

Tenyésztetes epitelsejt modellek alkalmazása biológiailag aktív peptidek és adjuváns terápiás szerek hatásának vizsgálatára

Doktori (Ph.D.) értekezés

Gróf Ilona

Témavezetők: **Dr. Deli Mária**, tudományos tanácsadó
Dr. Bocsik Alexandra, tudományos munkatárs

Biofizikai Intézet, Biológiai Barrierék Kutatócsoport
Szegedi Biológiai Kutatóközpont

Biológia Doktori Iskola
Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar

2021

Szeged

Tartalomjegyzék

Publikációs lista

Rövidítések jegyzéke

1. Bevezetés	1
1.1. Az epitélsejtes biológiai gátrendszerek	1
1.2. A légutak hámja.....	4
1.2.1. A cisztás fibrózis betegség.....	5
1.2.2. A cisztás fibrózis betegség vizsgálata modellrendszereken.....	7
1.2.3. Terápiás lehetőségek a cisztás fibrózisban.....	8
1.3. A bélhám.....	16
1.4. A bél- és tüdőhám mint gyógyszerbeviteli kapu	17
1.5. Gyógyszerbejutás fokozásának lehetőségei.....	18
1.5.1. Szoros kapcsolatokat módosító peptidek – PN159	19
2. Célkitűzések	15
3. Anyagok és módszerek.....	16
3.1. Vegyszerek	16
3.2. Sejttenyésztés.....	16
3.2.1. A humán cisztás fibrózis bronchiális tüdőepitél sejtvonalak tenyésztése.....	16
3.2.2. A humán endotélsejtek tenyésztése.....	17
3.2.3. A humán Caco-2 bélepitél-sejtvonal tenyésztése.....	17
3.3. Vizsgálati módszerek és kezelések.....	17
3.3.1. A humán cisztás fibrózis bronchiális epitélsejtek kezelése	17
3.3.2. A CFBE sejtek életképességének vizsgálata valósídejű sejtanálízissal	18
3.3.3. A CFBE sejtrétegek gátműködésének vizsgálata.....	19
3.3.3.1. A transzepiteliális elektromos ellenállás mérése.....	19
3.3.3.2. Permeabilitási vizsgálatok.....	20
3.3.4. Immunhisztokémia.....	27
3.3.4.1. Képanalízis	29
3.3.5. A sejtek intracelluláris pH értékének meghatározása	29
3.3.6. Az epitélsejt modellek kezelése PN159 peptiddel	24
3.3.6.1. A humán cisztás fibrózis bronchiális epitélsejtek kezelése.....	24
3.3.6.2. A humán Caco-2 bél epitélsejtek kezelése, a peptid internalizációja és kolokalizációja	25
3.3.7. A PN159 peptid antimikrobiális hatásának meghatározása	25
3.4. Statisztikai kiértékelés	26
4. Eredmények	27

4.1. A CFBE sejtek gátműködésének jellemzése mono- és ko-kultúrában	27
4.1.1. Transzepteliális elektromos ellenállás és permeabilitási vizsgálatok	27
4.1.2. A mono- és ko-kultúrában tenyésztett CFBE sejtek közötti kapcsolatok fehérjéinek immuncitokémiai festése	28
4.2. A CFBE sejtek tenyésztése folyadék-folyadék és levegő-folyadék határfelületen	30
4.3. A CFTR csatorna aktiválásának és gátlásának vizsgálata a CFBE sejtpáron: ellenállási és permeabilitási mérések	31
4.4. Citokinek hatása a CFBE sejtvonalpár gátműködésére	33
4.5. A nátrium bikarbonát hatása a cisztás fibrózis bronchiális epitelsejt tenyészeteken	34
4.5.1. Életképességi vizsgálatok: valósidejű sejtanálízis és kettős magfestés	34
4.5.2. A nátrium bikarbonát hatása a CFBE sejtek gátműködésére	36
4.5.2.1. Transzepteliális elektromos ellenállás és permeabilitás vizsgálat.....	36
4.5.2.2. Immuncitokémia.....	38
4.5.3. A bikarbonát hatása a CFBE sejtek nyugalmi intracelluláris pH értékére.....	46
4.5.4. A bikarbonát hatása a CFTR csatorna immunolokalizációjára CFBE sejtekben....	46
4.6. A PN159 peptid hatása különböző epitelsejtes gátmodelleken	48
4.6.1. A PN159 peptid hatása CFBE sejtrétegekre: elektromos ellenállás, permeabilitás és immunfestés	48
4.6.2. A PN159 peptid hatása a Caco-2 bélepitél sejtek F-aktin festődési mintázatára....	44
4.6.3. A PN159 peptid sejtbe való bejutásának és sejtpenetráló hatásának vizsgálata Caco-2 bélepitél sejteken	44
4.6.4. A PN159 peptid és a klaudin-4 fehérje kolokalizációjának vizsgálata.....	45
4.7. A PN159 peptid antimikrobiális hatása	46
5. Megbeszélés.....	47
5.1. A CFBE modell jellemzése különböző tenyésztési körülmények között.....	47
5.2. A CFTR csatorna aktivátor és inhibitor hatásának vizsgálata a CFBE sejtpáron	49
5.3. Citokinek hatása a CFBE sejtvonalpár gátműködésére	49
5.4. A nátrium bikarbonát hatása a CFBE tenyészetes modelleken	50
5.5. A PN159 peptid hatása a különböző epitelsejtes gátmodelleken	57
5.6. A PN159 peptid antimikrobiális hatása	58
5.7. Összegzés.....	59
6. Köszönetnyilvánítás	54
7. Hivatkozások.....	55
8. Összefoglalás	65
9. Summary	68
10. Függelék	71

Publikációs lista:

MTMT azonosító: 10055650

Kumulatív hatástényező (IF): 49,244; Összes hivatkozások száma: 29; Hirsch index: 3

A tézis tárgyához tartozó publikációk

- I. Bocsik A, **Gróf I**, Kiss L, Ötvös F, Zsíros O, Daruka L, Fülöp L, Vastag M, Kittel Á, Imre N, Martinek TA, Pál C, Szabó-Révész P, Deli MA.
Dual action of the PN159/KLAL/MAP peptide: increase of drug penetration across Caco-2 intestinal barrier model by modulation of tight junctions and plasma membrane permeability.
Pharmaceutics. 11(2). pii: E73. (2019)
IF: 4,773
- II. **Gróf I**, Bocsik A, Harazin A, Santa-Maria AR, Vizsnyiczai G, Barna L, Kiss L, Für G, Rakonczay Z Jr, Ambrus R, Szabó-Révész P, Gosselet F, Jaikumpun P, Szabó H, Zsembery Á, Deli MA.
The effect of sodium bicarbonate, a beneficial adjuvant molecule in cystic fibrosis, on bronchial epithelial cells expressing a wild-type or mutant CFTR channel.
International Journal of Molecular Science. 21(11):4024. (2020)
IF: 4,556

A tézis tárgyához közvetlenül nem tartozó publikációk

- I. Bartos C, Jójárt-Laczkovich O, Katona G, Budai-Szűcs M, Ambrus R, Bocsik A, **Gróf I**, Deli MA, Szabó-Révész P.
Optimization of a combined wet milling process in order to produce poly(vinyl alcohol) stabilized nanosuspension.
Drug Design, Development and Therapy. 12:1567-1580. (2018)
IF: 3,208
- II. Veszelka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, **Gróf I**, Mészáros M, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA.
Comparison of a rat primary cell-based blood-brain barrier model with epithelial and brain endothelial cell lines: gene expression and drug transport.
Frontiers in Molecular Neuroscience. 11:166. (2018)
IF: 3,720
- III. L Kiss E, Berkó S, Gácsi A, Kovács A, Katona G, Soós J, Csányi E, **Gróf I**, Harazin A, Deli MA, Budai-Szűcs M.
Design and optimization of nanostructured lipid carrier containing dexamethasone for ophthalmic use.
Pharmaceutics. 11(12). pii: E679. (2019)
IF: 4,773
- IV. Ismail R, Bocsik A, Katona G, **Gróf I**, Deli MA, Csóka I.
Encapsulation in polymeric nanoparticles enhances the enzymatic stability and the permeability of the GLP-1 analog, liraglutide, across a culture model of intestinal permeability.
Pharmaceutics. 11(11). pii: E599. (2019)
IF: 4,773

- V. Imre N, Hetényi A, Szabó E, Bodnár B, Szkalisity A, **Gróf I**, Bocsik A, Deli MA, Horvath P, Czibula Á, Monostori É, Martinek TA.
Routing nanomolar protein cargoes to lipid raft-mediated/caveolar endocytosis through a ganglioside GM1-specific recognition tag.
Advanced Science. 7(4):1902621. (2020)
IF: 15,804
- VI. Kiss EL, Berkó S, Gácsi A, Kovács A, Katona G, Soós J, Csányi E, **Gróf I**, Harazin A, Deli MA, Balogh GT, Budai-Szűcs M.
Development and characterization of potential ocular mucoadhesive nano lipid carriers using full factorial design.
Pharmaceutics. 12(7):682. (2020)
IF: 4,421
- VII. Bíró T, Bocsik A, Jurišić Dukovski B, **Gróf I**, Lovrić J, Csóka I, Deli MA, Aigner Z.
New approach in ocular drug delivery: in vitro and ex vivo investigation of cyclodextrin containing, mucoadhesive eye drop formulations
Drug Design, Development and Therapy. 15:351-360. (2021)
IF: 3,216

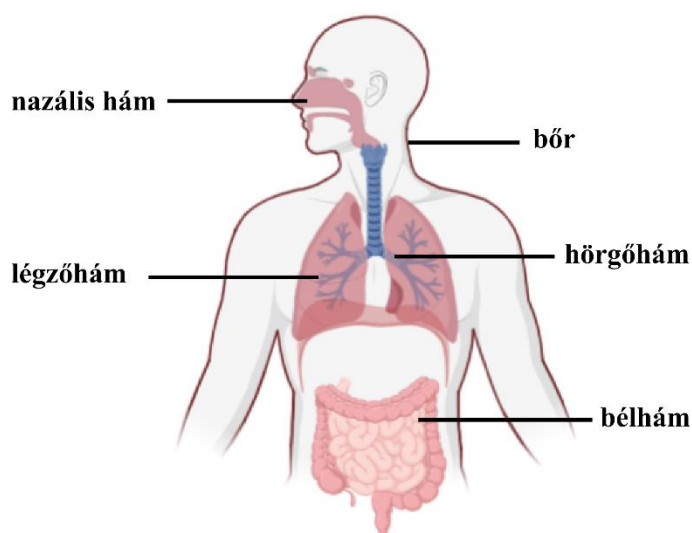
Rövidítések jegyzéke

ALI – levegő- folyadék határfelület
ATCC –American Type Culture Collection
ATP – adenozin trifoszfát
BCECF-AM – 2',7'-bisz-(2-karboxietil)-5-(és-6-) karboxifluoreszcein-acetoximetil észter
BSA – borjú szérum albumin
cAMP – ciklikus 3', 5'-adenozin-monofoszfát
CFTR – cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor
CO₂ – széndioxid
CPP – sejtpenetráló peptid
DMEM – Dulbecco módosította Eagle-médium
DMSO – dimetil szulfoxid
EBA – Evans-kék albumin komplex
EH-1 – Etídium homodimer-1
FBS – főtális borjúsérum
GI – gasztrointesztinális
IL-1 β – interleukin-1 β
LLI – folyadék- folyadék interfázis
NF- κ B – nuclear factor κ B
nm – nanométer
PBS – foszfát pufferoldat
PFA – paraformaldehid
SF – nátrium-fluoreszcein
TEER – transzepiteliális elektromos ellenállás
TJ – szoros kapcsolat (tight junction)
TNF- α – tumor nekrozis faktor- α
TX-100 – Triton X-100
WGA – búzacsíra agglutinin
ZO-1 – zonula okkludens-1 fehérje

1. Bevezetés

1.1. Az epitelsejtes biológiai gátrendszerek

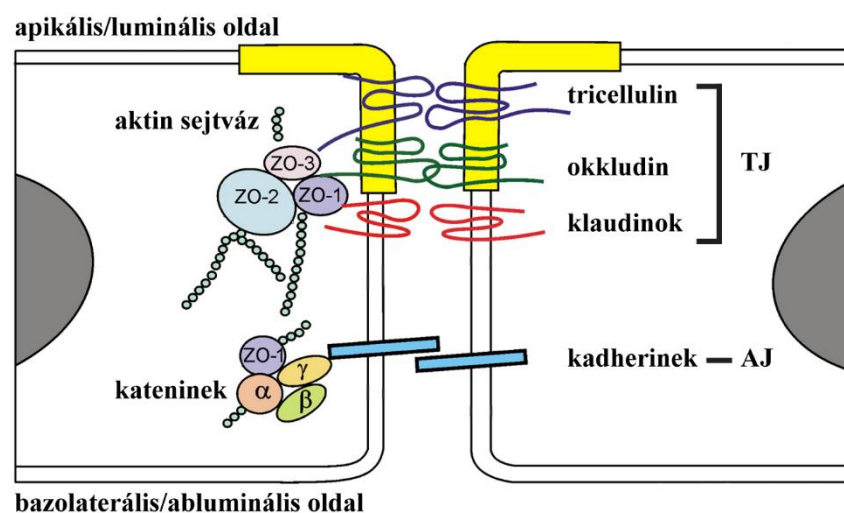
A biológiai gátrendszerek feladata sokrétű: az állandó homeosztázis fenntartása mellett a szervezet védelmében is fontos szerepet játszanak. Elválasztják szervezetünket a külső környezettől, a belső szerveket egymástól, valamint a vérkeringéstől és megakadályozzák káros anyagok illetve kórokozók bejutását a szervezetbe. Elsődleges határfelületnek tekinthetők az epitelsejtek alkotta külső barrierok, amelyek a szervezet egészét választják el a külvilágtól, úgymint a bőr, a légutak és a bélcsatorna hámszövete (Deli, 2009) (**1. ábra**). Míg alapvetően ugyanazt a szerepet töltik be, szerkezetileg eltéréseket mutatnak ezek a gátrendszerek a különböző szervek között, ezeket nevezzük szerv specifikus tulajdonságoknak. A bőrhám több sejtsoros, réteges szerkezettel rendelkezik, amely fontos védekező szerepet tölt be (Brandner, 2016). A bőr az anatómiai szerkezetéből adódóan a legkevésbé áteresztő barrier, az alacsony ion permeabilitását jól tükrözi a magas, 5000 Ω körüli elektromos ellenállási értéke. Az intesztinális gát elsődleges szerepe a tápanyagfelszívódás, emellett elválasztja a bél mikrobiomot a test többi részétől (Castoldi és mtsai, 2015). A vékonybél epitéliumának elektromos ellenállás értéke 100 Ω alatt van, amely az ionok számára jól átjárható barriert mutat (Deli, 2009). A tüdőhám alkotta barrier kifejezetten vékony, ami lehetővé teszi a gázcserét a levegő-folyadék határfelületen (Frank, 2012).



1. ábra. Példák az epitelsejtes biológiai gátrendszerekre.

Ezeknek a gátrendszereknek az anatómiai alapját az epitelsejtek alkotják, amelyek egymáshoz szorosan kapcsolódnak. A sejtek között lévő rést, az úgynevezett paracelluláris

utat, a sejtek membránjában található sejtkepcsoló fehérjék zárják le. Ezeket a struktúrákat szoros kapcsolatoknak nevezzük (*tight junction*, TJ), amelyek az elsődleges, fizikai alapját képezik a gátrendszereknek, meghatározzák annak szorosságát, ezzel korlátozzák ionok, molekulák és sejtek átjutását (**2. ábra**). A szoros kapcsolatok integrált membránfehérjékből, a membránfehérjéket és az aktin sejtvezet összekötő kapcsolófehérjékből, valamint a paracelluláris szorosságot és transzportot szabályozó jelzőmolekulákból állnak (Johnson és Quay, 2005; Van Itallie és Anderson, 2014). A transzmembrán TJ fehérjék közül az okkludin, a tricellulin és a klaudin család tagjai kiemelkedő szerepet játszanak a paracelluláris gátak kialakításában (Krause és mtsai, 2008). Az okkludin, amely fontos szerepet játszik a transzport szabályozásában, hasonló mértékben expresszálódik a különböző gátrendszereket alkotó sejtekben, például a vér-agy gátat alkotó agyi endotélsejtekben vagy az emésztőrendszer bélhámsejtjeiben (Haseloff és mtsai, 2015).



2. ábra. A szoros (TJ) és adherens (AJ) sejtközötti kapcsolatok egyszerűsített ábrázolása (Deli, 2009 alapján, módosítva)

A klaudin család több mint 20 tagja expresszálódik epitél- és endotélsejtekben. A klaudinok egyedi kifejeződési mintázata meghatározza a paracelluláris rés szövet-, töltés- és méret szelektivitását. A klaudin-1, -3, -4, -5, -8, -11, -14 és -19 hozzájárul a paracelluláris gátak szorosságához, míg a klaudin-2, -7, -15, -16 az ionok számára átjárható (Krause és mtsai, 2008). A bélhámsejtek expresszálják a klaudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, -12 és -15 fehérjéket, azonban kifejeződésük szintje a különböző bélszegmensekben és a szubcelluláris elhelyezkedésük eltérő (Chiba és mtsai, 2008). A tüdőepitélsejtekben a legfontosabb tagjai a klaudin családnak a klaudin-1, 3, -4, -7, -18 fehérjék (Schlingmann és mtsai, 2015). A

zonula okkludens fehérjék (ZO-1 és -2) összekapcsolják az okkludint és a klaudinokat az aktin sejtvázzal (**2. ábra**), és dinamikusan szabályoznak több jelátviteli utat és ezzel a kapcsolatok közötti permeabilitást (Paris és mtsai, 2008). Egy másik fontos adaptor fehérje a kettős funkciójú β -katenin, amely az adherens kapcsolatokat (AJ) stabilizálja a sejtmembránban, valamint transzkripciós faktorokhoz kötődve a génexpresszió kulcsszabályozójaként is működik (Reis és Liebner, 2013). Az epitelsejtes gátrendszerekben az adherens kapcsolatok az apikális junkcionális komplexumban helyezkednek el a szoros kapcsolatoktól bazolaterális irányban (Johnson és Quay, 2005). Az adherens kapcsolófehérjék, mint például az epiteliális E-kadherin, szintén részt vesznek a paracelluláris permeabilitás szabályozásában (Deli, 2009).

A gátműködés mellett a szoros kapcsolatok másik fő feladata a sejtréteg polaritásának kialakítása: a sejtek közötti kapcsolatok gátolják a fehérjék és lipidek szabad mozgását a plazmamembrán apikális és bazolaterális felszíne között (Cereijido és mtsai, 2008). Ennek következménye, hogy az apikális és a bazális sejtmembránban található transzporterek, receptorok és csatornák expressziós mintázata eltérő. Ennek egyik példája, a cisztás fibrózis transzmembrán konduktancia regulátor (CFTR) csatorna, ami az epitelsejtek apikális felszínén található. A CFTR csatorna hibás működése vagy hiánya számos betegségben megfigyelhető, de elsősorban a cisztás fibrózis betegséghez köthető, amiben a CFTR anion csatornát érintő mutáció mind a tüdő, mind az emésztőrendszer működésére hatással van.

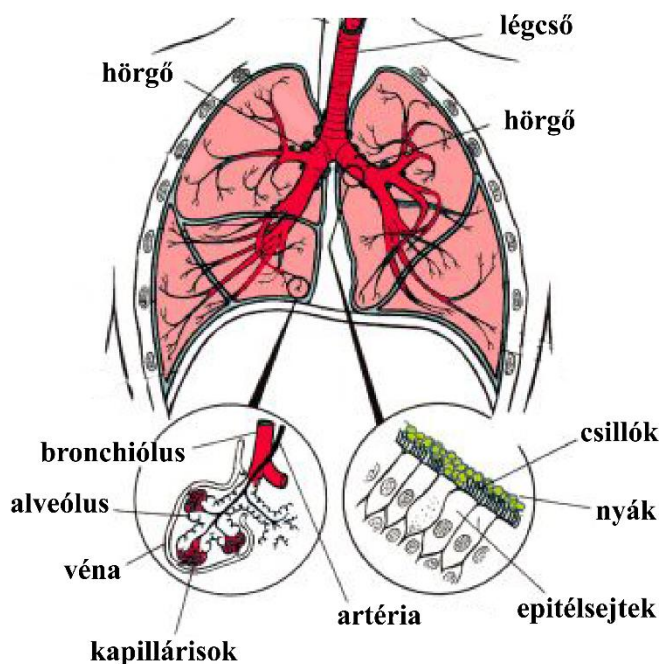
A szoros sejtközi kapcsolatok nem csak védik a szervezetet, hanem a hatóanyagok átjutását is korlátozzák a paracelluláris útvonalon keresztül (Deli, 2008), ezért ez az útvonal az egyik legfontosabb meghatározója a biológiai gátrendszereken keresztüli gyógyszer átjutásnak. A gyógyszerhatóanyagok átjutásának fokozása intenzíven vizsgált területe az orvosbiológiai és gyógyszerészeti kutatásoknak (Ward és mtsai., 2000; Abbott és mtsai, 2013). Több gyógyszerbeviteli útvonal létezik, amelyek közül a leggyakoribb a szájon át történő adagolás, mivel használata egyszerű, a betegek kényelmesen, az előírásoknak megfelelően tudják adagolni a gyógyszer mennyiségét. Azonban számos hatóanyag felszívódása korlátozott az intesztinális gáton keresztül, aminek egyik fontos tényezője a szoros sejtkapcsolatok által lezárt paracelluláris út (Deli, 2008). A hagyományos beviteli módok mellett a tüdőn keresztüli gyógyszerbejuttatás, mint alternatív beviteli útvonal egyre inkább előtérbe kerül (Deli, 2008).

Laboratóriumi körülmények között, *in vitro* tenyésztett epitelsejtek alkalmasak a biológiai gátrendszerek vizsgálatára, ugyanis kifejezik az élettani körülmények között megfigyelhető legfontosabb barrier jellemzőket, például a sejtkapcsoló és szállító fehérjéket.

Ezenkívül segítenek a különböző betegségek kórfolyamatainak megértésében, lehetséges terápiás szerek, kezelések tesztelésében és kifejlesztésében. A légzőrendszer tenyészetes modelljei például fontos szerepet játszanak a hatóanyag átjutás tanulmányozásában, továbbá segítenek a különböző légzőszervi megbetegedések kórfolyamatainak megértésében. Munkánk során a bélhám és a hörgőhám tenyészetes modelljeit használtuk a különböző vizsgálatokra.

1.2. A légutak hámja

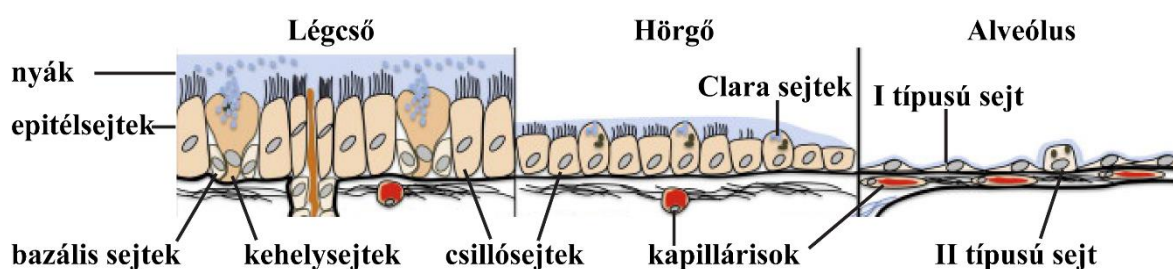
Az emberi légzőrendszer felső és alsó légutakra osztható. Az alsó légúti szakaszhoz tartoznak a hörgők, hörgőcskék (bronchiólusok) és a gázcserét végző léghólyagocskák vagy alveólusok (3. ábra). A hörgők hámját nyálkát szekretáló csillósejtek szegélyezik.



3. ábra. A légzőrendszer felépítése (Nanjwade és mtsai, 2011 alapján).

A légutakat borító hám összetett és eltérő felépítést mutat a bronchiólusok és az alveólusok szintjén (4. ábra). Sokféle sejtípus található a tüdőben, amelyek struktúrális és funkcionális szempontból egyaránt nagymértékben specializálódtak (Franks és mtsai, 2008). A légutakat a hörgők szintjén egyrétegű többmagsoros csillós hengerhám borítja, amely a nyálkot termelő kehelysejtekből, bazális sejtekből, valamint a csillós sejtekből áll. Lefelé haladva a hámréteg egyre vékonyodik, a terminális bronchiólusoknál egyrétegű csillós hám található rövidebb csillókkal és a szekretoros Clara sejtekkel, míg az alveólusok szintjén a

gázcserét lehetővé tévő egyrétegű laphám (I és II típusú alveólushám) figyelhető meg (4. ábra) (Chang és mtsai, 2008).



4. ábra. A légúti hám felépítése (Klein és mtsai, 2011 alapján).

A hörgők kehely- és Clara sejtjei nagy molekulatömegű glikoproteineket választanak ki, amelyek a nyákot alkotják (Lumsden és mtsai, 1984). Ezek fő alkotói a mucin fehérjék. A hörgőkben a MUC5 glikoproteinek együttesen alkotják a gél fázist a légúti hámsejtek apikális felületén, amely lehetővé teszi a felszíni folyadék számára, hogy megfelelően csapdázzon és távolítson el részecskéket, így védve az epitélium felszínét. A mucin szekréció megfelelő szabályozása a légutak felszínén elengedhetetlen a légzőrendszer megfelelő működéshez, mivel a túltermelés eltömítheti a légutakat, a nem elégséges termelés pedig ronthatja a csillószőrös tisztulást, amely fertőzésekhez és gyulladásokhoz vezet.

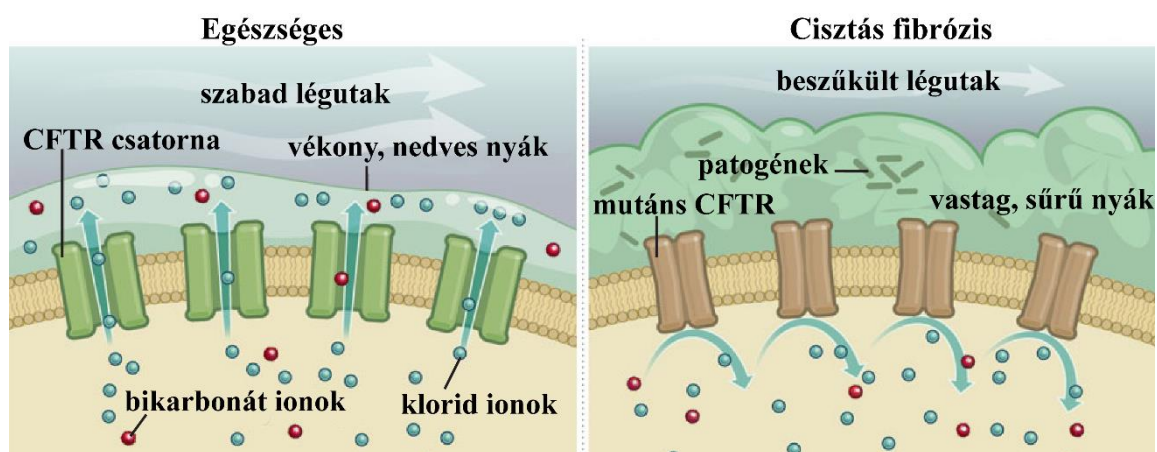
Az alveólusok falát vékony hámréteg alkotja, amely az I és II típusú alveolus sejtekből épül fel. Az I típusú alveoláris sejtek lapos laphámsejtek, amelyek gázáteresztő membránként működnek. A II típusú alveoláris sejtek legfontosabb feladata a felületaktív anyagok szintézise és szekréciója, amelyek csökkentik a felületi feszültséget a levegő-folyadék határfelületen, és megakadályozzák az alveólusok összeomlását (Chang és mtsai, 2008).

1.2.1. A cisztás fibrózis betegsége

A cisztás fibrózis egy autoszómális recesszíven öröklődő genetikai betegség. Hátterében a *CFTR* gén mutációja áll, amely egy ATP-kapuzott anion csatorna fehérjét kódol. A *CFTR* gén több mint 2000 mutációja ismert (Cystic Fibrosis Mutation Database), azonban a leggyakoribb a hetes kromoszóma hosszú karján, az 508-as pozíciójában található fenilalanin delécia ($\Delta F508$). Ez a mutáció a fehérje hibás összeszerelését eredményezi, ami az endoplazmatikus retikulumban (ER) ubiquitinálódik és a proteaszómában lebomlik (Ward és mtsai, 1995). Ha a mutáns CFTR csatorna el is éri az apikális plazmamembránt,

csökken a stabilitása (Lukacs és mtsai, 1993) és hibás lesz a kapuzási mechanizmusa (Dalemans és mtsai, 1991). A CFTR mutációk számos szervet érintenek, azonban a tüdőt érintő elváltozások felelősek a magas halálozási arányért (ECFS Patient Registry Annual Data Report 2018).

A CFTR csatorna felelős az epitelsejteken keresztüli klorid és bikarbonát ion transzportért, ezáltal szabályozva a sószállítást, a folyadékáramlást és az általános epitelsejt működéshez szükséges alapvető ion homeosztázist (**5. ábra**). Élettani állapotban a tüdő epitelsejtében a Na^+ abszorpció és Cl^- szekréció egyensúlyban van, amit az biztosít, hogy a CFTR csatorna gátló hatással van az epiteliális nátrium csatornára (ENaC), ezzel szabályozva a nátrium és víz visszaszívását a légúti lumenből.



5. ábra. A CFTR csatorna egészséges és cisztás fibrózis állapotban (Ledford, 2012 alapján)

Működőképes CFTR csatorna hiányában csökken a klorid és bikarbonát kiáramlás a sejtek apikális felszínén, valamint az ENaC kikerül a CFTR szabályozó hatása alól, aminek következtében fokozódik a Na^+ és víz visszaszívása a sejtekbe, ez pedig a periciliáris folyadék réteg csökkenéséhez vezet. Mivel a csillók nem tudnak megfelelően mozogni, a nyák mozgása lelassul, ami a csillószőrös tisztulás romlását, ezáltal a nyák pangását idézi elő. Így a sejtek felszínén egy besűrűsödött, savas pH-jú nyákréteg alakul ki (**5. ábra**). A csillószőrös tisztulás romlásának következtében különféle kórokozó mikróbák szaporodnak el a légutakban. A fertőzések és a kialakult immunválasz következtében folyamatos gyulladás jön létre a betegek tüdejében (Boucher, 2007).

1.2.2. A cisztás fibrózis betegség vizsgálata modellrendszereken

A CF egy intenzíven kutatott betegség, amelynek vizsgálatához mind *in vivo*, mind *in vitro* modelleket is alkalmaznak. Az állati modellek hozzájárulhatnak a CF során a légutakban megfigyelhető fertőzések és gyulladások kezdeti mechanizmusainak megértéséhez, valamint kiegészíthetik a sejtenyészetekeken kapott eredményeket (McCarron és mtsai, 2018). Mivel a CF egér és patkány modellek nem mutatnak spontán fertőzőes és gyulladásos reakciókat és a légutak felépítése is eltér a humántól, ezért a nagyobb állatok, például vadászgörények és sertések, amelyek tüdőfelépítése és fiziológiája hasonló az emberi légutakhoz, megfelelőbb modelleknek tekinthetők. A genetikai módosítással létrehozott cisztás fibrózisos sertések fenntartása és a velük folytatott kísérletek azonban rendkívül költségesek (McCarron és mtsai, 2018).

A sejtenyészeti módszerek, különösképpen a polarizált *in vitro* epiteliális modellek kritikus fontosságúak a CFTR szerepének jobb megértéséhez. A CF-re jellemző légúti elváltozások főleg a légsövet és a hörgőket érintik, ezért a cisztás fibrózis patogenezisének tanulmányozására és a CFTR funkcionális válaszána vizsgálatára humán bronchiális epitelsejteket alkalmaznak leginkább (Van Goor és mtsai, 2006; Awatade és mtsai, 2014). A primer tenyészetek az *in vivo* állapothoz közeli sejtfelépítést mutatnak, használatuk során azonban számos nehézséggel kell számolni: (i) a betegekből származó primer bronchiális epitelsejtek kinyerése limitált, etikai engedélyhez kötött és nehezen megvalósítható többek között az alacsony sejtszám és mikrobiális kolóniák jelenléte miatt (Awatade és mtsai, 2018); (ii) széleskörű felhasználásukat megnehezíti a levegő-folyadék interfázison való tenyésztésük során tapasztalt korlátozott sejtszaporodás, amely a sejtek transzformációjának és öregedésének tulajdonítható (Gentzsch és mtsai, 2017); (iii) csak alacsony passzálási számon használhatóak és a tenyésztésükhöz összetett, speciális tápfolyadékot igényelnek, ami megnöveli a fenntartásuk költségeit.

A bronchiális epitelsejt-vonalak polarizált monoréteget hoznak létre, azonban korlátozott a differenciálódási képességük. Ennek ellenére számos előnyös tulajdonsággal rendelkeznek: (i) könnyebben kezelhetők, mint a primer sejtek; (ii) mivel egyetlen donorból származnak, a donorok közti eltérés nem játszik szerepet a vizsgálatok során; (iii) hosszabb élettartamúak; (iv) tenyésztésükhöz többnyire egyszerűbb összetételű és kevésbé drága tápfolyadékot igényelnek; (v) alkalmasak nagy teljesítményű szűrésre (Hiemstra és mtsai, 2018). A legtöbb szakirodalmi vizsgálat során egy cisztás fibrózisos sejtvonalat hasonlítanak össze egy nem cisztás fibrózisos sejtvonallal (Molina és mtsai, 2015; Weiser és mtsai, 2011;

Castellani és mtsai, 2012), amelynek eredményeképp felmerül a különböző genetikai háttérrel rendelkező modellek problémája.

A légúti tenyészetes modellek összetettségének növelése érdekében számos ko-kultúra modellt hoztak már létre, amelyek segítségével nagyobb hasonlóságot lehet elérni az *in vivo* tüdőszövettel. Ezekben a modellekben a tüdőhám sejteket főleg immunsejtekkel tenyésztették együtt, például makrofágokkal vagy hízósejtekkel (Marescotti és mtsai, 2019). Az endotélsejtek fontosságát leírták a hörgőhám sejtvonal polarizáltságának kialakításában, valamint a fertőzésekre adott immunválaszban betöltött szerepében (Blume és mtsai, 2017). Ennek ellenére kevés számú hörgőhám és vaszkuláris endotél ko-kultúra modell található az irodalomban, a CF tanulmányozására pedig még nem hoztak létre ilyen modellt.

1.2.3. Terápiás lehetőségek a cisztás fibrózisban

A tüneti kezelések jelentős fejlődésen mentek keresztül, és ez nagyban hozzájárult a kór lefolyásának lelassításához, így a halálozási átlagéletkor mára meghaladja a 40 évet (Keogh és mtsai, 2018). A tüdőt érintő tünetek kezeléséhez mind gyógyszeres, mind adjuváns/ kiegészítő módszereket is alkalmaznak.

A legkorszerűbb gyógyszeres terápia a CFTR csatornát célzó kismolekulák alkalmazása, ezeket CFTR-modulátoroknak nevezik (Lopes-Pacheco, 2020). Öt fő csoportba sorolják őket: átírást segítő anyagok, korrektorok, potenciátorok, stabilizálók, és amplifikálók. Ezek közül két osztály (potenciátorok és korrektorok) alkalmazása engedélyezett specifikus CFTR mutációkat hordozó betegek esetében. Az első engedélyezett modulátor, az ivacaftor (Kalydeco) a CFTR G551D mutációt veszi célba. Ez egy úgynevezett „kapuzási” mutáció, amely során a csatorna a megfelelő helyen található, de a funkciója sérült. Az ivacaftor megnöveli a csatorna nyitott állapotban eltöltött idejét. A terápia egyik hátránya, hogy a G551D mutáció csak a CF betegek 2,3%-ában van jelen (Rafeeq és Murad, 2017), továbbá a terápia magas költsége is korlátozó tényező lehet (Whiting és mtsai, 2014). Egy másik CFTR modulátor, a lumacaftor ígéretes eredményeket mutatott az $\Delta F508$ mutáció esetén, megnövelte a plazmamembránba eljutó csatornák mennyiségét (Van Goor és mtsai, 2011), azonban működésüket nem javította (Kopeikin és mtsai, 2014). Az önálló mechanizmusok alapján a lumacaftor és ivacaftor kombinációját (Orkambi) javasolják a $\Delta F508$ mutáció esetén (Wainwright és mtsai, 2015). A lumacaftor segíti a hibás fehérje megfelelő helyre szállítását, az ivacaftor pedig kijavítja és fokozza a csatorna aktivitását, ezáltal növeli az ionok és a folyadék áramlását. Ezek a kezelések csak a leggyakoribb mutációkat hordozó betegek számára jelenthetnek megoldást, a ritka vagy

egyedi CFTR mutációt hordozó betegek számára nem alkalmasak. Ezen kívül a túlzott költségek miatt sok beteg számára anyagi okokból nem hozzáférhető a kezelés (Lopes-Pacheco, 2020).

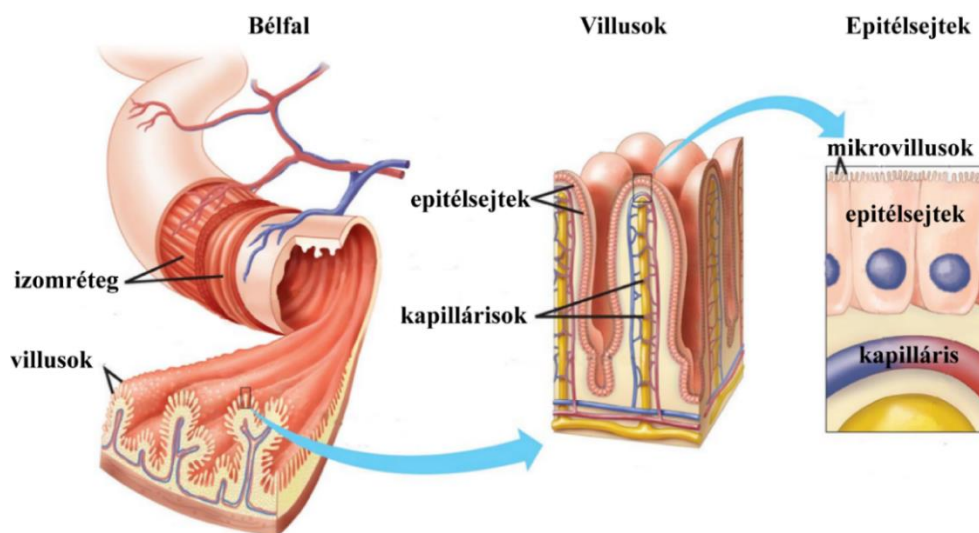
Az adjuváns terápiák fontos részét képezik a betegség kezelésének, céljuk a sűrű nyák felhalmozódásának megakadályozása és a bakteriális fertőzések megelőzése a légúti traktusban. A mellkasi fizioterápia célja a légutakat elzáró besűrűsödött nyák eltávolítása különböző váladékeltávolító technikák segítségével (Radtke és mtsai, 2017). Ezen felül a fizikai erőnlét fokozása is fontos, amely javítja az oxigenizációt, erősíti a légzőizmokat, illetve elősegíti a váladékürülést. A cisztás fibrózisos betegek tüdejében a két leggyakoribb bakteriális patogén a *Pseudomonas aeruginosa* és a *Staphylococcus aureus*. A *P. aeruginosa* fertőzés felelős elsősorban a betegek nagyszámú elhalálzásáért (Emerson és mtsai, 2002), kezelésére különböző antibiotikum terápiákat alkalmaznak (Hancock és Speert, 2000). A fertőzések következtében kialakuló neutrofil sejtek által kiváltott gyulladás csökkentésére különböző gyulladáscsökkentőket mint az ibuprofént vagy kortikoszteroidokat, továbbá N-acetilcisztein kezelést alkalmaznak (McElvaney és mtsai, 2019). A besűrűsödött nyák oldásában nagy szerepe van az inhalált váladékoldó szereknek. Ezek közé tartozik a hipertóniás (7%) sóoldat, a mannitol szárazpor vagy a dornáz alfa, egy humán rekombináns dezoxiribonukleáz I, amely a neutrofil granulociták DNS-ét hasítja (Agent és Parrott, 2015).

A nátrium bikarbonátot, mint nyákoldót, régóta alkalmazzák a gyógyászatban, és empirikusan a CF terápiában is, mint adjuvánst (pl. Salvus víz inhaláció). A nátrium bikarbonát hatását CF-ben azonban alig vizsgálták. A CF sertés modelljében a savas pH csökkentette az antimikrobiális peptidek baktériumölő képességét a légutakban, amelyet normalizált a porlasztott nátrium bikarbonát inhalálása (Pezzulo és mtsai, 2012). A nátrium bikarbonát nemcsak helyreállítja az antimikrobiális peptidek aktivitását, de közvetlen bakteriosztatikus hatása is van, gátolja a betegségre jellemző baktériumok biofilm-képződését (Dobay és mtsai, 2018). Az egyetlen tavaly közzétett klinikai vizsgálat során a porlasztott nátrium bikarbonát inhalációja biztonságos és jól tolerálható adjuváns szernek bizonyult, átmenetileg megemelte a légúti folyadék pH értékét, valamint csökkentette a köpet viszkozitását és viszkoelaszticitását (Gomez és mtsai, 2020). Eddig azonban direkt hatását még nem tesztelték légúti tenyészetes modelleken.

1.3. A bélhám

Az emésztőrendszernek a legnagyobb a külső környezettel érintkező felülete, hozzávetőlegesen 200 m² (Deli, 2009). Ezzel összefüggésben egyike azoknak a szerveknek, amelyek nagyfokú antigén terhelésnek vannak kitéve. Az emésztőrendszer általános feladata az elfogyasztott tápanyagok emésztése enzimek szekréciójának és a tápanyagok felszívódásának összetett folyamatain keresztül. Emellett a gasztrointesztinális epiteliális gát megakadályozza a potenciálisan káros anyagok – kórokozók, antigének, gyulladást előidéző faktorok – nyálkahártyán keresztüli eljutását a bél lumenéből a belső környezetbe, miközben lehetővé teszik olyan anyagok szelektív átjutását, amelyek a bél immunrendszerének fejlődését és az immuntoleranciát segítik elő (Salvo Romero és mtsai, 2015).

A bélcsatorna nyálkahártyájának nagy részét polarizált, egyrétegű köbhám sejtek rétege borítja, amely 3-5 naponta folyamatosan megújul. Ebben az egysejtrétegben a legtöbb sejt enterocita (kb. 80%), mellettük megtalálhatóak még a nyáktermelő kehelysejtek és a defenzint szekretáló Paneth sejtek (Van der Flier és Clever, 2009). A sejtek között kapcsoló fehérjék találhatók, amelyek az epitelsejtek specifikus funkcióinak ellátásához szükséges szerkezeti polaritást biztosítják: a sejtek apikális felszínén található a kefeszegély (mikrovillusok vagy mikrobolyhok), amely megnövelt felszínt biztosít a tápanyagok felszívódásában a receptor- és szállítófehérjék segítségével (6. ábra).



