matriptase-2 autoactivation and ectodomain shedding**, *J. Biol. Chem.*, 289. 19500-19707, 2014.

Jin, J.S., Hsieh, D.S., Loh, S.H., Chen, A., Yao, C.W., Yen, C.Y.: **Increasing expression of serine protease matriptase in ovarian tumors: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters**, *Mod. Pathol.*, 19. 447-452, 2006.

Kang, J.Y., Dolled-Filhart, M., Ocal, I.T., Singh, B., Lin, C.Y., Dickson, R.B., Rimm, D.L., Camp, R.L.: **Tissue microarray analysis of hepatocyte growth factor/Met pathway components reveals a role for Met, matriptase, and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1 in the progression of node-negative breast cancer**, *Cancer. Res.*, 63. 1101-1105, 2003.

Katz, B.A., Sprengeler, P.A., Luong, C., Verner, E., Elrod, K., Kirtley, M., Janc, J., Spencer, J.R., Breitenbucher, J.G., Hui, H., McGee, D., Allen, D., Martelli, A., Mackman,

R.L.: **Engineering inhibitors highly selective for the S1 sites of Ser190 trypsin-like serine protease drug targets**, Chem. Biol., 8. 1107-1121, 2001.

Kleuser B.: **Divergent Role of Sphingosine 1-Phosphate in Liver Health and Disease**, Int. J. Mol. Sci., 19. 722, 2018.

Ko, C.J., Huang, C.C., Lin, H.Y., Juan, C.P., Lan, S.W., Shyu, H.Y., Wu, S.R., Hsiao, P.W., Huang, H.P., Shun, C.T., Lee, M.S.: **Androgen-Induced TMPRSS2 Activates Matriptase and Promotes Extracellular Matrix Degradation, Prostate Cancer Cell Invasion, Tumor Growth, and Metastasis**, Cancer. Res., 75. 2949-2960, 2015.

Ko, C.J., Lan, S.W., Lu, Y.C., Cheng, T.S., Lai, P.F., Tsai, C.H., Hsu, T.W., Lin, H.Y., Shyu, H.Y., Wu, S.R., Lin, H.H., Hsiao, P.W., Chen, C.H., Huang, H.P., Lee, M.S.: **Inhibition of cyclooxygenase-2-mediated matriptase activation contributes to the suppression of prostate cancer cell motility and metastasis**, Oncogene., 10. 4597-4609, 2017.

Lahey, K.A., Ronaghan, N.J., Shang, J., Dion, S.P., Désilets, A., Leduc, R., MacNaughton, W.K.: **Signaling pathways induced by serine proteases to increase intestinal epithelial barrier function**, PLoS. One., 12. e0180259. 2017.

Laukoetter, M.G., Nava, P., Nusrat, A.: **Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease**, World J. Gastroenterol., 14. 401-407, 2008.

LeBeau, A.M., Lee, M., Murphy, S.T., Hann, B.C., Warren, R.S., Delos Santos, R., Kurhanewicz, J., Hanash, S.M., VanBrocklin, H.F., Craik, C.S.: **Imaging a functional tumorigenic biomarker in the transformed epithelium**, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 110. 93-98, 2013.

Lee, D.H., Zhou, L.J., Zhou, Z., Xie, J.X., Jung, J.U., Liu, Y., Xi, C.X., Mei, L., Xiong, W.C.: **Neogenin inhibits HJV secretion and regulates BMP-induced hepcidin expression and iron homeostasis**, Blood., 115. 3136-3145, 2010.

Lee, H.S., Park, B.M., Cho, Y., Kim, S., Kim, C., Kim, M.G., Park, D.: **Shedding of epithin/PRSS14 is induced by TGF- β and mediated by tumor necrosis factor- α converting enzyme**, Biochem. Biophys. Res. Commun., 452. 1084-1090, 2014.

Lee, M.S.: **Matrix-degrading type II transmembrane serine. protease matriptase: its role in cancer development and malignancy**, J. Cancer. Mol. 2. 183-190, 2006.

Lee, M.S., Kiyomiya, K., Benaud, C., Dickson, R.B., Lin, C.Y.: **Simultaneous activation and hepatocyte growth factor activator inhibitor 1-mediated inhibition of**

matriptase induced at activation foci in human mammary epithelial cells, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 288. 932-941, 2005.

Lee, S.L., Dickson, R.B., Lin, C.Y.: **Activation of hepatocyte growth factor and urokinase/plasminogen activator by matriptase, an epithelial membrane serine protease**, *J. Biol. Chem.*, 275. 36720-36725, 2000.

Lin, C.Y., Anders, J., Johnson, M., Sang, Q.A., Dickson, R.B.: **Molecular cloning of cDNA for matriptase, a matrix-degrading serine protease with trypsin-like activity**, *J. Biol. Chem.*, 274.18231-18236, 1999.

Li, C., Jiang, X., Yang, L., Liu, X., Yue, S., Li, L.: **Involvement of sphingosine 1-phosphate (S1P)/S1P3 signaling in cholestasis-induced liver fibrosis**, *Am. J. Pathol.*, 175, 1464–1472, 2009.

Lin, L., Goldberg, Y.P., Ganz, T.: **Competitive regulation of hepcidin mRNA by soluble and cell-associated hemojuvelin**, *Blood.*, 106. 2884-2889, 2005.

List, K., Bugge, T.H., Szabo, R.: **Matriptase: potent proteolysis on the cell surface**, *Mol. Med.*, 12. 1-7. 2006a.

List, K., Haudenschild, C.C., Szabo, R., Chen, W., Wahl, S.M., Swaim, W., Engelholm, L.H., Behrendt, N., Bugge, T.H.: **Matriptase/MT-SP1 is required for postnatal survival, epidermal barrier function, hair follicle development, and thymic homeostasis**, *Oncogene*, 21. 3765-3779, 2002.

List, K., Kosa, P., Szabo, R., Bey, A.L., Wang, C.B., Molinolo, A., Bugge, T.H.: **Epithelial integrity is maintained by a matriptase-dependent proteolytic pathway**, *Am. J. Pathol.* 175. 1453-1463, 2009.

List, K., Szabo, R., Molinolo, A., Nielsen, B.S., Bugge, T.H.: **Delineation of matriptase protein expression by enzymatic gene trapping suggests diverging roles in barrier function, hair formation, and squamous cell carcinogenesis**, *Am. J. Pathol.*, 168. 1513-1525, 2006b.