6. ábra. A bélfal felépítése és a bélhám szerkezete (Taghipoor, 2012 alapján, módosítva).

A bélhámon keresztüli anyagátjutás két útvonalon keresztül valósulhat meg, a sejten keresztüli transzcelluláris, valamint a sejtek közötti, paracelluláris útvonalon. Transzcellulárisan passzív diffúzióval jutnak át a zsírban oldódó anyagok, míg a vízben

oldódó molekulák és tápanyagok átjutása aktívan, szállítófehérjék segítségével történik. A paracelluláris útvonalon keresztüli anyagáramlást a sejtközi kapcsolatok szabályozzák, amelyek fontos szerepet játszanak a gátrendszeren keresztüli hatóanyag átjutás gátlásában (Deli, 2009). Az intesztinális epitélium felszínét a kehelysejtek által termelt nyák borítja, amely megakadályozza a nagyobb részecskék, baktériumok közvetlen érintkezését az epitélsejt réteggel (Turner, 2009). A nyálka hidratációjának fontosságát a CF során létrejövő elváltozások is jól mutatják: ebben a betegségben a hiperviskózus nyálka termelése hozzájárul a tüdőben, hasnyálmirigyben és bélben kialakuló tünetekhez.

1.4. A bél- és tüdőhám mint gyógyszerbeviteli kapu

Hatóanyag felszívódás szempontjából a legjobban szabályozható gyógyszeradagolási mód az intravénás infúzió. Előnyös tulajdonságai mellett azonban számos hátránnyal rendelkezik: invazív, költséges, beadásához szakképzett személyzet és/vagy kórházi ellátás szükséges (Kürti és mtsai, 2009). Ebből adódóan a legelterjedtebb módszer a gyógyszerek szájon keresztüli beadása: a betegek együttműködése magas, minimális kényelmetlenséget okoz, emellett biztonságos, hatékony és könnyen hozzáférhető. A gyógyszer-molekulák fő felszívódási helyének a vékonybél alsó szakaszát (éhbél és a csípőbél) tekintik. Ez a szakasz kiváló vér- és nyirokkeringéssel rendelkezik, a felszínét borító bélbolyhok megnövelik a felszívódási felszínt, valamint az itt lévő sejtközi szoros kapcsolatok kevésbé zártak összehasonlítva az emésztőrendszer többi részével, amit az alacsony transzepiteliális elektromos ellenállás értékek is tükröznek (Ward és mtsai, 2000). Azonban a hatóanyag a bélből a portális vénán keresztül először a májba jut, ahol jelentős része metabolizálódhat és csak ezután kerül be a szisztémás keringésbe, majd onnantól az egyes szervekbe és szövetekbe.

Napjainkban egyre elterjedtebb az alternatív gyógyszerbeviteli kapukon keresztüli gyógyszeradagolás, amely történhet a bőrön, az orr-, száj-, végbél- vagy a tüdőnyálkahártyán keresztül. Nagy előnyük, hogy az így bejuttatott hatóanyag elkerüli a *first pass* metabolizmust a májban, emellett gyors gyógyszer felszívódást biztosítanak a szisztémás keringésbe (Ward és mtsai, 2000). A tüdő elterjedt alternatív beviteli kapunak számít nagy alveoláris felülete (kb. 160 m²), nagyfokú vaszkularizációja, valamint az emésztőrendszerrel eltérő gyógyszer metabolizáló környezete miatt (Agu és mtsai, 2001). A helyi hatások mellett nagy potenciállal rendelkezik a szisztémás keringés célzására is (Scheuch és mtsai, 2006).

A gyógyszerek felszívódását nagyban befolyásolja a tüdőben és az emésztőrendszerben is megtalálható nyálkaréteg és a sejtek közötti szoros kapcsolatok. Előbbi

extracelluláris barrierként működik, amelynek elváltozásai a különböző betegségekben, többek között CF során, befolyásolja a gyógyszerek oldódását, felszívódását (Bhat és mtsai, 1996). Légzőszervi megbetegedések kezelésénél fontos tényező a légutak felszínét borító folyadék állaga a hatékony tracheobronchiális gyógyszerbejuttatáshoz (Widdicomb, 1997). CF betegekben a légutakat borító nyálka sűrűsége és pH-ja megváltozik, amely a légáramlás csökkenését, az inhalált hatóanyagok, terápiás szerek felszívódását illetve célbajutását lassítja és akadályozza (Bhat és mtsai, 1996). A bélrendszerben szintén fontos szerepe van a hámsejteket borító nyálkahártya rétegnek, ami elősegíti egy nem kevert vízréteg kialakulását, a gyógyszereknek először ezen a rétegen kell átjutnia, mielőtt felszívódnának a hámon keresztül (Khanvilkar és mtsai, 2001). Szintén fontos fizikai korlátozó tényezőnek számítanak az epitélsejtek közötti szoros kapcsolatok, amelyek a vízdékony molekulák és fehérjék mellett számos hatóanyag átjutását is gátolják a hámsejteken.

1.5. Gyógyszerbejutás fokozásának lehetőségei

A biológiai gátrendszeren keresztüli hatóanyag bejutás fokozására három alapvető stratégia létezik: (i) alternatív útvonalak használata; (ii) a hatóanyag módosítása; (iii) a gátrendszerek célzott megnyitása (Deli, 2009).

Az alternatív beviteli kapukon keresztüli hatóanyag bejuttatás egyre több figyelmet kap napjainkban, a már korábban is említett előnyös tulajdonságuk miatt. A tüdőn keresztüli hatóanyag bevitelre egy jó példa a pár éve forgalomba került Afrezza, amely lehetővé teszi az inzulin inhalált formában történő adagolását cukorbetegnek (Chan és Cheng-Lai, 2017). Az orron keresztüli gyógyszerbejuttatás hatékonyságát korábban kutatócsoportunk is igazolta. Állatkísérletben a meloxicám hatóanyagot tartalmazó nanorészecskék orron keresztüli adagolása gyors és magas plazma koncentrációt eredményezett, összehasonlítva a szájon keresztüli bejuttatással (Kürti és mtsai, 2013).

A biológiai gátakon keresztüli átjutás fokozható a hatóanyagok kémiai módosításával. A lipofil, erősen kationos molekulák hatékonyabban jutnak át a sejtmembránon és jutnak be például az agyszövetbe: ezt a módszert sikeresen alkalmazták az epilepszia és depresszió kezelésére alkalmas valproinsav esetében (Deli, 2011). Kísérletes és klinikai vizsgálatok alapján a ciklodextrinek is alkalmasak lehetnek agyi gyógyszerbejuttatás fokozására (Vecsernyés és mtsai, 2014). A ciklodextrinek, kiváltképp a hidrofil származékaik, nemcsak szolubilizálják a lipofil hatóanyagokat, hanem komplexképződéssel javítják a gyógyszer felszívódását (Strickley, 2004; Loftsson és mtsai, 2007).

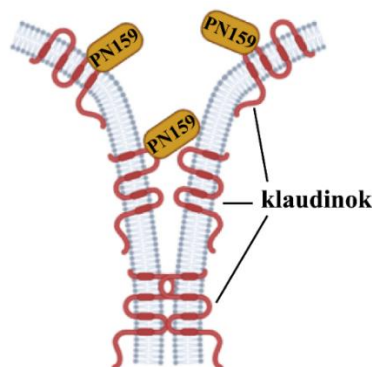
Számos lehetőség létezik a gátrendszerek paracelluláris útjának megnyitására, ezzel fokozva a hidrofíl molekulák, különösen a nagy biofarmakonok, úgymint fehérjék és peptidek, valamint a lipofil és amfifil efflux pumpa ligandok átjutását (Deli, 2009 és 2011). Számos jól jellemzett és hatékony gyógyszerészeti segédanyag létezik, ilyenek az anionos és nem-ionos felületaktív anyagok és a zsírsavak, amelyek széleskörben használtak, mint oldódást segítő ágensek orális, injekciós és nazális formulációkban (Strickley, 2004). Ezek a segédanyagok fokozzák a paracelluláris átjárhatóságot és felszívódást növelő hatásukat számos tanulmányban leírták már (Aungst, 2012). Csoportunk korábbi munkája során nem-ionos felületaktív szukróz észtereket vizsgált a bélhám modelljén: a szukróz észterek a szoros kapcsolatokra hatva növelték a paracelluláris átjárhatóságot ionok, hatóanyagok és jelzőmolekulák számára (Kiss és mtsai, 2014). A gátrendszerek alapját képező szoros kapcsolatok szerkezetének és működési mechanizmusának ismeretében lehetséges olyan modulátor peptidek tervezése, melyek a paracelluláris gát megnyitásával fokozzák a gyógyszerbejutást (Deli, 2009).

1.5.1. Szoros kapcsolatokat módosító peptidek – PN159

Az okkludin volt az első azonosított és klónozott TJ membránfehérje (Furuse és mtsai, 1998), ezt követően fedezték fel a klaudin fehérjecsaládot (Krause és mtsai, 2008). Az okkludin és klaudinok aminosav sorrendjének és másodlagos szerkezetének feltárását követően lehetővé vált olyan peptidek tervezése, amelyek a szoros kapcsolatokra hatva megnyitják a paracelluláris gátat, ezáltal fokozva a különböző gyógyszerek átjutását (7. ábra). A TJ modulátor peptidek széles skáláját szintetizálták meg különböző sejtkapcsoló fehérje szerkezetek alapján és tesztelték le gátrendszer modelleken *in vivo* és *in vitro* (Deli, 2009). Csoportunk korábbi kísérletei során 6 szoros kapcsolatot módosító peptidet vizsgált a bélhám és a vér-agy gát tenyészetes modelljén (Bocsik és mtsai, 2016). Minden peptid a sejtközi kapcsolatok reverzibilis megnyílását okozta, azonban a leghatásosabbnak a PN159 peptid bizonyult mindkét modell esetén (Bocsik és mtsai, 2016).

A PN159 peptidet 1996-ban írták le először, mint egy szintetikus antimikrobiális hatású, amfipatikus sejtpenetráló peptidet (CPP). Aminosav szekvenciája miatt (KLALKLALKALKLA-amid) KLAL peptidnek is nevezik (Dathe és mtsai, 1996). Egy másik megnevezése a MAP, amely a modell amfipatikus peptid rövidítésből származik (Oehlke és mtsai, 1998; Hällbrink és mtsai, 2001). A peptid TJ módosító hatását először bronchiális epitélisejteken írták le (Johnsson és Quay, 2005). A PN159 peptid hatásosan növelte a légúti hám áteresztőképességét mind tenyészetes, mind állat kísérletekben (Chen

és mtsai, 2006), azonban a specifikus célfehérje ismeretlen volt. Csoportunk kimutatta, hogy a PN159 peptid a kladin-1 és -5 fehérjék extracelluláris doménjével (extracellular loop 1) lép kölcsönhatásba (7. ábra) (Bocsik és mtsai, 2016).



7. ábra. A PN159 peptid kapcsolódik a kladin fehérjék extracelluláris doménjéhez, ezáltal megnyitja a paracelluláris útvonalat.

Mivel a PN159 peptid α -helikális másodlagos fehérjeszerkezetet mutat, erős kölcsönhatásba lép a biológiai membránokkal és sejtpenetráló hatású (Dathe és mtsai, 1996; Arouri és mtsai, 2013). A CPP-k rövid, 5-30 aminosavból álló természetes vagy szintetikus peptidek, amelyek számos kis- és makromolekulát (nukleinsavak, fehérjék) képesek szállítani a sejtmembránon keresztül (Copolovici és mtsai, 2014). A legkutatottabb CPP-k közé tartoznak az amfipatikus peptidek: ezek mind hidrofíli, mind hidrofób tulajdonságokkal rendelkeznek, és kifejezetten lizin, arginin, leucin és alanin gazdagok. A PN159 peptid is ebbe a csoportba tartozik (Dathe és mtsai, 1996; Oehlke és mtsai, 1998). A CPP-k felépítése nagyban hasonlít a veleszületett immunitás részét képező antimikrobiális peptidekéhez, ennek megfelelően a patogénekkal szemben ezek is mutatnak antimikrobiális hatást (Palm és mtsai, 2006). Az antibiotikum rezisztens baktériumok egyre nagyobb klinikai problémát jelentenek, főképpen az úgy nevezett ESKAPE kórokozók: *Enterobacter species*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* és *Enterococcus faecium* (Boucher és mtsai, 2009). A mikrobáknak ez a csoportja felelős a nagyszámú kórházi fertőzésekért szerte a világon. A CPP-k ígéretes alternatívák lehetnek az antibiotikum-rezisztencia leküzdésében, ugyanis antibiotikum rezisztens *Escherichia coli* törzsek megnövekedett érzékenységet mutattak antimikrobiális peptidekkel szemben (Lázár és mtsai, 2018).

2. Célkitűzések

Az adjuváns terápiák fontos szerepet játszanak különböző betegségek tüneti kezelésében. Munkánk során a cisztás fibrózisban empirikusan alkalmazott nátrium bikarbonát hatását vizsgáltuk humán tenyészetes epitélsejt modelleken. Az a néhány tanulmány, amely a nátrium bikarbonátot CF-ben vizsgálta, előnyös hatásáról számolt be állatmodellen, baktériumokon és betegeken. A nátrium bikarbonát közvetlen hatását azonban bronchiális epitélsejtekre eddig még nem vizsgálták. Kísérleteinkben az élő szervezet komplexitását jobban tükröző tenyészetes modellt alkalmaztunk: egy új légúti kultúra modellt hoztunk létre, amelyben humán vad típusú és CF bronchiális epitélsejteket humán vaszkuláris endotélsejtekkel tenyésztettünk együtt.

A gátrendszeren keresztüli gyógyszer bejuttatás egyik korlátozó tényezője a sejtek közötti szoros kapcsolat. Ahogy csoportunk korábban már igazolta, a hatóanyagok célbajuttatását fokozni lehet a TJ-k reverzibilis megnyitásával, ezért további célunk volt a sejtközötti kapcsolatokat megnyitó, biológiailag aktív PN159 peptid vizsgálata a légúti- és bélhám tenyészetes modellejein. Mivel a PN159 sejtpenetráló hatású is, a peptid antimikrobiális hatását megvizsgáltuk ESKAPE patogéneken, amelyek közé tartozik a CF-re jellemző *S. aureus* és *P. aeruginosa*.

Munkánk során a következő kérdésekre kerestük a választ:

1. Milyen hatást fejtenek ki a bronchiális epitélsejtek gátműködésére az endotélsejtek, valamint a különböző tenyésztési körülmények?
2. Hogyan hat a nátrium bikarbonát a bronchiális sejtek életképességére, gátműködésére, az intracelluláris pH-ra és a CFTR csatorna immunfestésére?
3. Milyen hatást fejt ki a PN159 peptid
 - a légúti és bélhám tenyészetes modelljein a gátműködésre és morfológiára?
 - az ESKAPE bakteriális patogének életképességére?

3. Anyagok és módszerek

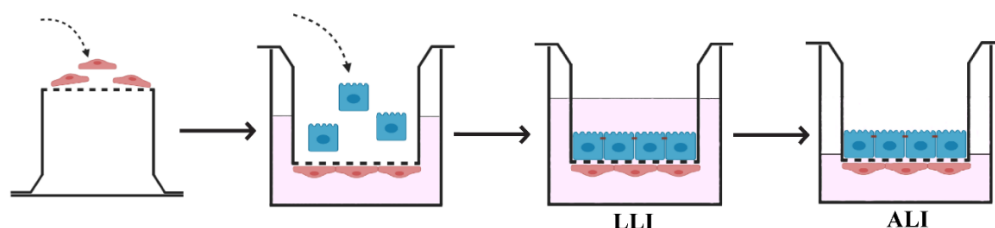
3.1. Vegyszerek

A kísérleteink során használt laborárúk, reagensek és vegyszerek beszerzési forrása, hacsak másképpen nem jelöltük, a Sigma-Aldrich Kft., Magyarország volt. A PN159 peptidet Dr. Fülöp Livia (SZTE, Orvosi Vegytani Intézet) biztosította számunkra.

3.2. Sejtenyésztés

3.2.1. A humán cisztás fibrózis bronchiális tüdőepitél sejtvonalak tenyésztése

A humán cisztás fibrózis bronchiális epitél (CFBE) sejt párt Dr. Bebők Zsuzsa biztosította részünkre (Bebők és mtsai, 2005). A CFBE41o- sejt vonalat – ezek a sejtek eredendően nem expresszálnak endogén CFTR csatornát – vad típusú CFTR csatornát (WT-CFTR) és a leggyakoribb CFTR csatorna mutációt ($\Delta F508$ -CFTR) hordozó plazmával transzfektálták (Bebők és mtsai, 2005). A CFBE sejteket 10% borjúsavóval (FBS, Pan-Biotech GmbH, Németország), glutaminnal (Glutamax, 2 mM) és gentamicinnel (50 $\mu\text{g/ml}$) kiegészített Minimum Eagle Medium (MEM) tápfolyadékban tenyésztettük inkubátorban 37 °C-on, 5% CO_2 -tartalom mellett. A sejteket ($\leq P18$) növesztés során puromicin (2 $\mu\text{g/ml}$) szelekció alatt tartottuk, hogy a transzgének kifejeződését biztosítsuk. A tenyésztő felszíneket patkányfarok ínból kinyert kollagénnel vontuk be, így segítve a sejtek letapadását és növekedését. A tápfolyadékot kétnaponta cseréltük. A permeabilitási kísérletekhez a tüdő epitélsejteket 12-lyukú tenyésztőedényekbe helyezett sejtenyésztő betéteken növesztettük (Transwell, poliszter membrán, 0,4 μm pórusméret, 1,1 cm^2 membránfelszín, Corning Costar Co., USA). A kezdeti sejtszám 10^5 sejt/ cm^2 volt, majd az epitélsejteket 10 napig növesztettük monokultúrában, vagy az endotélsejtekkel ko-kultúrában (**8. ábra**).



8. ábra. A ko-kultúra összeállítása. 1. lépés: endotélsejtek kirakása az inwert aljára; 2.lépés: 4 óra elteltével az epitélsejtek szélesztése az inwert belsejébe; 3. lépés: inwert feltöltése médiummal. Pár nap elteltével levegő-folyadék tenyészet létrehozása.

A folyadék-folyadék határfelületen (LLI) növesztett sejtek esetén a felső kompartmentbe 0,5 ml, az alsó kompartmentbe 1,5 ml tenyésztőfolyadék került. A levegő-folyadék határfelületen (ALI) történő tenyésztéshez a tápfolyadékot három nap elteltével

leöntöttük a konfluens epitelsejt rétegről, míg az alsó kompartmentben lévő endotelsejtek 1 ml friss tápfolyadékot kaptak (**8. ábra**). A kísérleteket 10 nap elteltével végeztük el, amikor a sejtréteg állandó, stabil ellenállás értékeket mutatott.

3.2.2. A humán endotelsejtek tenyésztése

A ko-kultúra létrehozásához használt humán hematopoetikus őssejtekből származó endotelsejteket (Pedroso és mtsai, 2011; Cecchelli és mtsai, 2014) endotelsejt médiumban (ECM-NG, Sciencell, Carlsbad, USA) tenyésztettük, amit 5% borjúsavóval, 1% endoteliális növekedési faktorról (ECGS, Sciencell) és 0,5% gentamicinnel egészítettünk ki (Vandenhoute és mtsai., 2016). A sejtek növesztéséhez a tenyésztő felületeket 0,2%-os zselatin oldattal vontuk be. A permeabilitási kísérletekhez először az endotelsejteket szélesztettük a sejttenyésztő betét membránjának alsó, úgynevezett abluminális felszínére ($\leq P9$; 8×10^4 sejt/cm²), amit előtte IV típusú kollagénnel és a fibronektinnel vontunk be, majd a sejteket 3 órán át inkubátorban tartottuk. A sejtek letapadását követően a sejttenyésztő betéteket a 1,5 ml endotél médiumot tartalmazó 12-lyukú tenyésztőedényekbe helyeztük, majd a tüdőepitel-sejteket a membrán felső, úgynevezett lumenális felszínére pipettáztuk (**8. ábra**).

3.2.3. A humán Caco-2 bélepitél-sejtvonal tenyésztése

A humán Caco-2 bélhám eredetű adenokarcinóma sejtvonalat az ATCC cégtől szereztük be (katalógus szám: HTB-37). A sejteket 10% borjúsavóval (Gibco, Life Technologies, USA) és 0,5% gentamicinnel kiegészített DMEM/HAM F-12 (Gibco, Life Technologies) médiumban tenyésztettük inkubátorban 37 °C-on, 5% CO₂ tartalom mellett. A tenyésztési felületeket patkányfarok kollagénnel (0,05%) vontuk be.

3.3. Vizsgálati módszerek és kezelések

3.3.1. A humán cisztás fibrózis bronchiális epitelsejtek kezelése

A CFBE sejtvonalakban a vad típusú és mutáns CFTR csatornák jelenlétének igazolásához a tenyészeteket a CFTR csatornát aktiváló és gátló szerekkel kezeltük meg. A CFTR csatorna-aktivátor 8-(4-klór-fenil-tio)-cAMP (cAMP) törzsoldatát (25 mM) steril desztillált vízben készítettük el, majd a kezelésekhöz tápfolyadékban 250 μ M koncentrációra hígítottuk. A cAMP lebomlásának elkerülése érdekében cAMP-specifikus foszfodiészteráz 4 inhibitor (RO 201724, 17,5 μ M) adtunk a kezelési oldathoz.

A CFTR inhibitor 3-[(3-trifluormetil) fenil]-5-[(4-karboxifenil) metilén]-2-tioxo-4-tiazolidinon (CFTR_{inh}-172) törzsoldatát (100 mM) dimetil szulfoxidban (DMSO) készítettük

el, majd az 1 órás kezeléshez tápfolyadékban 10 μM -os koncentrációra hígítottuk. A cisztás fibrózisos betegek tüdejében megfigyelhető gyulladásos állapot modellezésére a mono- és ko- kultúrákat TNF- α (50 ng/ml) és IL-1 β (25 ng/ml) kombinációjával kezeltük a sejtenyésztő betét mindkét oldalán. A CFTR aktiváló és gátló szerekkel, valamint a citokinekkal végzett kezelések után a sejtrétegek integritását elektromos ellenállás és permeabilitás mérésekkel vizsgáltuk meg.

A nátrium bikarbonát (NaHCO_3) hatásának tesztelésére 50, 100 és 200 mM kezelési oldatokat készítettünk. A MEM tápfolyadék gyárilag 26 mM nátrium bikarbonátot tartalmaz. Az 500 mM-os törzsoldat előállításához 5,5 ml tápfolyadékban 200,5 mg NaHCO_3 -t oldottunk fel, majd 0,2 μm fecskendőszűrőn sterilre szűrtük. A kezelőoldatokat a törzsoldatból hígítottuk és frissen készítettük a kísérletek előtt. Az életképességi vizsgálathoz 50, 100 és 200 mM koncentrációkat, a sejtrétegek gátműködésének vizsgálatához és az intracelluláris pH mérésekhez 100 mM bikarbonát koncentrációt használtunk. Az inhalált nátrium bikarbonát kezelés modellezésére csak a tüdőepitelsejteket kezeltük a tenyésztőbetétek felső (apikális) folyadékterében.

3.3.2. A CFBE sejtek életképességének vizsgálata valósídejű sejtanalízissel

A sejtenyészetek biológiai állapotának, letapadásának, növekedésének és életképességének jelzőanyag nélküli, valósídejű nyomonkövetésére impedancia mérést használtunk (RTCA-SP, ACEA Biosciences, USA). A rendszer nagy előnye, hogy a sejtek monitorozása folyamatos, a mérés zavarásmentesen, fiziológiás körülmények között zajlik. Ezt a módszert csoportunk már számos kísérletben alkalmazta (Kiss és mtsai, 2013). A cisztás fibrózis bronchiális epitelsejteket egy speciális, 96-lyukú lemezen (E-plate, ACEA Biosciences) tenyésztettük, aminek az alján impedancia mérésére alkalmas arany mikroelektrodák találhatók (**9. ábra**). A mérés előtt a háttér impedancia meghatározásához sejtmentes tápfolyadékot használtunk. A sejtek növekedésével és letapadásával arányosan emelkedik a mért impedancia, amit a sejtindex (CI) értékével fejezünk ki. A sejtindexet a rendszer programja számolja ki az $(R_n - R_b)/15$ képlet segítségével, ahol R_n a sejtek és az elektród között mért impedancia, az R_b pedig a háttér impedancia, amit a sejtmentes tápfolyadék esetében mérünk. Az E-plate lemezek lyukait kollagénnel (0,05%) vontuk be, majd 30 percig UV alatt szárítottuk. A háttér impedancia méréséhez 50 μl sejtmentes tápfolyadékot pipettáztunk a lyukakba.



9. ábra. RTCA-SP valós idejű sejtanalizáló műszer (ACEA, www.aceabio.com/products/rtcasp).

Ezt követően 50 µl sejtuszupenziót (10^4 sejt/lyuk) mértünk a lemez lyukaiba. A készülék mérőegységét az E-plate-tel együtt a 37 °C-os CO₂ inkubátorba helyeztük és a bronchiális epitélsejteket addig tenyésztettük, amíg a sejtek teljesen benőtték a lyukak felszínét és az impedancia nem nőtt tovább (platófázis). Ekkor a sejteket 50, 100, 200 mM nátrium bikarbonát tartalmú tápfolyadékkal kezeltük meg. A műszer a sejtindexet ezután 24 órán keresztül 10 percenként rögzítette. Az impedancia értékeket a kezelés előtti utolsó időpont értékeihez normalizáltuk, így határoztuk meg a nátrium bikarbonát sejtekre kifejtett hatását, amit az idő függvényében ábrázoltunk. Teljes sejtpusztulást okozó referencia vegyületként Triton X- 100 detergenst (TX-100; 10 mg/ml) használtunk.

3.3.3. A CFBE sejtrétegek gátműködésének vizsgálata

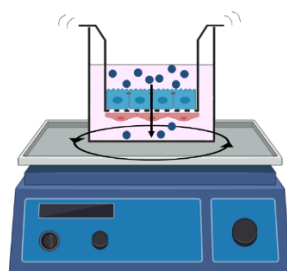
3.3.3.1. A transzepiteliális elektromos ellenállás mérése

Az epitélsejtek közötti szoros kapcsolatok korlátozzák az anyagok szabad átjutását a paracelluláris útvonalon keresztül. A tenyészetekben mért transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) értéke a sejtek közötti szoros kapcsolatok nátrium-ionnal szembeni áteresztőképességét mutatja, mivel a fiziológias testnedvekhez hasonlóan, a tenyésztő és a pufferoldatokban is a nátrium-ion van jelen a legnagyobb koncentrációban (150 mM) (Benson és mtsai, 2013). A humán CFBE sejtvonalak sejtrétegeinek ellenállásértékeit EVOM rezisztencia-mérővel és STX-2 elektródákkal (World Precision Instruments, USA) mértük a mono- és ko-kultúrákon a tápfolyadék cseréje előtt minden második nap. A TEER értékekből levontuk a tenyésztő betéteken sejtek nélkül mért ellenállásértékek átlagát ($\sim 100 \Omega \times \text{cm}^2$), majd a tenyésztőmembrán felszínéhez viszonyítva ($\Omega \times \text{cm}^2$) átlagoltuk és ábrázoltuk a TEER értékeket. Az ellenállás mérést a kísérletek előtt és közvetlenül utána is elvégeztük. A levegő-folyadék határfázison tenyésztett CFBE sejteknél az ellenállás mérése

előtt az alsó és felső folyadéktérbe 500-500 µl friss tápfolyadékot pipettáztunk, majd a lemezeket CO₂ inkubátorban 15 percig inkubáltuk a hőmérséklet és pH kiegyenlítődésének biztosításához.

3.3.3.2. Permeabilitási vizsgálatok

A sejtréteg szorosságának meghatározásához két olyan jelzőanyagot használtunk, amelyekre a sejtréteg áteresztőképessége élettani körülmények között alacsony, ezek a nátrium fluorescein (SF; 376 Da) és a szérum albumin, amit Evans-kék festékkel jelöltünk (EBA; 67 kDa). Ezeknek a permeabilitási jelzőmolekuláknak az átjutását mind a kontroll, mind a kezelt csoportokon megmértük (**10. ábra**).



10. ábra. A permeabilitási kísérletekhez a tenyésztőbetéteket a sejtekkel többlyukú lemezekbe helyeztük és a jelzőanyagokat a felső folyadéktébe mértük (kék pöttyök). A lemezeket síkrázón az inkubátorba tettük. A kísérlet során a jelzőanyagok az alsó folyadéktérbe jutnak (nyíl).

A kezelést követő TEER mérés után a tenyésztőbetéteket 12-lyukú tenyésztő-lemezekbe helyeztük, amely lyukanként 1,5 ml steril, 37 °C-os Ringer-Hepes oldatot (118 mM NaCl, 4,8 mM KCl, 2,5 mM CaCl₂, 1,2 mM MgSO₄, 5,5 mM D-glükóz, 20 mM Hepes, pH 7,4) tartalmazott az alsó (bazális) folyadéktérben. A felső (apikális) folyadéktérbe 500 µl Ringer-Hepes oldatot pipettáztunk, amely SF (10 µg/ml) és EBA (1 mg/ml BSA + 167,5 µg/ml Evans-kék) jelzőanyagokat tartalmazott. A tenyésztőedényeket kísérlettől függően 30 vagy 60 percen keresztül 37 °C-on CO₂ inkubátorban síkrázó készüléken (120 fordulat/perc; OS10 síkrázó, BioSan, Lettország) tartottuk (**10. ábra**). Az enyhe rázással biztosítottuk az oldatok folyamatos mozgását, ami a permeabilitásmérés fontos része (Youdim és mtsai, 2003). Az átjutott jelzőanyag mennyiségét az alsó kompartmentből összegyűjtött mintákból többlyukú lemezleolvasóval (BMG Fluostar Optima, BMG Labtech, Németország) határoztuk meg. A fluorescein emisszióját 485 nm hullámhosszon történő gerjesztést követően 520 nm-en, míg az EBA elnyelését 584 nm-en történt gerjesztés után 680 nm-en mértük. A látszólagos permeabilitási együtthatót (P_{app}) a következő képlet segítségével határoztuk meg:

$$P_{app}(\text{cm/s}) = \frac{[C]_B \times V_B}{A \times [C]_A \times t}$$

ahol $[C]_B$ az alsó kompartment mintáiban mért jelzőanyag-koncentráció, $[C]_A$ a felső kompartmentbe mért kiindulási jelzőanyag-koncentráció, V_B az alsó kompartment térfogata (1,5 ml), A a membrán felszíne (1,12 cm²) és t a permeabilitás vizsgálat időbeni hossza (30 perc vagy 1 óra).

3.3.4. Immunhisztokémia

Az immunfestésekhez használt ellenanyagok és reagensek listáját az **1. táblázat**ban soroljuk fel. Az elsődleges ellenanyagokkal a sejteket 4 °C-on egy éjszakán keresztül inkubáltuk. Másnap a mintákat a másodlagos ellenanyaggal és a bisz-benzimid sejtmagfestéssel (Hoechst 33342; 1 µg/ml) szobahőmérsékleten egy órán keresztül festettük. Az ellenanyagokkal és reagensekkel (lektin és falloidin) történő kezelések között és után a mintákat háromszor mostuk PBS-ben, majd lefedtük (Fluoromount-G, Southern Biotech, USA).

1. táblázat. A kísérletek során használt elsődleges és másodlagos ellenanyagok és reagensek. (A: Alexa Fluor)

Antitest neve	Forgalmazó	Katalógus szám	Gazda szervezet	Hígítás	Antitest regisztrációs szám
anti-ZO-1	Invitrogen	61-7300	nyúl	1:200	AB_138452
anti-β-katenin	Sigma	C2206	nyúl	1:200	AB_476831
anti-E-kadherin	BD Biosciences	610181	egér	1:200	AB_397580
anti-CFTR	Alomone Labs	ACL-006	nyúl	1:200	AB_2039804
anti-klaudin-4	Thermo Fisher Scientific	32-9400	egér	1:200	AB_2533096
anti-nyúl-IgG-A488	Thermo Fisher Scientific	A11034	kecske	1:400	AB_2576217
anti-egér-IgG-A488	Invitrogen	A21202	kecske	1:400	AB_141607
anti-nyúl-IgG-Cy3	Sigma	C2306	bárány	1:400	AB_258792
WGA-A488	Invitrogen	W11261	–	–	–
Falloidin-Atto647N	Thermo Fisher Scientific	A22287	–	1:200	AB_2620155

A különböző körülmények között tenyésztett, valamint a nátrium bikarbonáttal és PN159 peptiddel kezelt CFBE sejtvonalpár morfológiai különbségeinek vizsgálatához a sejtkapcsoló fehérjék immunhisztokémiai festését végeztük el. A sejteket a kezelések után

foszfát puffer oldattal (PBS) mostuk és 3%-os paraformaldehid (PFA) oldattal fixáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. Ezután a sejteket 0,2% TX-100 oldattal permeabilizáltuk 10 percig, majd a nem specifikus kötőhelyeket 3% borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó PBS-ben blokkoltuk 1 órán át. A CFBE sejtvonalak festéséhez nyúl anti-ZO-1, nyúl anti- β -catenin és egér anti-E-cadherin elsődleges ellenanyagokat használtunk. Másodlagos ellenanyaggal történő festéskor Alexa Fluor-488 jelölt anti-egér és a Cy3-jelölt anti-nyúl ellenanyagot használtuk sejtmagfestékekkel kombinálva (**1. táblázat**).

A CFTR csatorna elhelyezkedésének meghatározásához a sejteket nyúl anti-CFTR antitesttel és Alexa-488 jelölt búzacsíra agglutinin (WGA) lektinnel jelöltük meg. A WGA lektin a sejtek felszínét borító glikokalix N-acetil-D-glükózamin és szíálsav részeit festi meg. Fixálás és mosás után adtuk a sejtekhez a WGA festéket (5 μ g/ml), amivel 10 percig inkubáltuk a mintákat (Betteridge és mtsai, 2017). Ezt követte a sejtek permeabilizálása, a nem specifikus kötőhelyek blokkolása és a CFTR antitest hozzáadása a mintákhoz. Másnap hozzáadtuk a másodlagos antitestet, a Cy3-jelölt anti-nyúl IgG-t valamint a sejtmagfestéket.

Kettős sejtmagfestéssel vizsgáltuk a nátrium bikarbonát hatását a CFBE sejtek életképességére, és a PN159 peptid membrán permeabilizáló hatását a Caco-2 sejteken. A bisz-benzimid sejtmagfesték mind az élő, mind a sérült sejtek sejtmagi DNS-ét kékre festi, míg a vörös fluoreszcens jelet adó etidium homodimer-1 (EH-1) festék csak a permeábilissá vált sejtmembránon keresztül képes bejutni a sejtmagba, így alkalmas sejtleletképesség és membrán permeabilitás vizsgálatokra. Az EH-1 festéket (1 μ M; 856 Da) a kezelések lejárta előtt fél órával adtuk hozzá a sejtekhez, majd mosást követően aceton-metanol 1:1 arányú keverékével fixáltuk a sejteket. A sejtmagok festésén kívül a sejtek közötti szoros kapcsolatok szerkezetét is megvizsgáltuk anti-ZO-1, anti- β -catenin, és anti-E-cadherin festéssel.

A PN159 peptid kezelt Caco-2 sejtek sejtvázának morfológiai változásának nyomkövetéséhez a sejteket fixáltuk (3% PFA), a membránt permeabilizáltuk (0,2% TX-100), majd blokkolás után hozzáadtuk a fluoreszcensen jelölt falloidin festéket a sejtekhez, amelyet egy óra után lemostunk. Hozzáadtuk az elsődleges ZO-1 antitestet, majd másnap a Cy3-jelölt anti-nyúl IgG másodlagos antitestet és a sejtmagfestéket.

A klaudin-4 sejtkapcsoló fehérje és PN159 peptid kolokalizációjának vizsgálatához a sejteket Bodipy FL maleimiddel jelölt PN159 peptiddel (10 μ M) kezeltük 5 percig. Ezután a sejteket jéghideg aceton-metanol (1:1) oldattal fixáltuk 2 percig, majd mosást követően a nem specifikus kötőhelyeket blokkoltuk. Ezután ráértük a sejtekre az egér anti- klaudin-4

elsődleges antitestet, majd másnap anti- egér Alexa 488 másodlagos ellenanyagot adtunk a sejtekhez.

A megfestett mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. Az élősejtes peptid bejutási vizsgálatokat Visitron spinning disk konfokális mikroszkóp (Visitron Systems GmbH, Németország) segítségével végeztük el. Az immunfestésekről Olympus (Olympus Fluoview FV1000, Olympus Life Science Europa GmbH, Németország) vagy Leica TCS SP5 (Leica Microsystems GmbH, Németország) konfokális mikroszkóppal készítettünk felvételeket.

3.3.4.1. Képanalízis

A CFTR csatorna sejten belüli elhelyezkedését és a ZO-1, E-kadherin, β -katenin sejtkapcsoló fehérjék festődésének intenzitását képanalízis segítségével értékeltük ki (MATLAB, The Mathworks Inc, USA). Először a WGA festés segítségével meghatároztuk az apikális membrán területét. Ehhez egy 10 pixel széles 2D Gaussian filterrel a WGA képeket oldalirányban simítottuk. Minden egyes kisimított WGA képszeleten, oszloponként (z-irány) meghatároztuk a sejtek apikális membránjának elhelyezkedését úgy, hogy megkerestük azt a pixel pozíciót, ahol az intenzitás először emelkedik az oszlop maximum értékének 30%-a fölé, a képszelet tetejéről indulva. Miután megállapítottuk a sejtek apikális körvonalát, a sejtmembránra és a citoplazmára térbeli maszkokat számoltunk. A membránmaszkot 12 pixel (2,4 μ m) széles csíkként számítottuk a sejtek felső szélétől kezdve. A citoplazma maszkot a membrán maszk alsó határától a kép teljes aljáig (bazális oldal) határoztuk meg. Végül a térbeli maszkok segítségével kiszámoltuk a CFTR festés pixel intenzitását a membrán és citoplazma területén. Csoportonként 9 képet analizáltunk, minden kép 512 képszeletből állt (4018 képszelet/csoport). A sejtkapcsoló fehérjék immunfestésének intenzitás analíziséhez a képeket területekre szegmentáltuk. Ehhez a K-csoportosításon alapuló képszegmentálási funkciót használtuk, amellyel citoplazma és sejtkapcsolati régiókra bontottuk a képeket. A szegmentálás alapján térbeli maszkokat kaptunk, amiknek a segítségével kiszámoltuk a sejtkapcsoló fehérjék területein mérhető átlagos pixelintenzitást.

3.3.5. A sejtek intracelluláris pH értékének meghatározása

A CFBE sejtek belső nyugalmi pH-jának (pH_i) meghatározásához a sejteket kollagénnel bevont üveg fedőlemezeken (24 mm) növesztettük 35 mm átmérőjű sejtenyésző csészékben (Orange Scientific, Belgium). Mindkét sejttypusnál

2×10^5 sejt/csésze volt a kezdeti sejtsűrűség, majd az egybefüggő sejtrétegek kialakulása után végeztük el az intracelluláris pH mérést. A bikarbonát hatásának vizsgálatához a CFBE sejteket inkubátorban 100 mM bikarbonát tartalmú tápfolyadékkal kezeltük egy órán át. A sejtek mosását követően a 2',7'-bisz-(2-karboxietil)-5-(és-6-) karboxifluoreszcein-acetoximetil észter (BCECF-AM; 2 μ M; Biotium Inc., USA) pH-érzékeny fluoreszcens festékkel töltöttük fel a CFBE sejteket HEPES-puffer oldatban (HEPES-BS; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM D-glükóz, 10 mM HEPES; pH = 7,4). Ezután a sejteket nedves kamrában 37 °C-on 25 percig inkubáltuk. Az üveg fedőlemezeket a sejtekkel belehelyeztük egy Zeiss Axio Observer 7 invert fluoreszcens mikroszkópra (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Németország) szerelt perfúziós kamrába (QE-1, Warner Instruments, USA). A sejteket 495 ($\pm$ 3) nm és 436 ($\pm$ 10) nm hullámhosszon fénnnyel gerjesztettük, és a 495/436 fluoreszcencia kibocsátási arányt 540 ± 20 nm hullámhosszon mértük a pH_i meghatározásához. A mikroszkóp által készített felvételeken tizennégy-tizenhét véletlenszerűen kiválasztott sejtet jelöltünk ki (Region of Interest = ROI), ahol a fluoreszcencia intenzitásokat ZEN szoftver (Carl Zeiss Microscopy GmbH) segítségével mértük. Két másodpercenként egy mérést rögzítettünk. A mérés során a 495 és 436 nm-nél gerjesztett festék emissziós értékek hányadosait rögzítettük (Arány = [Emissziós intenzitás 495 nm-nél gerjesztve]/[Emissziós intenzitás 436 nm-nél gerjesztve]). A sejteket folyamatosan áramoltattuk pufferrel 1–1,5 ml/perc sebességgel. A sejtek nyugalmi pH értékének meghatározásához először rögzítettük az inkubáló oldatban (HEPES, pH = 7,4) a már fent említett arányszámot, majd ezeket az értékeket szintén mértük, amikor különböző pH-jú, magas K^+ (130 mM) tartalmú kalibrációs HEPES puffer oldatot (K-HEPES-BS; 15 mM NaCl, 130 mM KCl, 1 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM D-glükóz, 10 mM HEPES sav) áramoltattunk a sejteken. A kalibrációs oldatok pH értékeit pH = 6,0 és pH = 8,4 között állítottuk be, továbbá 10 μ M nigericin nátrium sóval (Tocris Bioscience, UK) egészítettük ki. A nigericin által a sejtek belső pH-ja megegyezik az oldat pH-jával, és ezen adatokból egy kalibrációs egyenes készíthető. A kalibrációs egyenes segítségével a sejtek nyugalmi állapotában mért arányszámából pH_i kiszámolható.

3.3.6. Az epitelsejt modellek kezelése PN159 peptiddel

3.3.6.1. A humán cisztás fibrózis bronchiális epitelsejtek kezelése

A fluoreszcensen jelölt és jelöletlen PN159 peptidet Dr. Fülöp Livia (SZTE ÁOK, Orvos Vegytani Intézet) állította elő (Bocsik és mtsai, 2016). A CFBE sejtvonalak különböző kezelésekre adott válaszáinak hasonlóságainak és különbségeinek tesztelésére a

PN159/KLAL peptid (NH₂-KLALKLALKALKKAALKLA-amid) hatását is megmértük. A peptidet, ami sejtpenetráló és sejtközi kapcsolatokat megnyitó hatással is rendelkezik, kutatócsoportunk korábban már tanulmányozta (Bocsik és mtsai, 2016). A peptid törzsoldatát (5 mM) DMSO-ban készítettük, a kezelésekhez tápfolyadékban hígítottuk 10 µM koncentrációra. A CFBE monokultúrát 30 percig kezeltük a peptiddel (csak a felső folyadékteret, ahol az apikális sejtkecskák találhatók). A kezelőoldat eltávolítása után két időpontban mértük a TEER és a permeabilitás értékeit: rögtön a peptidhatás után, valamint 24 órával később, a sejtkecskák helyreállási időszakának végén.

3.3.6.2. A humán Caco-2 bél epitelsejtek kezelése, a peptid internalizációja és kolokalizációja

A különböző koncentrációjú (1, 3, 10 µM) PN159 peptid kezelőoldatokat minden kísérlet előtt frissen hígítottuk ki a törzsoldatból. A sejtkecskák morfológiai változásának nyomonkövetéséhez az egy órás kezelést követően a sejtkecskák aktin sejtkecskát és ZO-1 sejtkecskák fehérjéit festettük meg. A CFBE sejtkecskákhoz hasonlóan, kettős magfestést végeztünk el a Caco-2 sejtkecskák az egy órás PN159 peptid kezelését követően. A sejtkecskák festésén kívül a sejtkecskák közötti szoros kapcsolatok szerkezetét is megvizsgáltuk a ZO-1 sejtkecskák fehérje immunhisztokémiai festésével. A PN159 peptid élő sejtkecskákba való bejutásának vizualizációjához a Caco-2 sejtkecskák kollagénnel bevont üvegaljájú Petri-csészékben tenyésztettük. A Bodipy FL maleimiddel (Thermo Fischer, USA) fluoreszcensen jelölt peptiddel 1, 3 és 10 µM koncentrációban kezeltük a sejtkecskák 5 percig. A peptid kezelés előtt 10 perccel a sejtkecskákat Hoechst 33342 festékkel jelöltük meg. A kezelés után az élő sejtkecskák háromszor mostuk 1% FBS-Ringer–Hepes pufferrel, majd ugyanebben az oldatban vizsgáltuk a sejtkecskák konfokális mikroszkóppal. A kladin-4 sejtkecskák fehérje és a peptid kolokalizációjának vizsgálatához a sejtkecskák Bodipy FL maleimiddel jelölt PN159 peptiddel (10 µM) kezeltük 5 percig. A kladin-4 és magfestést követően a mintákról konfokális mikroszkóp segítségével képeket készítettünk.

3.3.7. A PN159 peptid antimikrobiális hatásának meghatározása

A PN159 peptid antimikrobiális aktivitás spektrumát öt ESKAPE kórokozón (*Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter cloacae* spp. *Cloacae*) és egy vankomicin-rezisztens ESKAPE kórokozón (*Enterococcus faecium*) vizsgáltuk (2. táblázat). A PN159 peptid minimum gátló koncentráció (MIC) értékét az ESKAPE kórokozó törzsnél Mueller-Hinton táptalajban határoztuk meg. Az *Enterococcus faecium* esetében, amely nem nő Mueller-Hinton agaron,

agy és szív kivonatot tartalmazó táptalajt használtunk. A MIC értékeket az általános sorozathígítási technika alkalmazásával határoztuk meg (Wiegand és mtsai, 2008). Röviden: 96 lyukú mikrotiter lemezekben 11 lépésből álló sorozat hígításokat készítettünk, törzsenként három biológiai párhuzamossal. A kórokozókat mindegyik lyukba 5×10^5 baktérium/ml sűrűségben oltottuk be, majd a lemezeket 37 °C-on inkubáltuk. A lemezeket 300 fordulat/perc sebességgel rázattuk a 18 órás inkubálás alatt. A sejtnövekedést az optikai sűrűség mérésével követtük nyomon (OD600, Synergy 2 mikrolemez-leolvasó BioTek Instruments Inc., USA). A MIC értékeket a teljes növekedésgátlásként határoztuk meg ($OD600 < 0,05$). Referenciavegyületekként három különböző hatásmechanizmussal bíró baktericid szer antimikrobiális hatását teszteltük. A cefoxitin a sejtfal szintézist gátolja, a gentamicin (Applyhem GmbH, Németország) egy 30S riboszómális alegység gátló, míg a ciprofloxacin egy giráz inhibitor. A cefoxitin és gentamicin esetén a legmagasabb tesztelt koncentrációk a 100 µg/ml voltak, míg a ciprofloxacinnál 10 µg/ml koncentrációt alkalmaztunk.

3.4. Statisztikai kiértékelés

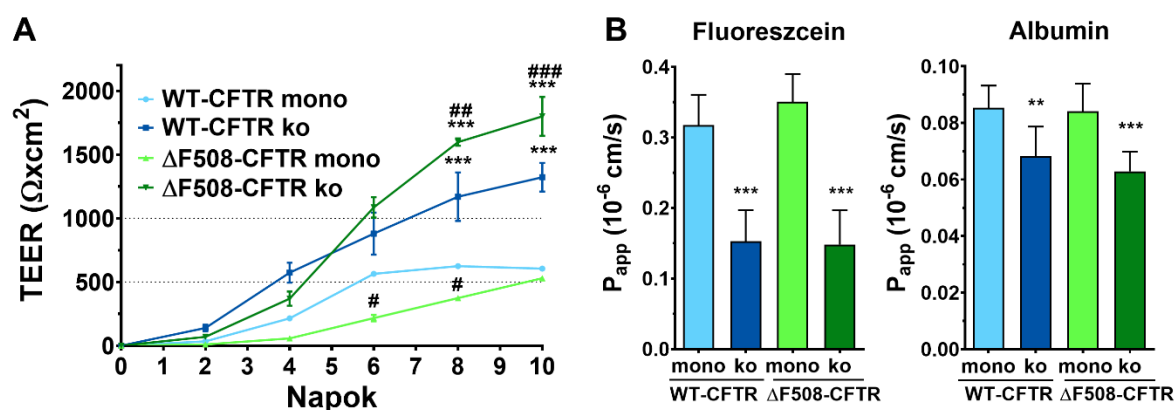
Az adatok statisztikai kiértékeléshez a GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., USA) programot használtuk. A kísérletekben kapott adatokat átlag $\pm$ SD formában adtuk meg. Az egyes kezelési csoportok közötti különbségeket kétutas ANOVA-t követően Bonferroni-teszttel elemeztük. Statisztikailag szignifikánsnak a $P < 0.05$ értékeket tekintettük. A kísérleteket legalább háromszor megismételtük, és kísérletenként legalább három párhuzamos mintát használtunk.

4. Eredmények

4.1. A CFBE sejtek gátműködésének jellemzése mono- és ko-kultúrában

4.1.1. Transzepiteliális elektromos ellenállás és permeabilitási vizsgálatok

A tenyésztőbetéteken növesztett CFBE sejtvonalak szoros sejtréteget hoztak létre mindkét modell esetén a tizedik napra: a transzepiteliális elektromos ellenállás (TEER) értékek meghaladták az $500 \Omega \times \text{cm}^2$ -t (**11A ábra**) és a két, eltérő méretű jelzőmolekula P_{app} értékei az igen alacsonynak számító 10^{-7} cm/s tartományba estek (**11B ábra**).

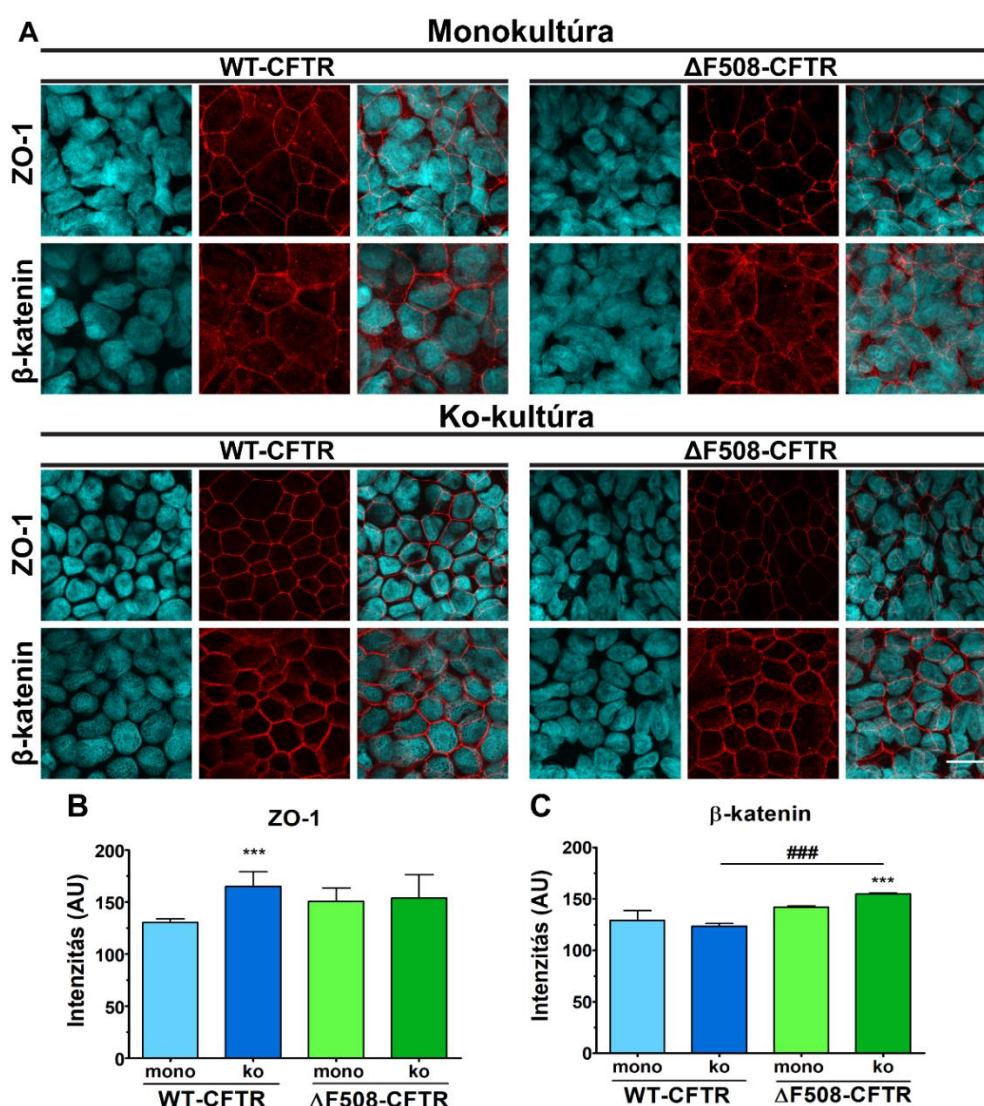


11. ábra. A mono- és humán endotélsejtekkel ko-kultúrában növesztett cisztás fibrózis bronchiális epitélsejtek (CFBE) transzepiteliális elektromos ellenállás (A) és permeabilitási értékei (apikális bazális irányban) (B). Az értékeket átlag $\pm$ SD-ként ábrázoltuk, $n = 4$ /csoport. Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a monokultúrához hasonlítva; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$ az adott vad típusú csoporthoz hasonlítva.

A humán vaszkuláris endotélsejtek jelenléte tovább fokozta a tüdő epitélsejtek biológiai gát tulajdonságait, ahogy azt a magas ellenállási értékek (WT-CFTR CFBE monokultúra: 605 ± 7 , ko-kultúra: $1322 \pm 112 \Omega \times \text{cm}^2$; Δ F508-CFTR CFBE monokultúra: 529 ± 16 , ko-kultúra: $1800 \pm 152 \Omega \times \text{cm}^2$) is jól mutatnak. Az endotélsejtekkel való együtt tenyésztés alacsonyabb permeabilitási értékeket eredményezett (**11B ábra**), mind a kis molekulású fluoreszcein (WT-CFTR CFBE monokultúra: $3,2 \pm 0,4$, ko-kultúra: $1,5 \pm 0,4 \times 10^{-7}$ cm/s; Δ F508-CFTR CFBE monokultúra: $3,5 \pm 0,3$, ko-kultúra: $1,5 \pm 0,5 \times 10^{-7}$ cm/s), mind a nagyobb molekulású albumin (WT-CFTR CFBE monokultúra: $0,8 \pm 0,1$, ko-kultúra: $0,6 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ cm/s; Δ F508-CFTR CFBE monokultúra: $0,8 \pm 0,1$, ko-kultúra: $0,6 \pm 0,1 \times 10^{-7}$ cm/s) jelzőmolekulák esetében.

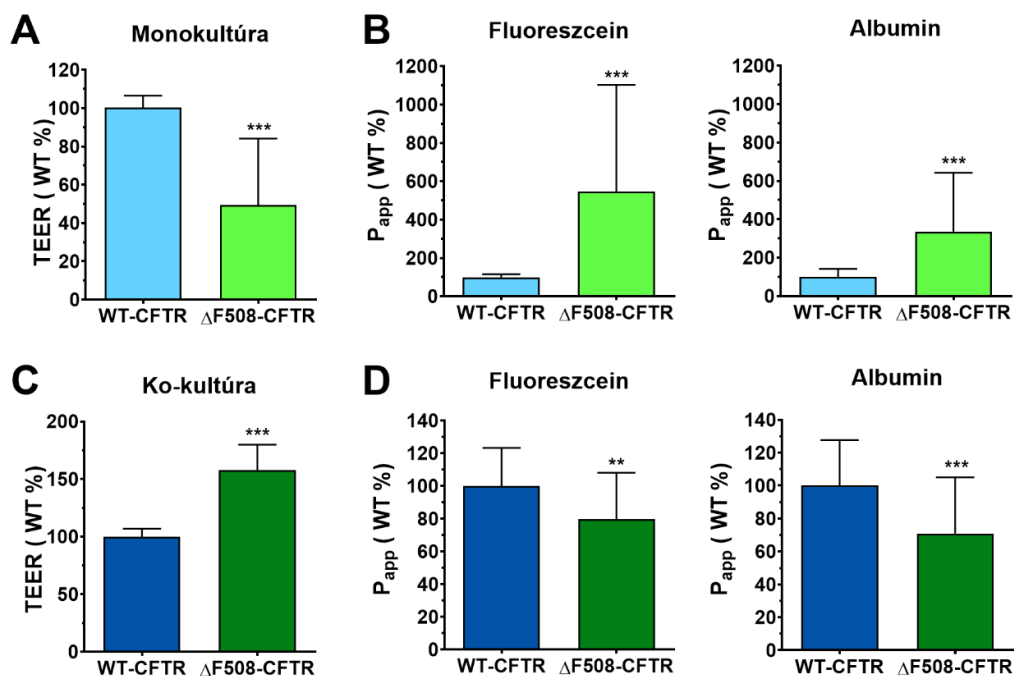
4.1.2. A mono- és ko-kultúrában tenyésztett CFBE sejtek közötti kapcsolatok fehérjéinek immuncitokémiai festése

A sejtek közötti szoros kapcsolatok (TJ) szerkezetének vizsgálatához a szoros kapcsolat asszociált citoplazmatikus ZO-1 linker fehérjét, valamint az adherens kapcsolatok linker fehérjét, a β -katenint festettük meg. A bronchiális epitelsejtek ko-kultúrában való növesztése fokozta a sejtek közötti kapcsolatok szorosságát, valamint hozzájárult az epitelsejtek egyrétegben való növekedéséhez, ahogy azt a ZO-1 és β -katenin festődése is jól mutatja (12A ábra).



12. ábra. A zonula okkludens (ZO-1) és β -katenin kapcsoló fehérjék immunfestése 10 nap monokultúrában és ko-kultúrában való növesztést követően (A). A sejthatárt kirajzoló ZO-1 (B) és β -katenin festés (C) átlag pixel intenzitása. Az értékeket átlag $\pm$ SD-ként ábrázoltuk, $n = 3-6$ /csoport. Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. *** $p < 0,001$ a monokultúrához hasonlítva; ### $p < 0,001$ a vad típusú csoporthoz hasonlítva. Piros szín: kapcsoló fehérjék. Ciánkék: sejtmag. Mércé: 25 μ m.

A ZO-1 átlag pixel intenzitása a sejtek határán magasabb volt WT-CFTR CFBE sejtek esetén, míg magasabb β -katenin fluoreszcencia intenzitás volt megfigyelhető a $\Delta F508$ -CFTR CFBE sejtekben (**12B ábra**). Az endotélsejtek jelenlétének hatására a CFBE sejtek határán lévő kapcsoló fehérjék jelintenzitása erősebb és élesebb lett (**12. ábra**).

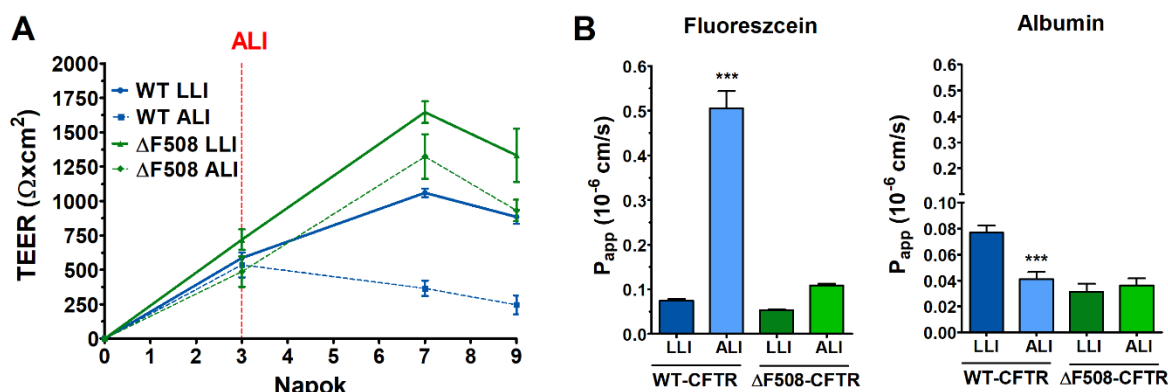


13. ábra. A tisztás fibrózis bronchiális epitélsejt (CFBE) monokultúra és ko-kultúra modelleken mért transzepiteliális elektromos ellenállás (**A, C**) és permeabilitási értékei (**B, D**) 8 független kísérlet alapján. Az értékeket a WT-CFTR CFBE csoportok százalékában ábrázoltuk (átlag $\pm$ SD, $n = 16-52$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a WT-CFTR CFBE sejtekhez hasonlítva.

Hogy összehasonlítsuk a vad típusú és mutáns CFBE sejtrétegek integritását, 8 független kísérlet eredményeit egyesítettük, majd analizáltuk (**13. ábra**). Mivel a CFBE sejtvonalak alap TEER és permeabilitási értékei nagyfokú eltérést mutattak a kísérletek között, ezért az értékeket a WT-CFTR CFBE csoportok százalékában ábrázoltuk. A monokultúrában tenyésztett $\Delta F508$ -CFTR CFBE sejtek gyengébb barriert tudtak kialakítani, amit a vad típusú sejtekhez képest alacsonyabb TEER értékek és emelkedett jelzőanyag átjutás mutat (**13A-B ábra**). Ezzel szemben, a vaszkuláris endotélsejtekkel együtt növesztett $\Delta F508$ -CFTR CFBE sejtek szorosabb sejtréteget hoztak létre, ezt a megemelkedett ellenállás és a csökkent P_{app} értékek jelzik (**13C-D ábra**). A szorosabb sejtrétegek kialakulását a β -katenin sejtkapcsoló fehérje immunfestés intenzitásának fokozódása is igazolja (**12C ábra**).

4.2. A CFBE sejtek tenyésztése folyadék-folyadék és levegő-folyadék határfelületen

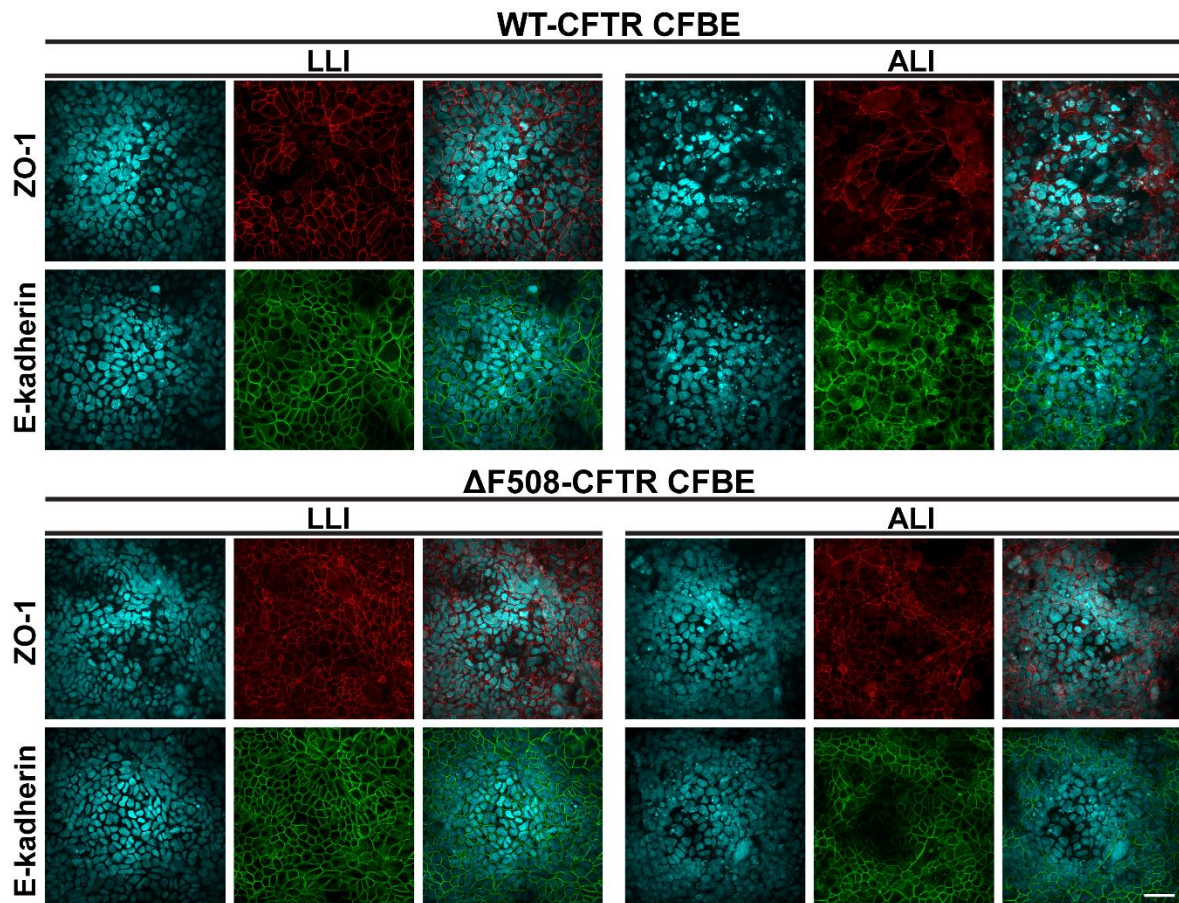
A CFBE sejtek levegő-folyadék interfázison történő tenyésztése – amely élettanilag relevánsabb – nem eredményezett jobb barrier tulajdonságokat a folyadék-folyadék tenyésztési állapothoz képest. ALI körülmények között a sejtrétegek elektromos ellenállás értékei a vad típusú CFBE sejtek esetén 27%-a, a mutáns sejtek esetén 69%-a volt a folyadékban tenyésztett sejtekéhez képest. Ezzel összhangban több jelzőmolekula jutott át a folyadékban tenyésztett sejtekhez képest (14. ábra).



14. ábra. A ko-kultúrában tenyésztett CFBE sejtek transzepiteliális elektromos ellenállás (A) és permeabilitás értékei (B) folyadék-folyadék (LLI) vagy levegő- folyadék interfázison (ALI) való tenyésztést követően. Az értékeket átlag ± SD-ként ábrázoltuk, $n = 4$ /csoport. Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. *** $p < 0,001$ a LLI csoporthoz hasonlítva.

A ZO-1 és az epitelsejtekre jellemző E-kadherin (kadherin-1) sejtkapcsoló fehérjék immunfestése szintén alátámasztotta a gyengébb barrier integritást (15. ábra). A levegőn tenyésztett sejtek morfológiai analízise során több apoptotikus sejtmagot és a sejtkapcsoló struktúrák festődési mintázatának hiányát figyeltük meg több látótérben is, elsősorban a tenyésztőbetétek közepén.

Ezek az eredmények összhangban állnak az irodalomban leírtakkal: a levegőn tenyésztett CFBE41o- humán bronchiális epitelsejtek szintén gyengébb barrier tulajdonságokkal rendelkeznek, mint a folyadékban tenyésztettek. A főbb okokként a sejtek felszínének kiszáradását és emiatt a hörgőhámsejtek apoptotikus sejthalálát azonosították (Ehrhardt és mtsai, 2006). További kísérleteinkhez ezért a legegyszerűbb és leggyakrabban használt módszert, a tenyésztőbetét mindkét oldalán tápfolyadékban történő tenyésztést választottuk.

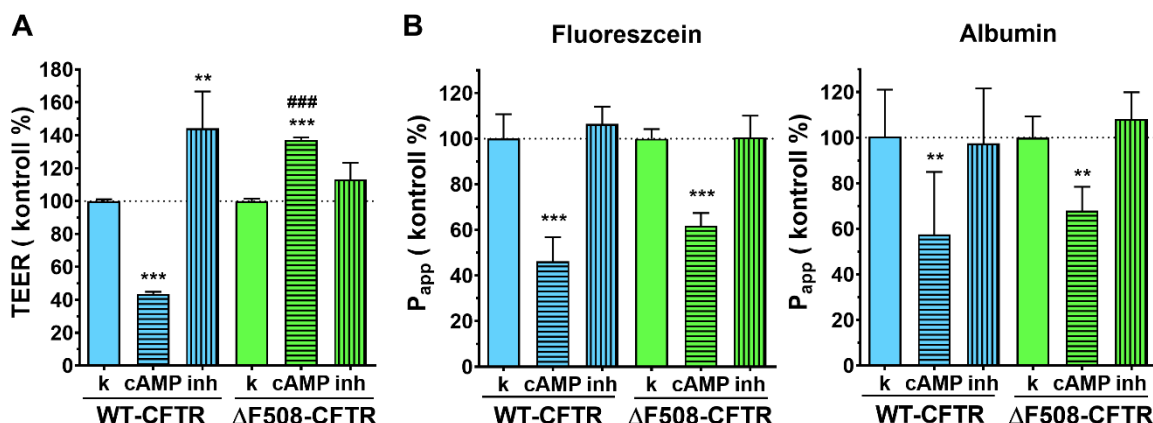


15. ábra. Folyadék- folyadék (LLI) és levegő-folyadék interfázison (ALI) tenyésztett CFBE sejtekben a ZO-1 és E-kadherin sejtkapcsoló fehérjék immunfestése. Zöld és piros: sejtkapcsoló fehérjék. Kék: sejtmag. Mércé: 40 μm

4.3. A CFTR csatorna aktiválásának és gátlásának vizsgálata a CFBE sejtpáron: ellenállási és permeabilitási mérések

A transzepiteliális elektromos ellenállás a sejtrétegen keresztüli ionáramlást tükrözi. A CFTR anion csatorna aktivációja a sejtekbe bejutó cAMP analóggal a vad típusú sejtek esetében csökkent ellenállási értékeket eredményezett, ami a csatornán keresztüli nagyobb ionáramlást, azaz a csatorna fokozott működését jelzi (**16A ábra**). A WT-CFTR CFBE sejtréteg ellenállás értékeinek csökkenése azonban nem járt együtt a jelzőanyagok fokozott átjutásával, ellenkezőleg, kevesebb fluoreszcen és albumin jutott át a sejtrétegen a kontroll csoporthoz képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a vad típusú sejteknél tapasztalt csökkent TEER értékek nem egy gyengébb barriert jeleznek, hanem a cAMP által aktivált CFTR csatornán keresztüli megnövekedett ionáramlást mutatják. A $\Delta F508$ -CFTR CFBE sejtek magasabb TEER és csökkent permeabilitási értékeket mutattak, amelyek a sejtréteg

szorosságának fokozódását tükrözik (16. ábra). A csatorna aktivációra jellemző TEER csökkenés nem volt megfigyelhető (16A ábra).



16. ábra. A sejtekbe bejutó cAMP analóg (250 μ M) és a CFTR csatorna gátló CFTR_{inh}-172 (inh; 10 μ M) 1 órás kezelés hatása a sejtréteg elektromos ellenállására (A) és permeabilitására (B). Az értékeket a kontroll csoport százalékában ábrázoltuk (átlag $\pm$ SD, $n = 4$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz hasonlítva, ### $p < 0,001$ az adott vad típusú csoporthoz hasonlítva.

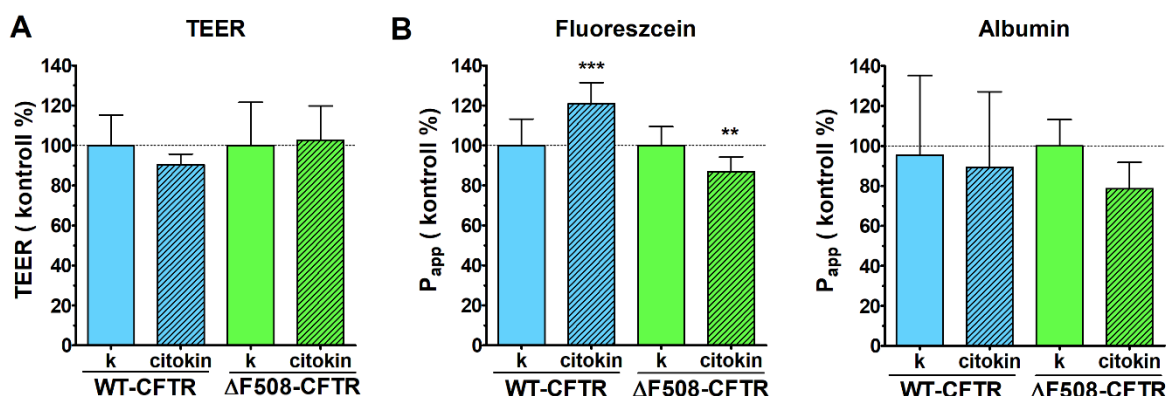
Mindkét sejtvonal esetében a cAMP közismert barrier erősítő hatását figyeltük meg, amelyet a paracelluláris jelzőanyagok csökkent permeabilitási értékei is alátámasztanak (16B ábra). Az ionáramlásra vonatkozó TEER eredményeink összhangban vannak az irodalomban már leírt, bronchiális epitelsejteken végzett kísérletek adataival: a cAMP kezelés csökkentette a vad típusú, működő CFTR csatornát kifejező CFBE sejtek TEER értékeit, míg a mutáns CFTR csatornát kifejező CFBE sejtek esetében fokozta a sejtréteg elektromos ellenállását (Molenda és mtsai, 2014). Továbbá, a Δ F508-CFTR csatornát, ha az a sejtmembránban található is meg, nem lehet stimulálni forskolinnal megnövelt cAMP-szinttel sem (Bebők és mtsai, 2005).

A CFTR inhibitor kezelés a vad típusú bronchiális epitelsejteken a TEER értékekre az aktivátorral ellentétes hatást váltott ki (16A ábra). A WT-CFTR CFBE sejtek esetén tapasztalt megnövekedett ellenállás értékek a legátolt CFTR csatorna következtében lecsökkent ionáramlást tükrözik. Ezzel szemben a mutáns CFTR csatornát kifejező epitelsejtek ellenállás értékei nem változtak, ami további bizonyíték arra, hogy a CFTR csatorna ezekben a sejtekben nem funkcionális. Ezek az eredmények megerősítik a sejtvonalak megbízhatóságát, alátámasztják, hogy csak a WT-CFTR CFBE sejtek fejeznek ki aktív, működőképes CFTR csatornát. A CFTR_{inh}-172 kezelés nem okozott változást a sejtréteg integritásában, ahogy azt a jelzőanyagok változatlan átjutása is mutatja (16B ábra).

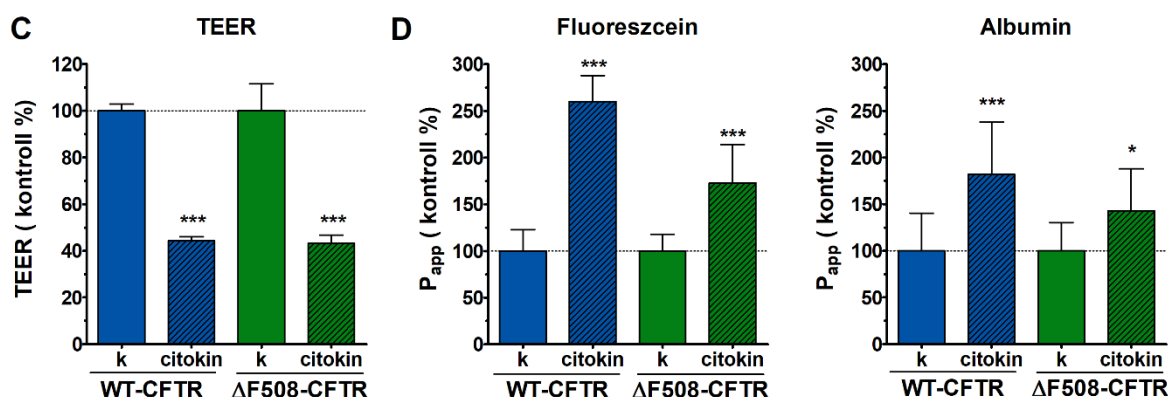
4.4. Citokinek hatása a CFBE sejtvonalpár gátműködésére

A cisztás fibrózisban megfigyelhető gyulladás modellezésére a CFBE sejteket TNF α és IL-1 β citokinek kombinációjával kezeltük meg csoportunk korábbi, intesztinális epitelsejteken elvégzett kísérletei alapján (Váradí és mtsai, 2017). A hat órás citokin kezelés nem változtatta meg szignifikánsan a monokultúrában növesztett CFBE sejtek ellenállás (17A ábra) és albumin átjutási értékeit (17B ábra). A WT-CFTR CFBE sejtréteg áteresztő képessége a kis molekulású fluoreszcein jelzőanyagra alacsony maradt, különösképpen a ko-kultúrában tapasztalt változásokhoz képest (17B ábra). Fontos kiemelni, hogy a kismértékű fluoreszcein átjutásban mért változások ellenére a sejtréteg szoros gátat alkotott, amelyet az alacsony permeabilitási értékek is alátámasztanak (a fluoreszcein P_{app} értéke a kontroll csoportban: $3,0 \pm 0,2 \times 10^{-7}$ cm/s).

Monokultúra



Ko-kultúra



17. ábra. A CFBE monokultúrák (A-B) és ko-kultúrák (C-D) transzepiteliális elektromos ellenállása (A, C) és permeabilitási értékei (B, D) 6 órás citokin kezelés után. Az értékeket a kontroll csoport százalékában ábrázoltuk (átlag $\pm$ SD, $n = 4$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz hasonlítva.

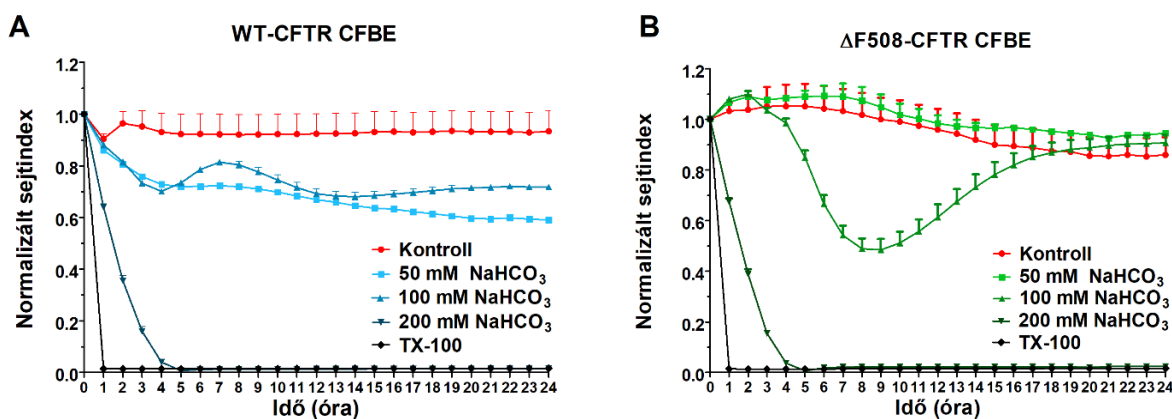
A ko-kultúrában tenyésztett CFBE sejtvonalak esetén károsodott a sejtréteg a citokin kezelés hatására. A TEER értékek a kontroll csoport értékeinek felére csökkentek

(17C ábra). Ezzel egyidőben a különböző jelzőanyagok permeabilitási értékei a kontroll csoporthoz képest a többszörösükre nőttek (fluoreszcein: P_{app} a WT-CFTR sejtek esetén 260%, $\Delta F508$ -CFTR sejtekénél 172%; albumin: P_{app} a WT-CFTR sejtek esetén 181%, $\Delta F508$ -CFTR sejtekénél 143%) (17D ábra). A citokinek hatása a vaszkuláris endotélsejtek jelenlétében erőteljesebb volt (17C-D ábra), mint a monokultúrákban, ahol a barrier funkció alig változott (17A-B ábra). Eredményeink arra utalnak, hogy a CFBE ko-kultúra modellek erőteljesebben reagálnak a citokin kezelésre, emiatt alkalmasabb modellek lehetnek a gyulladásos állapotok *in vitro* vizsgálatához, mint a monokultúrák.

4.5. A nátrium bikarbonát hatása a cisztás fibrózis bronchiális epitelsejt tenyészeteken

4.5.1. Életképességi vizsgálatok: valósidejű sejtanalízis és kettős magfestés

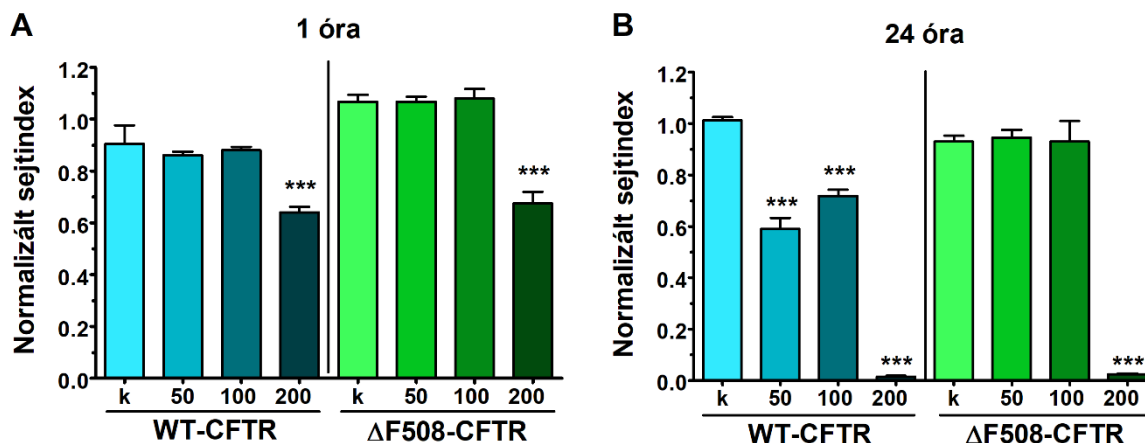
A nátrium bikarbonát idő és koncentrációfüggő hatást mutatott a CFBE sejtek életképességére a valósidejű sejtanalízis mérések alapján (18. ábra). A kontroll csoport MEM tápfolyadékot kapott, amely gyárilag 26 mM NaHCO_3 -ot tartalmaz. Az 50 és 100 mM nátrium bikarbonát koncentrációk nem változtatták meg WT-CFTR CFBE sejtek életképességét a kezelés első órájában, azonban a további időpontok esetén jelentős impedancia csökkenést tapasztaltunk (18. ábra).



18. ábra. A WT-CFTR CFBE (A) és a $\Delta F508$ -CFTR CFBE (B) sejtek valósidejű impedancia mérése különböző koncentrációjú (50, 100, 200 mM) nátrium bikarbonát kezelés hatására. A kontroll csoport tápoldata 26 mM nátrium bikarbonátot tartalmazott. A nátrium bikarbonát hatását az impedancia értékekre normalizált sejtinдексként ábrázoltuk (átlag $\pm$ SD, $n = 11-13$ /csoport).

Ezzel ellentétben, a mutáns CFTR csatornát kifejező sejtekénél az 50 mM-os koncentráció nem változtatta meg a sejtek impedanciáját, míg a 100 mM koncentráció esetén egy átmeneti csökkenést tapasztaltunk a 6-15 órás intervallumban, amely azonban a 16-24 órás időtartamban a kontroll szintjére állt vissza (18A ábra). A legmagasabb, 200 mM nátrium bikarbonát koncentráció mindkét sejtvonalnál a sejtek pusztulását idézte elő, az

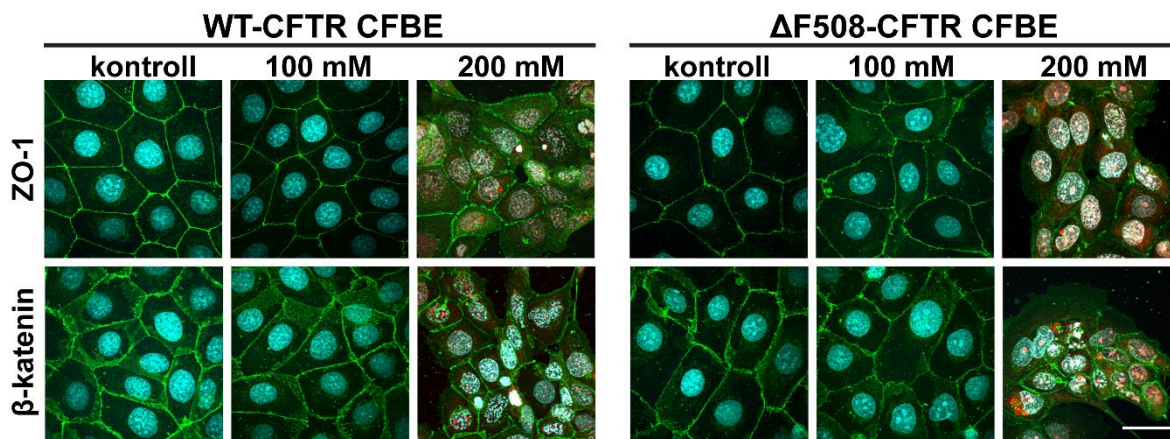
impedancia értékek a referencia anyag Triton X-100 detergenssel kezelt csoportok szintjére csökkentek le (**18. ábra**). Kiemelve az 1 és 24 órás kezelési időpontokat, a következő megállapításokat tehetjük: az első órában a legmagasabb koncentráció, a 200 mM nátrium bikarbonát esetén szignifikáns impedancia esést tapasztaltunk mindkét sejtvonal esetében (**19A ábra**).



19. ábra. A WT-CFTR CFBE és ΔF508-CFTR CFBE sejtek impedancia mérése különböző koncentrációjú (50, 100, 200 mM) nátrium bikarbonát tápoldattal való kezelést követő első órában (**A**) és egy nap elteltével (**B**). A nátrium bikarbonát hatását az impedanciára normalizált sejtinдексként ábrázoltuk (átlag±SD, $n = 11-13$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz hasonlítva.