List, K., Szabo, R., Molinolo, A., Sriuranpong, V., Redeye, V., Murdock, T., Burke, B., Nielsen, B.S., Gutkind, J.S., Bugge, T.H.: **Deregulated matriptase causes ras-independent multistage carcinogenesis and promotes ras-mediated malignant transformation**, *Genes. Dev.*, 19. 1934-1950, 2005.

List, K., Szabo, R., Wertz, P.W., Segre, J., Haudenschild, C.C., Kim, S.Y., Bugge, T.H.: **Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of Matriptase/MT-SP1**, *J. Cell. Biol.*, 163. 901-910, 2003.

Mackei M., Molnár A., Nagy S., Pál L., Kővágó C., Gálfi P., Dublec K., Husvéth F., Neogrády Z., Mátis G.: **Effects of acute heat stress on a newly established chicken hepatocyte-nonparenchymal cell co-culture model**, *Animals (Basel)*, 10. 409, 2020a.

Mackei M., Orbán, K., Molnár, A., Pál, L., Dublec K., Husvéth, F., Neogrády, Z., Mátis, G.: **Cellular effects of T-2 toxin on primary hepatic cell culture models of chickens**, *Toxins (Basel)*, 12. 46, 2020b.

Maehara, M., Toyoda, E., Takahashi, T., Watanabe, M., Sato, M.: **Potential of Exosomes for Diagnosis and Treatment of Joint Disease: Towards a Point-of-Care Therapy for Osteoarthritis of the Knee**, *Int. J. Mol. Sci.*, 22, 2650-2666, 2021.

Matsushima-Nishiwaki, R., Yamada, N., Fukuchi, K., Kozawa, O.: **Sphingosine 1-phosphate (S1P) reduces hepatocyte growth factor-induced migration of hepatocellular carcinoma cells via S1P receptor 2**, *PLoS One.*, 13. e0209050, 2018.

Meyer, D., Sielaff, F., Hammami, M., Böttcher-Friebertshäuser, E., Garten, W., Steinmetzer, T.: **Identification of the first synthetic inhibitors of the type II transmembrane serine protease TMPRSS2 suitable for inhibition of influenza virus activation**, *Biochem. J.*, 452. 331-343, 2013.

Milner, J.M., Patel, A., Davidson, R.K., Swingler, T.E., Desilets, A., Young, D.A., Kelso, E.B., Donell, S.T., Cawston, T.E., Clark, I.M., Ferrell, W.R., Plevin, R., Lockhart, J.C., Leduc, R., Rowan, A.D.: **Matriptase is a novel initiator of cartilage matrix degradation in osteoarthritis**, *Arthritis Rheum.*, 62. 1955-66, 2010.

Nakamura, T., Nishizawa, T., Hagiya, M., Seki, T., Shimonishi, M., Sugimura, A., Tashiro, K., Shimizu, S.: **Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor**, *Nature.*, 342. 440-443, 1989.

Napp, J., Dullin, C., Müller, F., Uhland, K., Petri, J.B., van de Locht, A., Steinmetzer, T., Alves, F.: **Time-domain in vivo near infrared fluorescence imaging for evaluation of matriptase as a potential target for the development of novel, inhibitor-based tumor therapies**, *Int. J. Cancer.*, 127. 1958-1974, 2010.

Nemeth, E., Tuttle, M.S., Powelson, J., Vaughn, M.B., Donovan, A., Ward, D.M., Ganz, T., Kaplan, J.: **Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization**, *Science.* 306. 2090-2093, 2004.

Nemeth, E., Valore, E.V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., Ganz, T.: **Hepcidin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein**, *Blood.*, 101. 2461-2463, 2003.

Netzel-Arnett, S., Buzza, M.S., Shea-Donohue, T., Désilets, A., Leduc, R., Fasano, A., Bugge, T.H., Antalis, T.M.: **Matriptase protects against experimental colitis and promotes intestinal barrier recovery**, *Inflamm. Bowel Dis.*, 18. 1303-1314, 2012.

Netzel-Arnett, S., Currie, B.M., Szabo, R., Lin, C.Y., Chen, L.M., Chai, K.X., Antalis, T.M., Bugge, T.H., List, K.: **Evidence for a matriptase-prostasin proteolytic cascade regulating terminal epidermal differentiation**, *J. Biol. Chem.*, 281. 32941-32945, 2006.

Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., Vaulont, S.: **Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 98. 8780-8485, 2001.

Nicolas, G., Bennoun, M., Porteu, A., Mativet, S., Beaumont, C., Grandchamp, B., Sirito, M., Sawadogo, M., Kahn, A., Vaulont, S.: **Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin**, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*; 99. 4596-4601, 2002a.

Nicolas, G., Chauvet, C., Viatte, L., Danan, J.L., Bigard, X., Devaux, I., Beaumont, C., Kahn, A., Vaulont, S.: **The gene encoding the iron regulatory peptide hepcidin is regulated by anemia, hypoxia, and inflammation**, *J. Clin. Invest.*, 110. 1037-1044, 2002b.

Oberst, M., Anders, J., Xie, B., Singh, B., Ossandon, M., Johnson, M., Dickson, R.B., Lin, C.Y.: **Matriptase and HAI-1 are expressed by normal and malignant epithelial cells in vitro and in vivo**, *Am. J. Pathol.*, 158. 1301-1311. 2001.

Oberst, M.D., Chen, L.Y., Kiyomiya, K., Williams, C.A., Lee, M.S., Johnson, M.D., Dickson, R.B., Lin, C.Y.: **HAI-1 regulates activation and expression of matriptase, a membrane-bound serine protease**, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 289. 462-470, 2005.

Oberst, M.D., Johnson, M.D., Dickson, R.B., Lin, C.Y., Singh, B., Stewart, M., Williams, A., al-Nafussi, A., Smyth, J.F., Gabra, H., Sellar, G.C.: **Expression of the serine protease matriptase and its inhibitor HAI-1 in epithelial ovarian cancer: correlation with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters**, *Clin. Cancer. Res.*, 8. 1101-1107, 2002.

Oberst, M.D., Singh, B., Ozdemirli, M., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lin, C.Y.: **Characterization of matriptase expression in normal human tissues**, *J. Histochem. Cytochem.*, 51. 1017-1025, 2003a.

Oberst, M.D., Williams, C.A., Dickson, R.B., Johnson, M.D., Lin, C.Y.: **The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor**, J. Biol. Chem., 278. 26773-26779, 2003b.