Az 50 és 100 mM NaHCO_3 tartalmú tápfolyadékkal kezelt vad típusú CFBE sejtek alacsonyabb sejtinдекс értékeket mutattak 24 óra elteltével (**19B ábra**), amely a nátrium bikarbonáttal szembeni fokozott érzékenységet mutatja. A mutáns CFBE sejtek esetében az 50 mM és 100 mM nátrium bikarbonáttal kezelt csoportok sejtinдекс értékei a kontroll csoportéval megegyezők voltak mind a rövid, mind a hosszabb távú kezelési időpontokban (**19B ábra**). Ez az eredmény a bikarbonát jótékony hatását igazolja a mutáns csatornát kifejező cisztás fibrózis bronchiális epitelsejtekre.

Az impedancia mérés eredményeit a sejtek morfológiai vizsgálatával is alátámasztottuk (**20. ábra**). A 24 órás kezelést követően az 50 és 100 mM NaHCO_3 kezelés nem változtatta meg a CFBE sejtek TJ fehérjéinek festődési mintázatát a kontroll csoporthoz képest, ami összhangban áll az impedancia mérés eredményeivel. A 200 mM NaHCO_3 koncentráció sejtkárosító hatását a kettős magfestés eredményei is megerősítették. A legmagasabb nátrium bikarbonát koncentrációnál a sejtközi kapcsolatok felszakadoztak, a plazmamembrán pedig károsodott, ezáltal átjárhatóvá vált az etídium-homodimer-1 festék számára (**20. ábra**).



20. ábra. A CFBE sejtek morfológiája különböző koncentrációjú nátrium bikarbonát kezelés hatására. A sejteket 26 mM (kontroll csoport), 100 és 200 mM nátrium bikarbonátot tartalmazó tápoldattal kezeltük 24 órán keresztül. Zöld: kapcsoló fehérjék immunfestése. Kék: sejtmag. Piros: károsodott sejtek magjai. Mércé: 40 μ m.

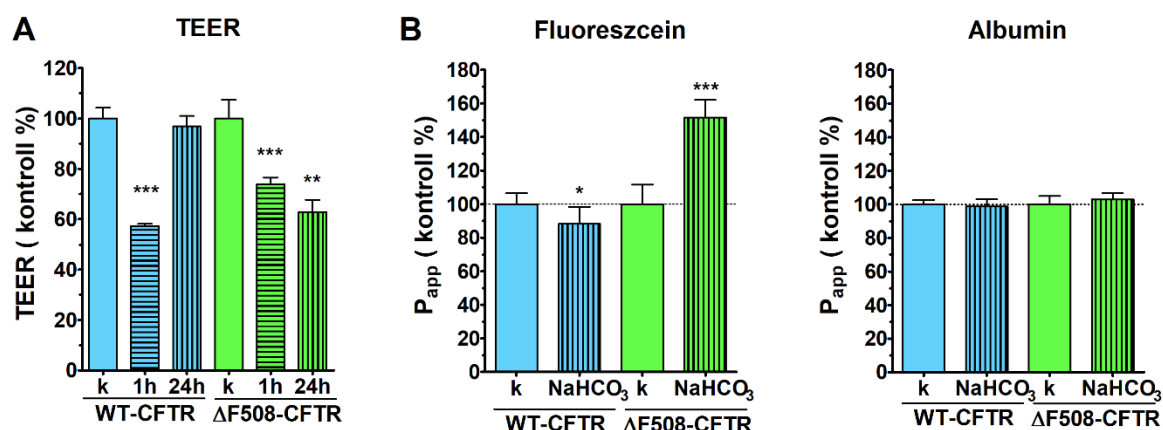
A sejtleletképességi vizsgálatok eredményei alapján a további kísérleteinkhez a 100 mM nátrium bikarbonát koncentrációt választottuk, amelynek bakteriosztatikus hatását leírták a *Pseudomonas aeruginosa*-val szemben, amely a cisztás fibrózisban leggyakrabban előforduló patológiás baktérium típus (Dobay és mtsai, 2018).

4.5.2. A nátrium bikarbonát hatása a CFBE sejtek gátműködésére

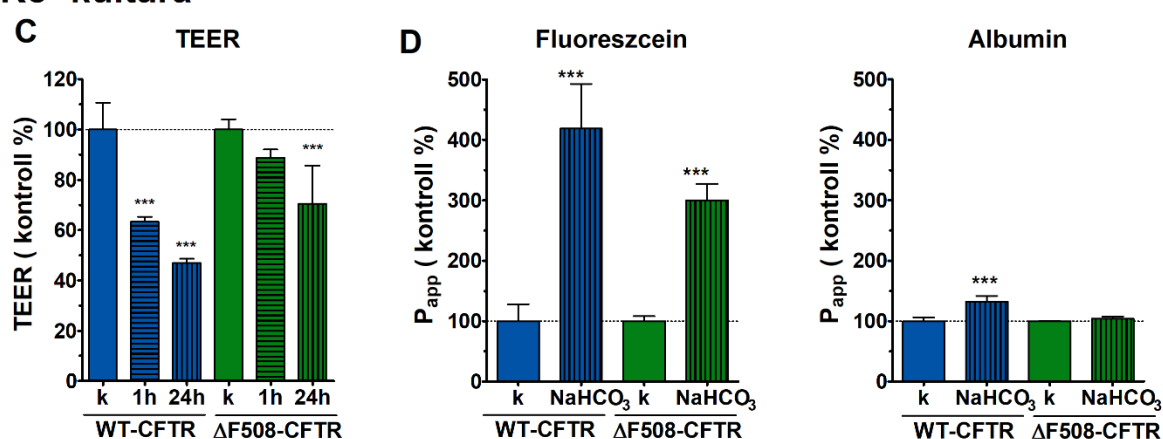
4.5.2.1. Transzepiteliális elektromos ellenállás és permeabilitás vizsgálat

A nátrium bikarbonát CFBE sejtek barrier integritására kifejtett hatásának tanulmányozására a mono- és ko-kultúrákat 100 mM nátrium bikarbonátot tartalmazó tápoldattal kezeltük 24 órán keresztül. A TEER értékeket az 1 órás kezelési időpontban is lemértük. A CFBE monokultúra nátrium bikarbonáttal való kezelése a TEER értékek csökkenését eredményezte az 1 órás időpontban (WT-CFTR: a kontroll 57%-a, Δ F508-CFTR: a kontroll 74%-a), ami a vad típusú sejtek esetében visszaállt a kontroll csoport ellenállás értékeire 24 óra elteltével (**21A ábra**). A Δ F508-CFTR CFBE monokultúra esetén az ellenállás értékek tovább csökkentek a 24 órás kezelés végére, a kontroll csoport 62%-ára, ami a fluoreszcein magasabb átjutását eredményezte (**21B ábra**). Az albumin jelzőmolekula átjutási értéke azonban nem változott egyik sejtípus esetében sem, ami a szoros barrier meglétét jelzi (**21B ábra**). Ezek az adatok is alátámasztják, hogy a 100 mM nátrium bikarbonát koncentráció nem károsítja a CFBE monokultúrák barrier tulajdonságait.

Monokultúra



Ko- kultúra

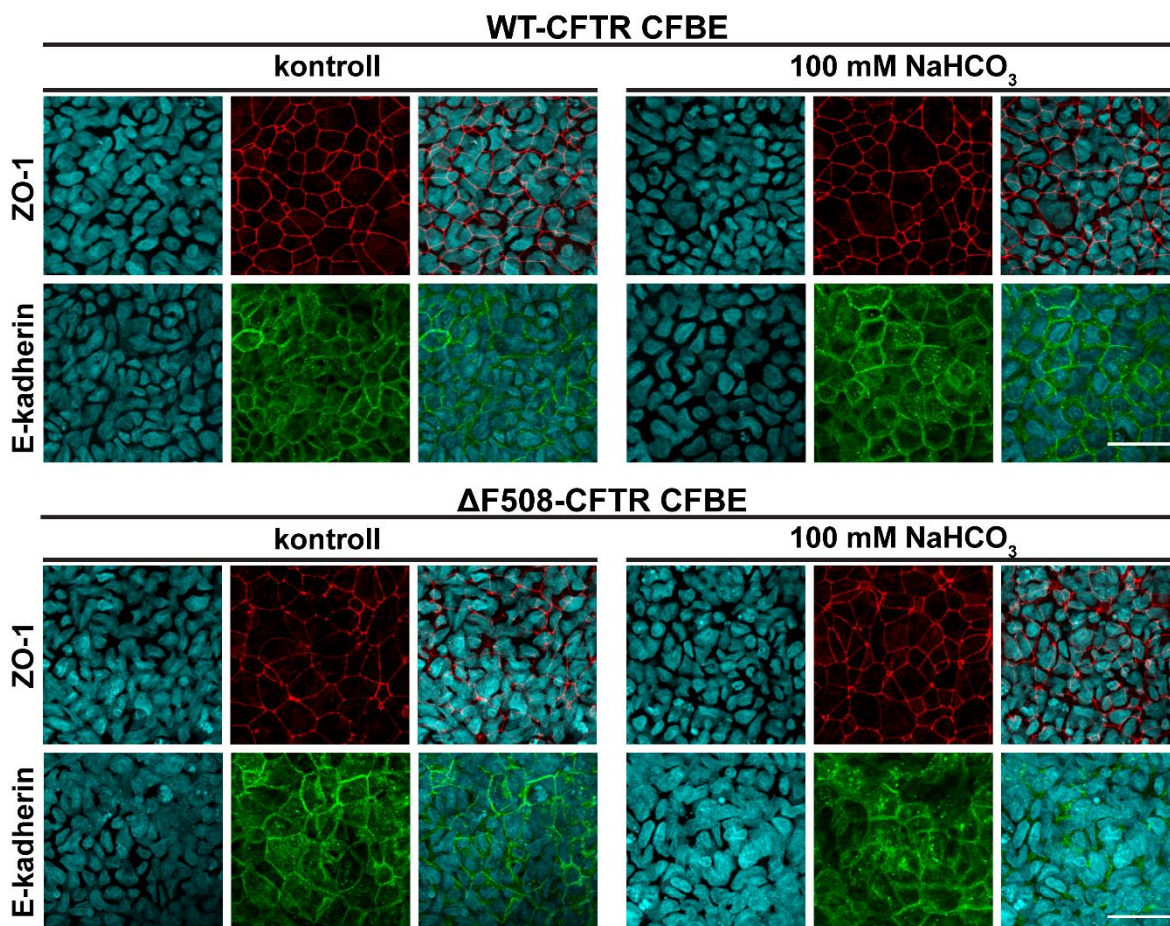


21. ábra. A 100 mM nátrium bikarbonát hatása a monokultúrában (A-B) és ko-kultúrában (C-D) növesztett CFBE sejtek barrier integritására. A transzepiteliális elektromos ellenállás értékek a kezelés első és 24. órájában (A-C), valamint a permeabilitási értékek (B-D) a 24 órás kezelést követően. Az értékeket a kontroll csoport százalékában ábrázoltuk (átlag ± SD, $n = 4$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a kontroll csoporthoz hasonlítva.

A ko-kultúrák közül a WT-CFTR CFBE sejtek sokkal érzékenyebben reagáltak a NaHCO₃ kezelésre mindkét kezelési időpontban, ahogy azt az alacsonyabb TEER értékek is mutatnak (1 óra: WT-CFTR sejtek: a kontroll 63%-a, ΔF508-CFTR sejtek: a kontroll 88%-a; 24 óra: WT-CFTR sejtek: a kontroll 47%-a, ΔF508-CFTR sejtek: a kontroll 70%-a) (21C ábra). Ezzel összhangban a vad típusú sejtekben a kontroll csoporthoz képest megnőtt mind a kisméretű fluoreszcein (4,18×), mind a nagyméretű albumin (1,3×) átjutása a sejtrétegeken (21D ábra). A ΔF508-CFTR CFBE ko-kultúra esetében a 100 mM nátrium bikarbonát kezelés nem változtatta meg a sejtrétegek ellenállását egy órás kezelésnél. A TEER értékek csak 24 órás kezelés után csökkentek (21C ábra), amivel párhuzamosan a fluoreszcein magasabb (3×) átjutását mértük a kontrollhoz képest. Az albumin átjutása változatlan maradt (21D ábra), ami a továbbra is zárt gátműködést mutatja.

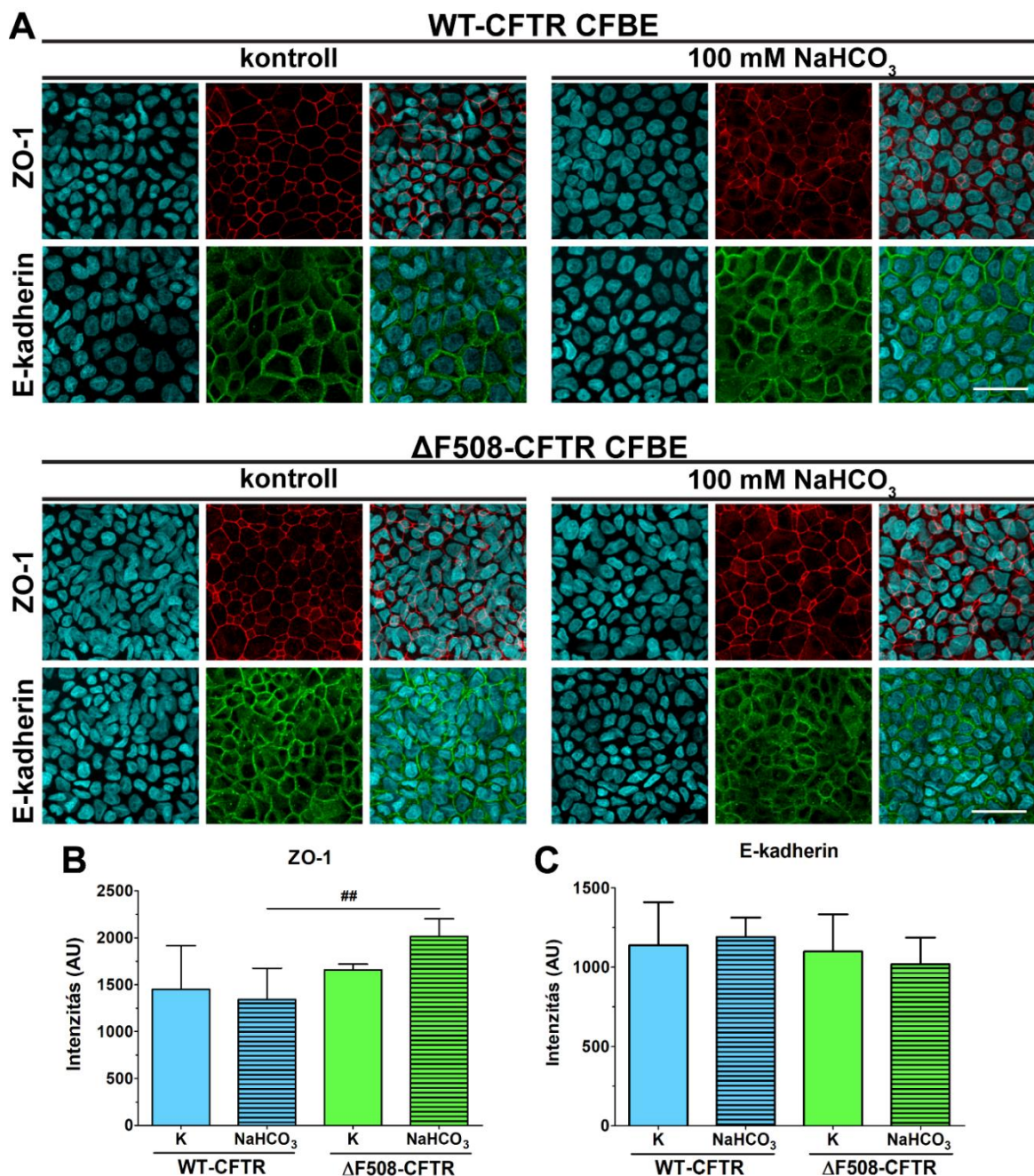
4.5.2.2. Immuncitokémia

A gátműködés funkcionális mérési eredményeit a sejtkapcsoló fehérjék immunfestése is alátámasztja. A ZO-1 és E-kadherin fehérjék a sejthatárokon, övszerűen helyezkednek el (**22. ábra**). A 24 órás NaHCO_3 kezelés nem változtatta meg a monokultúrában növesztett CFBE sejtek sejtkapcsoló fehérjéinek festődési mintázatát a kontrollhoz képest.



22. ábra. A nátrium bikarbonát kezelés (24 óra) hatása a monokultúrában tenyésztett CFBE sejtek zonula okkludens-1 (ZO-1) és E-kadherin sejtkapcsoló fehérjéinek morfológiájára. A kontroll csoport 26 mM, a kezelt csoportok 100 mM nátrium bikarbonát tartalmú tápoldatot kaptak. Piros: ZO-1. Zöld: E-kadherin. Kék: sejtmag. Mércé: 40 μm .

A ko-kultúrák 24 órás, 100 mM nátrium bikarbonáttal történő kezelése nem okozott szemmel látható változást az E-kadherin és a ZO-1 festődési mintázatában a kontroll csoporthoz képest (**23. ábra**). A vad típusú CFBE sejteknél a sejtkapcsoló struktúrák festés intenzitásának analízise is megerősítette ezt az eredményt. A mutáns CFTR csatornát kifejező sejtek esetében a nátrium bikarbonát jótékony hatását tudtuk kimutatni: a kezelés hatására erősödött a sejthatáron lévő ZO-1 fehérje immunfestődésének átlag pixel intenzitása a NaHCO_3 kezelt vad típusú sejtekhez képest (**23B ábra**).



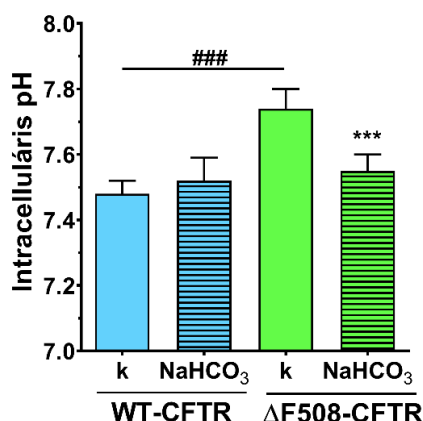
23. ábra. A nátrium bikarbonát (100 mM, 24 óra) hatása a ko-kultúrában tenyésztett CFBE sejtek zonula okkludens-1 (ZO-1) és E-kadherin sejtkapcsoló fehérjéinek morfológiájára (A). A ZO-1 (B) és E-kadherin (C) immunfestődésének átlag pixel intenzitása a sejthatárokon (átlag ± SD, $n = 3-6$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. ## $p < 0,01$ a vad típusú epitélsejtekhez hasonlítva. Piros: ZO-1. Zöld: E-kadherin. Kék: sejtmag. Mércé: 40 μm .

A morfológiai vizsgálatok eredményei összhangban állnak az életképességi és barrier integritás vizsgálatok eredményeivel. Ezek alapján a tápfolyadékban megemelkedett nátrium bikarbonát szint mind a vad típusú, mind a mutáns epitélsejtekre kismértékű hatást fejtett ki: csak kis ionokkal és a passzív diffúzió kisméretű jelzőmolekulájával szemben

mértünk megnyílást. A bronchiális hámsejtek sejtkapcsoló fehérjéi megőrizték a sejtek határát kirajzoló, övszerűen elhelyezkedő festődési mintázatot (22 és 23. ábra).

4.5.3. A bikarbonát hatása a CFBE sejtek nyugalmi intracelluláris pH értékére

A WT-CFTR CFBE sejtek nyugalmi intracelluláris pH (pH_i) értéke $7,48 \pm 0,04$ volt, és ez a 100 mM nátrium bikarbonát kezelés hatására nem változott (24. ábra). A mutáns CFTR csatornát kifejező CFBE sejtek esetén megemelkedett intracelluláris pH-t mértünk ($7,74 \pm 0,06$), ami az egy órás 100 mM $NaHCO_3$ kezelés hatására a vad típusú sejtek pH értékére csökkent (26. ábra).



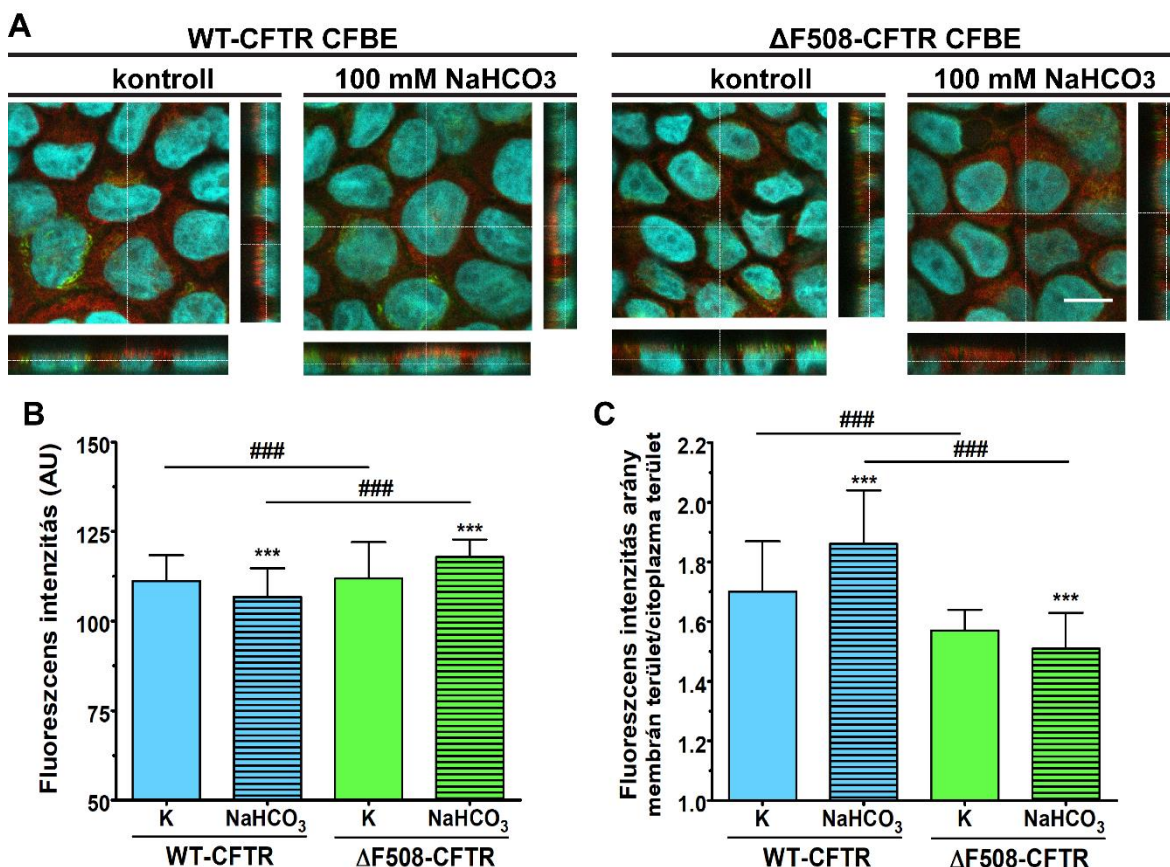
24. ábra. A nátrium bikarbonát kezelés hatása a CFBE sejtek nyugalmi intracelluláris pH értékére. A WT-CFTR és $\Delta F508$ -CFTR CFBE sejtekben mért intracelluláris pH nátrium bikarbonát kezelés (100 mM, 1 óra) után. A kontroll csoport tápoldata 26 mM nátrium bikarbonátot tartalmazott. Átlag $\pm$ SD, $n = 47$ -67/csoport. Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. ### $p < 0,001$ a vad típusú epitelsejtekhez hasonlítva, *** $p < 0,001$ a kontroll csoportéhoz hasonlítva.

Az intracelluláris pH mérés eredményei alapján a 100 mM nátrium bikarbonát kezelés közvetlen jótékony hatását tudtuk kimutatni a mutáns CFTR csatornát kifejező hörgőhám sejtek esetében.

4.5.4. A bikarbonát hatása a CFTR csatorna immunolokalizációjára CFBE sejtekben

Immuncitokémiával mindkét sejtvonalban kimutattuk a CFTR csatorna jelenlétét (25. ábra). Az apikális membrán elhelyezkedésének meghatározásához búzacsíra lektin festést alkalmaztunk, ami a plazmamembrán glikokalix rétegéhez kötődik. A konfokális mikroszkóppal készített fotókon a CFTR festődési mintázata diffúz jelet adott: Z-irányban mind az apikális, mind a citoplazmás régióban megfigyelhető volt az immunjel (25A ábra). Képanalízis segítségével meghatároztuk az immunfestés plazmamembrán közeli apikális régióját és a maradék sejterületet (citoplazma). A CFTR festés átlag pixel intenzitás az apikális területen mindkét CFBE sejtvonal esetén hasonló volt (WT-CFTR CFBE:

111,09 ± 7,35, ΔF508-CFTR CFBE: 111,86 ± 10,17; **25B ábra**). A NaHCO₃ kezelés hatására a vad típusú CFBE sejtek esetében csökkent a CFTR csatorna immunfestésének átlag pixel intenzitása (106,73 ± 8,00) az apikális régióban, míg a mutáns CFTR csatornát kifejező CFBE sejteknél nőtt (117,85 ± 4,91).



25. ábra. A nátrium bikarbonát (kontroll csoport: 26 mM; kezelt csoport: 100 mM, 24 óra) hatása a CFTR csatorna immunlokalizációjára WT-CFTR és ΔF508-CFTR CFBE sejtekben. Piros: CFTR immunfestés. Zöld: WGA lektin festés. Kék: sejtmag. Mércse: 10 μm (**A**). Az epitélsejtek membrán régiójában a CFTR immunfestés átlag pixel intenzitása (**B**) és a CFTR immunfestés átlag pixel intenzitásának aránya a membrán és citoplazma területén (**C**). Átlag ± SD, *n* = 4018/csoport. Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. ### *p* < 0,001 a vad típusú epitélsejtekhez hasonlítva, *** *p* < 0,001 a kontroll csoportéhoz hasonlítva.

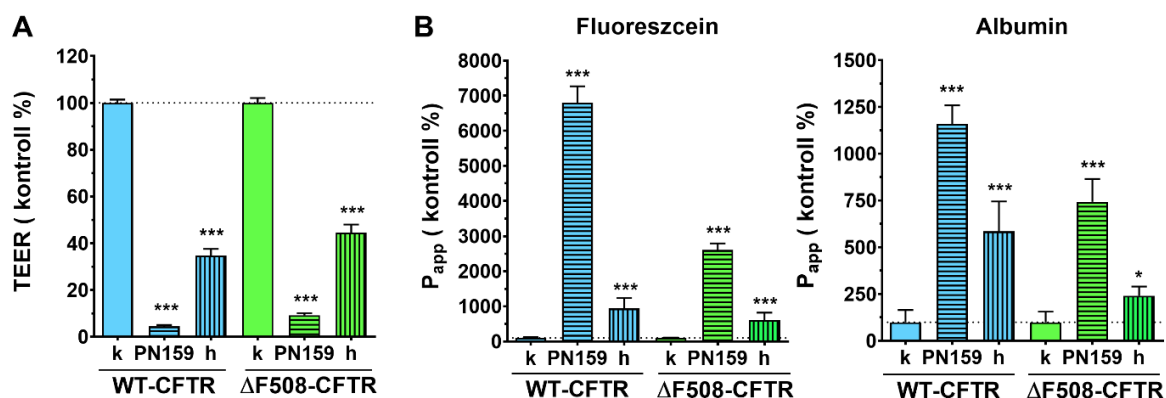
A CFTR immunfestés pixel intenzitásának aránya a membrán és citoplazma régiókban szignifikánsan magasabb volt a WT-CFTR CFBE sejtek esetén, mint a ΔF508-CFTR CFBE sejtekben (1,70 ± 0,17 vs. 1,57 ± 0,07; **25C ábra**). Ez az adat több CFTR csatorna jelenlétére utal a WT-CFTR CFBE sejtek apikális membrán régiójában, az irodalmi adatokkal összhangban (Bebők és mtsai, 2005). A nátrium bikarbonát kezelés tovább növelte a CFTR immunfluoreszcens intenzitás arányát a vad típusú sejtekben (1,86 ± 0,18 vs 1,70 ± 0,17 WT-CFTR kontroll), míg ellentétes hatást mértük a mutáns CFBE sejtek esetében (1,51 ± 0,12 vs 1,57 ± 0,07 ΔF508-CFTR kontroll). A morfológiai elemzés során

megfigyeltük, hogy a WT-CFTR CFBE sejtek átlagos magassága alacsonyabb volt, mint a mutáns sejtvonalé ($6,4 \pm 0,7 \mu\text{m}$ vs $8,1 \pm 0,5 \mu\text{m}$), ami eltérő sejttérfogot szabályozást jelezhet.

4.6. A PN159 peptid hatása különböző epitelsejtes gátmodelleken

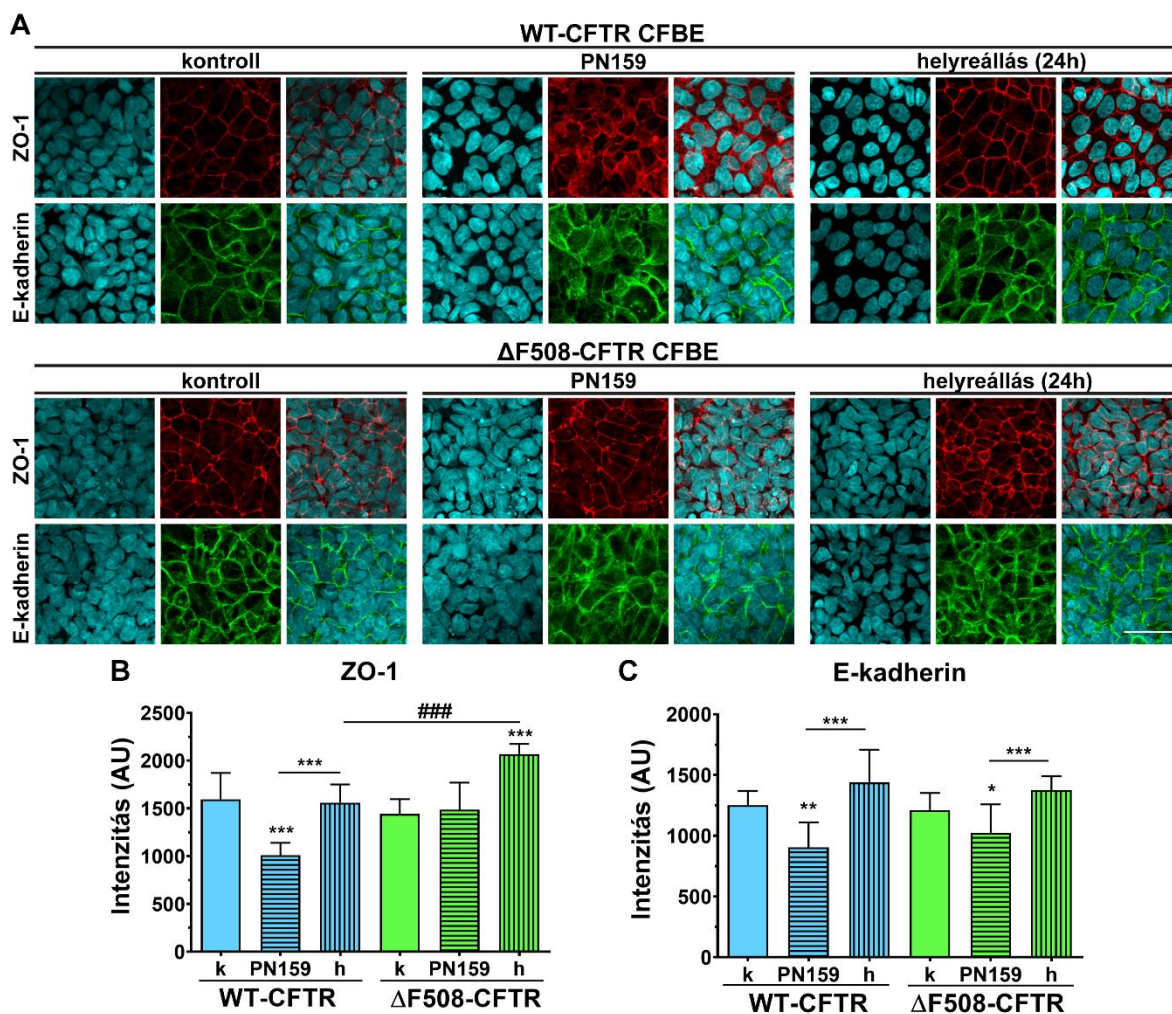
4.6.1. A PN159 peptid hatása CFBE sejtrétegekre: elektromos ellenállás, permeabilitás és immunfestés

A két CFBE sejtvonal különböző kezelésekre adott válaszához további vizsgálatához a kutatócsoportunk által jól jellemzett PN159 vagy KLAL peptid (Bocsik és mtsai, 2016) hatását teszteltük a sejteken. A sejtpenetráló és szoros kapcsolatokat megnyitó peptid kezelés (30 perc) hatására a CFBE sejtek TEER értékei a kontroll csoportok 10%-ára csökkentek le (**26A ábra**). Ezzel párhuzamosan, a különböző jelzőanyagok átjutása a sejtrétegen sokszorosára nőtt (WT-CFTR sejtek: SF 68×, EBA 120×, $\Delta\text{F508-CFTR}$ sejtek: SF 26×, EBA 7×), ami a barrier teljes megnyílását jelzi (**26B ábra**).



26. ábra. A CFBE sejtréteg TEER (**A**) és permeabilitási (**B**) értékei PN159 peptid kezelést (10 μM , 30 perc) követően, majd a peptid eltávolítása és a sejtréteg helyreállása (h) után (24 óra). Az értékeket a kontroll csoport százalékában ábrázoltuk (átlag $\pm$ SD, $n = 4/\text{csoport}$). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ a kontroll csoportéhoz (k) hasonlítva.

A peptid eltávolítása és a sejtrétegek helyreállása után (24 óra) a TEER értékek növekedtek, de a kontroll csoportok szintjét nem érték el (WT-CFTR sejtek: a kontroll 35%-a, $\Delta\text{F508-CFTR}$ sejtek: a kontroll 45%-a) (**26A ábra**). A peptid eltávolítását követően 24 órával a permeabilitási adatok az alapértékek közelébe tértek vissza, azonban ezek az értékek magasabbak a nem kezelt csoportokénál, az alacsonyabb TEER értékekkel összhangban (**26B ábra**). A sejtkapcsoló fehérjék immunfestése megerősítette, hogy a PN159 peptid megnyitotta az epitelsejtek közötti kapcsolatokat (**27. ábra**).

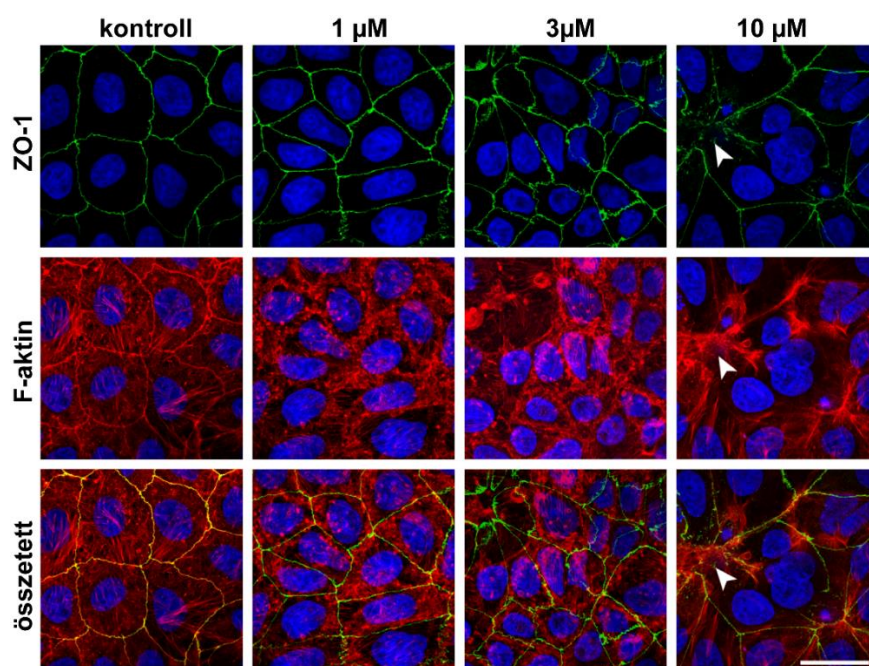


27. ábra. A CFBE sejtek ZO-1 és E-kadherin immunfestődése PN159 peptid kezelés (10 μ M, 30 perc) és a sejtrétegek helyreállása (24 óra) után (**A**). A ZO-1 (**B**) és E-kadherin (**C**) festések átlag pixel intenzitása (átlag $\pm$ SD, $n = 3-6$ /csoport). Statisztikai próba: kétutas Anova és Bonferroni teszt. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ a kontroll és kezelt csoporthoz hasonlítva. ### $p < 0,001$ a vad típusú sejtekhez hasonlítva. Zöld és piros: kapcsolófehérjék. Kék: sejtmag. Mércé: 40 μ m.

A kontroll csoportban megfigyelhető sejtek közötti folyamatos, övszerű ZO-1 és E-kadherin festődési mintázat a peptid kezelés hatására megváltozott, felszakadozott, és az immunjel a sejtek citoplazmájában is megjelent (**27A ábra**). A képanalízis megerősítette ezt a megfigyelést: a peptid kezelés hatására a vad típusú sejtekben csökkent a ZO-1 és E-kadherin immunfestés átlag pixel intenzitása a sejthatárokon (**27B-C ábra**). A mutáns sejttípus esetén nem csak a funkcionális mérések bizonyították a PN159 peptid sejtkapcsolatokat megnyitó hatását, hanem a szignifikáns mértékben lecsökkent E-kadherin festődési intenzitás is (**27C ábra**). A morfológiai változások azonban visszafordíthatók voltak a 24 órás helyreállási szakasz végére. Mindkét vizsgált CFBE sejtvonal hasonlóan reagált a peptid kezelésre, a PN159 peptid hatékonyan megnyitotta a bronchiális epitelsejtek sejtközi kapcsolatait és ez a hatás visszafordítható volt.

4.6.2. A PN159 peptid hatása a Caco-2 bélepitél sejtek F-aktin festődési mintázatára

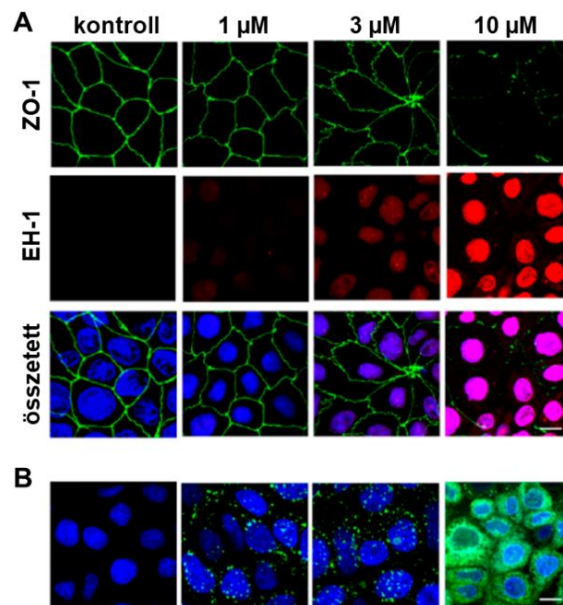
A PN159 peptid koncentráció függő hatása a Caco-2 sejtek aktin sejtvázáinak, illetve a ZO-1 festődésének változásán is jól látszik (28. ábra). A peptid 1 μM koncentrációja enyhe hatást gyakorolt a Caco-2 sejtek morfológiájára, míg a 3 μM PN159 peptid kezelés hatására szignifikáns változásokat figyeltünk meg a kapcsolófehérjék mintázatában és az aktin sejtváaz elrendeződésében (28. ábra). A legmagasabb PN159 peptid koncentráció (10 μM) erőteljes változást okozott az aktin sejtváaz morfológiájában és a ZO-1 sejt kapcsoló fehérje festése a sejt közötti kapcsolatok megnyílását jelezte (28. ábra).



28. ábra. A PN159 peptid koncentráció függő hatása a Caco-2 sejtek ZO-1 és aktin sejtvázáinak festődési mintázatára 1 órás kezelés után. Zöld: ZO-1. Piros: F-aktin. Kék: sejt mag. Mércé: 20 μm . A nyílhegyek a sejt közötti kapcsolatok megnyílását jelzik.

4.6.3. A PN159 peptid sejtbe való bejutásának és sejtpenetráló hatásának vizsgálata Caco-2 bélepitél sejteken

A PN159 peptid hatását a sejtmembrán integritásra az etídium homodimer-1 festék bejutásával vizsgáltuk a Caco-2 sejt vonalon. A sejteket PN159 peptiddel (1, 3 és 10 μM) kezeltük meg, majd 1 óra elteltével hozzáadtuk a sejtmembrán áteresztőképességét jelző etídium homodimer-1 festéket a tenyészetekhez (856 Da). A sejt mag festődés alapján a legmagasabb peptid koncentrációval kezelt sejtek esetében jutott be a legtöbb EH-1 festék a sejtekbe (29A ábra), ami a megnövekedett membrán permeabilitást jelzi.

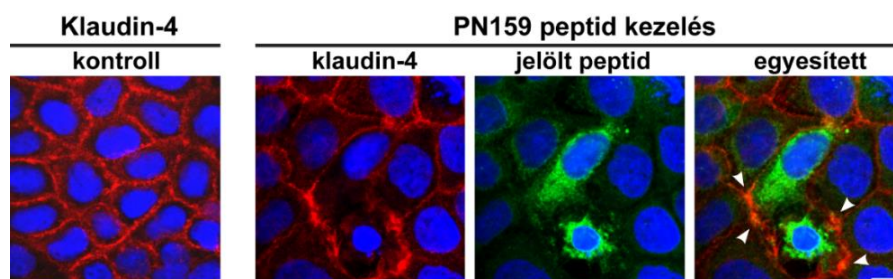


29. ábra. A ZO-1 sejtkapcsoló fehérje fluoreszcens festődése és kettős magfestés Caco-2 sejtekben 1 órás PN159 peptid kezelés után (A). Zöld: ZO-1. Piros: etídium homodimer-1 (EH-1). Különböző koncentrációjú Bodipy FL jelölt PN159 peptid bejutása élő Caco-2 epitelsejtekbe 5 perces kezelés után (B). Zöld: Bodipy FL-PN159 peptid. Kék: sejtmag. Mércé: 10 μm .

A zöld jelet adó, fluoreszcensen jelölt PN159 peptid bejutását élő Caco-2 sejtekbe konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (29B ábra). A peptid 1 és 3 μM koncentrációjánál a Caco-2 sejtek citoplazmájában zöld fluoreszcens vezikuláris festődést láttunk, ami tovább erősödött a 10 μM koncentrációnál (29B ábra).

4.6.4. A PN159 peptid és a klaudin-4 fehérje kolokalizációjának vizsgálata

Kutatócsoportunk a PN159 peptid szerkezeti modellezésének segítségével energetikailag kedvező kapcsolatot mutatott ki a klaudin-4 epiteliális sejtkapcsoló fehérje és a peptid között. Ezt az eredményt az immunhisztokémiai festéssel is igazolni tudtuk. A Bodipy FL jelölt PN159 peptid a citoplazmán kívül a sejtmembránban is detektálható volt, és a felszakadozott klaudin-4 festéssel kolokalizációt mutatott (30. ábra).



30. ábra. A Bodipy FL jelölt PN159 peptiddel (10 μM) kezelt Caco-2 sejtek immunfestése klaudin-4 sejtkapcsoló fehérjére. Piros: klaudin-4. Zöld: Bodipy FL jelölt PN159 peptid. Kék: sejtmag. Mércé: 10 μm . Nyíl: klaudin-4 és a jelölt peptid kolokalizációja.

4.7. A PN159 peptid antimikrobiális hatása

Ismert sejtpenetráló hatása miatt a PN159 peptid antimikrobiális hatását először teszteltük hat ESKAPE patogén baktériumon, széles koncentráció tartományban (0,8-70 µM). A vizsgált baktériumok közül, az *Acinetobacter baumannii* és az *Enterococcus faecium* volt a két legérzékenyebb törzs, 5 µM alatti MIC értékekkel. A *Staphylococcus aureus* és a *Klebsiella pneumoniae* esetén 10 µM körül volt a PN159 növekedésgátló koncentrációja, amely a humán epitelsejtekre is hatással volt már.

2. táblázat. A PN159 peptid, cefoxitin, gentamicin és ciprofloxacin antimikrobiális hatása különböző ESKAPE patogénekre minimális gátló koncentrációként (MIC, µM) kifejezve.

ESCAPE patogének (ATCC)	PN159	Cefoxitin	Gentamicin	Ciprofloxacin
<i>Acinetobacter baumannii</i> (17978)	3,6	222,6	0,6	0,94
<i>Enterococcus faecium</i> (700221)	4,4	>222,6	>143,9	>30,18
<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	9,2	6,9	1,1	1,89
<i>Klebsiella pneumonia</i> (10031)	13,8	3,5	0,6	0,06
<i>Enterobacter cloacae</i> spp (13047)	31,0	>222,6	1,1	0,06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	46,4	>222,6	2,3	1,89

A vankomicin rezisztens *Enterobacter cloacae* és a *Pseudomonas aeruginosa* esetében is hatékony volt a peptid, azonban a legérzékenyebb patogénnél használt peptid koncentráció 10× értékénél. A referenciaként használt baktericid antibiotikummal, a cefoxitinnel összehasonlítva, a PN159 peptid hatékonyabbnak bizonyult az *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* és *Pseudomonas aeruginosa* törzsek esetén. A gentamicin és ciprofloxacin erős antimikrobiális hatást mutatott az összes ESKAPE patogénre nézve, kivéve az *Enterococcus faecium* esetén, amely az összes vizsgált antibiotikumra rezisztens volt, azonban a PN159 peptid gátolni tudta a növekedését (2. táblázat).

5. Megbeszélés

5.1. A CFBE modell jellemzése különböző tenyésztési körülmények között

A tüdőt érintő betegségek jobb megértéséhez és vizsgálatához szükség van olyan tenyészetes epitelsejtes modellekre, amelyek az élő szervezetben jelenlévő komplexitást megfelelően tükrözik. Munkánk során létrehoztunk és jellemeztünk egy új ko-kultúra modellt a hörgőhámrétegek gátműködésének tanulmányozására cisztás fibrózisban. A kísérleteinkben használt CFBE sejtvonalat széleskörben alkalmazzák a betegség vizsgálatára és lehetséges gyógyszeres terápiák tesztelésére (Gruenert és mtsai, 2004; Castellani és mtsai, 2018). A cisztás fibrózis patológiájának vizsgálatára több kutatócsoport is vad típusú és mutáns $\Delta F508$ -CFTR csatornákkal transzfektálta a CFBE sejteket, amelyek eredendően nem expresszálnak endogén CFTR csatornát (Bebők és mtsai, 2005; Ehrhardt és mtsai, 2006; Molenda és mtsai, 2014). Az ugyanazzal a genetikai háttérrel rendelkező, de eltérő CFTR csatornát kifejező CFBE sejtvonalpárt Bebők és munkatársai hozták létre és jellemezték részleteiben (Bebők és mtsai, 2005). Kísérleteink során ezt a tenyészetes modellt vizsgáltuk mono- és ko-kultúra körülmények között. Számos tanulmány bizonyítja, hogy a WT és mutáns csatornákat expresszáló CFBE sejtek hasznos modellrendszerei az CFTR anioncsatorna biogenezisének és szabályozásának kutatására. A CFBE sejtek előnyei közé tartozik az egyszerű tenyésztés és a megfelelő CFTR csatornák erőteljes expressziója. Továbbá kifejezik a hörgőhám sejtekre jellemző tulajdonságokat: polarizált fenotípus, a CFTR apikális expressziója vad típusú sejtekben, valamint a CFTR aktivitását szabályozó adenozin és adrenerg receptorok expressziója (Bebők és mtsai, 2005). Az irodalmi adatokkal összhangban megerősítettük, hogy mindkét CFBE sejtvonal szoros barriert hoz létre, ahogy azt a magas TEER és alacsony permeabilitási értékek, valamint a jól kifejezett sejtközzéti kapcsolatok is mutatják (Molenda és mtsai, 2014). Molenda és mtsai megfigyeléséhez hasonlóan, mi is nagyfokú szórást tapasztaltunk a CFBE sejtvonalpár alap TEER és permeabilitási értékei között, ezért a különböző kísérletek során kapott adatokat összesítettük, és az értékeket a WT-CFTR CFBE csoportok százalékában ábrázoltuk. A magasabb TEER és alacsonyabb permeabilitási értékek alapján a vad típusú CFTR csatornát kifejező CFBE sejtek szorosabb sejtréteget alakítanak ki, mint a $\Delta F508$ -CFTR mutációt hordozó CFBE sejtek, ezeket az eredményeket az irodalmi adatok is alátámasztják (Castellani és mtsai, 2018; LeSimple és mtsai, 2010; Weiser és mtsai, 2011). Hasonló adatokat kaptak más egészséges és cisztás fibrózisos bronchiális epitelsejtvonalak összehasonlítása esetén (Molina és mtsai, 2015). Ezek a cikkek nemcsak a paracelluláris

transzportút szabályozásának megváltozását kapcsolják össze a CFTR kóros működésével (Weiser és mtsai, 2011), de azt is bizonyítják, hogy a WT-CFTR expressziója helyreállítja a szoros kapcsolatok lokalizációját és működését a bronchiális hámsejtekben (Castellani és mtsai, 2018).

Mivel összetettebb, az élettani körülményekhez közelebb álló kísérleti viszonyokat biztosítanak a légúti hámsejtek ko-kultúra modelljei, használatuk egyre elterjedtebb (Marescotti és mtsai, 2019; Castellani és mtsai, 2018). Ezekhez a modellekhez azonban főleg alveoláris tüdőhám sejteket alkalmaznak (Marescotti és mtsai, 2019). Sok esetben 3D organoidokként növesztik őket, a szferoidok azonban a tenyésztőbetétes modellekhez képest permeabilitási vizsgálatokra kevésbé alkalmasak (Castellani és mtsai, 2018). Néhány tanulmányt közöltek eddig humán hörgőhám és endotélsejt ko-kultúrákról, de ezeket a modelleket egészséges sejtekből állították össze (Chowdhury és mtsai, 2010; Luyts és mtsai, 2015; Blume és mtsai, 2017; Dao és mtsai, 2018; Liu és mtsai, 2019). Tanulmányunk az első, amelyben humán cisztás fibrózis bronchiális epitélsejtvonalak és humán vaszkuláris endotélsejtek felhasználásával tenyésztőbetéteken ko-kultúra modelleket hoztunk létre és jellemeztünk. Az endotélsejtek jelenléte fokozta a CFBE sejtek barrier képző tulajdonságait, megnövekedett a sejtréteg elektromos ellenállása, csökkent a különböző jelzőmolekulák átjutása. Az immunfestés alapján megállapítottuk, hogy az epitélsejtek jól szerveződött egysejtréteget hoztak létre, szoros sejtközötti kapcsolatokkal az endotélsejtek jelenlétének hatására. Az egészséges endotélsejtekkel együtt tenyésztett $\Delta F508$ -CFTR CFBE sejtek szorosabb sejtréteget hoztak létre összehasonlítva a vad típusú ko-kultúrákkal, amit a magasabb TEER értékek, a hidrofil jelzőmolekulák csökkent átjutása, és a β -katenin TJ fehérje immunfestésének sejthatáron mért nagyobb intenzitása is alátámaszt. Adataink összhangban állnak irodalmi megfigyelésekkel: egy másik humán hörgőhám epitélsejt - humán endotélsejt ko-kultúránál szintén magasabb TEER értékeket mértek. A jelenség hátterében, a megemelkedett okkludin integráns membrán TJ fehérje szint állhat, amit az endotélsejtek által termelt szolubilis faktorok idézhettek elő (Chowdhury és mtsai, 2010).

A levegő-folyadék határfelületen történő tenyésztés jobban tükrözi az élettani körülményeket, azonban kísérleteink során az így tenyésztett CFBE-sejtek gyengébb barrier tulajdonságokat mutattak a hagyományos folyadék-folyadék tenyészetekhez képest. Eredményeinket alátámasztja egy közlemény, amelyben szintén gyengébb barrier tulajdonságokat figyeltek meg a levegő-folyadék határfelületen tenyésztett CFBE sejtek esetében (Ehrhardt és mtsai, 2006). Ennek az lehet az egyik oka, hogy a CFBE410⁺ sejtvonal nem termel mucint, ezáltal a levegőn történő tenyésztése a sejtek kiszáradásához vezetett.

Mind a mi megfigyelésünk, mind az irodalmi adatok arra utalnak, hogy nem minden légúti tenyészetes modell esetében alkalmazható ez a tenyésztési körülmény.

5.2. A CFTR csatorna aktivátor és inhibitor hatásának vizsgálata a CFBE sejtpáron

A CFTR csatorna működését módosító kezelések eredményei alapján igazoltuk a modellek megbízhatóságát, és alátámasztottuk a vad típusú sejtekben a működőképes CFTR csatorna jelenlétét, míg a mutáns sejteknél annak hiányát. A cAMP kezelés hatására a WT-CFTR CFBE sejtréteg elektromos ellenállás értéke lecsökkent, amely a fokozott CFTR csatorna működés következtében megnövekedett ionáramlás eredménye. Ezzel ellentétben a csatorna gátlása a TEER értékek növekedését okozta. A mutáns csatornát hordozó CFBE sejtek esetén a megnövekedett TEER értékek csak a cAMP más sejtes modellekben is leírt barrier fokozó hatását tükrözik (Deli és mtsai, 2005), amit a mindkét sejtvonalnál megfigyelhető csökkent jelzőmolekula-átjutás is alátámaszt. Ezek az eredményeink megegyeznek az irodalomban leírt adatokkal (Molenda és mtsai, 2014; Weiser és mtsai, 2011).

5.3. Citokinek hatása a CFBE sejtvonalpár gátműködésére

A CF egyik fő jellemzője a krónikus gyulladásos folyamatok kialakulása a légzőrendszerben. Számos tenyészetes tüdőmodellen megfigyelték már a gátrendszer szorosságának csökkenését proinflammatorikus citokin kezelés hatására (Castellani és mtsai, 2018; Humlicek és mtsai, 2007). A CFBE ko-kultúra modell gyulladásos állapotra adott válaszának teszteléséhez TNF α és IL-1 β citokinek kombinációjával kezeltük meg a sejteket. A citokinek kombinációja az NF- κ B transzkripció faktor sejtmagi transzlokációját és a barrier integritás csökkenését okozta más biológiai gátmodelleken végzett korábbi vizsgálataink során, nevezetesen bélhámsejteken (Várad és mtsai, 2017) és agyi endotélsejteken (Harazin és mtsai, 2018). A gyulladásos citokinekkel történő kezelés a barrier károsodásához vezetett a ko-kultúrában növesztett CFBE hörgőhám sejtvonalak esetén is az alacsony TEER és magas permeabilitási értékek alapján. Ezt a hatást azonban a monokultúrák esetén nem tapasztaltuk: a sejtek citokinre adott válasza kismértékű volt. Mivel korábbi vizsgálatainkban citokinek hatására az endotélsejtekből felszabaduló reaktív szabadgyökök mennyisége megnőtt (Harazin és mtsai, 2018), azt feltételezzük, hogy ez is hozzájárulhat az endotélsejtek jelenlétében megfigyelt citokinekre adott fokozott epitelsejt válaszhoz. Ezek az eredmények megerősítik, hogy a ko-kultúrák alkalmasabb modellek lehetnek a gyulladásos állapotok *in vitro* vizsgálatára.

5.4. A nátrium bikarbonát hatása a CFBE tenyészetes modelleken

A bikarbonát fontos szerepet játszik a légúti nyák pH értékének és viszkozitásának szabályozásában, ezért a nátrium bikarbonát inhaláció a CF tüneti kezelésében fontos kiegészítő kezelés lehet (Quinton, 2010). Egy *in vitro* vizsgálat során a nátrium bikarbonát (100 mM) csökkentette a cisztás fibrózisos betegek bronchiális váladékának viszkozitását (Stigliani és mtsai, 2016). Klinikai vizsgálatokban a porlasztott NaHCO_3 oldat (4,2% és 8,4%) inhalálása a nyák pH értékének növekedését és viszkozitásának csökkenését okozta, továbbá igazolták, hogy a kezelés biztonságos és nincsenek mellékhatásai (Gomez és mtsai, 2020). Ezen felül a nátrium bikarbonát bakteriosztatikus hatását is leírták a cisztás fibrózisban előforduló két leggyakoribb patogén esetében. A nátrium bikarbonát (100 mM) gátolta a *Pseudomonas aeruginosa* és *Staphylococcus aureus* szaporodását és biofilm képződését, megerősítve a bikarbonát további jótékony hatását a CF terápiájában (Dobay és mtsai, 2018).

Kutatásunk egyik célja azt volt, hogy elsőként vizsgáljuk a nátrium bikarbonát különböző koncentrációinak közvetlen hatását a bronchiális epitelsejtek életképességére, gátműködésére, és a sejtek morfológiájára. Impedancia méréssel követtük nyomon a sejtek válaszát, ami alapján megállapítottuk, hogy a CFBE sejtek életképességét nem befolyásolta jelentősen a megnövekedett nátrium bikarbonát koncentráció. Kísérleteink során a 100 mM NaHCO_3 (ez a tápfolyadékban lévő mennyiség négyszerese) bizonyult a legmagasabb, de még biztonságosan alkalmazható koncentrációnak az életképesség és a sejtmorfológiai vizsgálatok alapján. Vizsgálataink során különbségeket állapítottunk meg a CFBE sejtvonalpár nátrium bikarbonátra adott válaszai között. A vad típusú CFTR csatornát kifejező CFBE sejtek érzékenyebbek voltak a nátrium bikarbonát magasabb koncentrációival szemben, míg a mutáns csatornát expresszáló epitelsejtek a kontroll csoporttal megegyező impedancia értékeket mutattak a kezelés korai és későbbi időpontjában. A sejtkapcsoló ZO-1 fehérje immunfestődésének elemzése alapján NaHCO_3 sejtréteg szorosságát fokozó hatását tudtuk kimutatni a ΔF508 -CFTR CFBE sejteknél. A legfontosabb megállapításunk az ellenállás, permeabilitás és a morfológiai eredmények alapján, hogy a nátrium bikarbonát kezelés (100 mM) nem befolyásolja jelentősen a CFBE sejtek gátműködését.

A CFTR csatorna fontos szerepet játszik a sejtek intracelluláris pH értékének szabályozásában. Egyrészt közvetlenül részt vesz a HCO_3^- transzportjában, másrészt szabályozza más csatornák működését (Chen és mtsai, 2009). Működőképes CFTR csatorna hiányában ez a szabályozási funkció sérül. A ΔF508 -CFTR csatornát hordozó CFBE

sejtekben magasabb nyugalmi sejten belüli pH értéket mértünk, mint a vad típusú sejtekben. Eredményünket alátámasztja, hogy hasonló megfigyelést tettek CFTR-KO bélepitelsejtek esetén is (Walker és mtsai, 2016). A mutáns CFBE sejtek 100 mM nátrium bikarbonáttal történő kezelése normalizálta az intracelluláris pH értéket, mégpedig a vad típusú CFBE sejtekéhez közeli szintre. Megfigyeléseink alapján a magasabb nátrium bikarbonát koncentráció nem csak biztonságosan alkalmazható a CFBE sejteken, de jótékony hatása lehet a mutáns csatornát kifejező sejtek esetén.

A nátrium bikarbonát alkalmazása (100 mM) mindkét CFBE sejtvonalban módosította a CFTR expresszióját az apikális sejtmembránban. Az extracelluláris HCO_3^- jelvivő molekulaként serkenti a szolubilis adenilát-cikláz enzim működését, ezzel megnöveli az intracelluláris cAMP-koncentrációt, ami a CREB transzkripciós faktoron keresztül fokozza a CFTR gén kifejeződését (Baudouin-Legros és mtsai, 2008). Feltételezzük, hogy a WT-CFTR csatornát expresszáló sejtek magasabb HCO_3^- permeabilitása és a cAMP útvonal aktiválódása állhat a CFTR csatorna megnövekedett apikális kifejeződésének hátterében. A csökkent membrán/citoplazma CFTR immunfluoreszcencia arány magyarázatához a ΔF508 -CFTR csatornát hordozó sejtekben további vizsgálatokra van szükség.

A morfológiai elemzések alapján a mutáns hörgőhámsejtek megnövekedett átlag sejtmagassággal rendelkeznek, ami a nagyobb sejttérfogatra utal a vad típusú CFTR csatornát kifejező sejtekhez képest. A CFTR sejttérfogat szabályozásban betöltött fontos szerepét más kutatócsoportok is bizonyították. Leírták, hogy a CFTR-KO egerekből izolált vékonybél epitelsejtekben hibás sejttérfogat-szabályozás figyelhető meg, aminek az oka, hogy hibás lesz a térfogat érzékeny K^+ csatornák CFTR-függő szabályozása (Valverde és mtsai, 1995). Egy másik tanulmányban a CFTR felerősítette és felgyorsította hipotónia után a szabályozási térfogat csökkenését ATP felszabadulással és jelátviteli utak aktiválásával járó autokrin mechanizmuson keresztül (Braunstein és mtsai, 2001). Következésképpen működő CFTR csatorna hiányában lecsökkenhet az ATP szekréciója, és ez az autokrin, purinerg jelátviteli rendszer kimerülhet mind alap, mind hipotóniás körülmények között. Továbbá a CF hámsejtek megváltozott intracelluláris Cl^- koncentrációja szintén hozzájárulhat a sejttérfogat hibás szabályozásához (Treharne és mtsai, 2006).

5.5. A PN159 peptid hatása a különböző epitelsejtes gátmodelleken

A CFBE sejtpár további jellemzéséhez a kutatócsoportunk által már korábban is vizsgált PN159/KLAL peptiddel kezeltük meg a sejteket, amely kettős hatással rendelkezik: megnyitja a sejtközi szoros kapcsolatokat (Bocsik és mtsai, 2016), valamint sejtpenetráló

tulajdonsága is van (Dathe és mtsai, 1996). Ennek a szintetikus kationos peptidnek a sejtkapcsolatokat módosító hatását humán bronchiális epitelsejteken fedezték fel először (Herman és mtsai, 2007), és hasonló hatást igazoltunk a bélhám és a vér-agy gát tenyészetes modelljein (Bocsik és mtsai, 20016). A PN159 peptid hatékonyan és reverzibilisen nyitotta meg a CFBE bronchiális epitelsejtek sejtkapcsolatait, továbbá nem volt különbség a két CFBE sejtvonalpár peptidre adott válasza között.

Caco-2 sejteken, az intesztinális gátrendszer tenyészetes modelljén, a PN159 koncentráció-függő hatását mutattuk ki a sejtkapcsolatok megnyílására, ami együtt járt az aktin sejtváz átrendeződésével. A legnagyobb változást a legmagasabb peptid koncentráció esetén tapasztaltuk, ahogy azt a korábbi kísérleteink során is kimutattuk már (Bocsik és mtsai, 2016). Csoportunk vizsgálatait során a PN159 mikromoláris tartományban történő kötődését igazoltuk a klaudin-1, -4 és -7 fehérjékhez (Bocsik és mtsai, 2016), amelyek az intesztinális epitelsejtekre jellemző kapcsolófehérjék és Caco-2 sejtekben magasan expresszáltak (Veszélka és mtsai, 2018). A peptid klaudin-4 fehérjéhez való kötődéséről molekuláris modellezéssel kapott adatokat kísérleteinkben immunhisztokémiai festéssel is megerősítettük: a fluoreszcensen jelölt peptid kolokalizációját figyeltük meg a sejtek határán a klaudin-4 fehérjével. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy a PN159 peptid a klaudinokkal kölcsönhatva nyitja meg a sejtközötti kapcsolatokat. Kísérleteinkben a Caco-2 modellen a PN159/KLAL peptid koncentráció-függő sejtfelvételét is kimutattuk élő sejteken végzett konfokális mikroszkópia alapján, ami a peptid sejtpenetráló hatásának megerősítése humán bélhám sejtekben. Eredményeinkkel megegyező hatást találtak humán melanóma sejteken, ahol a peptid gyors felvételét mutatták ki 1 μ M-os koncentrációban (Hällbrink és mtsai, 2001). A PN159 peptid sejtekbe jutását ezen kívül még négy sejtvonalon igazolták, ezekben a kísérletekben 10 μ M-os koncentrációt alkalmazva a peptid sejtkárosítás nélkül jutott be a sejtek citoplazmájába (Mueller és mtsai, 2008).

5.6. A PN159 peptid antimikrobiális hatása

A sejtpenetráló peptidek többsége antimikrobiális hatással rendelkezik szerkezeti tulajdonságaikból adódóan, különösen a kationos és az amfipatikus membrán-aktív peptidek (Arouri és mtsai, 2013). Irodalmi adatok alapján az amfipatikus PN159 peptid hatékonyan gátolta különböző mikroorganizmusok növekedését, úgymint *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus megaterium*, *Saccharomyces cerevisiae* (Dathe és mtsai, 1996; Palm és mtsai, 2006; Bagheri és mtsai, 2009). Munkánk során kimutattuk a PN159 peptid antimikrobiális hatását a 3-46 μ M koncentráció tartományban klinikailag

releváns ESKAPE patogének esetén. A referencia antibiotikumokkal összehasonlítva a PN159 hatékonyabbnak bizonyult az *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* és *Pseudomonas aeruginosa* baktériumok növekedésének gátlásában. Irodalmi adatok alapján egy másik amfipatikus antimikrobiális peptid, a melittin is gátolta az *Escherichia coli* és *Micrococcus luteus* növekedését (Maher és McClean, 2006), továbbá három ESKAPE patogénen is tesztelték. Az *Acinetobacter baumannii* és a *Pseudomonas aeruginosa* érzékenyebb volt a melittin kezelésre, mint a *Klebsiella pneumoniae*, amely növekedésének gátlásához több mint 100 μM melittinre volt szükség (Lam és mtsai, 2016), míg tanulmányunkban 10 μM körüli PN159 már hatékonynak bizonyult.

5.7. Összegzés

Az adjuváns terápiák fontos részét képezik a betegségek kezelésének, ezért fontos és intenzíven kutatott területet képvisel az új módszerek és kiegészítő gyógyászati szerek feltárása. Vizsgálataink során a nátrium bikarbonátot, a cisztás fibrózis betegség lehetséges kiegészítő terápiás szerét, valamint a PN159/KLAL kettős hatású peptidet vizsgáltuk a humán epitelsejtes gátrendszerek tenyészetes modelljein. Kísérleteinkben elsőként hoztunk létre és jellemeztünk egy, a cisztás fibrózis vizsgálatára alkalmas ko-kultúra modellt CF bronchiális epitelsejtvonalak és humán endotelsejtek együtt tenyésztésével. Különbségeket állapítottunk meg a vad típusú és a mutáns CFTR csatornát hordozó bronchiális epitelsejtek között a különböző kezelésekre adott válaszaik alapján. Vizsgálatainkkal először mutattuk ki a nátrium bikarbonát közvetlen jótékony hatását a ΔF508 -CFTR CFBE sejteken. Munkánk során igazoltuk a PN159/KLAL peptid membránpermeabilitást és sejtkapcsolatokat módosító hatását a Caco-2 bélhám, és a CFBE hörgőhám modelleken. Kimutattuk a peptid interakcióját a klaudin-4 sejtkapcsoló fehérjével. Munkánk során feltártuk a PN159 peptid antimikrobiális hatását klinikailag releváns ESKAPE patogén baktériumok esetén. Referencia antibiotikumokkal összehasonlítva a PN159 peptid hatékonyabbnak bizonyult a *Pseudomonas aeruginosa* esetében, ami a krónikus légúti fertőzés és gyulladás okozta nagyszámú elhalálozás legfőbb oka cisztás fibrózisban. Eredményeink alapján a nátrium bikarbonát biztonságosan alkalmazható kiegészítő terapia lehet a cisztás fibrózis kezelésében. A kettős hatású biológiailag aktív PN159 peptid egyrészt a gátrendszereken keresztüli gyógyszerátjuttatásra és cisztás fibrózisban a génterápiás szerek hatékonyságának növelésére, másrészt rezisztens baktériumok elleni védekezésre lehetne alkalmas.

6. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, Dr. Deli Máriának és Dr. Bocsik Alexandrának a munkám során nyújtott szakmai irányításért. Külön köszönöm Dr. Deli Máriának a szüntelen támogatását és a türelmét, továbbá, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy a csoportjában kiemelkedő szakmai körülmények között és baráti környezetben dolgozhassak.

Ezúton szeretném megköszönni a Biológiai Barrierék Kutatócsoport valamennyi jelenlegi és egykori munkatársának – Dr. Veszélka Szilvia, Dr. Hoyk Zsófia, Dr. Walter Fruzsina, Dr. Harazin András, Dr. Mészáros Mária, Dr. Ana Raquel Pato Santa Maria, Barna Lilla, Vigh Judit, Porkoláb Gergő, Dr. Sántha Petra, Dr. Kiss Lóránd, és a tudományos diákkörös hallgatóink – a mindennapi nyitott, baráti légkört és a rengeteg szakmai támogatást, segítséget.

Külön köszönöm Dr. Kiss Lórándnak és Dr. Kürtiné Bocsik Alexandrának hogy diákkoromban megtanították nekem a kutatáshoz szükséges alapvető kísérletes technikákat.

Köszönöm Dr. Ormos Pálnak és Dr. Nagy Ferencnek, az SZBK Igazgatóinak, Dr. Zimányi Lászlónak a Biofizikai Intézet igazgatójának és Dr. Siklós Lászlónak, a Biofizikai Intézet Molekuláris Neurobiológiai Kutatóegysége vezetőjének, hogy lehetővé tették az intézetben való munkámat. Köszönöm a kutatóegység, a Biofizikai Intézet és az egész kutatóközpont minden munkatársának támogatását, kiemelve Dr. Vizsnyiczai Gaszton segítségét a képanalízis elvégzésében.

Szeretném megköszönni együttműködő partnereinknek, akik lehetővé tették a közös cikkek létrejöttét. Hálás köszönet Dr. Bebők Zsuzsannának, hogy biztosította a számunkra a CFBE sejtvonalat és Dr. Zsembery Ákosnak a bikarbonáttal végzett kísérletek során nyújtott szakmai támogatásáért. Köszönet illeti Dr. Rakonczay Zoltánt, Dr. Kiss Lórándot és Fűr Gabriellát, akik az intracelluláris pH mérést végezték. Köszönöm Dr. Fülöp Líviának és Gyebrovszki Andreának, hogy előállították számunkra a PN159 peptidet, Dr. Daruka Leilának Dr. Pál Csaba csoportjából pedig, hogy letesztelte azt baktériumokon.

Kimondhatatlanul hálás vagyok barátaimnak az egyetemi és a doktori éveim alatt adott biztatásukért, szeretetükért, hogy hittek bennem és mindig támogattak.

Végezetül pedig mélységes hálával tartozom családomnak, Édesanyámnak, Édesapámnak és Testvéreimnek, a feltétlen szeretetért és támogatásért.

A kísérletek a GINOP-2.2.1-15-2016-00007 és az EFOP-3.6.2-16-2017-00006 pályázatok támogatásával valósultak meg.

Az 1., 7., 8., és 10. ábrát az BioRender.com internetes oldal segítségével készítettem el.

7. Hivatkozások

- Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis*. 2013 May;36(3):437-49.
- Agent P, Parrott H. Inhaled therapy in cystic fibrosis: agents, devices and regimens. *Breathe (Sheff)*. 2015 Jun;11(2):110-8.
- Agu RU, Ugwoke MI, Armand M, Kinget R, Verbeke N. The lung as a route for systemic delivery of therapeutic proteins and peptides. *Respir Res*. 2001;2(4):198-209.
- Arouri A, Dathe M, Blume A. The helical propensity of KLA amphipathic peptides enhances their binding to gel-state lipid membranes. *Biophys Chem*. 2013 Oct-Nov;180-181:10-21.
- Aungst BJ. Absorption enhancers: applications and advances. *AAPS J*. 2012 Mar;14(1):10-8.
- Awatade NT, Uliyakina I, Farinha CM, Clarke LA, Mendes K, Solé A, Pastor J, Ramos MM, Amaral MD. Measurements of Functional Responses in Human Primary Lung Cells as a Basis for Personalized Therapy for Cystic Fibrosis. *EBioMedicine*. 2014 Dec 17;2(2):147-53.
- Awatade NT, Wong SL, Hewson CK, Fawcett LK, Kicic A, Jaffe A, Waters SA. Human Primary Epithelial Cell Models: Promising Tools in the Era of Cystic Fibrosis Personalized Medicine. *Front Pharmacol*. 2018 Dec 7;9:1429.
- Bagheri M, Beyermann M, Dathe M. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Mar;53(3):1132-41.
- Baron J, Burke JP, Guengerich FP, Jakoby WB, Voigt JM. Sites for xenobiotic activation and detoxication within the respiratory tract: implications for chemically induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988 May;93(3):493-505.
- Baudouin-Legros M, Hamdaoui N, Borot F, Fritsch J, Ollero M, Planelles G, Edelman A. Control of basal CFTR gene expression by bicarbonate-sensitive adenylyl cyclase in human pulmonary cells. *Cell Physiol Biochem*. 2008;21(1-3):75-86.
- Bebok Z, Collawn JF, Wakefield J, Parker W, Li Y, Varga K, Sorscher EJ, Clancy JP. Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o- airway epithelial monolayers. *J Physiol*. 2005 Dec 1;569(Pt 2):601-15.
- Benson K, Cramer S, Galla HJ. Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond. *Fluids Barriers CNS*. 2013 Jan 10;10(1):5.
- Betteridge KB, Arkill KP, Neal CR, Harper SJ, Foster RR, Satchell SC, Bates DO, Salmon AHJ. Sialic acids regulate microvessel permeability, revealed by novel in vivo studies of endothelial glycocalyx structure and function. *J Physiol*. 2017 Aug 1;595(15):5015-5035.
- Bhat PG, Flanagan DR, Donovan MD. Drug diffusion through cystic fibrotic mucus: steady-state permeation, rheologic properties, and glycoprotein morphology. *J Pharm Sci*. 1996 Jun;85(6):624-30.

- Blume C, Reale R, Held M, Loxham M, Millar TM, Collins JE, Swindle EJ, Morgan H, Davies DE. Cellular crosstalk between airway epithelial and endothelial cells regulates barrier functions during exposure to double-stranded RNA. *Immun Inflamm Dis*. 2017 Jan 18;5(1):45-56.
- Bocsik A, Walter FR, Gyebrovski A, Fülöp L, Blasig I, Dabrowski S, Ötvös F, Tóth A, Rákhely G, Veszélka S, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA. Reversible Opening of Intercellular Junctions of Intestinal Epithelial and Brain Endothelial Cells With Tight Junction Modulator Peptides. *J Pharm Sci*. 2016 Feb;105(2):754-765.
- Boucher RC. Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration. *Trends Mol Med*. 2007 Jun;13(6):231-40.
- Boucher HW, Talbot GH, Bradley JS, Edwards JE, Gilbert D, Rice LB, Scheld M, Spellberg B, Bartlett J. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*. 2009 Jan 1;48(1):1-12.
- Brandner JM. Importance of Tight Junctions in Relation to Skin Barrier Function. *Curr Probl Dermatol*. 2016;49:27-37.
- Braunstein GM, Roman RM, Clancy JP, Kudlow BA, Taylor AL, Shylonsky VG, Jovov B, Peter K, Jilling T, Ismailov II, Benos DJ, Schwiebert LM, Fitz JG, Schwiebert EM. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J Biol Chem*. 2001 Mar 2;276(9):6621-30.
- Brouillard F, Bouthier M, Leclerc T, Clement A, Baudouin-Legros M, Edelman A. NF-kappa B mediates up-regulation of CFTR gene expression in Calu-3 cells by interleukin-1beta. *J Biol Chem*. 2001 Mar 23;276(12):9486-91.
- Castellani S, Di Gioia S, di Toma L, Conese M. Human Cellular Models for the Investigation of Lung Inflammation and Mucus Production in Cystic Fibrosis. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2018 Nov 15;2018:3839803.
- Castoldi A, Favero de Aguiar C, Moraes-Vieira PM, Olsen Saraiva Câmara N. They Must Hold Tight: Junction Proteins, Microbiota And Immunity In Intestinal Mucosa. *Curr Protein Pept Sci*. 2015;16(7):655-71.
- Cecchelli R, Aday S, Sevin E, Almeida C, Culot M, Dehouck L, Coisne C, Engelhardt B, Dehouck MP, Ferreira L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS One*. 2014 Jun 17;9(6):e99733.
- Cereijido M, Contreras RG, Shoshani L, Flores-Benitez D, Larre I. Tight junction and polarity interaction in the transporting epithelial phenotype. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):770-93.
- Chan J, Cheng-Lai A. Inhaled Insulin: A Clinical and Historical Review. *Cardiol Rev*. 2017 May/Jun;25(3):140-146.
- Chang MM-J, Shih L, Wu R. Pulmonary Epithelium: Cell Types and Functions (2008) *The Pulmonary Epithelium in Health and Disease*, pp. 1-26

- Chen JH, Cai Z, Sheppard DN. Direct sensing of intracellular pH by the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Cl⁻ channel. *J Biol Chem*. 2009 Dec 18;284(51):35495-506.
- Chen SC, Eiting K, Cui K, Leonard AK, Morris D, Li CY, Farber K, Sileno AP, Houston ME Jr, Johnson PH, Quay SC, Costantino HR. Therapeutic utility of a novel tight junction modulating peptide for enhancing intranasal drug delivery. *J Pharm Sci*. 2006 Jun;95(6):1364-71.
- Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):588-600.
- Chowdhury F, Howat WJ, Phillips GJ, Lackie PM. Interactions between endothelial cells and epithelial cells in a combined cell model of airway mucosa: effects on tight junction permeability. *Exp Lung Res*. 2010 Feb;36(1):1-11.
- Copolovici DM, Langel K, Eriste E, Langel Ü. Cell-penetrating peptides: design, synthesis, and applications. *ACS Nano*. 2014 Mar 25;8(3):1972-94.
- Cystic Fibrosis Mutation Database; <http://www.genet.sickkids.on.ca/app> (2021.03.12.))
- Dabrowski S, Staat C, Zwanziger D, Sauer RS, Bellmann C, Günther R, Krause E, Haseloff RF, Rittner H, Blasig IE. Redox-sensitive structure and function of the first extracellular loop of the cell-cell contact protein claudin-1: lessons from molecular structure to animals. *Antioxid Redox Signal*. 2015 Jan 1;22(1):1-14.
- Dalemans W, Barbry P, Champigny G, Jallat S, Dott K, Dreyer D, Crystal RG, Pavirani A, Lecocq JP, Lazdunski M. Altered chloride ion channel kinetics associated with the delta F508 cystic fibrosis mutation. *Nature*. 1991 Dec 19-26;354(6354):526-8.
- Dao DT, Vuong JT, Anez-Bustillos L, Pan A, Mitchell PD, Fell GL, Baker MA, Bielenberg DR, Puder M. Intranasal delivery of VEGF enhances compensatory lung growth in mice. *PLoS One*. 2018 Jun 7;13(6):e0198700.
- Dathe M, Schümann M, Wieprecht T, Winkler A, Beyermann M, Krause E, Matsuzaki K, Murase O, Bienert M. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* 1996, 35, 12612–12622.
- Deli MA, Abrahám CS, Kataoka Y, Niwa M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol Neurobiol*. 2005 Feb;25(1):59-127.
- Deli MA. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1788(4):892- 910.
- Deli MA. Drug Transport and the Blood-Brain Barrier. In: Solubility, Delivery and ADME Problems of Drugs and Drug Candidates, editors: Tihanyi K and Vastag M., Bentham E-books, 2011, 144-165.
- Dobay O, Laub K, Stercz B, Kéri A, Balázs B, Tóthpál A, Kardos S, Jaikumpun P, Ruksakiet K, Quinton PM, et al. Bicarbonate Inhibits Bacterial Growth and Biofilm Formation of Prevalent Cystic Fibrosis Pathogens. *Front Microbiol*. 2018, 9, 2245.

- ECFS Patient Registry Annual Data Report 2018, <https://www.ecfs.eu/news/ecfs-patient-registry-annual-data-report-2018> (2021.03.12.)
- Ehrhardt C, Collnot EM, Baldes C, Becker U, Laue M, Kim KJ, Lehr CM. Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o-. *Cell Tissue Res.* 2006 Mar;323(3):405-15.
- Emerson J, Rosenfeld M, McNamara S, Ramsey B, Gibson RL. *Pseudomonas aeruginosa* and other predictors of mortality and morbidity in young children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 2002 Aug;34(2):91-100.
- Evans MJ, Van Winkle LS, Fanucchi MV, Plopper CG. Cellular and molecular characteristics of basal cells in airway epithelium. *Exp Lung Res.* 2001 Jul-Aug;27(5):401-15.
- Frank JA. Claudins and alveolar epithelial barrier function in the lung. *Ann N Y Acad Sci.* 2012 Jun;1257:175-83.
- Franks TJ, Colby TV, Travis WD, et al. Resident cellular components of the human lung. Current knowledge and goals for research on cell phenotyping and function. *Proc Am Thorac Soc .* 2008;5:763–766.
- Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29;141(7):1539-50.
- Gentzsch M, Boyles SE, Cheluvvaraju C, Chaudhry IG, Quinney NL, Cho C, Dang H, Liu X, Schlegel R, Randell SH. Pharmacological Rescue of Conditionally Reprogrammed Cystic Fibrosis Bronchial Epithelial Cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017 May;56(5):568-574.
- Gomez CCS, Parazzi PLF, Clinckspoor KJ, Mauch RM, Pessine FBT, Levy CE, Peixoto AO, Ribeiro MÂGO, Ribeiro AF, Conrad D, Quinton PM, Marson FAL, Ribeiro JD. Safety, Tolerability, and Effects of Sodium Bicarbonate Inhalation in Cystic Fibrosis. *Clin Drug Investig.* 2020 Feb;40(2):105-117.
- Griffiths MJ, Bonnet D, Janes SM. Stem cells of the alveolar epithelium. *Lancet.* 2005 Jul 16-22;366(9481):249-60.
- Gruenert DC, Willems M, Cassiman JJ, Frizzell RA. Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J Cyst Fibros.* 2004 Aug;3 Suppl 2:191-6.
- Hällbrink M, Florén A, Elmquist A, Pooga M, Bartfai T, Langel U. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Dec 1;1515(2):101-9.
- Hancock RE, Speert DP. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. *Drug Resist Updat.* 2000 Aug;3(4):247-255.
- Harazin A, Bocsik A, Barna L, Kincses A, Váradi J, Fenyvesi F, Tubak V, Deli MA, Vecsernyés M. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ.* 2018 May 15;6:e4774.

- Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, Wolburg H, Blasig IE. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood-brain barrier: structural and functional aspects. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Feb;38:16-25.
- Hausmann R, Grepl M, Knecht V, Moeller MJ. The glomerular filtration barrier function: new concepts. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2012 Jul;21(4):441-9.
- Herman RE, Makienko EG, Prieve MG, Fuller M, Houston ME Jr, Johnson PH. Phage display screening of epithelial cell monolayers treated with EGTA: identification of peptide FDFWITP that modulates tight junction activity. *J Biomol Screen.* 2007 Dec;12(8):1092-101.
- Hiemstra PS, Grootaers G, van der Does AM, Krul CAM, Kooter IM. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicol In Vitro.* 2018 Mar;47:137-146.
- Hong KU, Reynolds SD, Watkins S, Fuchs E, Stripp BR. Basal cells are a multipotent progenitor capable of renewing the bronchial epithelium. *Am J Pathol.* 2004 Feb;164(2):577-88.
- Humlicek AL, Manzel LJ, Chin CL, Shi L, Excoffon KJ, Winter MC, Shasby DM, Look DC. Paracellular permeability restricts airway epithelial responses to selectively allow activation by mediators at the basolateral surface. *J Immunol.* 2007 May 15;178(10):6395-403.
- Johnson PH, Quay SC. Advances in nasal drug delivery through tight junction technology. *Expert Opin Drug Deliv.* 2005 Mar;2(2):281-98.
- Keogh RH, Szczesniak R, Taylor-Robinson D, Bilton D. Up-to-date and projected estimates of survival for people with cystic fibrosis using baseline characteristics: A longitudinal study using UK patient registry data. *J Cyst Fibros.* 2018 Mar;17(2):218-227.
- Khanvilkar K, Donovan MD, Flanagan DR. Drug transfer through mucus. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001 Jun 11;48(2-3):173-93.
- Kiss L, Hellinger É, Pilbat AM, Kittel Á, Török Z, Füredi A, Szakács G, Veszélka S, Sipos P, Ózsvári B, Puskás LG, Vastag M, Szabó-Révész P, Deli MA. Sucrose esters increase drug penetration, but do not inhibit p-glycoprotein in caco-2 intestinal epithelial cells. *J Pharm Sci.* 2014 Oct;103(10):3107-19.
- Kiss L, Walter FR, Bocsik A, Veszélka S, Ozsvári B, Puskás LG, Szabó-Révész P, Deli MA. Kinetic analysis of the toxicity of pharmaceutical excipients Cremophor EL and RH40 on endothelial and epithelial cells. *J Pharm Sci.* 2013 Apr;102(4):1173-81.
- Kiyokawa H, Morimoto M. Notch signaling in the mammalian respiratory system, specifically the trachea and lungs, in development, homeostasis, regeneration, and disease. *Dev Growth Differ.* 2020 Jan;62(1):67-79.
- Kopeikin Z, Yukesk Z, Yang H, Bompadre SG. Combined effects of VX-770 and VX-809 on several functional abnormalities on F508del-CFTR channels. *J Cyst Fibros.* 2014;13:508–14
- Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1778(3):631-45.