Okajima, F., Tomura, H., Sho, K., Kimura, T., Sato, K., Im, D.S., Akbar, M., Kondo, Y.: **Sphingosine 1-phosphate stimulates hydrogen peroxide generation through activation of phospholipase C-Ca²⁺ system in FRTL-5 thyroid cells: possible involvement of guanosine triphosphate-binding proteins in the lipid signaling**, Endocrinology., 138. 220-229, 1997.

Page, M.J., Di Cera, E.: **Serine peptidases: Classification, structure and function**. Cell. Mol. Life Sci. 65. 1220–1236, 2008.

Papanikolaou, G., Samuels, M.E., Ludwig, E.H., MacDonald, M.L., Franchini, P.L., Dubé, M.P., Andres, L., MacFarlane, J., Sakellaropoulos, N., Politou, M., Nemeth, E., Thompson, J., Risler, J.K., Zaborowska, C., Babakaiff, R., Radomski, C.C., Pape, T.D., Davidas, O., Christakis, J., Brissot, P., Lockitch, G., Ganz, T., Hayden, M.R., Goldberg, Y.P.: **Mutations in HFE2 cause iron overload in chromosome 1q-linked juvenile hemochromatosis**, Nat. Genet., 36. 77-82, 2004.

Park, C.H., Valore, E.V., Waring, A.J., Ganz, T.: **Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver**, J. Biol. Chem. 276. 7806-7810, 2001.

Parr, C., Sanders, A.J., Davies, G., Martin, T., Lane, J., Mason, M.D., Mansel, R.E., Jiang, W.G.: **Matriptase-2 inhibits breast tumor growth and invasion and correlates with favorable prognosis for breast cancer patients**, Clin. Cancer. Res., 13. 3568-3576, 2007.

Pászti-Gere E., Barna R.F., Kovago C., Szauder I., Ujhelyi G., Jakab C., Meggyesházi N., Szekacs A.: **Changes in the distribution of type II transmembrane serine protease, TMPRSS2 and in paracellular permeability in IPEC-J2 cells exposed to oxidative stress**, Inflammation. 38. 775-783, 2015a.

Pászti-Gere E., Barna R.F., Ujhelyi G., Steinmetzer T.: **Interaction exists between matriptase inhibitors and intestinal epithelial cells**, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 31. 736-741, 2016a.

Pászti-Gere E., Jerzsele Á., Balla P., Ujhelyi G., Székács A.: **Reinforced epithelial barrier integrity via matriptase induction with sphingosine-1-phosphate did not result in disturbances in physiological redox status**, Oxid. Med. Cell. Longev., 2016:9674272, 2016b.

Pászti-Gere E., Matis G., Farkas O., Kulcsar A., Palocz O., Csiko G., Neogrady Z., Galfi P.: **The effects of intestinal LPS exposure on inflammatory responses in a porcine enterohepatic co-culture system**, *Inflammation.*, 37. 247-260, 2014.

Pászti-Gere E., McManus, S., Meggyesházi N., Balla P., Gálfi P., Steinmetzer, T.: **Inhibition of matriptase activity results in decreased intestinal epithelial monolayer integrity in vitro**, *PLoS ONE.*, 10. e0141077, 2015b.

Pászti-Gere E., Szombath G., Gütschow, M., Steinmetzer, T., Székács, A.: **3-Amidinophenylalanine-derived matriptase inhibitors can modulate hepcidin production in vitro**, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 393. 511-520, 2020.

Pinnix, Z.K., Miller, L.D., Wang, W., D'Agostino, R. Jr., Kute, T., Willingham, M.C., Hatcher, H., Tesfay, L., Sui, G., Di, X., Torti, S.V., Torti, F.M.: **Ferroportin and iron regulation in breast cancer progression and prognosis**, *Sci. Transl. Med.*, 2. 43ra56, 2010.

Pomothy J., Szombath G., Rokonál P., Mátis G., Neogrady Z., Steinmetzer, T., Pászti-Gere E.: **The Impact of Acute Matriptase Inhibition in Hepatic Inflammatory Models**, *Biomed. Res. Int.*, 2016:6306984, 2016.

Quimbar, P., Malik, U., Sommerhoff, C.P., Kaas, Q., Chan, L.Y., Huang, Y.H., Grundhuber, M., Dunse, K., Craik, D.J., Anderson, M.A., Daly, N.L.: **High-affinity Cyclic Peptide Matriptase Inhibitors**, *J. Biol. Chem.*, 288. 13885-13896, 2013.

Ramsay, A.J., Reid, J.C., Velasco, G., Quigley, J.P., Hooper, J.D.: **The type II transmembrane serine protease matriptase-2--identification, structural features, enzymology, expression pattern and potential roles**, *Front. Biosci.*, 13. 569–579, 2008.

Rather, G.M., Lin, S.Y., Lin, H., Banach-Petrosky, W., Hirshfield, K.M., Lin, C.Y., Johnson, M.D., Szekely, Z., Bertino, J.R.: **Activated matriptase as a target to treat breast cancer with a drug conjugate**, *Oncotarget.*, 9. 25983-25992, 2018.

Riddick, A.C., Shukla, C.J., Pennington, C.J., Bass, R., Nuttall, R.K., Hogan, A., Sethia, K.K., Ellis, V., Collins, A.T., Maitland, N.J., Ball, R.Y., Edwards, D.R.: **Identification of degradome components associated with prostate cancer progression by expression analysis of human prostatic tissues**, *Br. J. Cancer.* 92. 2171-2180, 2005.

Ronaghan, N.J., Shang, J., Iablokov, V., Zaheer, R., Colarusso, P., Dion, S., Désilets, A., Leduc, R., Turner, J.R., MacNaughton, W.K.: **The serine protease-mediated increase**

in intestinal epithelial barrier function is dependent on occludin and requires an intact tight junction, *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 311, 466-479, 2016.

Rowell, D.L., Eckmann, L., Dwinell, M.B., Carpenter, S.P., Raucy, J.L., Yang, S.K., Kagnoff, M.F.: **Human hepatocytes express an array of proinflammatory cytokines after agonist stimulation or bacterial invasion**, *Am. J. Physiol. Gastr. L.* 273, 322–332, 1997.

Röhlich, P.: **Szövettan. Porcszövet.** Semmelweis kiadó, Budapest. 139-146, 2006.

Saleem, M., Adhami, V.M., Zhong, W., Longley, B.J., Lin, C.Y., Dickson, R.B., Reagan-Shaw, S., Jarrard, D.F., Mukhtar, H.: **A novel biomarker for staging human prostate adenocarcinoma: overexpression of matriptase with concomitant loss of its inhibitor, hepatocyte growth factor activator inhibitor-1**, *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.*, 15. 217-227, 2006.