- Krause G, Winkler L, Piehl C, Blasig I, Piontek J, Müller SL. Structure and function of extracellular claudin domains. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 May;1165:34-43.
- Kürti L., Deli M., Szabóné Révész P. Intranazális gyógyszerbevitel újabb lehetőségei szisztémás hatás elérése céljából. *Gyógyszerészet* 2009; 53, 67–73.
- Kürti L, Gáspár R, Márki Á, Kápolna E, Bocsik A, Veszélka S, Bartos C, Ambrus R, Vastag M, Deli MA, Szabó-Révész P. In vitro and in vivo characterization of meloxicam nanoparticles designed for nasal administration. *Eur J Pharm Sci.* 2013 Sep 27;50(1):86-92.
- Lam SJ, O'Brien-Simpson NM, Pantarat N, Sulistio A, Wong EH, Chen YY, Lenzo JC, Holden JA, Blencowe A, Reynolds EC, Qiao GG. Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nat Microbiol.* 2016 Sep 12;1(11):16162.
- Lázár V, Martins A, Spohn R, Daruka L, Grézel G, Fekete G, Számel M, Jangir PK, Kintses B, Csörgő B, Nyerges Á, Györkei Á, Kincses A, Dér A, Walter FR, Deli MA, Urbán E, Hegedűs Z, Olajos G, Méhi O, Bálint B, Nagy I, Martinek TA, Papp B, Pál C. Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nat Microbiol.* 2018 Jun;3(6):718-731.
- Ledford H. Drug bests cystic-fibrosis mutation. *Nature.* 2012 Feb 7;482(7384):145.
- LeSimple P, Liao J, Robert R, Gruenert DC, Hanrahan JW. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator trafficking modulates the barrier function of airway epithelial cell monolayers. *J Physiol.* 2010 Apr 15;588(Pt 8):1195-209.
- Liu Z, Mackay S, Gordon DM, Anderson JD, Haithcock DW, Garson CJ, Tearney GJ, Solomon GM, Pant K, Prabhakarparandian B, et al. Co-cultured microfluidic model of the airway optimized for microscopy and micro-optical coherence tomography imaging. *Biomed. Opt. Express.* 2019, 10, 5414–5430.
- Lofthsson T, Vogensen SB, Brewster ME, Konrádssóttir F. Effects of cyclodextrins on drug delivery through biological membranes. *J Pharm Sci.* 2007 Oct;96(10):2532-46.
- Lopes-Pacheco M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol.* 2020 Feb 21;10:1662.
- Lu YC, Chen H, Fok KL, Tsang LL, Yu MK, Zhang XH, Chen J, Jiang X, Chung YW, Ma AC, Leung AY, Huang HF, Chan HC. CFTR mediates bicarbonate-dependent activation of miR-125b in preimplantation embryo development. *Cell Res.* 2012 Oct;22(10):1453-66.
- Lukacs GL, Chang XB, Bear C, Kartner N, Mohamed A, Riordan JR, Grinstein S. The delta F508 mutation decreases the stability of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the plasma membrane. Determination of functional half-lives on transfected cells. *J Biol Chem.* 1993 Oct 15;268(29):21592-8.
- Lumsden AB, McLean A, Lamb D. Goblet and Clara cells of human distal airways: evidence for smoking induced changes in their numbers. *Thorax.* 1984 Nov;39(11):844-9.

- Luyts K, Napierska D, Dinsdale D, Klein SG, Serchi T, Hoet PH. A coculture model of the lung–blood barrier: the role of activated phagocytic cells. *Toxicol In Vitro*. 2015 Feb;29(1):234-41.
- Maher S, McClean S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem Pharmacol*. 2006 Apr 28;71(9):1289-98.
- Marescotti D, Serchi T, Luettich K, Xiang Y, Moschini E, Talikka M, Martin F, Baumer K, Dulize R, Peric D, et al. How complex should an in vitro model be? Evaluation of complex 3D alveolar model with transcriptomic data and computational biological network models. *ALTEX* 2019, 36, 388–402.
- McCarron A, Donnelley M, Parsons D. Airway disease phenotypes in animal models of cystic fibrosis. *Respir Res*. 2018 Apr 2;19(1):54.
- McElvaney OJ, Wade P, Murphy M, Reeves EP, McElvaney NG. Targeting airway inflammation in cystic fibrosis. *Expert Rev Respir Med*. 2019 Nov;13(11):1041-1055.
- Molenda N, Urbanova K, Weiser N, Kusche-Vihrog K, Günzel D, Schillers H. Paracellular transport through healthy and cystic fibrosis bronchial epithelial cell lines--do we have a proper model? *PLoS One*. 2014 Jun 19;9(6):e100621.
- Molina SA, Stauffer B, Moriarty HK, Kim AH, McCarty NA, Koval M. Junctional abnormalities in human airway epithelial cells expressing F508del CFTR. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2015 Sep 1;309(5):L475-87.
- Mueller J, Kretzschmar I, Volkmer R, Boisguerin P. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug Chem*. 2008 Dec;19(12):2363-74.
- Nanjwade BK, Adichwal SA, Gaikwad KR, Parikh KA, Manvi FV. Pulmonary drug delivery: novel pharmaceutical technologies breathe new life into the lungs. *PDA J Pharm Sci Technol*. 2011 Sep-Oct;65(5):513-34.
- Nettesheim P, Jetten AM, Inayama Y, Brody AR, George MA, Gilmore LB, Gray T, Hook GE. Pathways of differentiation of airway epithelial cells. *Environ Health Perspect*. 1990 Apr;85:317-29.
- Oehlke J, Scheller A, Wiesner B, Krause E, Beyermann M, Klauschenz E, Melzig M, Bienert M. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 11;1414(1-2):127-39.
- Palm C, Netzereab S, Hällbrink M. Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides*. 2006 Jul;27(7):1710-6.
- Paris L, Tonutti L, Vannini C, Bazzoni G. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):646-59.
- Pedroso DC, Tellechea A, Moura L, Fidalgo-Carvalho I, Duarte J, Carvalho E, Ferreira L. Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS One*. 2011 Jan 24;6(1):e16114.

- Pezzulo AA, Tang XX, Hoegger MJ, Abou Alaiwa MH, Ramachandran S, Moninger TO, Karp PH, Wohlford-Lenane CL, Haagsman HP.v.EM, Bánfi B, et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* 2012, 487, 109–113.
- Quinton, P.M. Role of epithelial HCO₃⁻ transport in mucin secretion: Lessons from cystic fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2010, 299, C1222–C1233
- Radtke T, Nevitt SJ, Hebestreit H, Kriemler S. Physical exercise training for cystic fibrosis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2017 Nov 1;11(11):CD002768.
- Rafeeq MM, Murad HAS. Cystic fibrosis: current therapeutic targets and future approaches. *J Transl Med.* 2017 Apr 27;15(1):84.
- Reis M, Liebner S. Wnt signaling in the vasculature. *Exp Cell Res.* 2013 May 15;319(9):1317-23.
- Rhodin JA. The ciliated cell. Ultrastructure and function of the human tracheal mucosa. *Am Rev Respir Dis.* 1966 Mar;93(3):Suppl:1-15.
- Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, Casado Bedmar M, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015 Nov;107(11):686-96.
- Scheuch G, Kohlhaeufel MJ, Brand P, Siekmeier R. Clinical perspectives on pulmonary systemic and macromolecular delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006 Oct 31;58(9-10):996-1008.
- Schlingmann B, Molina SA, Koval M. Claudins: Gatekeepers of lung epithelial function. *Semin Cell Dev Biol.* 2015 Jun;42:47-57.
- Serafini SM, Michaelson ED. Length and distribution of cilia in human and canine airways. *Bull Eur Physiopathol Respir.* 1977 Jul-Aug;13(4):551-9.
- Simonin J, Bille E, Crambert G, Noel S, Dreano E, Edwards A, Hatton A, Pranke I, Villeret B, Cottart CH, et al. Author Correction: Airway surface liquid acidification initiates host defense abnormalities in Cystic Fibrosis. In *Sci. Rep.*; 2019; Volume 9.
- Singh G, Katyal SL, Brown WE, Kennedy AL, Singh U, Wong-Chong ML. Clara cell 10 kDa protein (CC10): comparison of structure and function to uteroglobin. *Biochim Biophys Acta.* 1990 Jul 6;1039(3):348-55.
- Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S. *Clostridium perfringens* enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol.* 1999 Oct 4;147(1):195-204.
- Staat C, Coisne C, Dabrowski S, Stamatovic SM, Andjelkovic AV, Wolburg H, Engelhardt B, Blasig IE. Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. *Biomaterials.* 2015 Jun;54:9-20.
- Stigliani M, Manniello MD, Zegarra-Moran O, Galiotta L, Minicucci L, Casciaro R, Garofalo E, Incarnato L, Aquino RP, Del Gaudio P, Russo P. Rheological Properties

- of Cystic Fibrosis Bronchial Secretion and in Vitro Drug Permeation Study: The Effect of Sodium Bicarbonate. *J Aerosol Med Pulm Drug Deliv.* 2016 Aug;29(4):337-45.
- Strickley RG. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. *Pharm Res.* 2004 Feb;21(2):201-30.
- Suzuki H, Nishizawa T, Tani K, Yamazaki Y, Tamura A, Ishitani R, Dohmae N, Tsukita S, Nureki O, Fujiyoshi Y. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science.* 2014 Apr 18;344(6181):304-7.
- Taghipoor M. Modélisation Du Transport, De La Dégradation Et De L'absorption Des Aliments Dans L'intestin Grêle./ Modelling of feedstuffs transport, degradation and absorption in the small intestine. *Dynamical Systems.* PhD thesis, Université François Rabelais, Tours, 2012.; pp. 1-116, in French.
- Tirouvanziam R, Conrad CK, Bottiglieri T, Herzenberg LA, Moss RB, Herzenberg LA. High-dose oral N-acetylcysteine, a glutathione prodrug, modulates inflammation in cystic fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Mar 21;103(12):4628-33.
- Treharne KJ, Crawford RM, Mehta A. CFTR, chloride concentration and cell volume: could mammalian protein histidine phosphorylation play a latent role? *Exp Physiol.* 2006 Jan;91(1):131-9.
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 Nov;9(11):799-809.
- Valverde MA, O'Brien JA, Sepúlveda FV, Ratcliff RA, Evans MJ, Colledge WH. Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Sep 26;92(20):9038-41.
- Vandenhoute E, Drolez A, Sevin E, Gosselet F, Mysiorek C, Dehouck MP. Adapting coculture in vitro models of the blood-brain barrier for use in cancer research: maintaining an appropriate endothelial monolayer for the assessment of transendothelial migration. *Lab Invest.* 2016 May;96(5):588-98.
- Van Der Flier L, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009;71:241-60.
- Van Goor F, Straley KS, Cao D, González J, Hadida S, Hazlewood A, Joubran J, Knapp T, Makings LR, Miller M., *et al.* Rescue of DeltaF508-CFTR trafficking and gating in human cystic fibrosis airway primary cultures by small molecules. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2006 Jun;290(6):L1117-30.
- Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PD, *et al.* Correction of the F508del- CFTR protein processing defect in vitro by the investigational drug VX-809. *Proc Natl Am Sci USA.* 2011;108(46):18843–8.
- Van Itallie CM, Anderson JM. Architecture of tight junctions and principles of molecular composition. *Semin Cell Dev Biol.* 2014 Dec;36:157-65.
- Váradi J, Harazin A, Fenyvesi F, Réti-Nagy K, Gogolák P, Vámosi G, Bácskay I, Fehér P, Ujhelyi Z, Vasvári G, Róka E, Haines D, Deli MA, Vecsernyés M. Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Protects against Cytokine-Induced Barrier Damage in Caco-2 Intestinal Epithelial Monolayers. *PLoS One.* 2017 Jan 19;12(1):e0170537.

- Vecsernyés M, Fenyvesi F, Bácskay I, Deli MA, Szenté L, Fenyvesi É. Cyclodextrins, blood-brain barrier, and treatment of neurological diseases. *Arch Med Res*. 2014 Nov;45(8):711-29.
- Veszélka S, Tóth A, Walter FR, Tóth AE, Gróf I, Mészáros M, Bocsik A, Hellinger É, Vastag M, Rákhely G, Deli MA. Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Front Mol Neurosci*. 2018 May 22;11:166.
- Viart V, Bergougnoux A, Bonini J, Varilh J, Chiron R, Tabary O, Molinari N, Claustres M, Taulan-Cadars M. Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur Respir J*. 2015 Jan;45(1):116-28.
- Wainwright CE, Elborn JS, Ramsey BW, Marigowda G, Huang X, Cipolli M, et al. Lumacaftor-ivacaftor in patients with cystic fibrosis homozygous for phe508del CFTR. *N Engl J Med* 2015;373:220-31.
- Walker NM, Liu J, Stein SR, Stefanski CD, Strubberg AM, Clarke LL. Cellular chloride and bicarbonate retention alters intracellular pH regulation in Cfr KO crypt epithelium. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2016 Jan 15;310(2):G70-80.
- Ward CL, Omura S, Kopito RR. Degradation of CFTR by the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell*. 1995 Oct 6;83(1):121-7.
- Ward, P. D., Tippin, T. K., & Thakker, D. R. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharmaceutical science & technology today*, 2000;3(10), 346–358.
- Weiser N, Molenda N, Urbanova K, Bähler M, Pieper U, Oberleithner H, Schillers H. Paracellular permeability of bronchial epithelium is controlled by CFTR. *Cell Physiol Biochem*. 2011;28(2):289-96.
- Whiting P, Al M, Burgers L, Westwood M, Ryder S, Hoogendoorn M, Armstrong N, Allen A, Severens H, Kleijnen J. Ivacaftor for the treatment of patients with cystic fibrosis and the G551D mutation: a systematic review and cost-effectiveness analysis. *Health Technol Assess*. 2014 Mar;18(18):1-106.
- Widdicombe JG. Airway liquid: a barrier to drug diffusion? *Eur Respir J*. 1997 Oct;10(10):2194-7.
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat Protoc*. 2008;3(2):163-75.
- Youdim KA, Avdeef A, Abbott NJ. In vitro trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today*. 2003 Nov 1;8(21):997-1003.

8. Összefoglalás

Tenyésztési modellek alkalmazása biológiailag aktív peptidek és adjuváns terápiás szerek hatásának vizsgálatára

Az epitelsejtes biológiai gátrendszerek kulcsfontosságúak a szervezet és egyes szervek védelmében. Emellett számos betegségben is fontos szerepet játszanak: egyrészt működési zavaruk, vagy károsodásuk a betegségek kialakulását elősegítheti és lefolyását súlyosbíthatja, másrészt az epitelsejtek fizikai és kémiai védelmi rendszerei gátolhatják a gyógyszerek felszívódását és bejutását az egyes szervekbe. Sok betegség kezelésében fontos szerepet játszanak a kiegészítő terápiák, ezért a lehetséges adjuváns szerek és eljárások felkutatására nagy igény van. Ezek a szerek segíthetik a betegség tüneteinek mérséklését, más esetben a gátrendszerek reverzibilis megnyitásával fokozhatják a hatóanyagok célbajutását és hatását. Azonban mind a hatóanyagok, mind az adjuváns szerek vizsgálatához megfelelő modellrendszerek szükségesek, amelyeknek egyik fő kritériuma, hogy az élő szervezetben található adott szerv komplexitását a lehetőségekhez képest minél jobban tükrözzék.

A nátrium bikarbonát jótékony hatása, elsősorban nyákoldóként, régóta ismert tüdőbetegségekben. Nemrégiben azt is kimutatták, hogy a nátrium bikarbonát bakteriosztatikus hatással rendelkezik: csökkentette a cisztás fibrózisban leggyakrabban előforduló patogén, a *Pseudomonas aeruginosa* növekedését. A közelmúltban egy klinikai vizsgálatban a nátrium bikarbonát inhaláció jótékony hatását írták le cisztás fibrózisos betegekben: megnövekedett a légúti folyadék pH értéke, valamint csökkent a köpet sűrűsége. A nátrium bikarbonát közvetlen hatását légúti epitelsejteken azonban eddig még nem vizsgálták. Első lépésként megfelelő tenyésztési modellre van szükség, amely mind az egészséges, mind a cisztás fibrózisra jellemző csatorna állapotokat tükrözi és ugyanazzal a genetikai háttérrel rendelkezik. Hogy a modell még közelebb álljon az *in vivo* rendszerek összetettségéhez, elengedhetetlen többféle sejt együttes tenyésztése. Elsőként hoztunk létre és jellemeztünk egy, a cisztás fibrózis vizsgálatára alkalmas ko-kultúra modellt bronchiális epitelsejtvonalak és humán endotelsejtek együtt tenyésztésével. Kísérleteink során olyan cisztás fibrózis bronchiális epitél (CFBE) sejtvonalakat használtunk, amelyeket egészséges CFTR csatornát, illetve $\Delta F508$ mutáns CFTR csatornát hordozó plazmákkal transzfektáltak. A sejteket önmagukban (monokultúra), vagy humán endotelsejtekkel együtt (ko-kultúra) tenyésztettük, folyadék-folyadék és levegő-folyadék határfelületen. Az endotelsejtek jelenlétében a bronchiális epitelsejtek szorosabb sejtréteget hoztak létre, amit a magasabb elektromos ellenállás értékek és alacsonyabb jelzőmolekula átjutási értékek is tükröztek. A

sejtközi kapcsolatok megerősödését igazoltuk az immunfestődési mintázat intenzitásának analízise alapján. Ezeket az eredményeket azonban csak a folyadék-folyadék határfelületen növesztett sejteknél tapasztaltuk, a levegő-folyadék határfelületen tenyésztett epitelsejtek gyengébb gátrendszert hoztak létre. Ezek az eredmények alátámasztják, hogy habár a levegő-folyadék határfelületen történő tenyésztés közelebb áll az élettani körülményekhez, nem minden légúti tenyészetes modell esetében alkalmazható ez a tenyésztési körülmény. Az irodalmi adatokkal összhangban a monokultúrában tenyésztett a mutáns CFTR csatornát kifejező sejtek gyengébb barriert alkottak, mint vad típusú CFBE sejtek. Az endotelsejtek jelenlétében azonban a $\Delta F508$ -CFTR csatornát kifejező CFBE sejtek szorosabb sejtréteget hoztak létre összehasonlítva a vad típusú ko-kultúrákkal. Ezt az eredményt alátámasztják a magasabb TEER értékek, a hidrofil jelzőmolekulák csökkent átjutása, és a β -katenin fehérje immunfestésének sejthatáron mért nagyobb intenzitása.

A CFTR csatorna működését módosító kezelések eredményei alapján igazoltuk a modellek megbízhatóságát és alátámasztottuk a vad típusú sejtekben a működőképes CFTR csatorna jelenlétét, míg a mutáns sejteknél annak hiányát. A CFTR csatorna aktivátor (cAMP) kezelés hatására a WT-CFTR CFBE sejtrétegek elektromos ellenállás értéke lecsökkent, amely a fokozott CFTR csatorna működés következtében megnövekedett ionáramlás eredménye, míg a CFTR csatorna gátlása ellentétes hatást hozott létre, a TEER értékek növekedését okozta. A mutáns csatornát hordozó CFBE sejtek esetén a megnövekedett TEER értékek csak a cAMP barrier fokozó hatását tükrözik, amit a csökkent jelzőmolekula-átjutás is alátámaszt.

A cisztás fibrózisos betegek légzőrendszerét jellemző krónikus gyulladás modellezéséhez citokinekkal kezeltük meg a tenyészeteket. Csak a ko-kultúrák esetén kaptunk szignifikáns választ a citokin kezelésre: a sejtrétegek elektromos ellenállása csökkent, a jelzőanyagok átjutása fokozódott. Ezt a hatást a monokultúrák esetén nem tapasztaltuk, a sejtek citokinekre adott válasza kismértékű volt. Ez az eredmény arra utal, hogy a ko-kultúra modellek alkalmasabbak lehetnek a gyulladásos állapotok *in vitro* vizsgálatára.

Elsőként vizsgáltuk a nátrium bikarbonát különböző koncentrációinak közvetlen hatását a bronchiális epitelsejtekre. A CFBE sejtvonalpár eltérő választ adott a nátrium bikarbonát kezelésre. Az életképességi és a sejtréteg integritási vizsgálatok alapján a vad típusú CFTR csatornát kifejező sejtek érzékenyebbnak bizonyultak, míg a mutáns sejtek esetén a bikarbonát előnyös hatását tudtuk kimutatni. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a legmagasabb, de még biztonságosan alkalmazható nátrium bikarbonát koncentráció

100 mM-os volt. A nátrium bikarbonát kezelés hatására a mutáns CFBE sejtek magasabb intracelluláris pH értéke a vad típusú sejtekhez közeli értékre csökkent le. A nátrium bikarbonát kezelés mindkét CFBE sejtvonalban módosította a CFTR csatorna expresszióját az apikális sejtmembránban. A vad típusú sejteknél tapasztalt hatás – az apikális sejtmembránban megnövekedett CFTR csatorna kifejeződés – hátterében azt feltételezzük, hogy a bikarbonát, mint jelátvivő molekula hatására aktiválódó cAMP/PKA/CREB útvonal állhat. Az immunfestődési képek analízisének segítségével megállapítottuk, hogy a mutáns csatornát kifejező CFBE sejtek megnövekedett átlag sejtmagassággal rendelkeznek a vad típusú CFTR csatornát kifejező sejtekhez képest, ami a nagyobb sejttérfogatra, és a sejttérfogat szabályozásának zavarára utalhat.

A PN159 peptid kettős hatással rendelkezik: mind sejtpenetráló, mind sejtközüti szoros kapcsolatokat megnyitó tulajdonsága ismert. A PN159 peptid kezelés hasonló hatást váltott ki a CFBE sejtvonalakban. Kísérleteink során igazoltuk a PN159 peptid szoros sejtközüti kapcsolatokat megnyitó hatását a humán bronchiális epitelsejt modellen: a sejtréteg elektromos ellenállása csökkent, a paracelluláris jelzőmolekulák átjutása fokozódott. A sejtközüti kapcsolatok megnyílását a sejtkapcsoló fehérjék immuncitokémiai festésével és analízisével is megerősítettük. A Caco-2 sejteken igazoltuk a peptid membránpenetráló hatását, mivel a jelzett peptid koncentrációfüggő módon bejutott az élő sejtekbe. Bizonyítottuk a peptid kolokalizációját a klaudin-4 sejtkapcsoló fehérjével, valamint a peptid-fehérje kölcsönhatás következtében az aktin sejtváz megváltozását. Munkánk során kimutattuk a PN159 peptid antimikrobiális hatását klinikailag releváns ESKAPE patogének esetén. A referencia antibiotikumokkal összehasonlítva a PN159 peptid hatékonyabbnak bizonyult a *Pseudomonas aeruginosa* baktériumtörzs növekedésének gátlásában, ami a krónikus légúti fertőzés és gyulladás okozta nagyszámú elhalálozásért felelős cisztás fibrózisos betegekben. Az irodalmi adatok alapján az amfipatikus tulajdonságú peptidek, mint a PN159, antibakteriális hatása a bakteriális membránok permeabilitásának fokozásával van összefüggésben.

Eredményeink is alátámasztják, hogy a nátrium bikarbonát, mint adjuváns szer, biztonsággal alkalmazható a cisztás fibrózis kezelésében és segíthet a tüdőt érintő tünetek mérséklésében. A PN159 peptid hatásosan nyitja az epitelsejtek közüti kapcsolatokat, így alkalmas jelölt lehet gyógyszerhatóanyagok, génterápiás ágensek átjuttatására biológiai gátrendszereken, továbbá antimikrobiális hatásának köszönhetően ígéretes jelölt lehet a multidrog rezisztens baktériumtörzsek kezelésében.

9. Summary

Application of epithelial cell culture models to study the effects of biologically active peptides and adjuvant therapeutic agents

Epithelial cell based biological barriers are crucial to protect the body and many organs from the harmful effects of the environment. In addition, they play an important role in many diseases: on the one hand, their dysfunction or damage can promote the development diseases and aggravate their symptoms, while on the other hand, the physical and chemical defense systems of epithelial cells can restrict the absorption and the entry of drugs into organs. Adjuvant therapies play an important role in the treatment of many diseases, hence there is a great need to search for potential adjuvant agents and procedures. Adjuvants can help alleviate the symptoms of diseases, and increase the absorption and effect of drugs by reversibly opening biological barriers. However, appropriate model systems are required to study active substances and adjuvants. One of the main criteria of *in vitro* models is to reflect as closely as possible the complexity of a given organ *in vivo*.

The beneficial effect of sodium bicarbonate, used primarily as a mucolytic, has long been known in the treatment of lung diseases. Sodium bicarbonate has also recently been shown to have a bacteriostatic effect: it reduced the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, the most common pathogen in cystic fibrosis. Recently, a clinical study has been described the favourable effects of sodium bicarbonate inhalation in patients with cystic fibrosis, it increased the pH of airway fluid and decreased the density of sputum. However, the direct effect of sodium bicarbonate on airway epithelial cells has not been studied so far.

As a first step, suitable culture models were needed for our studies that reflect the channel conditions characteristic of both healthy situation and cystic fibrosis and have the same genetic background. Since the models should reflect the complexity of *in vivo* systems as closely as possible, the co-culture of multiple cell types is necessary. We are the first to establish and characterize a co-culture model for cystic fibrosis using bronchial epithelial cell lines and human vascular endothelial cells. In our experiments we used cystic fibrosis bronchial epithelial (CFBE) cell lines transfected with a plasmid carrying a wild type CFTR channel or a CFTR channel with the $\Delta F508$ mutation, the most frequent in cystic fibrosis. Cells were cultured alone (monoculture) or with human vascular endothelial cells (co-culture) at liquid-liquid or air-liquid interface. In the presence of endothelial cells, bronchial epithelial cells formed a tighter cell layer, which was reflected by the higher electrical resistance and lower permeability values for different marker molecules. The strengthening

of intercellular junctions was confirmed by the analysis of the immunostaining intensity. However, these results were observed only in cells grown in the traditional way with culture medium in both compartments. In our case CFBE cells cultured at the air-liquid interface formed a weaker barrier. Our results support that although culture at the air-liquid interface is closer to physiological conditions, improvement of barrier properties is not observed in all respiratory culture models. In accordance with literature data, cells expressing the mutant CFTR channel cultured in monoculture formed a weaker barrier than wild-type CFBE cells. However, in the presence of endothelial cells, CFBE cells expressing the $\Delta F508$ -CFTR channel formed a tighter cell layer compared to wild-type co-cultures. This result is supported by higher TEER values, decreased permeability of hydrophilic marker molecules and higher intensity of β -catenin protein immunostaining at the cell borders.

Using small molecules modifying CFTR channel function we confirmed the presence of a functional CFTR channel in wild-type cells and its absence in mutant cells, thus we verified the reliability of the models. Treatment with CFTR channel activator cyclic AMP decreased the electrical resistance of WT-CFTR CFBE cell layers, which is the result of increased ion flow due to increased CFTR channel function. The inhibition of CFTR channels produced the opposite effect, increased the TEER values. In the case of CFBE cells expressing the mutant channel, the increased TEER values only reflect the barrier enhancing effect of the cyclic AMP, which is also supported by the decreased marker molecule permeability.

To model chronic inflammation, characteristic for the respiratory system in cystic fibrosis patients, cultures were treated with cytokines. Cytokine treatment elicited a significant cellular response only in the case of co-cultures, the electrical resistance of the cell layers decreased and the permeability of marker molecules increased. This effect was not observed in monocultures, the response of the cells to cytokines was small. This result suggests that co-culture models may be more suitable for *in vitro* studies of inflammatory conditions.

Our study is the first to investigate the direct effect of different concentrations of sodium bicarbonate on bronchial epithelial cells. The CFBE cell lines gave a different response to sodium bicarbonate treatment. Based on our cell viability and cell layer integrity data cells expressing the wild-type CFTR channel were found to be more sensitive to elevated sodium bicarbonate levels, while on the mutant cells we could show a beneficial effect of bicarbonate. We found that the highest but still safe concentration of sodium bicarbonate on CFBE cells was 100 mM in our experiments. The higher intracellular pH of

mutant CFBE cells was decreased by sodium bicarbonate treatment to a value close to that of wild-type cells. CFTR channel expression in the apical cell membrane was also modified by sodium bicarbonate treatment in both CFBE cell lines. We hypothesize that the effect observed in wild-type cells, increased CFTR channel expression in the apical cell membrane, might be mediated through the cyclic AMP / PKA / CREB pathway activated by bicarbonate as a signaling molecule. By the analysis of images taken from immunostaining we found that CFBE cells expressing the mutant channel have an increased average cell height compared to cells expressing the wild-type CFTR channel, which may indicate higher cell volume and disruption of cell volume regulation.

The PN159 peptide has a dual effect, it is known to have both cell penetrating and tight junction opening properties. PN159 peptide treatment showed a similar effect on both CFBE cell lines. We demonstrated that PN159 peptide opened the intercellular tight junctions in the human bronchial epithelial cell models, the electrical resistance of the cell layers decreased and the permeability of hydrophilic paracellular marker molecules increased. The opening of intercellular junctions was also confirmed by immunocytochemical staining for junctional proteins and image analysis. We showed the membrane-penetrating effect of the peptide on Caco-2 cells, since the fluorescently labeled peptide entered the living cells in a concentration-dependent manner. We demonstrated the colocalization of the peptide with the claudin-4 integral membrane tight junction protein and detected alterations in the actin cytoskeleton due to the interaction of the peptide with junctions. In our work the antimicrobial effect of the PN159 peptide on clinically relevant ESKAPE pathogens was also demonstrated. Compared with the reference antibiotics, the PN159 peptide was shown to be more effective in inhibiting the growth of *Pseudomonas aeruginosa*, which is responsible for the high mortality in cystic fibrosis due to chronic respiratory infection and inflammation. Based on the literature, the antibacterial effect of amphipathic peptides, such as PN159, is associated with the bacterial membrane permeability enhancing properties.

In conclusion, our results support the safe use of sodium bicarbonate as an adjuvant in the treatment of cystic fibrosis and that it may help alleviate the respiratory symptoms. The PN159 peptide effectively opens the intercellular junctions in different types of epithelial cells, making it a suitable candidate for the enhanced delivery of drugs or gene therapy agents through biological barriers. This peptide can also be a promising candidate for the treatment of multidrug-resistant bacterial strains due to its antimicrobial activity.

10. Függelék

I. Publikáció



Article

The Effect of Sodium Bicarbonate, a Beneficial Adjuvant Molecule in Cystic Fibrosis, on Bronchial Epithelial Cells Expressing a Wild-Type or Mutant CFTR Channel

Ilona Gróf ^{1,2}, Alexandra Bocsik ¹, András Harazin ¹, Ana Raquel Santa-Maria ^{1,2}, Gaszton Vizsnyiczai ¹, Lilla Barna ^{1,2}, Lóránd Kiss ³ , Gabriella Fűr ³, Zoltán Rakonczay Jr. ³ , Rita Ambrus ⁴, Pirooska Szabó-Révész ⁴ , Fabien Gosselet ⁵ , Pongsiri Jaikumpun ⁶, Hajnalka Szabó ⁷, Ákos Zsembery ⁶ and Mária A. Deli ^{1,*}

¹ Institute of Biophysics, Biological Research Centre, H-6726 Szeged, Hungary; grof.ilona@brc.hu (I.G.); bocsik.alexandra@brc.hu (A.B.); harazin.andras@brc.hu (A.H.); anaraquel.santamaria@brc.hu (A.R.S.-M.); vizsnyiczai.gaszton@brc.hu (G.V.); barna.lilla@brc.hu (L.B.)

² Doctoral School of Biology, University of Szeged, H-6720 Szeged, Hungary

³ Department of Pathophysiology, University of Szeged, H-6725 Szeged, Hungary; kiss.lorand@med.u-szeged.hu (L.K.); gabriella.fur@gmail.com (G.F.); rakonczay.zoltan@med.u-szeged.hu (Z.R.J.)

⁴ Institute of Pharmaceutical Technology and Regulatory Affairs, University of Szeged, H-6720 Szeged, Hungary; arita@pharm.u-szeged.hu (R.A.); revesz@pharm.u-szeged.hu (P.S.-R.)

⁵ Blood-Brain Barrier Laboratory, UR 2465, Artois University, F-62300 Lens, France; fabien.gosselet@univ-artois.fr

⁶ Department of Oral Biology, Semmelweis University, H-1089 Budapest, Hungary; jaikumpun@gmail.com (P.J.); zsembery.akos@dent.semmelweis-univ.hu (Á.Z.)

⁷ Department of Pediatrics, Fejér County Szent György University Teaching Hospital, H-8000 Székesfehérvár, Hungary; szabo65@yahoo.com

* Correspondence: deli.maria@brc.hu

Received: 3 April 2020; Accepted: 30 May 2020; Published: 4 June 2020



Abstract: Clinical and experimental results with inhaled sodium bicarbonate as an adjuvant therapy in cystic fibrosis (CF) are promising due to its mucolytic and bacteriostatic properties, but its direct effect has not been studied on respiratory epithelial cells. Our aim was to establish and characterize co-culture models of human CF bronchial epithelial (CFBE) cell lines expressing a wild-type (WT) or mutant (deltaF508) CF transmembrane conductance regulator (CFTR) channel with human vascular endothelial cells and investigate the effects of bicarbonate. Vascular endothelial cells induced better barrier properties in CFBE cells as reflected by the higher resistance and lower permeability values. Activation of CFTR by cAMP decreased the electrical resistance in WT but not in mutant CFBE cell layers confirming the presence and absence of functional channels, respectively. Sodium bicarbonate (100 mM) was well-tolerated by CFBE cells: it slightly reduced the impedance of WT but not that of the mutant CFBE cells. Sodium bicarbonate significantly decreased the more-alkaline intracellular pH of the mutant CFBE cells, while the barrier properties of the models were only minimally changed. These observations indicate that sodium bicarbonate is beneficial to deltaF508-CFTR expressing CFBE cells. Thus, sodium bicarbonate may have a direct therapeutic effect on the bronchial epithelium.

Keywords: bronchial epithelial cells; CFTR channel; cystic fibrosis; cytokine; impedance kinetics; permeability; sodium bicarbonate; tight junctions; transepithelial electric resistance

1. Introduction

Despite recent advances, the pharmacological therapy of cystic fibrosis (CF), an autosomal recessive genetic disorder caused by the mutation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR or ABCC7) gene, is still a largely unmet medical need. Mutations related to the CFTR gene can result in the CFTR protein misfolding, decreased trafficking to and stability in the plasma membrane of epithelial cells and an impaired activity of this ATP-gated anion channel [1]. This is the reason why CF is considered a disease of impaired protein folding and function, and rescue of the cells from stress due to chronic expression of misfolded proteins, including mutant CFTR, can improve the loss-of-function phenotype [2]. Used in triple combination, small molecular CFTR modulators, like correctors, which act as pharmacological chaperones or proteostasis regulators, and potentiators, which directly improve CFTR channel functions, now offer a breakthrough therapy for the most common CFTR mutations [3,4]. Patients carrying the most common $\Delta F508$ -CFTR mutations can benefit from these new drugs, however these therapies are either not suitable for all patients, who might be unresponsive due to rare or unique CFTR mutations, or they cannot afford them due to their excessive cost [5].

CF is a multi-organ disease with progressive decline in lung function, therefore the care of CF patients requires a multidisciplinary and multifaceted approach including pharmaco- and physiotherapy as well as psychosocial interventions [6]. Adjuvant therapies also play an important role in the management of CF, especially to prevent the accumulation of viscous mucus and bacterial infection in the respiratory tract. CFTR and bicarbonate secretion are central elements in the regulation of mucus viscosity. CFTR not only functions as a cAMP/PKA-regulated epithelial anion channel, but also controls the activity of other ion channels and transporters, such as the epithelial Na^+ channel (ENaC) or the $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger SLC26A4 [7]. Gene mutations or exogenous noxae (i.e., cigarette smoke) can impair CFTR functions compromising transepithelial electrolyte and water transport in the respiratory tract [8]. In recent years, a large number of evidence suggests that defective HCO_3^- secretion plays a central role in the pathogenesis of CF- and non-CF-related airway diseases [7,8]. Importantly, HCO_3^- controls the luminal pH in the airways. It has been demonstrated in a porcine model of CF that the acidic pH in the trachea reduced the bacterial-killing capacity of antimicrobial peptides, such as lysozyme and lactoferrin, which was corrected by administration of nebulized sodium bicarbonate [9]. More recently, it has been reported that the antibacterial effects of defensins and LL-37 peptide are largely pH-dependent [10]. Sodium bicarbonate not only restores the activity of antimicrobial peptides by regulating pH in the airway surface liquid, but has a direct bacteriostatic effects and inhibits biofilm formation of CF-related bacteria [11]. It is also noteworthy, that HCO_3^- is necessary for chelating protons and Ca^{2+} for proper unfolding of secreted mucin molecules which helps to maintain the normal viscosity of the airway surface liquid [12].

To better understand CF and develop new treatments, relevant model systems are needed. Immortalized airway epithelial cells have been proven to be particularly useful experimental tools [13]. Several cell lines exist to study CF, especially CFTR mutations, the respective phenotypes and pharmacological therapies. Although in some studies non-respiratory cell lines (e.g., HeLa) transfected with wild-type (WT) or mutant CFTR are used to investigate the function of the CFTR channel, differences were found in both receptor trafficking and activation as compared to transfected respiratory cell lines [14]. The human CF bronchial epithelial cell line CFBE41o⁻ (CFBE), developed by Kunzelmann et al. [15], forms adherent, tight and polarized cell layers and expresses a transcriptome that is similar to that of primary airway epithelial cells [16]. This cell line, which does not express endogenous CFTR at mRNA or protein level, has been transfected by several groups to generate cell lines expressing wild-type or $\Delta F508$ CFTR [14,16,17]. This human cell line model from a relevant tissue type maintains many features necessary for studies on CFTR function and treatment with small drug molecules at the cellular level. To increase the complexity and similarity of respiratory culture models to the lung tissue, in vitro co-culture models were introduced. Indeed, an increasing correlation was found between airway models and in vivo tissue by the combination of multiple lung-relevant cell types [18]. In these

models in addition to alveolar epithelial cells, vascular endothelial cells and/or immune cells, like macrophages or mast cells are used [18]. However, few co-culture models exist for bronchial epithelium. Recently a co-culture model of human bronchial epithelial cells with human microvascular endothelial cells was described and optimized for microscopical studies [19]. However, no such co-culture models have been established for the study of CF.

Experimental and clinical results with inhaled sodium bicarbonate as an adjuvant therapy in CF are promising due to its mucolytic and bacteriostatic properties, but its direct effect has yet not been studied on respiratory epithelial cells. Our aim was to establish and characterize co-culture models of human CF bronchial epithelial cell lines expressing wild-type or $\Delta F508$ -CFTR channels with human vascular endothelial cells and investigate the effects of bicarbonate. Specifically, our study focused on the sodium-bicarbonate-treatment-induced changes in cell impedance, viability, morphology, barrier function, intracellular resting pH and cellular localization of the CFTR channel.

2. Results

2.1. Characterization of the Barrier Properties of the CFBE Cells in Monoculture and in Co-Culture with Endothelial Cells

Both CFBE cell lines formed good barriers by day 10 on culture inserts, the transepithelial electrical resistance (TEER) values were above $500 \Omega \times \text{cm}^2$ (Figure 1A) and the P_{app} for both permeability markers were low, in the range of 10^{-6} cm/s (Figure 1B). The integrity of bronchial epithelial layers was increased more than 2- and 3-fold in the presence of human vascular endothelial cells as reflected by the higher resistance values (WT-CFTR CFBE cells monoculture: 605 ± 7 , co-culture: $1322 \pm 112 \Omega \times \text{cm}^2$; $\Delta F508$ -CFTR CFBE monoculture: 529 ± 16 , co-culture: $1800 \pm 152 \Omega \times \text{cm}^2$). Endothelial cells also induced lower permeability values (Figure 1B) for fluorescein (WT-CFTR CFBE monoculture: 0.32 ± 0.04 , co-culture: $0.15 \pm 0.04 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $\Delta F508$ -CFTR CFBE monoculture: 0.35 ± 0.03 , co-culture: $0.15 \pm 0.05 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$) and albumin (WT-CFTR CFBE monoculture: 0.08 ± 0.01 , co-culture: $0.06 \pm 0.01 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$; $\Delta F508$ -CFTR CFBE monoculture: 0.08 ± 0.01 , co-culture: $0.06 \pm 0.01 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$).

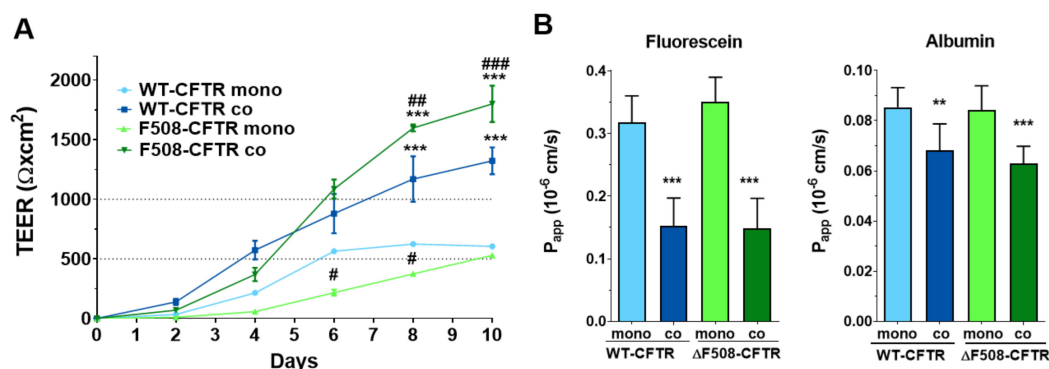


Figure 1. Transepithelial electrical resistance (TEER) (A) and permeability values (apical to basal direction) (B) of cystic fibrosis bronchial epithelial (CFBE) monocultures or co-cultures with endothelial cells. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 4/\text{group}$. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the monocultures; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ compared to the respective wild-type group.

To evaluate junctional morphology, the tight-junction-associated cytoplasmic linker zonula occludens protein-1 (ZO-1), the adherens junction integral membrane protein E-cadherin and its linker protein, β -catenin, were selected. The co-culture conditions also increased the tightness of the interepithelial junctions and made epithelial cells to form a better monolayer visualized by immunostaining for ZO-1 and β -catenin junctional proteins (Figure 2A). The mean pixel intensity of ZO-1 staining at the cell border was higher in the case of the WT-CFTR CFBE cells (Figure 2B), while stronger β -catenin intensity was observed in the $\Delta F508$ -CFTR CFBE cells (Figure 2C). The localization

of the immunosignal was stronger and sharper at the cell border in the junctional area of CFBE cell lines when they were grown together with endothelial cells (Figure 2A).