Sales, K.U., Friis, S., Konkel, J.E., Godiksen, S., Hatakeyama, M., Hansen, K.K., Rogatto, S.R., Szabo, R., Vogel, L.K., Chen, W., Gutkind, J.S., Bugge, T.H.: **Non-hematopoietic PAR-2 is essential for matriptase-driven pre-malignant progression and potentiation of ras-mediated squamous cell carcinogenesis**, *Oncogene.*, 34. 346-356, 2015.

Sanders, A.J., Parr, C., Martin, T.A., Lane, J., Mason, M.D., Jiang, W.G.: **Genetic upregulation of matriptase-2 reduces the aggressiveness of prostate cancer cells in vitro and in vivo and affects FAK and paxillin localisation**, *J. Cell. Physiol.*, 216. 780-789, 2008.

Santin, A.D., Cane', S., Bellone, S., Bignotti, E., Palmieri, M., De Las Casas, L.E., Anfossi, S., Roman, J.J., O'Brien, T., Pecorelli, S.: **The novel serine protease tumor-associated differentially expressed gene-15 (matriptase/MT-SP1) is highly overexpressed in cervical carcinoma**, *Cancer.*, 98. 1898-1904, 2003.

Satomi, S., Yamasaki, Y., Tsuzuki, S., Hitomi, Y., Iwanaga, T., Fushiki, T.: **A role for membrane-type serine protease (MT-SP1) in intestinal epithelial turnover**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 287. 995-1002, 2001.

Schaffner, F., Ruf, W.: **Tissue factor and protease-activated receptor signaling in cancer**, *Semin. Thromb. Hemost.*, 34.147-153, 2008.

Scharschmidt, T.C., List, K., Grice, E.A., Szabo, R.; NISC Comparative Sequencing Program, Renaud, G., Lee, C.C., Wolfsberg, T.G., Bugge, T.H., Segre, J.A.: **Matriptase-**

deficient mice exhibit ichthyotic skin with a selective shift in skin microbiota, J. Invest. Dermatol., 129. 2435–2442, 2009.

Schmidt, P.J., Toran, P.T., Giannetti, A.M., Bjorkman, P.J., Andrews, N.C.: **The transferrin receptor modulates Hfe-dependent regulation of hepcidin expression**, Cell. Metab., 7. 205-214, 2008.

Schweinitz, A., Dönnecke, D., Ludwig, A., Steinmetzer, P., Schulze, A., Kotthaus, J., Wein, S., Clement, B., Steinmetzer, T.: **Incorporation of neutral C-terminal residues in 3-amidinophenylalanine-derived matriptase inhibitors**, Bioorg. Med. Chem. Lett., 19. 1960-1965, 2009.

Seitz, I., Hess, S., Schulz, H., Eckl, R., Busch, G., Montens, H.P., Brandl, R., Seidl, S., Schomig, A., Ott, I.: **Membrane-type serine protease-1/matriptase induces interleukin-6 and -8 in endothelial cells by activation of protease-activated receptor-2**, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 27. 769–775, 2007.

Shi, Y.E., Torri, J., Yieh, L., Wellstein, A., Lippman, M.E., Dickson, R.B.: **Identification and characterization of a novel matrix-degrading protease from hormone-dependent human breast cancer cells**, Cancer Res., 53, 1409-1415, 1993. Shimomura, T., Denda, K., Kitamura, A., Kawaguchi, T., Kito, M., Kondo, J., Kagaya, S., Qin, L., Takata, H., Miyazawa, K., Kitamura, N.: **Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor**, J. Biol. Chem., 272. 6370-6376, 1997.

Sidenius, N., Blasi, F.: **The urokinase plasminogen activator system in cancer: recent advances and implication for prognosis and therapy**, Cancer. Metastasis. Rev., 22. 205-222, 2003.

Silvestri, L., Pagani, A., Nai, A., De Domenico, I., Kaplan, J., Camaschella, C.: **The serine protease matriptase-2 (TMPRSS6) inhibits hepcidin activation by cleaving membrane hemojuvelin**, Cell Metab. 8. 502-511, 2008.

Sisay, M.T., Steinmetzer, T., Stirnberg, M., Maurer, E., Hammami, M., Bajorath, J., Gütschow, M.: **Identification of the first low-molecular-weight inhibitors of matriptase-2**, J. Med. Chem., 53. 5523-5535, 2010.

Steinmetzer, T., Dönnecke, D., Korsonewski, M., Neuwirth, C., Steinmetzer, P., Schulze, A., Saupe, S.M., Schweinitz, A.: **Modification of the N-terminal sulfonyl residue in 3-amidinophenylalanine-based matriptase inhibitors**, Bioorg. Med. Chem. Lett., 19. 67-73. 2009.

Steinmetzer, T., Schweinitz, A., Stürzebecher, A., Dönnecke, D., Uhland, K., Schuster, O., Steinmetzer, P., Müller, F., Friedrich, R., Than, M.E., Bode, W., Stürzebecher, J.: **Secondary Amides of Sulfonylated 3-Amidinophenylalanine. New Potent and Selective Inhibitors of Matriptase**, *J. Med. Chem.* 49.4116-4126, 2006.

Stirnberg, M., Maurer, E., Horstmeyer, A., Kolp, S., Frank, S., Bald, T., Arenz, K., Janzer, A., Prager, K., Wunderlich, P., Walter, J., Gütschow, M.: **Proteolytic processing of the serine protease matriptase-2: identification of the cleavage sites required for its autocatalytic release from the cell surface**, *Biochem. J.*, 430. 87-95, 2010.

Stürzebecher J, Vieweg H, Steinmetzer T, Schweinitz A, Stubbs MT, Renatus M, Wikström P.: **3-Amidinophenylalanine-based inhibitors of urokinase**, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 9. 3147-3152, 1999.

Swaminathan, S., Fonseca, V.A., Alam, M.G., Shah, S.V.: **The role of iron in diabetes and its complications**, *Diabetes Care.*, 30. 1926-1933, 2007.

Szabo, R., Bugge, T.H.: **Type II transmembrane serine proteases in development and disease**. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*;40. 1297-1316, (review), 2008.

Szabo, R., Bugge, T.H.: **Membrane-anchored serine proteases in vertebrate cell and developmental biology**, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, 27. 213-235, 2011.