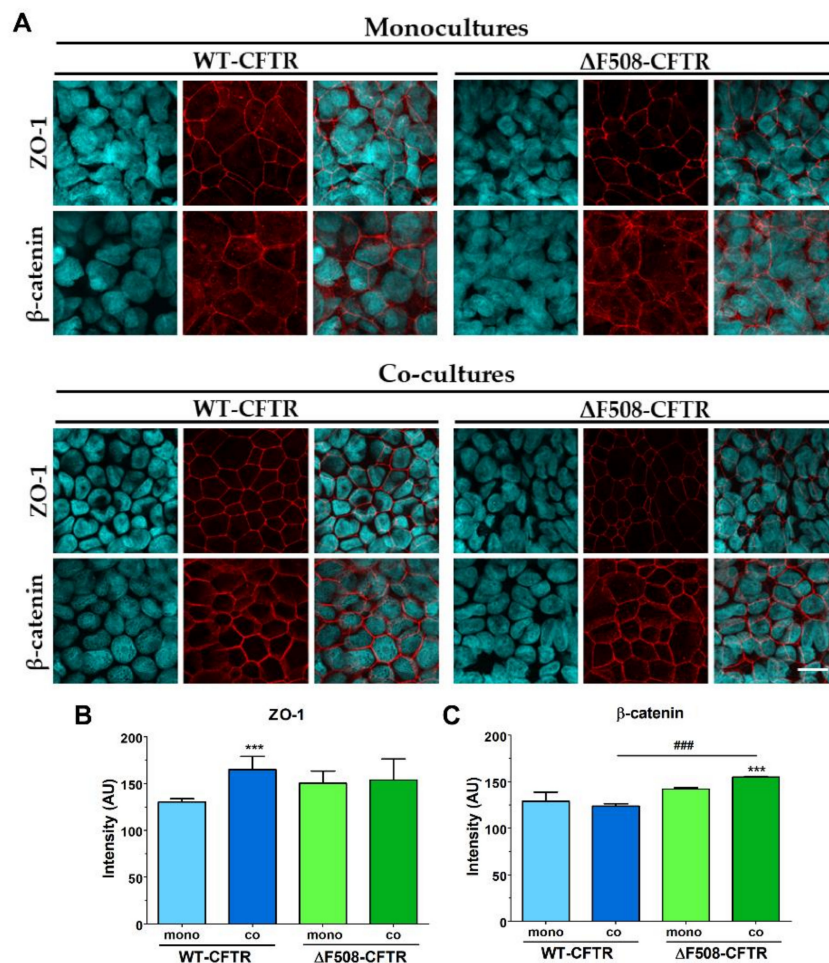


Figure 2. Immunostaining for junctional proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and β -catenin after 10 days of monoculture or co-culture with endothelial cells (A). The mean pixel intensity of ZO-1 (B) and β -catenin (C) staining at the cell border. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 3$ –6/group. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. *** $p < 0.001$ compared to the monocultures. ### $p < 0.001$ compared to WT-CFBE cells. Red color: immunostaining for junctional proteins. Cyan color: staining of cell nuclei. Bar: 25 μ m.

To compare the barrier integrity of the wild-type and mutant CFBE cells we pooled and analyzed the results of eight independent experiments (Figure 3). Since we found considerable variability in the basal TEER and permeability values of the CFBE cell lines, the values are given as a percentage of the WT-CFTR CFBE groups. Monocultures of the Δ F508-CFTR CFBE cells showed weaker barrier properties as reflected by the lower TEER values (Figures 1 and 3A) and higher permeability values (Figure 3B) for marker molecules compared to the wild-type cells. In contrast, co-culture of Δ F508-CFTR CFBE cells with human vascular endothelial cells resulted in tighter barrier properties as demonstrated by the increased resistance (Figures 1A and 3C), the decreased permeability for the hydrophilic small marker fluorescein and large marker albumin (Figure 3D) and stronger β -catenin staining intensity at the junctional area (Figure 2C).

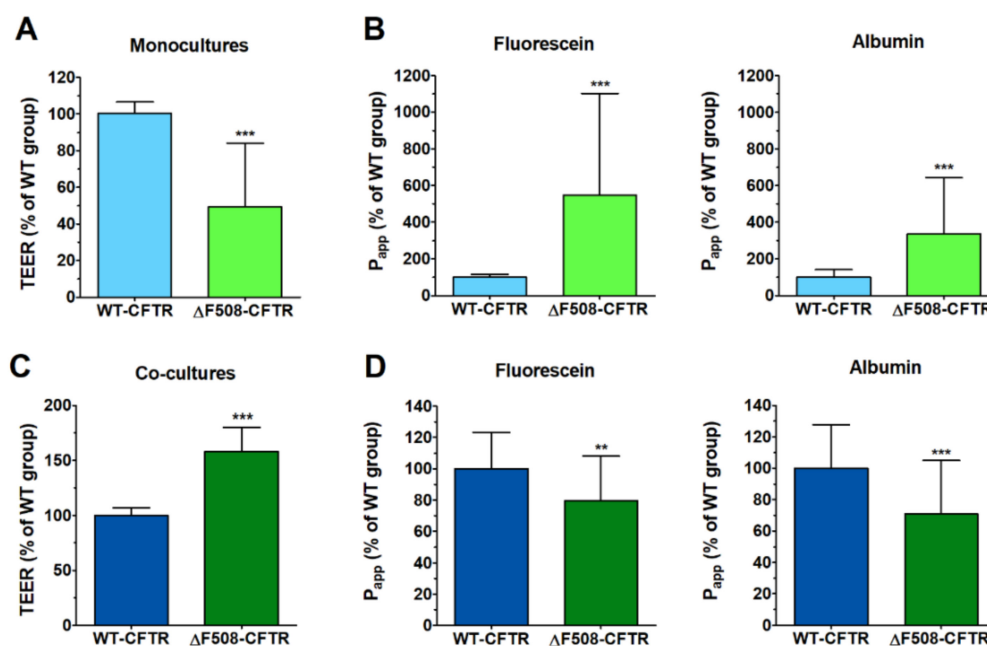


Figure 3. Transepithelial electrical resistance (TEER) (A,C) and permeability values (B,D) of CFBE monocultures or co-cultures measured in 8 independent experiments. The values presented as a percentage of the WT-CFTR CFBE group. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 16$ –52/group. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the WT-CFTR CFBE cells.

The culture of CFBE cells at air-liquid interface (ALI), considered as a physiologically more relevant condition, did not result in better barrier properties. As compared to the CFBE cells cultured in a standard way (liquid-liquid interface, LLI) the electrical resistance was lower and more fluorescently labeled molecules went across the cell layers kept in the ALI (Figure S1). Immunostaining of the junctional proteins ZO-1 and E-cadherin also confirm the decreased cell-layer integrity (Figure S2). These results are in accordance with literature data: lower TEER values and an altered staining pattern of junctional proteins were obtained at air-liquid-cultured cell layers due to desiccation and a high rate of apoptosis [17]. Based on these results, standard culture conditions were chosen for the experiments.

2.2. The Effect of CFTR Activator and Inhibitor on the Resistance and Permeability of CFBE Cell Lines

Transepithelial electrical resistance (TEER) measures ion movement across cell layers. Activation of the CFTR anion channel by a cell-permeable cAMP analog decreased the electrical resistance to less than half in wild-type, but not in mutant CFBE cell layers (Figure 4A). The permeability values of the wild-type cells for fluorescein and albumin did not increase (Figure 4B). In contrast, less tracer molecules could penetrate across the cell layers, which indicates that the decreased TEER values of the wild-type CFBE cells mean increased ion transport through the activated CFTR channel and not a weaker barrier integrity. ΔF508-CFTR CFBE cells showed increased TEER values and decreased permeability values which reflects a tighter cell layer (Figure 4).

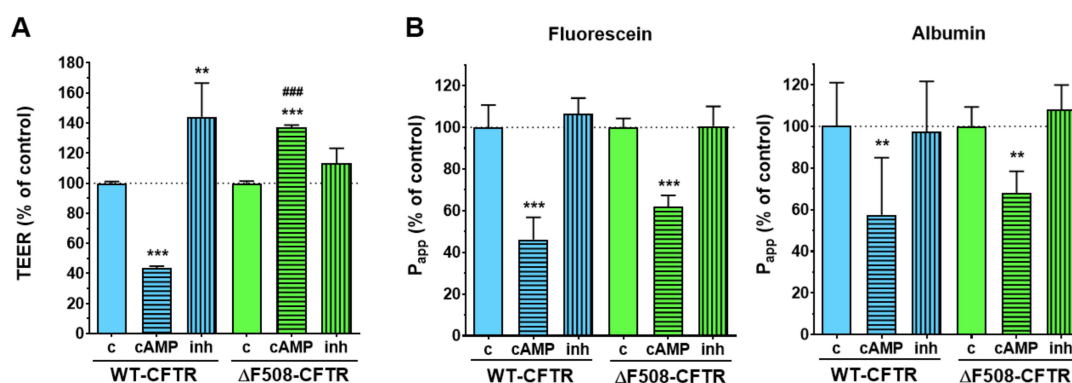


Figure 4. Effects of a cell-permeable cAMP analog (250 μ M) and the CFTR channel inhibitor CFTR_{inh}-172 (inh; 10 μ M) treatment (1 h) on the electrical resistance (A) and permeability (B) values. Values: percentage of control groups. Means $\pm$ SD, $n = 4$ /group. 2-way ANOVA and Bonferroni test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control groups, ### $p < 0.001$ compared to the respective wild-type group.

The well-known barrier-tightening effects of cAMP were observed in both cell lines based on the decreased permeability for paracellular tracers (Figure 4B). Our results on ion permeability in the cell line pair are in accordance with previous findings on bronchial epithelial cells demonstrating that cAMP treatment decreased the TEER values of CFBE cells expressing WT-CFTR channels, but increased the resistance of cell layers expressing Δ F508-CFTR channels [20]. Furthermore, the Δ F508-CFTR channels in the CFBE cells, even when expressed at the cell membrane, cannot be stimulated by forskolin-elevating cAMP levels [14].

The 1 h CFTR_{inh}-172 treatment had an opposite effect to cAMP: it increased the TEER values of the wild-type CFBE cells (1.4 times higher) while no significant change could be observed in the case of the mutant CFTR-expressing CFBE cells (Figure 4A) indicating that only the WT-CFTR CFBE cells express active CFTR channels. The CFTR-inhibitor treatment did not change the cell-layer integrity for marker molecules (Figure 4B).

2.3. The Effect of Cytokines on the Barrier Integrity of CFBE Cell Lines

To mimic inflammatory conditions, CFBE cells were treated with a combination of TNF α (50 ng/mL) and IL-1 β (25 ng/mL), as in our previous study on intestinal epithelial cells [21]. The integrity of the cell layers was damaged in both the CFBE cell lines in co-culture conditions after the 6 h cytokine treatment: the resistance decreased to less-than-half of the TEER values of the control groups (Figure 5A). In parallel, the permeability values increased for both markers (Figure 5B) in both cell lines (fluorescein P_{app} in WT-CFTR cells 260%, in Δ F508-CFTR cells 172%; albumin P_{app} in WT-CFTR cells 181%, in Δ F508-CFTR cells 143%). The effect of the cytokines was more robust in the case of the co-cultures (Figure 5) compared to the monocultures, in which a minimal disturbance of the barrier function was observed (Figure S3). These results suggest that co-culture models of CFBE cells are more reactive to cytokines and can be more suitable models to investigate inflammatory conditions in vitro.

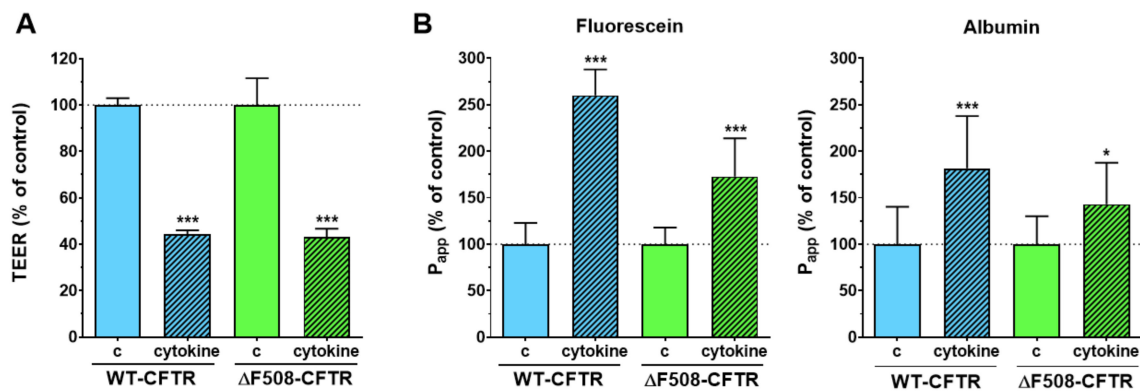


Figure 5. Transepithelial electrical resistance (TEER) (A) and permeability values (B) of co-cultures after a 6-h cytokine treatment. Values are presented as a percentage of control groups. Means $\pm$ SD, $n = 4$ /group. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to the control groups.

2.4. The Effect of PN159/KLAL Peptide on the Resistance and Permeability of CFBE Cell Lines

To further investigate the response of the CFBE cell line pair we tested a tight-junction modulator and cell-penetrating peptide, PN159/KLAL, that has been well-characterized in our previous studies [22,23]. After 30 min of peptide treatment the TEER values of CFBE cells dropped to below 10% of the level of the control groups (Figure 6A). At the same time, the permeability of the two tracer molecules increased by more than 2 or 3 orders of magnitude (WT-CFTR cells: 6801% of control SF and 1195% of control EBA, ΔF508-CFTR cells: 2606% of control SF and 742% of control EBA) indicating a full opening of the barrier (Figure 6B). After a 24-h recovery period, the TEER values increased but did not reach the values of the control groups (WT-CFTR cells: 35% of control, ΔF508-CFTR cells: 45% of control) (Figure 6A). When the peptide was removed, the permeability values also returned close to the baseline level, although they remained higher.

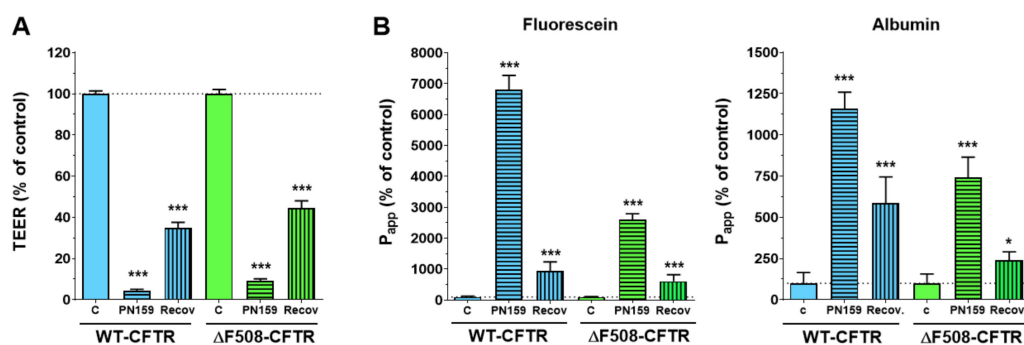


Figure 6. TEER (A) and permeability (B) values of the CFBE cell layers after a 30-min PN159 peptide treatment and a 24-h recovery period. Values are presented as a percentage of the control groups. Means $\pm$ SD, $n = 4$ /group. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ compared to the control groups.

The immunostaining of junctional proteins confirmed that the peptide opens the intercellular junctions (Figure 7).

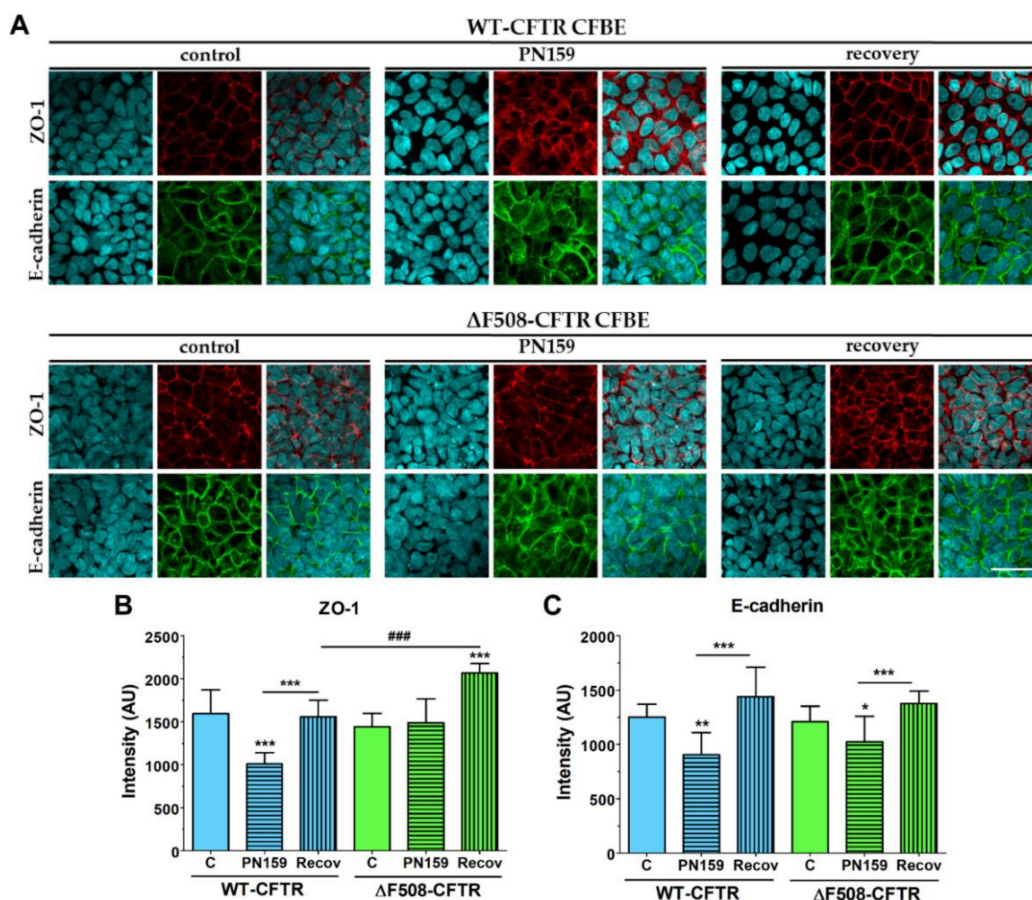


Figure 7. Immunostaining for junctional proteins ZO-1 and E-cadherin CFBE cells without or after a 30-min PN159 peptide treatment, and following a 24-h recovery period (A). The mean pixel intensity of ZO-1 (B) and E-cadherin (C) staining. Means $\pm$ SD, $n = 3$ –6/group. 2-way ANOVA & Bonferroni test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control and the treated group. ### $p < 0.001$ compared to wild-type epithelial cells. Green and red color: immunostaining for junctional proteins. Cyan color: staining of cell nuclei. Bar: 40 μ m.

The continuous pericellular belt-like ZO-1 and E-cadherin staining pattern, as seen in the control groups, became weaker and disorganized and a cytoplasmic redistribution of the junctional proteins from cell borders was observed. These observations were also confirmed by the analysis of the images taken on the fluorescent immunostaining of the junctional proteins. Peptide treatment resulted in decreased mean pixel intensity of ZO-1 and E-cadherin staining in the junctional area in case of the wild-type cells (Figure 7B,C). The junctional opening effect of the peptide was obvious not only from the functional measurements, but the significantly decreased E-cadherin staining at the cell border of the Δ F508-CFTR cells (Figure 7C). These morphologic changes caused by the peptide were reversible after a 24-h recovery period. Our data indicate that the PN159/KLAL peptide is efficient to open junctions in bronchial epithelial cells; this effect is reversible and the cell-line pair reacted in a similar way to the peptide.

2.5. The Effect of Sodium Bicarbonate on Impedance Kinetics and Viability of CFBE Cells

Sodium bicarbonate showed a concentration- and time-dependent effect on the CFBE cells measured by real-time impedance kinetics (Figure 8 and Supplementary Material Figure S4). The culture medium contained 26 mM NaHCO_3 in the control group. Sodium bicarbonate at 50 and 100 mM concentrations did not change the cell index of the WT-CFBE cells at the 1-h time point (Figure S4A), but reduced the impedance at later time points (Figure 8A). In contrast to wild-type CFBE cells,

the impedance of the cells expressing mutant CFTR was not changed by 50 mM sodium bicarbonate, while treatment with sodium bicarbonate at 100 mM concentration showed a temporary decrease (at 6–15 h) then returned to the level of the control cells in the 16–24-h period (Figure 8B and Figure S4). The highest (200 mM) concentration of sodium bicarbonate caused cell death as reflected by the decrease in impedance of both cell types to the level of the reference compound Triton X-100 detergent.

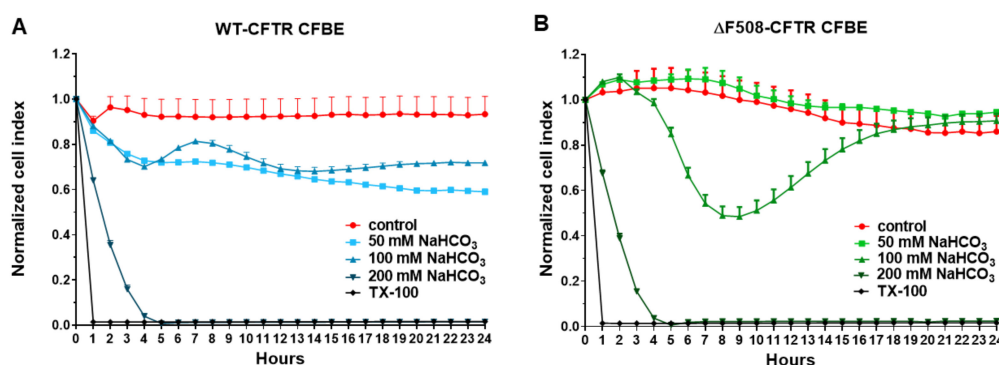


Figure 8. Impedance kinetics measurements of the WT-CFTR CFBE (A) and Δ F508-CFTR CFBE (B) cells after sodium bicarbonate treatment at different concentrations (50, 100, 200 mM). Culture medium in the control group contained 26 mM sodium bicarbonate. The effects of sodium bicarbonate on the impedance are shown as a normalized cell index. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 11$ –13.

The results of the impedance measurements were confirmed by morphological findings (Figure 9). Sodium bicarbonate at 50 and 100 mM concentrations did not change the staining pattern of the junctional proteins as compared to the control group after 24 h of treatment, in agreement with the results of the impedance data shown on Figure 8. Only the 200 mM sodium bicarbonate concentration was toxic to the cells, which resulted in damage to the layer integrity. The plasma membrane of the CFBE cells became permeable to the ethidium homodimer-1 dye which stained the cell nuclei only in the highest sodium bicarbonate treatment group (Figure 9). Based on these results the 100 mM sodium bicarbonate concentration, which has been found to be bacteriostatic in a recent work [11] was selected for the further experiments.

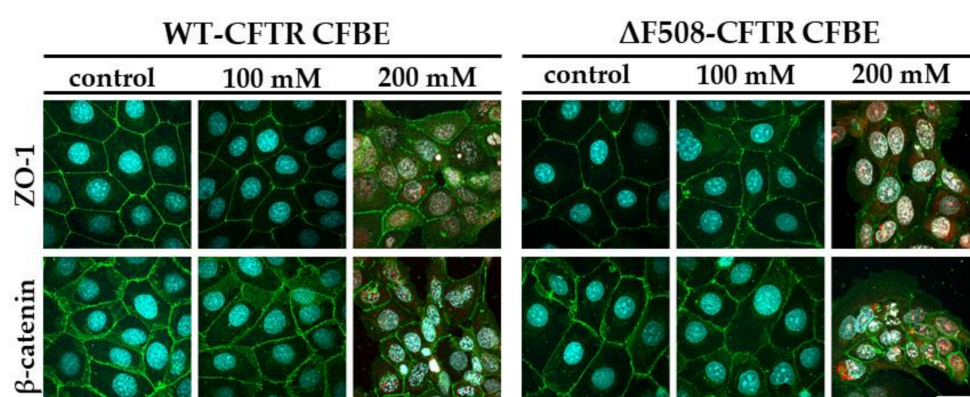


Figure 9. Morphology of CFBE cells after sodium bicarbonate treatment at different concentrations. Cells were treated with culture medium containing 26 (control group), 100 and 200 mM sodium bicarbonate for 24 h. Green color: immunostaining for junctional proteins. Cyan color: cell nuclei. Red color: nuclei of damaged cells. Bar: 40 μ m.

2.6. The Effect of Bicarbonate on the Barrier Integrity of CFBE Cells

To reveal the effect of sodium bicarbonate on barrier integrity, CFBE models in monoculture (Figure S5) and co-culture settings (Figure 10) were treated with culture medium containing 100 mM sodium bicarbonate for 24 h. TEER was also measured after 1 h of treatment (Figure 10A and Figure S5A). CFBE cells expressing wild-type CFTR channels were more sensitive to the bicarbonate treatment, as reflected by the lower TEER values at the two treatment time points (at 1 h: WT-CFTR cells: 57% of control, Δ F508-CFTR cells: 73% of control; 24 h: WT-CFTR cells: 36% of control, Δ F508-CFTR cells: 44% of control). The permeability value for the small hydrophilic marker fluorescein was 4.18 times higher and for the large marker albumin it was 1.3 times higher compared to the control group in co-cultures (Figure 10B). In CFBE cells kept in monoculture the permeability changes for fluorescein were smaller, while the P_{app} for albumin was unchanged (Figure S5B).

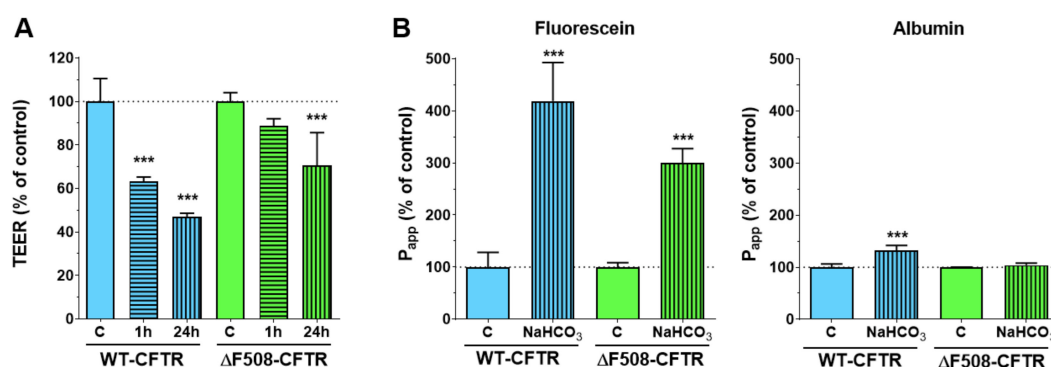


Figure 10. The effect of sodium bicarbonate on the barrier integrity of CFBE cells in co-culture. Transepithelial electrical resistance (TEER) values at 1 and 24 hour time points (A) and permeability values (B) of the co-culture models after treatment with culture medium containing 26 mM (control group) or 100 mM sodium bicarbonate. Values are presented as a percentage of the control groups. Means $\pm$ SD, $n = 4$ /group. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. *** $p < 0.001$ compared to the control groups.

The 24-h treatment with culture medium containing 100 mM sodium bicarbonate did not visibly alter the staining pattern for junctional proteins E-cadherin and ZO-1 in CFBE cells in co-culture as compared to the control group (Figure 11). The analysis of junctional staining intensity also confirmed these results (Figure 11B,C), moreover a beneficial effect was observed in the case of the CFBE cells expressing the mutant CFTR channel: the sodium-bicarbonate treatment enhanced the mean pixel intensity of the ZO-1 protein immunostaining at the cell border (Figure 11B).

In agreement with data that cells expressing both types of CFTR channels tolerated well the elevated bicarbonate concentration in their culture medium (Figures 8–10) and that the barrier integrity changed only for small ions and tracer molecules of passive diffusion (Figure 10B) in all groups, a preserved, belt-like pericellular staining was visible for both junctional proteins (Figure 11). The same observations were made in the case of monocultures of the CFBE cell lines (Figure S6).

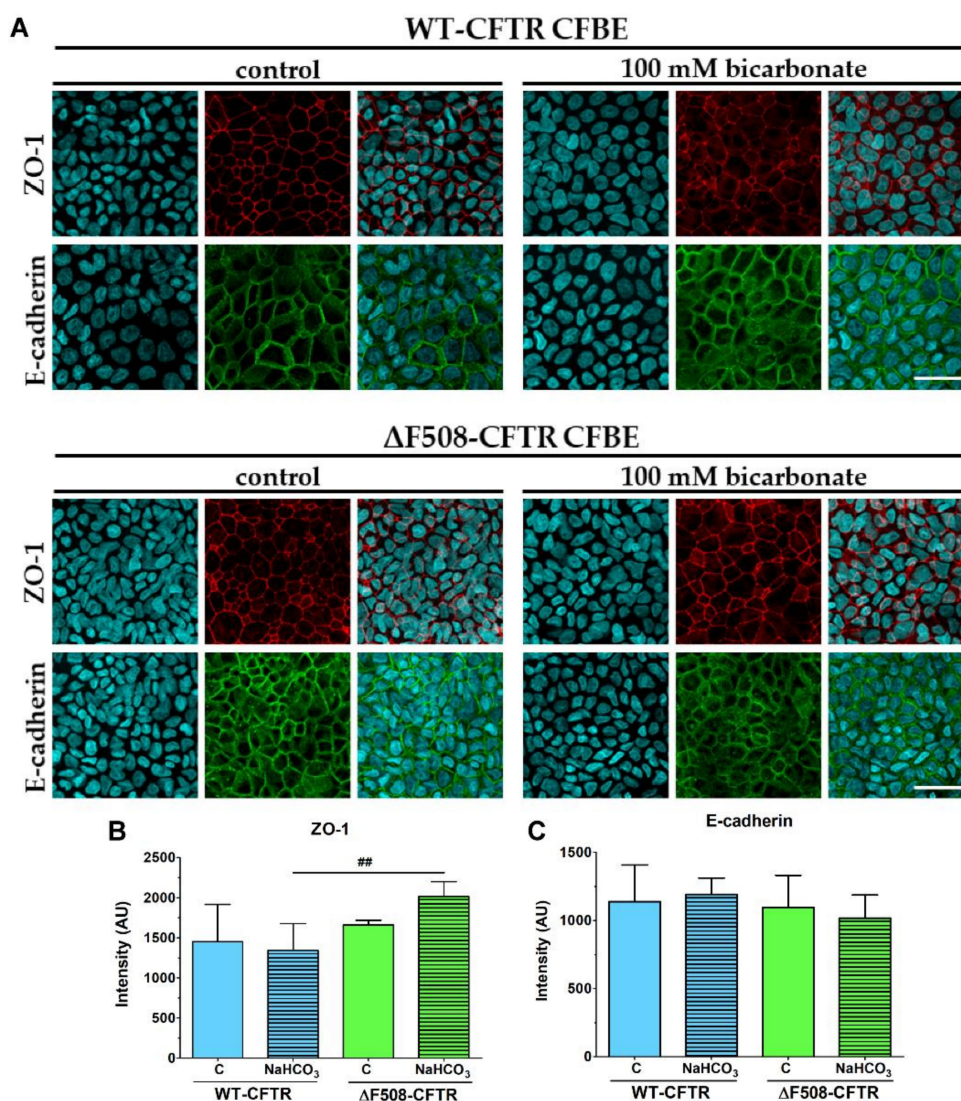


Figure 11. The effect of sodium bicarbonate on the junctional morphology of CFBE cells. Immunostaining of the co-culture model for junction proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and E-cadherin (**A**) after treatment with culture medium containing 26 mM (control group) or 100 mM bicarbonate treatment (24 h). The mean pixel intensity of ZO-1 (**B**) and E-cadherin (**C**) immunostainings at the junctional area. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 3$ –6/group. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. ## $p < 0.01$ compared to the wild-type epithelial cells. Red color: immunostaining for ZO-1. Green color: immunostaining for E-cadherin. Cyan color: cell nuclei. Bar: 40 μ m.

2.7. The Effect of Bicarbonate on the Resting Intracellular pH of CFBE Cells

The resting intracellular pH (pH_i) of the untreated WT-CFTR CFBE cells was found to be 7.48 ± 0.04 which was not changed by treatment with 100 mM NaHCO_3 . The cells expressing the mutant CFTR channel showed significantly elevated pH_i (7.74 ± 0.06) as compared to the WT cells (Figure 12). This finding is in accordance with a previous observation of Walker et al., who found that the intracellular pH of CFTR-KO crypt epithelial cells is more alkaline when compared to the wild-type cells [24]. Importantly, we found that NaHCO_3 treatment of ΔF508 -CFTR CFBE cells decreased the pH_i to the level of the pH_i measured in WT cells, indicating a beneficial effect on the mutant cells.

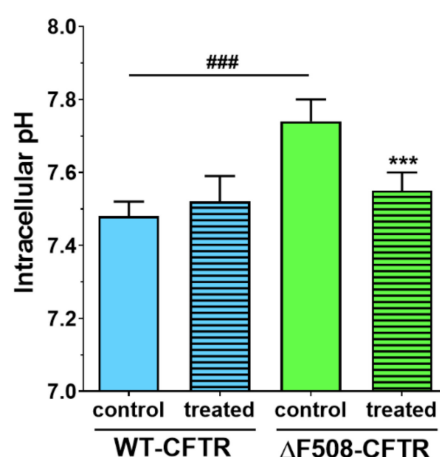


Figure 12. The effect of sodium bicarbonate treatment on the resting intracellular pH of CFBE cells. The pH_i of WT-CFTR and $\Delta F508$ -CFTR CFBE cells after a 1-h treatment with buffer containing 26 mM (control group) or 100 mM sodium bicarbonate. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 47$ –67. Statistical analysis: 2-way ANOVA followed by Bonferroni test. ### $p < 0.001$ compared to the wild-type epithelial cells, *** $p < 0.001$ compared to the control groups.

2.8. The Effect of Bicarbonate on the Immunolocalization of CFTR Channel in CFBE Cells

Both cell lines gave immunosignals for CFTR using a polyclonal antibody (Figure 13A). To determine the apical membrane region of the cells, wheat germ agglutinin (WGA) lectin staining was performed which labeled the plasma membrane glycocalyx. The immunostaining pattern in the confocal microscopy images looked diffuse and in the z-direction the fluorescent signal was observed in both the apical and cytoplasmic regions. Using image analysis, the mean pixel intensities of the CFTR immunostaining in apical regions close to the plasma membrane and the remaining cell (cytoplasm) regions were determined. The mean pixel intensities in apical regions of the CFBE cell-line pair were very close (WT-CFTR CFBE cells: 111.09 ± 7.35 vs. $\Delta F508$ -CFTR CFBE cells: 111.86 ± 10.17) (Figure 13B). Treatment of CFBE cells with culture medium containing sodium bicarbonate at 100 mM concentration decreased the mean pixel intensity of CFTR immunostaining in the apical regions of WT-CFTR CFBE cells (106.73 ± 8.00) but increased it in $\Delta F508$ -CFTR CFBE cells (117.85 ± 4.91). The ratios of the CFTR immunostaining pixel intensities in the apical and cytoplasmic regions were significantly higher in the CFBE cells expressing wild-type channels (Figure 13C) than in cells expressing the mutant channels (1.70 ± 0.17 vs. 1.57 ± 0.07) indicating more channels in the apical (membrane) region in WT-CFTR CFBE cells, in concordance with literature data [14].

Sodium bicarbonate treatment further increased the CFTR immunofluorescence intensity ratio in WT-CFTR CFBE cells (1.86 ± 0.18 vs. 1.70 ± 0.17 in the respective control group), while an opposite effect was measured in $\Delta F508$ -CFTR CFBE cells (1.51 ± 0.12 vs. 1.57 ± 0.07 in the respective control group). During the morphological analysis we observed that the average height of the WT-CFTR CFBE cells was lower than that of the mutant cell line ($6.4 \pm 0.7 \mu m$ vs. $8.1 \pm 0.5 \mu m$), which might indicate an altered cell-volume regulation.

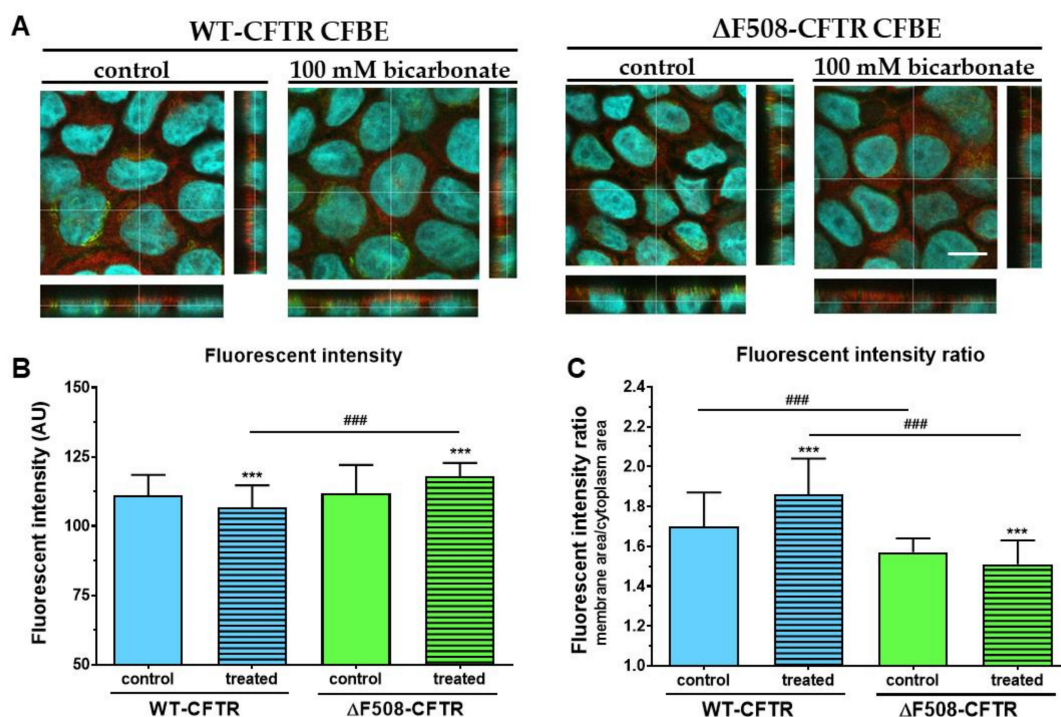


Figure 13. The effect of sodium bicarbonate on the immunolocalization of CFTR channels in CFBE cells. (A) WT-CFTR and Δ F508-CFTR CFBE cells were treated with culture medium containing 26 mM (control group) or 100 mM sodium bicarbonate for 24 h. Red color: immunostaining for CFTR. Green color: WGA lectin staining. Cyan color: cell nuclei. Bar: 10 μ m. Image analysis of the immunostainings showing (B) mean pixel intensities of the CFTR staining in the membrane region of the treatment groups and (C) the ratio of mean pixel intensities of the CFTR staining in the membrane region divided by mean pixel intensities of the CFTR staining in the cytoplasm regions. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 4018$ image stacks/group. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. ### $p < 0.001$ compared to the wild-type epithelial cells, *** $p < 0.001$ compared to the control groups.

3. Discussion

We have successfully established and characterized a new, physiologically more relevant co-culture model of cystic fibrosis using the CFBE cell line. This cell line, derived from samples from a CF patient, is widely used for studies on disease pathology and to test possible pharmacological treatments [25,26]. To better understand CF pathology, CFBE cells, which do not express endogenous CFTR, were transfected with WT and Δ F508-CFTR channels by several groups [14,17,20]. Bebők et al. have characterized in detail a CFBE cell-line pair sharing the same genetic background but expressing either the WT or the mutant channel [14], and this model was further developed in our experiments. Many studies prove that CFBE cells expressing WT and Δ F508-CFTR channels are a useful model system to study biogenesis, trafficking and regulation of this anion channel. The advantages of CFBE cells include easy culture of the cells, robust expression of the respective CFTR channels, epithelial characteristics, like a polarized phenotype and apical expression of CFTR in wild-type cells, and the expression of adenosine and adrenergic receptors which regulate CFTR activity [14]. We could confirm, that both CFBE cell lines formed tight barriers, showed high TEER values and well-established intercellular junctions in concordance with literature data [20]. We also demonstrated the expression of functional CFTR channels in the WT-CFTR CFBE cells, but not in the Δ F508-CFTR CFBE cells. Intracellular cAMP signaling is linked to CFTR activation and increased ion flux, which was reflected in the WT-CFTR CFBE cells as a decrease in TEER values, while the opposite effect was observed after treatment with a CFTR inhibitor. In contrast, the TEER values of the Δ F508-CFTR CFBE cells increased, which is due to the well-known barrier-tightening effects of cAMP [27] as indicated by the decreased paracellular

permeability for tracer molecules of diffusion in both cell lines. These functional data are in accordance with the positive immunostaining for CFTR in the cells in our study, and functional TEER results from the literature [20,28], and indicate the validity of our models.

Co-culture models of airway epithelial cells are increasingly used as a more complex experimental setup [18,26]. However, these models are made either from non-bronchial, mostly alveolar epithelial cells [18] or are used as 3D organoids, which are not suitable for permeability studies [26]. The only study we could find presenting a human bronchial epithelial and vascular endothelial co-culture was a microfluidic model optimized for microscopy [19]. Thus, our study is the first to establish and characterize a culture-insert-based co-culture model using a CFBE cell-line pair and human vascular endothelial cells. We found that the presence of endothelial cells induced better barrier properties in CFBE bronchial epithelial cells. The resistance values increased while the permeability values decreased for marker molecules. The co-culture conditions also increased the tightness of interepithelial junctions and made CFBE cells form a well-organized, tighter monolayer visualized by immunostaining. We observed, that the WT-CFBE model showed lower, while the $\Delta F508$ -CFTR CFBE model had significantly higher, TEER.

When the barrier integrity of the CFBE cell-line pair was compared, based on several independent experiments, we confirmed that monocultures of $\Delta F508$ -CFTR CFBE cells showed lower TEER and higher paracellular permeability values indicating weaker barrier properties. These findings are in agreement with literature data, in which bronchial epithelial cell monolayers expressing $\Delta F508$ -CFTR have a higher paracellular permeability [26,28]. These papers not only link CFTR dysfunction to the dysregulation of the paracellular transport route [28], but also demonstrate that the expression of the WT-CFTR restores tight-junction localization and function in cystic fibrosis bronchial epithelial cells [26]. Our novel finding is, that when $\Delta F508$ -CFTR CFBE cells are kept in co-culture with human vascular endothelial cells from a normal genetic background, this effect is rescued: the mutant cells show tighter barrier properties: increased resistance and decreased permeability for hydrophilic marker molecules.

Although air-liquid interface culture conditions are generally considered as better reflecting physiological conditions [26], in our hands culturing CFBE cells in air-liquid interface showed weaker barrier properties compared to the traditional liquid submerged cultures. Our results are supported by a study, in which impaired barrier properties were also obtained at air-liquid-cultured CFBE cells [17], indicating that this approach cannot necessarily be applied for all respiratory culture models.