Szabo, R., Netzel-Arnett, S., Hobson, J.P., Antalis, T.M., Bugge, T. H.: **Matriptase-3 is a novel phylogenetically preserved membrane-anchored serine protease with broad serpin reactivity**, *Biochem. J.*, 390. 231–242, 2005.

Szabo, R., Uzzun Sales, K., Kosa, P., Shylo, N.A., Godiksen, S., Hansen, K.K., Friis, S., Gutkind, J.S., Vogel, L.K., Hummler, E., Camerer, E., Bugge, T.H.: **Reduced prostatic (CAP1/PRSS8) activity eliminates HAI-1 and HAI-2 deficiency-associated developmental defects by preventing matriptase activation**, *PLoS. Genet.*, 8. e1002937, 2012.

Szabo, R., Wu, Q.Y., Dickson, R.B., Netzel-Arnett, S., Antalis, T.M., Bugge T.H.: **Type II transmembrane serine proteases**, *Thrombosis and Haemostasis*, 90. 185-193, 2003.

Takeuchi, T., Harris, J.L., Huang, W., Yan, K.W., Coughlin, S.R., Craik, C.S.: **Cellular localization of membrane-type serine protease 1 and identification of protease-activated receptor-2 and single-chain urokinase-type plasminogen activator as substrates**, *J. Biol. Chem.*, 275. 26333-26342, 2000.

Troeberg, L., Nagase, H.: **Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis**, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1824. 133-145, 2012.

Tseng, C.C., Jia, B., Barndt, R., Gu, Y., Chen, C.Y., Tseng, I.C., Su, S.F., Wang, J.K., Johnson, M.D., Lin, C.Y.: **Matriptase shedding is closely coupled with matriptase zymogen activation and requires de novo proteolytic cleavage likely involving its own activity**, PLoS One., 12. e0183507, 2017.

Uhland, K., Siphos, B., Arkona, C., Schuster, M., Petri, B., Steinmetzer, P., Mueller, F., Schweinitz, A., Steinmetzer, T., Van De Locht, A.: **Use of IHC and newly designed matriptase inhibitors to elucidate the role of matriptase in pancreatic ductal adenocarcinoma**, Int. J. Oncol. 35. 347-357, 2009.

Velasco, G., Cal, S., Quesada, V., Sánchez, L.M., & López-Otín, C.: **Matriptase-2, a Membrane-bound Mosaic Serine Proteinase Predominantly Expressed in Human Liver and Showing Degrading Activity against Extracellular Matrix Proteins**, J. Biol. Chem., 277, 37637 – 37646, 2002. (visszavont cikk)

Vogel, L.K., Saebø, M., Skjelbred, C.F., Abell, K., Pedersen, E.D., Vogel, U., Kure, E.H.: **The ratio of Matriptase/HAI-1 mRNA is higher in colorectal cancer adenomas and carcinomas than corresponding tissue from control individuals**, BMC Cancer., 6. 1-8, 2006.

Wahedi, M., Wortham, A.M., Kleven, M.D., Zhao, N., Jue, S., Enns, C.A., Zhang, A.S.: **Matriptase-2 suppresses hepcidin expression by cleaving multiple components of the hepcidin induction pathway**, J. Biol. Chem., 292. 18354-18371, 2017.

Wang, Y., Seemann, J.: **Golgi biogenesis**, Cold Spring Harb. Perspect. Biol., 3. a005330, 2011.

Wang, R.H., Li, C., Xu, X., Zheng, Y., Xiao, C., Zerfas, P., Cooperman, S., Eckhaus, M., Rouault, T., Mishra, L., Deng, C.X.: **A role of SMAD4 in iron metabolism through the positive regulation of hepcidin expression**, Cell. Metab., 2. 399-409, 2005.

Webb, S.L., Sanders, A.J., Mason, M.D., Jiang, W.G.: **Matriptase-2 inhibits HECV motility and tubule formation in vitro and tumour angiogenesis in vivo**, Mol. Cell. Biochem., 375. 207-217, 2013.

Weidner, K.M., Arakaki, N., Hartmann, G., Vandekerckhove, J., Weingart, S., Rieder, H., Fonatsch, C., Tsubouchi, H., Hishida, T., Daikuhara, Y.: **Evidence for the identity of human scatter factor and human hepatocyte growth factor**, Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., 88. 7001–7005, 1991.

Whittaker, G.R., Straus, M.R.: **Human matriptase/ST 14 proteolytically cleaves H7N9 hemagglutinin and facilitates the activation of influenza A/Shanghai/2/2013 virus in cell culture**, *Influenza Other Respi. Viruses.*, 14. 189-195. 2020.

Whittaker, G.R., Millet, J.K.: **Biochemical characterization of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus spike protein proteolytic processing**, *Methods Mol Biol.*, 2099:21-37. 2020.

Wilkerson, B.A., Grass, G.D., Wing, S.B., Argraves, W.S., Argraves, K.M.: **Sphingosine 1-phosphate (S1P) carrier-dependent regulation of endothelial barrier: high density lipoprotein (HDL)-S1P prolongs endothelial barrier enhancement as compared with albumin-S1P via effects on levels, trafficking, and signaling of S1P1**, *J. Biol. Chem.*, 287. 44645-44653, 2012.

Wilkinson, D.J., Wang, H., Habgood, A., Lamb, H.K., Thompson, P., Hawkins, A.R., Désilets, A., Leduc, R., Steinmetzer, T., Hammami, M., Lee, M.S., Craik, C.S., Watson, S., Lin, H., Milner, J.M., Rowan, A.D.: **Matriptase Induction of Metalloproteinase-Dependent Aggrecanolytic In Vitro and In Vivo: Promotion of Osteoarthritic Cartilage Damage by Multiple Mechanisms**, *Arthritis. Rheumatol.*, 69. 1601-1611, 2017. Erratum in: *Arthritis. Rheumatol.* 70. 1596, 2018.

Wilson, S., Greer, B., Hooper, J., Zijlstra, A., Walker, B., Quigley, J., Hawthorne, S.: **The membrane-anchored serine protease, TMPRSS2, activates PAR-2 in prostate cancer cells**, *Biochem. J.*, 388. 967-972, 2005

Xia, Y., Babitt, J.L., Sidis, Y., Chung, R.T., Lin, H.Y.: **Hemojuvelin regulates hepcidin expression via a selective subset of BMP ligands and receptors independently of neogenin**, *Blood.*, 111. 5195-204, 2008.

Yatomi, Y., Igarashi, Y., Yang, L., Hisano, N., Qi, R., Asazuma, N., Satoh, K., Ozaki, Y., Kume, S.: **Sphingosine 1-phosphate, a bioactive sphingolipid abundantly stored in platelets, is a normal constituent of human plasma and serum**, *J. Biochem.*, 121. 969-973, 1997.

Yatomi, Y., Ozaki, Y., Ohmori, T., Igarashi Y.: **Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release**, *Prostaglandins. Other. Lipid. Mediat.*, 64. 107-122, 2001.

Ye, F., Chen, S., Liu, X., Ye, X., Wang, K., Zeng, Z., Su, Y., Zhang, X.K., Zhou, H.: **3-Cl-AHPC inhibits pro-HGF maturation by inducing matriptase/HAI-1 complex formation**, *J. Cell Mol. Med.*, 23. 155-166, 2019.

Zeng, L., Cao, J., Zhang, X.: **Expression of serine protease SNC19/matriptase and its inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in normal and malignant tissues of gastrointestinal tract**, World. J. Gastroenterol., 11. 6202-6207, 2005.

Zhang, A.S., Anderson, S.A., Wang, J., Yang, F., DeMaster, K., Ahmed, R., Nizzi, C.P., Eisenstein, R.S., Tsukamoto, H., Enns, C.A.: **Suppression of hepatic hepcidin expression in response to acute iron deprivation is associated with an increase of matriptase-2 protein**, Blood., 117. 1687-1699, 2011.

Zhao, N., Nizzi, C.P., Anderson, S.A., Wang, J., Ueno, A., Tsukamoto, H., Eisenstein, R.S., Enns, C.A., Zhang, A.S.: **Low intracellular iron increases the stability of matriptase-2**, J. Biol. Chem., 290. 4432-4446, 2015.

Zhao, B., Yuan, C., Li, R., Qu, D., Huang, M., Ngo, J.C.: **Crystal structures of matriptase in complex with its inhibitor hepatocyte growth factor activator inhibitor-1**, J Biol. Chem., 288. 11155-11164, 2013.

Zoratti, G.L., Tanabe, L.M., Varela, F.A., Murray, A.S., Bergum, C., Colombo, É., Lang, J.E., Molinolo, A.A., Leduc, R., Marsault, E., Boerner, J., List, K.: **Targeting matriptase in breast cancer abrogates tumour progression via impairment of stromal-epithelial growth factor signalling**, Nat. Commun., 6. 6776, 2015.

10 A doktori kutatás eredményeinek közlései

10.1 A doktori kutatás témájához kapcsolódó közlemények

10.1.1 Lektorált, impakt faktorraal bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

Barna R.F., Mackei M., Pásztí-Gere E., Neogrády Zs., Jerzsele Á., Mátis G.: **The effects of matriptase inhibition on the inflammatory and redox homeostasis of chicken hepatic cell culture models**, Biomedicines, 9. 450, 2021.

Barna R.F., Pomothy J.M., Pásztiné Gere E., Mátis G., Jerzsele Á.: **A matriptáz enzimek élettani és patológiás szerepe**, Magyar Állatorvosok Lapja, 142. 673-680, 2020.

Barna R.F., Pomothy J.M., Paréj Zs., Pásztiné Gere E.: **Investigation of sphingosin-1-phosphate-triggered matriptase activation using a rat primary hepatocyte model**, Acta Vet. Hung., 67. 578-587, 2019.

Pásztiné Gere E., Barna R.F., Szombath G., Rokonál P., Gálfi P.: **A vasanyagcsere-zavarok kezelésének lehetőségei, új perspektívák**, Magyar Állatorvosok Lapja, 138. 559-564, 2016.

10.1.2 Konferencia prezentációk

Pomothy J.M., Barna R.F., Pásztiné Gere E.: **Matriptáz enzim aktivátor és inhibitor tesztelése humán és patkány primer májsejt modelleken**, Akadémiai beszámolók, 2020.

Barna R.F., Pomothy J.M. Pásztiné Gere E.: **Matriptáz modulátorok hatásának vizsgálata az extracelluláris hidrogén-peroxid-szintre primer májsejtmodellen**, Poór, Péter; Blázovics, Anna (szerk.) Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság X. Kongresszusa: Program és összefoglalók Szeged, Magyarország; Szegedi Tudományegyetem, p. 44, 2019.

Barna R.F., Pomothy J.M., Pásztiné Gere E.: **Matriptáz inhibitor tesztelése primer májsejteken és bélhámsejtvonalon**, In: 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2019.05.14-17 p. 3, 2019.

Barna R.F. Pomothy J.M., Pásztiné Gere E.: **Bélhámsejteken tesztelt új matriptáz inhibitorok jellemzése**, Sótonyi, P.; Gálfi, P.; Vörös, K.; Magyar, T. (szerk.) Akadémiai beszámolók p. 18, 2019.

Pomothy J.M., Barna R.F., Pászti Gere E.: **Matriptáz enzim aktivátor és inhibitor tesztelése patkány és humán primer májsejt modelleken**, 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2019.05.14-17. p. 49, 2019.

Barna R.F., Pomothy J.M., Pászti Gere E.: **Szelektív matriptáz inhibitorok biztonságos alkalmazásának vizsgálata IPEC-J2 bélhámsejteken**, In: [Magyar, Toxikológusok Társasága] (szerk.) TOX'2018 Tudományos Konferencia Program, kivonatok p. 112 Paper: C5-4 , 1 p., 2018.

Barna R.F., Pomothy J.M., Rokonál P., Szombath G., Pászti Gere E.: **Matriptáz modulátorok vizsgálata in vitro primer májsejteken**, MTA, Állatorvostudományi Bizottsága - Akadémiai beszámoló : Élettan és Biokémia Patológia Gyógyszertan és Toxikológia Morfológia, Budapest, Magyarország : MTA Állatorvostudományi Bizottsága, ÁTE Állatorvostudományi Doktori Iskola, p. 9, 2018.

10.2 A doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények

10.2.1 Lektorált, impakt faktorral bíró tudományos folyóiratban megjelent/elfogadott publikációk

Pomothy J.M., Barna R.F., Pászti E.A., Babiczky Á., Szóládi Á., Jerzsele Á., Pászti Gere E.: **Beneficial Effects of Rosmarinic Acid on IPEC-J2 Cells Exposed to the Combination of Deoxynivalenol and T-2 Toxin**, Mediators of Inflammation, 2020, Article ID 8880651, 2020.

Pomothy J.M., Barna R.F., Czimmermann Á.E., Szóládi Á., Pászti Gere E.: **A deoxynivalenol mikotoxin toxikus hatásai a gazdasági haszonállatokra**, Magyar Állatorvosok Lapja, 142. 117-127, 2020.

Pomothy J.M., Pászti-Gere E., Barna R.F., Prokoly D., Jerzsele Á.: **The Impact of Fermented Wheat Germ Extract on Porcine Epithelial Cell Line Exposed to Deoxynivalenol and T-2 Mycotoxins**, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, Article ID 3854247, 2020.

Pomothy J.M., Barna R.F., Szóládi Á., Pászti Gere E.: **The beneficial effects of rosmarinic acid on a non-tumorigenic epithelial cell line**, GRADUS 7 : 1 pp. 79-83, 2020.

Pászti-Gere E., Barna R.F., Ujhelyi G., Steinmetzer T.: **Interaction exists between matriptase inhibitors and intestinal epithelial cells**, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 31. 736-741, 2016.

Pászti-Gere E., Barna R.F., Kovago C., Szauder I., Ujhelyi G., Jakab C., Meggyesházi N., Szekacs A.: **Changes in the distribution of type II transmembrane serine protease, TMPRSS2 and in paracellular permeability in IPEC-J2 cells exposed to oxidative stress**, Inflammation. 38. 775-783, 2015.

10.2.2 Konferencia prezentációk

Pomothy J.M., Barna R.F., Prokoly D., Pásztiné, Gere E.: **Fermentált búzacsíra védő hatásának tesztelése trichotecén vázas mikotoxinok által károsított sertés bélhámsejteken**, Akadémiai beszámolók, 2020.

Pomothy J.M., Barna R.F., Pásztiné Gere E.: **Polifenol vegyületek antioxidáns hatásának vizsgálata mikotoxin indukálta oxidatív stresszválaszban**, Poór, Péter; Blázovics, Anna (szerk.) Magyar Szabadgyök-Kutató Társaság X. Kongresszusa : Program és összefoglalók. Szeged, Magyarország : Szegedi Tudományegyetem, p. 50, 2019.

Pomothy J.M., Barna R.F., Pásztiné, Gere E.: **A rozmaringsav hatásának vizsgálata IPEC-J2 sejteken**, Hoyk, Edit (szerk.) Környezettudományi és Analitikai Műhelykonferencia Absztraktkötet. Kecskemét, Magyarország: Palkovics András, (2019) pp. 14-15., 2 p.

Pomothy J.M., Barna R.F., Pásztiné, Gere E.: **A rozmarinsav védő hatásának vizsgálata mikotoxin expozíciónak kitett IPEC-J2 sejt vonalon**, 49. Membrán-transzport Konferencia, Sümeg, 2019.05.14-17 (2019) p. 50 Paper: 50

Pomothy J.M., Barna R.F., Pásztiné, Gere E.: **A DON és T-2 toxin hatásának vizsgálata sertés és humán nem daganatos sejt vonalakon**, Sótonyi, P.; Gálfi, P.; Vörös, K.; Magyar, T. (szerk.) Akadémiai beszámolók.(2019) p. 23 , 1 p.

Pomothy J.M., Barna R.F., Pásztiné, Gere E.: **A quercetin védő hatásának vizsgálata rövidtávú don kezelést követően IPEC-J2 sejt vonalon**. [Magyar, Toxikológusok Társasága] (szerk.) TOX'2018 Tudományos Konferencia Program, kivonatok. (2018) p. 98 Paper: C4-6, 1 p.

Pomothy J.M., Barna R.F., Kiss Zs., Pásztiné Gere E.: **A zearalenon és a Lactobacillus plantarum 2142 együttes hatása IPEC-J2 sejt vonalon**, In: MTA, Állatorvostudományi Bizottsága - Akadémiai beszámolók : Élettan és Biokémia Patológia Gyógyszertan és Toxikológia Morfológia. Budapest, Magyarország: MTA Állatorvostudományi Bizottsága, ÁTE Állatorvostudományi Doktori Iskola, (2018) pp. 12-13. , 2 p.

Pásztiné Gere, E, Barna R.F., McManus, S, Kővágó Cs., Gálfi P., Steinmetzer, T.: **Story of a selective matriptase inhibitor: Lack of enzyme activity puts the gut barrier at risk**, In: Mihovilovic, Marko (szerk.) BioTrans 2015 12th Biotrans Congress Bécs, Ausztria: Book-of-Abstracts.com, pp. P191-P191, 2015.

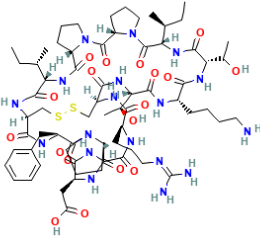
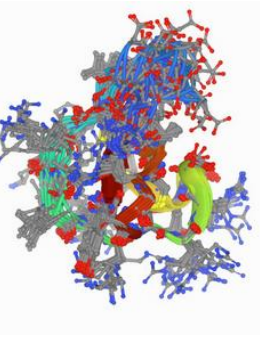
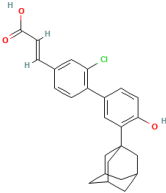
Pásztiné Gere E., Barna R.F., Kővágó Cs., Meggyesházi N., Fodor L., Gálfi P.: **Szelektív matriptáz inhibitorok hatása a paracelluláris transzportfolyamatokra**, 44. Membrán-transzport konferencia Sümeg, Magyarország p. 98, 2014.

Pásztiné Gere E., Barna R.F., Kővágó Cs., Meggyesházi N. Gálfi P.: **Matriptáz inhibitorok hatékonyságának vizsgálata sertés bélhámsejteken**, SZIE ÁOTK Akadémiai Beszámolók 2014. 01.27. In: Akadémiai beszámolók: Klinikumok, gyógyszerteran, toxikológia. Budapest, Magyarország, 2014.

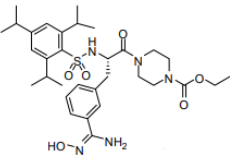
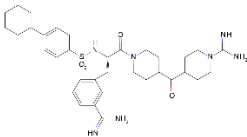
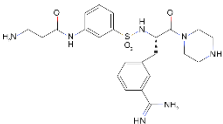
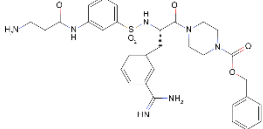
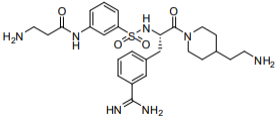
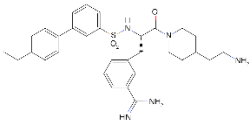
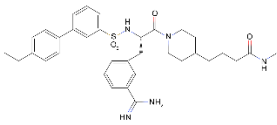
Pásztiné Gere E., Barna R.F., Kővágó Cs., Meggyesházi N., Fodor L., Gálfi P.: **Bélgyulladások vizsgálata és kezelési lehetőségei IPEC-J2 modellrendszerben**, In: TOX'2014 Tudományos konferencia. Magyarország, 2014.

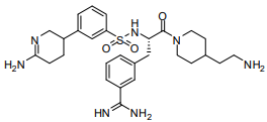
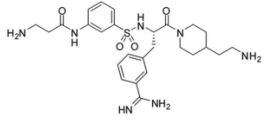
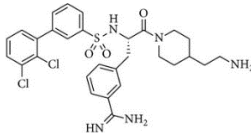
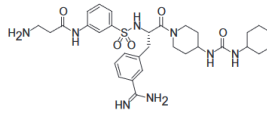
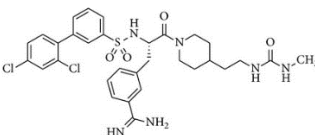
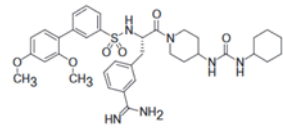
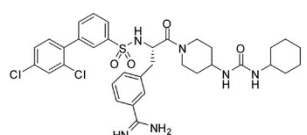
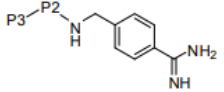
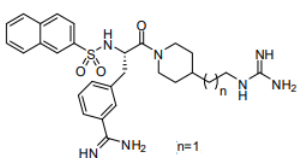
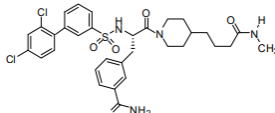
11 Mellékletek

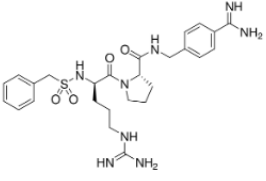
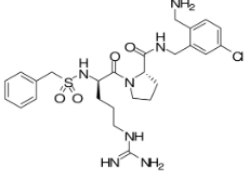
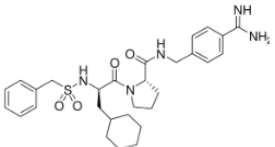
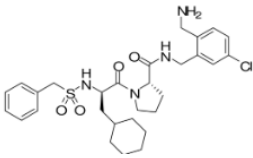
1. melléklet: Más inhibitorcsoportba tartozó, a disszertációban említésre kerülő inhibitorok

Inhibitor	Szerkezeti képlet	$K_{i\text{matriptáz-1}}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$K_{i\text{matriptáz-1}}$ ($\mu\text{mol/l}$)
SFTI-1		0,2	n.a.
MCoTI-II		0,0028	n.a.
3-Cl-AHPC		n.a.	n.a.

2. melléklet: A szakirodalomban *in vitro* és *in vivo* kísérletekben megemlített, disszertációban nem alkalmazott 3-APhA inhibitorok szerkezeti képlete és K_i (disszociációs állandó) értékei. Zárójelben más publikációban megtalálható elnevezések, adatok láthatóak.

Inhibitor	Szerkezeti képlet	$K_{i\text{matriptáz-1}}$ ($\mu\text{mol/l}$)	$K_{i\text{matriptáz-2}}$ ($\mu\text{mol/l}$)
WX-UK1 (CU-1275)		0,37	n.a.
CJ-697 (CU-697; 44)		0,026	n.a.
CJ-730		0,046	n.a.
CU-988		0,036	n.a.
CU-990		0,0061	n.a.
CU-1737 (59)		0,0038 (0,0066 Hammami, 2012)	n.a.
CU-1803 (24)		0,028	n.a.
CU-1804		0,0025	n.a.
CU-1807		0,0245	n.a.

CU-1832		0,0001	n.a.
MI021		0,0038	n.a.
MI441 (96)		0,011	0,21
MI453 (89)		0,008	0,79
MI461 (112)		0,0009	0,073
MI462* (113)		0,0027	1,42
MI463 (114)		0,0051	0,94
MI469	 P2:Ala P3: H-D-hPhe	0,044	n.a.
8 (16)	 n=1	0,046	n.a.
MI406 (93)		0,013	0,035

1		0,055	0,17
2		0,22	>10
3		0,77	0,46
4		2,1	>10

* Baron et al, 2013-as cikkjében MI462 inhibitora az ott látható szerkezeti képlet és a cikkben utalt K_i érték alapján is Hammami disszertációjában MI463 sorszámú inhibitora.

12 Köszönetnyilvánítás

Hálásan köszönöm Dr. Mátis Gábor és Dr. Jerzsele Ákos témavezetőimnek, hogy az utolsó évemben elfogadtak témavezetettnek, és mindenben segítettek a disszertációm megvalósulását. Köszönöm a rengeteg bátorítást, türelmet, biztatást, amivel segítettek munkám megvalósítását. Köszönöm volt témavezetőmnek, Dr. Pásztiné Dr. Gere Erzsébetnek, a motivációt, segítséget, lelkesítést, hogy elindított a tudományos pályámon.

Nagyon köszönöm mindenkinek a Biokémiai Osztályon, hogy befogadtak, támogattak a közös munka alatt. Külön hálás vagyok Dr. Neogrády Zsuzsannának, akihez bármikor fordulhattam segítségért, útmutatásért, biztatásért. Köszönöm Dr. Mackei Máténak, hogy mindig lehetett rá számítani, Vörösházi Júliának, aki a legjobb támogató szobatárs volt, valamint Seprődi Júliának és Petrovics Gabriellának a kedves aszisztenciáért. Köszönöm Hámori Fanni szakdolgozómnak a kísérletekben való lelkes segítséget.

Köszönöm Pomothy Judit PhD hallgatótársamnak, hogy végig támogattott a kísérletek, oktatás, komplex vizsga, publikációk alatt, nélküle nem valósult volna meg ez a disszertáció. Köszönöm a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék minden munkatársának is, hogy mindenben segítettek munkám létrejöttét, kiemelten Dr. Gálfi Péternek, Dr. Farkas Orsolyának, Dr. Karancsi Zitának, Dr. Kővágó Csabának.

Köszönöm a családomnak, páromnak, barátaimnak, az Exopetes csapatnak a türelmüket és támogatásukat, amivel elengedhetetlenül hozzájárultak dolgozatom létrejöttéhez.