Inflammatory changes in the respiratory system are a hallmark of CF and have been investigated in culture models, where loss of barrier integrity was described in airway epithelial cultures treated with proinflammatory cytokines [26,29]. To test the reaction of the model to inflammatory challenge, co-cultures of CFBE epithelial and endothelial cells were treated with a combination of TNF α and IL-1 β . This combination of cytokines caused NF- κ B translocation and the loss of barrier integrity in our previous studies on other biological barrier models, namely on intestinal epithelial cells [21] and brain endothelial cells [30]. Treatment with proinflammatory cytokines caused barrier damage in both CFBE cell-based co-culture models as demonstrated by the lower TEER and higher permeability values. This effect was not observed in CFBE epithelial monocultures, where the response of the cells to cytokines was modest. The presence of endothelial cells contributed to the more robust response to proinflammatory cytokine treatment in epithelial cells and suggests that co-cultures can be more suitable models to investigate inflammatory conditions in vitro.

To further characterize the CFBE cell lines we tested their response to the PN159/KLAL peptide, which has a dual effect on barrier cells: it opens the intercellular-tight junctions and also acts as a cell-penetrating peptide [23]. The junction-modulator effect of this synthetic cationic peptide was discovered on human bronchial epithelial cell cultures [31], and we have described a similar effect on models of the intestinal epithelium and the blood-brain barrier [22]. We found that the PN159/KLAL peptide efficiently and reversibly opened the junctions in CFBE bronchial epithelial cells and there was no difference between the reactions of the CFBE cell-line pair to the peptide.

By regulating mucus pH and viscosity, inhaled bicarbonate can be also crucial in the therapy of CF [32]. Indeed, sodium bicarbonate decreased high viscosity of the CF bronchial secretion [33] and a similar effect has been observed in a clinical investigation [34]. This new clinical study on CF patients confirmed the safety and tolerability of nebulized sodium bicarbonate (4.2% and 8.4% solutions) and demonstrated an increased pH and decreased viscosity in bronchial mucus [34]. In addition, sodium bicarbonate (100 mM) inhibited bacterial growth and biofilm formation of bacteria important in CF pathology, indicating it can have an additional beneficial effect in CF therapy [11].

Our study aimed to investigate the direct effect of elevated sodium bicarbonate concentrations on bronchial epithelial cell viability, barrier properties and morphology, which have not been studied yet. Using impedance kinetics to monitor the cell-layer response we confirmed that CFBE epithelial cells tolerate well-elevated sodium bicarbonate concentrations. In our experiments 100 mM sodium bicarbonate (a four-times-higher concentration than in the basal culture medium) was the highest, but still a safe concentration based on viability and cell morphology data. Interestingly, we found differences between the reactions of the CFBE cell lines. CFBE cells expressing the wild-type CFTR channel were more sensitive to higher concentrations of sodium bicarbonate. In $\Delta F508$ -CFTR bronchial cells expressing the mutant channel the impedance values were the same after treatment with elevated concentrations of bicarbonate as in the control group. In addition, even a barrier-increasing effect was seen in the case of these $\Delta F508$ -CFTR epithelial cells based on the image analysis of junctional protein ZO-1. One of our most important findings is that the barrier function of the CFBE epithelial cells is preserved after sodium bicarbonate treatment based on resistance, permeability and morphological results.

We not only demonstrated that higher concentrations of sodium bicarbonate can be safely used in CFBE cells, but we made observations that these might be also beneficial for cells expressing the mutant CFTR channel. We measured in $\Delta F508$ -CFTR bronchial epithelial cells a more alkaline-resting pH_i than in CFBE cells expressing wild-type CFTR. Similarly, in CFTR-KO crypt epithelial cells more alkaline pH_i was found [24]. Treatment of the cells with 100 mM sodium bicarbonate normalized the pH_i of mutant cells to the level of the WT-CFTR CFBE cells.

Although regulation of CFTR expression and targeting is not fully understood, transcription factors and miRNAs are known to regulate these processes [35]. Our results show that administration of 100 mM sodium bicarbonate modifies the apical expression of CFTR in both cell lines. Extracellular HCO_3^- acting as a signal molecule, stimulates the activity of soluble adenylyl cyclase increasing intracellular cAMP concentrations, which in turn activates protein kinase A [36]. Protein kinase A could trigger NF- κ B, a transcription factor known to mediate up-regulation of the CFTR gene expression in pulmonary epithelial cells [37]. Thus, it is conceivable that higher HCO_3^- -permeability of WT-CFTR expressing cells causes up-regulation of adenylyl cyclase activity increasing apical expression of CFTR. Further investigations are needed to explain the reduced CFTR immunofluorescence ratio in $\Delta F508$ -CFTR-expressing cells.

Our morphological analysis indicates that mutant CFBE cells have an increased average height suggesting larger cell volume than WT-CFTR-expressing cells. The important role of CFTR in cell-volume regulation has already been demonstrated by other research groups. For instance, it has been shown that cell-volume regulation is defective of small intestinal crypts isolated from CFTR^{-/-} mutant mice [38]. The authors claimed that this was due to impaired CFTR-dependent regulation of volume sensitive K⁺ channels. In another study, CFTR potentiated and accelerated regulatory-volume decrease following hypotonic challenge by an autocrine mechanism involving ATP release and signaling [39]. Consequently, lack of functional CFTR could lead to impaired ATP secretion and depletion of this autocrine, purinergic signaling system under both basal and hypotonic conditions. Furthermore, altered intracellular Cl⁻ concentrations of CF cells may also contribute to defective cell-volume regulation [40].

In conclusion, we characterized a new co-culture model of bronchial epithelial cells and demonstrated that vascular endothelial cells induced better barrier properties in CFBE cells as reflected

by the higher resistance and lower permeability values. Activation of CFTR by cAMP decreased the electrical resistance in wild-type but not in mutant CFBE cell layers confirming the presence and absence of functional channels, respectively. Elevated concentrations of sodium bicarbonate were well-tolerated by CFBE cells: it slightly reduced the impedance of wild-type but not that of the mutant CFBE cells. Sodium bicarbonate significantly increased the junctional staining intensity of ZO-1 protein and decreased the more-alkaline intracellular pH of the mutant CFBE cells, while the functional barrier properties of the models were preserved. Our observations on the direct effects of sodium bicarbonate on bronchial epithelial cells confirm the safe therapeutic use of inhaled sodium bicarbonate.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Unless specified otherwise, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich Ltd. (Budapest, Hungary).

4.2. Cell Cultures

The human cystic fibrosis bronchial epithelial (CFBE) cell-line pair was kindly provided by Dr. Zsuzsanna Bebők. The cells expressing the wild-type human CFTR (WT-CFTR CFBE) and the CFTR with the most common $\Delta F508$ mutation ($\Delta F508$ -CFTR CFBE) were generated by lentiviral transformation of the human CFBE41o⁻ cell line, which does not express CFTR [14]. CFBE human bronchial epithelial cells were grown under selective pressure in puromycin-containing medium to express the transgenes and used for the experiments until passage 18. The cells were grown in Minimum Eagle Medium (MEM) (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Pan-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), stable glutamine (Glutamax, 2 mM), puromycin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamycin in a humidified incubator with 5% CO_2 at 37 °C. All plastic surfaces were coated with 0.05% rat tail collagen in sterile, distilled water before cell seeding in culture dishes and the medium was changed every 2 days.

Bronchial epithelial cells were cultured in the presence of human vascular endothelial cells [41,42] to create the co-culture model. The endothelial culture media (ECM-NG, Sciencell, Carlsbad, CA, USA) was supplemented with 5% FBS, 1% endothelial growth supplement (ECGS, Sciencell, Carlsbad, CA, USA) and 0.5% gentamicin. For the permeability measurements the epithelial cells were cultured on inserts (Transwell, polycarbonate membrane, 0.4 μm pore size, 1.12 cm^2 , Corning Costar Co., MA, USA) placed in 12-well plates as mono- or co-cultures for 10 days. To prepare the co-culture model, endothelial cells ($\leq P9$) were passaged (8×10^4 cells/ cm^2) to the collagen-type-IV- and fibronectin- (both at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) coated bottom side of tissue culture inserts and bronchial epithelial cells were seeded (1×10^5 cells/ cm^2) to the upper side of the membranes which were coated with rat tail collagen. CFBE cells were cultured for 10 days in the presence or absence of endothelial cells and were treated when the cell layer had reached steady resistance values. In the liquid-liquid interface (LLI) culture mode the volume of the medium in the upper compartment was 0.5 mL, in the lower compartment 1.5 mL. For culturing the cells at air-liquid interface (ALI) the medium was removed from the confluent bronchial epithelial cell layer after three days, while the endothelial cells in the bottom compartment received 1 mL fresh culture medium.

4.3. Treatments

To functionally validate the presence of wild-type and mutant CFTR channels in the respective cell lines an activator and an inhibitor of CFTR channels were tested on the monocultures. The stock solution (25 mM) of the CFTR channel activator 8-(4-chlorophenylthio)-cAMP (cAMP) was prepared in sterile distilled water and it was further diluted in culture medium at 250 μM final concentration for treatments. To avoid the degradation of cAMP RO 20 1724 (17.5 μM), a cAMP-specific phosphodiesterase 4 inhibitor was added to the treatment solution. For the stock solution (100 mM) the CFTR

inhibitor 3-[(3-trifluoromethyl) phenyl]-5-[(4-carboxyphenyl) methylene]-2-thioxo-4-thiazolidinone (CFTR_{inh}-172) was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), further diluted in culture medium and tested at 10 μ M concentration also for 1 h. For both reagents, cell-layer integrity was monitored by electrical resistance and permeability measurements after 1 h of treatment.

To model inflammatory conditions, often observed in CF lung, the mono- and co-cultures were treated with a combination of TNF- α (50 ng/mL) and IL-1 β (25 ng/mL) in both compartments of the inserts [21]. After the 6-h cytokine treatment, cell-layer integrity was investigated by electrical resistance and permeability measurement.

To test the similarities and differences between the response of the CFBE cell lines to different treatments we also tested the effect of the PN159/KLAL peptide (NH₂-KLALKLALKALKA ALKLA-amide). This peptide, which shows both cell-penetrating effects and opens intercellular junctions, has been characterized in detail by our research group [22,23]. The stock solution of the peptide (5 mM) was prepared in DMSO, the final concentration of the peptide in cell culture medium was 10 μ M, as used in our previous studies. We treated the CFBE monoculture with the peptide for 30 min (only in upper compartments, where the apical junctional complex is situated). After the treatment medium was changed, TEER and permeability measurements were performed immediately and at the end of the 24 h recovery period.

To test the effect of sodium bicarbonate we prepared 50, 100 and 200 mM treatment solutions. The MEM culture medium already contains 26 mM sodium bicarbonate. To achieve a 500 mM stock solution we dissolved 200.5 mg NaHCO₃ in 5 mL cell culture medium, then sterilized with a 0.2 μ m syringe filter. The treatment solutions were diluted from the stock solution in culture medium and were freshly prepared before the experiments. For the viability assay 50, 100 and 200 mM concentrations, for the cell-layer integrity and intracellular pH measurements 100 mM concentration of bicarbonate were used (only upper, apical compartments were treated to mimic inhaled sodium bicarbonate treatment).

4.4. Measurement of the Electrical Resistance of CFBE Cell Layers

Transepithelial electrical resistance (TEER) indicates the integrity and paracellular permeability of cell layers for ions. TEER reflects the tightness of the intercellular junctions closing the paracellular cleft, therefore the overall tightness of cell layers of biological barriers. Before measuring the transepithelial electrical resistance (TEER) of the cell layers 500 μ L of fresh medium was added to the upper and lower compartments. The measurement was performed after 15 min of equilibration time in the CO₂ incubator. We used an EVOM volt-ohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) combined with STX-2 electrodes to determine TEER values which were expressed relative to the surface area of the monolayers as $\Omega \times \text{cm}^2$. TEER of cell-free inserts (90–100 $\Omega \times \text{cm}^2$) was subtracted from the measured data. The culture medium was changed and TEER was checked every second day. TEER values were measured before and right after the experiments.

4.5. Permeability Study on CFBE Cell Culture Model

To determine the tightness of the bronchial epithelial culture model two passive permeability marker molecules, fluorescein (10 μ g/mL; Mw: 376 Da) and Evans-blue labeled albumin (167.5 μ g/mL Evans-blue dye and 10 mg/mL bovine serum albumin; MW: 67.5 kDa) were tested [22]. The inserts were transferred to 12-well plates containing 1.5 mL Ringer buffer in the acceptor (lower/basal) compartments. In the donor (upper/apical) compartments 0.5 mL buffer was pipetted containing both markers. To avoid the unstirred-water-layer effect, the plates were kept on a horizontal shaker (120 rpm) during the assay. The assay lasted for 30 or 60 min. The concentrations of the marker molecules in the samples from both compartments were determined by a fluorescence multiwell plate reader (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Germany; fluorescein: 485 nm excitation wavelength, 520 nm emission wavelength; Evans-blue labeled albumin: 584 nm excitation wavelength, 680 nm emission wavelength).

The apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated as previously described [23]. Briefly, cleared volume was calculated from the concentration difference of the tracer in the acceptor compartment ($\Delta[C]_A$) after 30 or 60 min and in donor compartments at 0 h ($[C]_D$), the volume of the acceptor compartment (V_A ; 1.5 mL) and the surface area available for permeability (A ; 1.12 cm²) using this equation:

$$P_{app} \text{ (cm/s)} = \frac{\Delta[C]_A \times V_A}{A \times [C]_D \times \Delta t} \quad (1)$$

4.6. Cell Viability Measurements

The kinetics of the epithelial cell reaction to the sodium bicarbonate treatment was monitored by impedance measurement at 10 kHz (RTCA-SP instrument, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). Real-time cell electronic sensing is a non-invasive, label-free, impedance-based technique to quantify the kinetics of proliferation, viability and cellular reaction of adherent cells. This method to follow cell damage and/or protection in living barrier forming cells has been successfully used by our team in the last seven years [23,30]. The 96-well E-plates with built-in gold electrodes were coated with collagen type I (50 µg/mL) and dried for 30 min under sterile airflow. For background measurements 50 µL cell culture medium was added to the wells, then cells were seeded at a density of 1×10^4 cells/well to the coated 96-well plates with integrated gold electrodes (E-plate 96, ACEA Biosciences). Cells were cultured for 3–4 days in a CO₂ incubator at 37 °C and the impedance of cell layers was monitored every 10 min until the end of experiments by an RTCA-SP instrument (ACEA Biosciences). Cell index was defined as $(R_n - R_b)/15$, where R_n is the cell-electrode impedance of the well when it contains cells and R_b is the background impedance of the well with the medium alone. Cells were treated with culture medium containing sodium bicarbonate at 50, 100 and 200 mM concentrations at the beginning of the plateau phase of growth and the effects were followed for 24 h. Triton X-100 detergent (1 mg/mL) was used as a reference compound to induce cell death.

4.7. Immunohistochemistry

Immunostaining was used to evaluate morphological differences between the two CFBE cell lines when cultured in different conditions (mono- vs. co-culture, LLI vs. ALI) or treated by different concentrations of sodium bicarbonate. Cells were grown on culture inserts and after the treatments they were washed with phosphate buffered saline (PBS) and fixed with 3% paraformaldehyde solution for 15 min at room temperature. The cells were permeabilized by 0.2% TX-100 solution for 10 min and the nonspecific binding sites were blocked with 3% bovine serum albumin in PBS. Primary antibodies rabbit anti-ZO-1 (AB_138452, 1:400; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), rabbit anti-β-catenin (AB_476831, 1:400) and mouse anti-E-cadherin (AB_397580, 1:400; Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) were applied as an overnight treatment. Incubation with secondary antibodies Alexa Fluor-488-labeled anti-mouse (AB_2534088, 1:400; Life Technologies, Invitrogen, USA) and anti-rabbit IgG conjugated with Cy3 (AB_258792, 1:400) lasted for 1 h. Hoechst dye 33342 was used to stain cell nuclei. After mounting the samples (Fluoromount-G; Southern Biotech, Birmingham, USA) staining was visualized by confocal laser scanning microscope (Olympus Fluoview FV1000, Olympus Life Science Europa GmbH, Hamburg, Germany).

We used double nuclei staining to evaluate cell-membrane damage. The blue Hoechst dye stains every cell nuclei and the red ethidium homodimer-1 dye stains only the nuclei of damaged cells [23]. CFBE cells were cultured on collagen-coated glass coverslips (Menzel-Glaser, Braunschweig, Germany) in a 12-well plate. Cells were seeded at a 10^5 cells/well density and cultured for 3 days. Cell layers after reaching confluency were treated with culture medium containing 50, 100 and 200 mM bicarbonate for 24 h. Ethidium homodimer-1 dye (1 µM) was added to the cells in the last 30 min of the 24 h bicarbonate treatment. After a washing step with PBS the cells were fixed with acetone:methanol (1:1) solution for 3 min. Then the samples were processed for immunostaining for junctional proteins ZO-1 and β-catenin as described above.

The localization of CFTR channels in the CFBE cells was studied by concomitant staining of the samples with a rabbit polyclonal anti-CFTR antibody (Alomone Labs, Jerusalem, Israel; 1:400) and wheat germ agglutinin lectin (WGA) conjugated with Alexa fluor 488 (Invitrogen, W11261) which binds to the N-acetyl-D-glucosamine and sialic acid residues of the glycocalyx covering the cells' surface. The cells were fixed with 3% paraformaldehyde, washed with PBS and incubated with WGA (5 µg/mL) in PBS for 10 min at room temperature [43]. This step was followed by permeabilization with 0.2% TX-100 solution for 10 min, blocking with 3% bovine serum albumin in PBS for 1 h and incubation with the CFTR antibody overnight. After the washing steps cells were incubated with secondary antibody Cy3-conjugated anti-rabbit IgG for 1 h. Cell nuclei were stained with Hoechst dye 33342. Samples were mounted and the staining was visualized by a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany).

The cellular localization of the CFTR channels was determined by image analysis (MATLAB, The Mathworks Inc, Natick, Ma, USA) performed on the immunostained CFBE image stacks. First, the image stacks of the WGA staining were used to determine the apical region of the imaged cells. For this the WGA image stacks were laterally smoothed by a 10-pixel-wide 2D Gaussian filter. Within each column (z-direction) of a smoothed WGA stack the cells' apical membrane position was determined by finding the pixel position where the intensity first rises above 30% of the maximum value in the column, going from the top of the image stack (apical side). Next, based on the obtained apical contour of the cells, spatial masks were calculated for the cell membrane and cytoplasm. The membrane mask was calculated as a 12-pixels- (2.4 µm) wide stripe starting from the top edge of the cells. The cytoplasm mask was taken as the area between the bottom of the membrane mask and the bottom of the image stack (basal side). Finally, the spatial masks were used to calculate the mean pixel intensities of the CFTR staining in the membrane and cytoplasm regions (Video S1–S4). A total of 9 images were analyzed in each group consisting of 512 image stacks (4018 image stacks/group).

The intensity of junctional stainings (ZO-1, E-cadherin, β-catenin) were evaluated by image analysis (MATLAB, The Mathworks Inc, Natick, Ma, USA) performed on the immunostained images. A K-means clustering-based image segmentation function was used to segment the images into areas corresponding to the cytoplasm and the junctional regions. Based on the segmentation, spatial masks were obtained and used for calculating the mean pixel intensity in the junctional areas.

4.8. Measurement of Resting Intracellular pH

CFBE cells were cultured on rat tail collagen-coated glass coverslips (24 mm) in 35 mm cell culture dishes (Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgium). The cells were seeded at 2×10^5 cells/dish density and cultured until confluency. Cells treated with 100 mM NaHCO₃ in cell culture medium were kept for 1 h in a CO₂ incubator at 37 °C. The cells were washed once with PBS and were loaded with the pH-sensitive fluorescent dye 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6-) carboxyfluorescein-acetoxymethyl ester (BCECF-AM; Biotium Inc., Fremont, CA, USA) at 2 µM concentration in HEPES-buffered solution (HEPES-BS; 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-glucose and 10 mM HEPES acid; pH = 7.4) at 37 °C in a wet chamber for 20–30 min. Thereafter, the cells on coverslips were continuously perfused at a rate of 1–1.5 mL/minute in a perfusion chamber (QE-1, Warner Instruments, Hamden, CT, USA) mounted on a Zeiss Axio Observer 7 microscope (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany). The cells were excited with light at wavelengths of 495 (±3) nm and 436 (±10) nm, and the 495/436 fluorescence emission ratio was measured at 540 ± 20 nm to determine intracellular pH (pH_i). Images from fourteen to seventeen randomly selected cells (regions of interests, ROIs) were obtained by using the ZEN software (Carl Zeiss Microscopy GmbH). One measurement was recorded every two seconds. The 495/436 emission ratio of cells perfused with HEPES-BS was determined at the beginning of the measurements. To convert the emission ratio to resting pH_i, cells were perfused with a high K⁺ HEPES-BS (K-HEPES-BS; 15 mM NaCl, 130 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 10 mM D-glucose, 10 mM HEPES acid; pH set between 6.0 and 8.4, and 10 µM nigericin sodium salt (Tocris Bioscience, Bristol, UK)) calibration solutions with known pH values [44].

4.9. Statistical Analysis

All data presented are means $\pm$ SD. The values were compared using the analysis of variance followed by Dunnett's test or two-way ANOVA and Bonferroni post-hoc test posttest using GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Changes were considered statistically significant at $p < 0.05$.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/21/11/4024/s1>. Figure S1. Transepithelial electrical resistance (A) and permeability values (B) of the CFBE co-cultures grown at liquid-liquid interface (LLI) and air-liquid interface (ALI). Means $\pm$ SD, $n = 4$ /group. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. *** $p < 0.001$ compared to the LLI groups. Figure S2. Immunostaining of junctional proteins ZO-1 and E-cadherin in CFBE cells cultured at liquid-liquid interface (LLI) and air-liquid interface (ALI). Green and red color: immunostaining for junctional proteins. Cyan color: staining of cell nuclei. Bar: 40 μ m. Figure S3. Transepithelial electrical resistance (A) and permeability values (B) of monocultures after 6-hour cytokine treatment. Values are presented in the percentage of control groups. Means $\pm$ SD, $n = 4$ /group. Statistical analysis: 2-way ANOVA followed by Bonferroni test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control groups. Figure S4. Impedance measurements of WT-CFTR CFBE (A) and Δ F508-CFTR CFBE (B) cells after treatment with culture medium containing different concentrations of sodium bicarbonate (50, 100, 200 mM). Culture medium in the control groups contains 26 mM sodium bicarbonate. The effects of bicarbonate on the impedance were shown as normalized cell index. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 11$ –13. Statistical analysis: ANOVA and Bonferroni test. *** $p < 0.001$ compared to the control groups. Figure S5. The effect of sodium bicarbonate on the barrier integrity of CFBE cells in monoculture. Transepithelial electrical resistance values at 1 and 24-hour time points (A) and permeability values (B) of the monoculture models after treatment with culture medium containing 100 mM sodium bicarbonate. Values are presented in the percentage of control groups. Means $\pm$ SD, $n = 4$ /group. Statistical analysis: 2-way ANOVA followed by Bonferroni test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared to the control groups. Figure S6. The effect of sodium bicarbonate on the junctional morphology of CFBE cells in monoculture. Immunostaining of the monoculture models for junction proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and E-cadherin after treatment with culture medium containing 26 mM (control group) or 100 mM bicarbonate treatment (24 h). Red color: immunostaining for ZO-1. Green color: immunostaining for E-cadherin. Cyan color: cell nuclei. Bar: 40 μ m.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.D., A.B., H.S. and Á.Z.; methodology, A.B., I.G., L.B., A.H., A.R.S.-M and L.K.; formal analysis, I.G., A.B. and G.V.; investigation, I.G., A.B., L.K., A.H., G.F., L.B.; resources, Z.R.J., F.G., R.A., P.S.-R., G.V. and M.A.D.; data curation, I.G., A.B., A.H. and G.V.; writing—original draft preparation, I.G., M.A.D. and Á.Z.; writing—review and editing, I.G., A.B., A.H., A.R.S.-M., G.V., L.B., L.K., G.F., Z.R.J., R.A., P.S.-R., F.G., P.J., H.S., Á.Z. and M.A.D.; visualization, I.G., A.B., A.H. and G.V.; supervision, M.A.D., Z.R.J., and Á.Z.; funding acquisition, M.A.D., Z.R.J., R.A., P.S.-R. and Á.Z. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was financially supported by the EU-funded Hungarian grant EFOP-3.6.2-16-2017-00006 and European Training Network H2020-MSCA-ITN-2015 (Grant number 675619).

Acknowledgments: The human cystic fibrosis bronchial epithelial (CFBE) cell-line pair was kindly provided by Zsuzsanna Bebök (University of Alabama, USA).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Amaral, M.D.; Hutt, D.M.; Tomati, V.; Botelho, H.M.; Pedemonte, N. CFTR processing, trafficking and interactions. *J. Cyst. Fibros.* **2020**, *19*, S33–S36. [CrossRef] [PubMed]
2. Roth, D.M.; Hutt, D.M.; Tong, J.; Bouchecareilh, M.; Wang, N.; Seeley, T.; Dekkers, J.F.; Beekman, J.M.; Garza, D.; Drew, L.; et al. Modulation of the maladaptive stress response to manage diseases of protein folding. *PLoS Biol.* **2014**, *12*, e1001998. [CrossRef] [PubMed]
3. Li, H.; Pesce, E.; Sheppard, D.N.; Singh, A.K.; Pedemonte, N. Therapeutic approaches to CFTR dysfunction: From discovery to drug development. *J. Cyst. Fibros.* **2018**, *17*, S14–S21. [CrossRef] [PubMed]
4. Middleton, P.G.; Mall, M.A.; Dřevínek, P.; Lands, L.C.; McKone, E.F.; Polineni, D.; Ramsey, B.W.; Taylor-Cousar, J.L.; Tullis, E.; Vermeulen, F. Elexacaftor-Tezacaftor-Ivacaftor for Cystic Fibrosis with a Single Phe508del Allele. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1809–1819. [CrossRef]
5. Lopes-Pacheco, M. CFTR Modulators: The Changing Face of Cystic Fibrosis in the Era of Precision Medicine. *Front Pharmacol.* **2020**, *10*, 1662. [CrossRef]

6. Bell, S.C.; Mall, M.A.; Gutierrez, H.; Macek, M.; Madge, S.; Davies, J.C.; Burgel, P.R.; Tullis, E.; Castaños, C.; Castellani, C.; et al. The future of cystic fibrosis care: A global perspective. *Lancet Respir Med.* **2020**, *8*, 65–124. [\[CrossRef\]](#)
7. Kunzelmann, K.; Schreiber, R.; Hadorn, H.B. Bicarbonate in cystic fibrosis. *J. Cyst. Fibros.* **2017**, *16*, 653–662. [\[CrossRef\]](#)
8. Rab, A.; Rowe, S.M.; Raju, S.V.; Bebok, Z.; Matalon, S.; Collawn, J.F. Cigarette smoke and CFTR: Implications in the pathogenesis of COPD. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2013**, *305*, L530–L541. [\[CrossRef\]](#)
9. Pezzulo, A.A.; Tang, X.X.; Hoegger, M.J.; Abou Alaiwa, M.H.; Ramachandran, S.; Moninger, T.O.; Karp, P.H.; Wohlford-Lenane, C.L.; Haagsman, H.P.v.E.M.; Bánfi, B.; et al. Reduced airway surface pH impairs bacterial killing in the porcine cystic fibrosis lung. *Nature* **2012**, *487*, 109–113. [\[CrossRef\]](#)
10. Simonin, J.; Bille, E.; Crambert, G.; Noel, S.; Dreano, E.; Edwards, A.; Hatton, A.; Pranke, I.; Villeret, B.; Cottart, C.-H.; et al. Author Correction: Airway surface liquid acidification initiates host defense abnormalities in Cystic Fibrosis. In *Sci. Rep.*; 2019; Volume 9. [\[CrossRef\]](#)
11. Dobay, O.; Laub, K.; Stercz, B.; Kéri, A.; Balázs, B.; Tóthpál, A.; Kardos, S.; Jaikumpun, P.; Ruksakiet, K.; Quinton, P.M.; et al. Bicarbonate Inhibits Bacterial Growth and Biofilm Formation of Prevalent Cystic Fibrosis Pathogens. *Front Microbiol.* **2018**, *9*, 2245. [\[CrossRef\]](#)
12. Chen, E.Y.; Yang, N.; Quinton, P.M.; Chin, W.C. A new role for bicarbonate in mucus formation. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **2010**, *299*, L542–L549. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Hiemstra, P.S.; Grootaers, G.; van der Does, A.M.; Krul, C.A.M.; Kooter, I.M. Human lung epithelial cell cultures for analysis of inhaled toxicants: Lessons learned and future directions. *Toxicol Vitro.* **2018**, *47*, 137–146. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Bebok, Z.; Collawn, J.F.; Wakefield, J.; Parker, W.; Li, Y.; Varga, K.; Sorscher, E.J.; Clancy, J.P. Failure of cAMP agonists to activate rescued deltaF508 CFTR in CFBE41o- airway epithelial monolayers. *J. Physiol.* **2005**, *569*, 601–615. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
15. Kunzelmann, K.; Schwiebert, E.M.; Zeitlin, P.L.; Kuo, W.L.; Stanton, B.A.; Gruenert, D.C. An immortalized cystic fibrosis tracheal epithelial cell line homozygous for the delta F508 CFTR mutation. *Am. J. Respir Cell Mol. Biol.* **1993**, *8*, 522–529. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Gottschalk, L.B.; Vecchio-Pagan, B.; Sharma, N.; Han, S.T.; Franca, A.; Wohler, E.S.; Batista, D.A.; Goff, L.A.; Cutting, G.R. Creation and characterization of an airway epithelial cell line for stable expression of CFTR variants. *J. Cyst. Fibros.* **2016**, *15*, 285–294. [\[CrossRef\]](#)
17. Ehrhardt, C.; Collnot, E.M.; Baldes, C.; Becker, U.; Laue, M.; Kim, K.J.; Lehr, C.M. Towards an in vitro model of cystic fibrosis small airway epithelium: Characterisation of the human bronchial epithelial cell line CFBE41o-. *Cell Tissue Res.* **2006**, *323*, 405–415. [\[CrossRef\]](#)
18. Marescotti, D.; Serchi, T.; Luettich, K.; Xiang, Y.; Moschini, E.; Talikka, M.; Martin, F.; Baumer, K.; Dulize, R.; Peric, D.; et al. How complex should an in vitro model be? Evaluation of complex 3D alveolar model with transcriptomic data and computational biological network models. *ALTEX* **2019**, *36*, 388–402. [\[CrossRef\]](#)
19. Liu, Z.; Mackay, S.; Gordon, D.M.; Anderson, J.D.; Haithcock, D.W.; Garson, C.J.; Tearney, G.J.; Solomon, G.M.; Pant, K.; Prabhakarandian, B.; et al. Co-cultured microfluidic model of the airway optimized for microscopy and micro-optical coherence tomography imaging. *Biomed. Opt. Express.* **2019**, *10*, 5414–5430. [\[CrossRef\]](#)
20. Molenda, N.; Urbanova, K.; Weiser, N.; Kusche-Vihrog, K.; Günzel, D.; Schillers, H. Paracellular transport through healthy and cystic fibrosis bronchial epithelial cell lines—do we have a proper model? *PLoS ONE* **2014**, *9*, e100621. [\[CrossRef\]](#)
21. Váradi, J.; Harazin, A.; Fenyvesi, F.; Réti-Nagy, F.K.; Gogolák, P.; Vámosi, G.; Bácskay, I.; Fehér, P.; Ujhelyi, Z.; Vasvári, G.; et al. Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone Protects against Cytokine-Induced Barrier Damage in Caco-2 Intestinal Epithelial Monolayers. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0170537. [\[CrossRef\]](#)
22. Bocsik, A.; Walter, F.R.; Gyebrovski, A.; Fülöp, L.; Blasig, I.; Dabrowski, S.; Ötvös, F.; Tóth, A.; Rákhely, G.; Veszelka, S.; et al. Reversible Opening of Intercellular Junctions of Intestinal Epithelial and Brain Endothelial Cells with Tight Junction Modulator Peptides. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 754–765. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Bocsik, A.; Gróf, I.; Kiss, L.; Ötvös, F.; Zsíros, O.; Daruka, L.; Fülöp, L.; Vastag, M.; Kittel, Á.; Imre, N.; et al. Dual Action of the PN159/KLAL/MAP Peptide: Increase of Drug Penetration across Caco-2 Intestinal Barrier Model by Modulation of Tight Junctions and Plasma Membrane Permeability. *Pharmaceutics* **2019**, *11*, e73. [\[CrossRef\]](#)

24. Walker, N.M.; Liu, J.; Stein, S.R.; Stefanski, C.D.; Strubberg, A.M.; Clarke, L.L. Cellular chloride and bicarbonate retention alters intracellular pH regulation in Cftr KO crypt epithelium. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **2016**, *310*, G70–G80. [[CrossRef](#)]
25. Gruenert, D.C.; Willems, M.; Cassiman, J.J.; Frizzell, R.A. Established cell lines used in cystic fibrosis research. *J. Cyst. Fibros.* **2004**, *33*, 191–196. [[CrossRef](#)]
26. Castellani, S.; Di Gioia, S.; di Toma, L.; Conese, M. Human Cellular Models for the Investigation of Lung Inflammation and Mucus Production in Cystic Fibrosis. *Anal. Cell Pathol.* **2018**, *2018*, 3839803. [[CrossRef](#)]
27. Deli, M.A.; Abrahám, C.S.; Kataoka, Y.; Niwa, M. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: Physiology, pathology, and pharmacology. *Cell Mol. Neurobiol.* **2005**, *25*, 59–127. [[CrossRef](#)]
28. Weiser, N.; Molenda, N.; Urbanova, K.; Bähler, M.; Pieper, U.; Oberleithner, H.; Schillers, H. Paracellular permeability of bronchial epithelium is controlled by CFTR. *Cell Physiol. Biochem.* **2011**, *2828*, 289–296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Humlicek, A.L.; Manzel, L.J.; Chin, C.L.; Shi, L.; Excoffon, K.J.; Winter, M.C.; Shasby, D.M.; Look, D.C. Paracellular permeability restricts airway epithelial responses to selectively allow activation by mediators at the basolateral surface. *J. Immunol.* **2007**, *178*, 6395–6403. [[CrossRef](#)]
30. Harazin, A.; Bocsik, A.; Barna, L.; Kincses, A.; Váradi, J.; Fenyvesi, F.; Tubak, V.; Deli, M.A.; Vecsernyés, M. Protection of cultured brain endothelial cells from cytokine-induced damage by α -melanocyte stimulating hormone. *PeerJ.* **2018**, *6*, e4774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Herman, R.E.; Makienko, E.G.; Prieve, M.G.; Fuller, M.; Houston, M.E., Jr.; Johnson, P.H. Phage display screening of epithelial cell monolayers treated with EGTA: Identification of peptide FDFWITP that modulates tight junction activity. *J. Biomol. Screen.* **2007**, *12*, 1092–1101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Quinton, P.M. Role of epithelial HCO₃[−] transport in mucin secretion: Lessons from cystic fibrosis. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **2010**, *299*, C1222–C1233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Stigliani, M.; Manniello, M.D.; Zegarra-Moran, O.; Galiotta, L.; Minicucci, L.; Casciaro, R.; Garofalo, E.; Incarnato, L.; Aquino, R.P.; Del Gaudio, P.; et al. Rheological Properties of Cystic Fibrosis Bronchial Secretion and in Vitro Drug Permeation Study: The Effect of Sodium Bicarbonate. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* **2016**, *29*, 337–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gomez, C.C.S.; Parazzi, P.L.F.; Clinckspoor, K.J.; Mauch, R.M.; Pessine, F.B.T.; Levy, C.E.; Peixoto, A.O.; Ribeiro, M.Â.G.O.; Ribeiro, A.F.; Conrad, D.; et al. Safety, Tolerability, and Effects of Sodium Bicarbonate Inhalation in Cystic Fibrosis. *Clin. Drug Investig.* **2020**, *40*, 105–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Viart, V.; Bergougnoux, A.; Bonini, J.; Varilh, J.; Chiron, R.; Tabary, R.; Molinari, N.; Claustres, M.; Taulan-Cadars, M. Transcription factors and miRNAs that regulate fetal to adult CFTR expression change are new targets for cystic fibrosis. *Eur. Respir. J.* **2015**, *45*, 116–128. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Lu, Y.C.; Chen, H.; Fok, K.L.; Tsang, L.L.; Yu, M.K.; Zhang, X.H.; Chen, J.; Jiang, X.H.; Chuang, Y.W.; Hang Ma, A.C.; et al. CFTR mediates bicarbonate-dependent activation of miR-125b in preimplantation embryo development. *Cell Res.* **2012**, *22*, 1453–1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Brouillard, F.; Bouthier, M.; Leclerc, T.; Clement, A.; Baudouin-Legros, M.; Edelman, A. NF-kappa B mediates up-regulation of CFTR gene expression in Calu-3 cells by interleukin-1beta. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 9486–9491. [[CrossRef](#)]
38. Valverde, M.A.; O'Brien, J.A.; Sepúlveda, F.V.; Ratcliff, R.A.; Evans, M.J.; Colledge, W.H. Impaired cell volume regulation in intestinal crypt epithelia of cystic fibrosis mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1995**, *92*, 9038–9041. [[CrossRef](#)]
39. Braunstein, G.M.; Roman, R.M.; Clancy, J.P.; Kudlow, B.A.; Taylor, A.L.; Shylonsky, V.G.; Jovov, B.; Peter, K.; Jilling, T.; Ismailov, I.I.; et al. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator facilitates ATP release by stimulating a separate ATP release channel for autocrine control of cell volume regulation. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 6621–6630. [[CrossRef](#)]
40. Treharne, K.J.; Crawford, R.M.; Mehta, A. CFTR, chloride concentration and cell volume: Could mammalian protein histidine phosphorylation play a latent role? *Exp. Physiol.* **2006**, *91*, 131–139. [[CrossRef](#)]
41. Pedrosa, D.C.; Tellechea, A.; Moura, L.; Fidalgo-Carvalho, I.; Duarte, J.; Carvalho, E.; Ferreira, L. Improved survival, vascular differentiation and wound healing potential of stem cells co-cultured with endothelial cells. *PLoS ONE* **2020**, *6*, e16114. [[CrossRef](#)]

42. Cecchelli, R.; Aday, S.; Sevin, E.; Almeida, C.; Culot, M.; Dehouck, L.; Coisne, C.; Engelhardt, B.; Dehouck, M.P.; Ferreira, L. A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e99733. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Betteridge, K.B.; Arkill, K.P.; Neal, C.R.; Harper, S.J.; Foster, R.R.; Satchell, S.C.; Bates, D.O.; Salmon, A.H.J. Sialic acids regulate microvessel permeability, revealed by novel in vivo studies of endothelial glycocalyx structure and function. *J. Physiol.* **2017**, *595*, 5015–5035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hegyi, P.; Rakonczay, Z., Jr.; Gray, M.A.; Argent, B.E. Measurement of intracellular pH in pancreatic duct cells: A new method for calibrating the fluorescence data. *Pancreas*. **2004**, *28*, 427–434. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Supplementary Materials

The effect of sodium bicarbonate, a beneficial adjuvant molecule in cystic fibrosis, on bronchial epithelial cells expressing wild type and mutant CFTR channel

Ilona Gróf¹, Alexandra Bocsik¹, András Harazin¹, Ana Raquel Santa-Maria¹, Gaszton Vizsnyiczai¹, Lóránd Kiss², Gabriella Für², Zoltán Rakonczay Jr², Rita Ambrus³, Piroska Szabó-Révész³, Fabien Gosselet⁴, Pongsiri Jaikumpun⁵, Hajnalka Szabó⁶, Ákos Zsembery⁵, Mária A. Deli^{1*}

1. Comparison of CFBE cultures kept at liquid-liquid interface and at air-liquid interface

In addition to standard, liquid-liquid culture conditions the CFBE cell models were also tested at air-liquid interface (ALI), which is considered as a physiologically more relevant condition. However, at least in our hands, the barrier properties of the co-culture models after 6 days of ALI were not better than those of the models kept in medium only (Figure S1). We measured lower transepithelial electrical resistance (Figure S1A) in both WT-CFTR CFBE (27% of the LLI) and $\Delta F508$ -CFTR CFBE cells (69% of LLI). The permeability of the WT-CFTR CFBE model kept in ALI was also higher for the small molecule fluorescein and a trend was seen for albumin (Figure S1B). The permeability of the $\Delta F508$ -CFTR CFBE model was a similar trend with increased permeability for albumin.

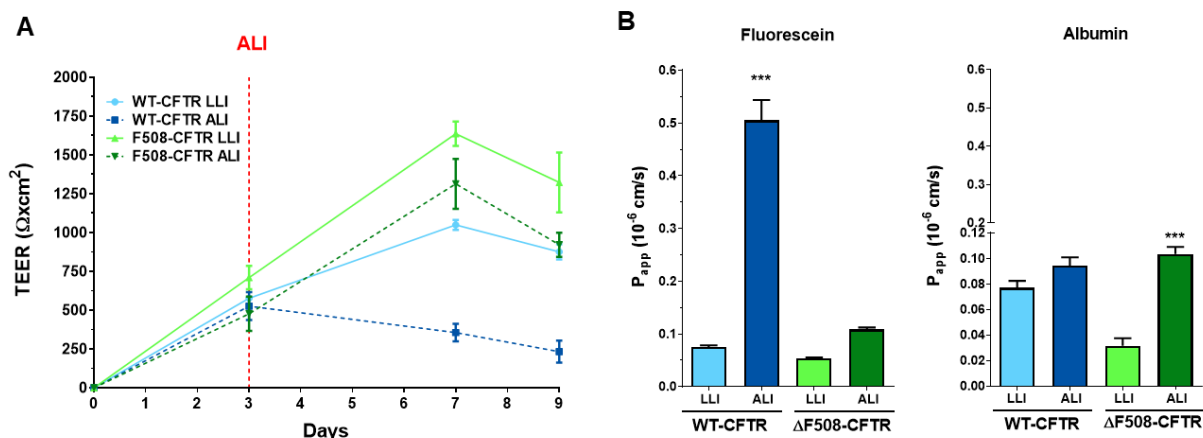


Figure S1. Transepithelial electrical resistance (A) and permeability values (B) of the CFBE co-cultures grown at liquid-liquid interface (LLI) and air-liquid interface (ALI). Means $\pm$ SD, $n = 4/\text{group}$. Statistical analysis: 2-way ANOVA and Bonferroni test. *** $P < 0.001$ compared to the LLI groups.

Morphological analysis of the CFBE cultures by immunostaining of the junctional proteins ZO-1 and E-cadherin confirmed the damaged cell layer integrity (Figure S2). More apoptotic cell nuclei and loss of junctional staining pattern was observed in case of the ALI-cultured cells.

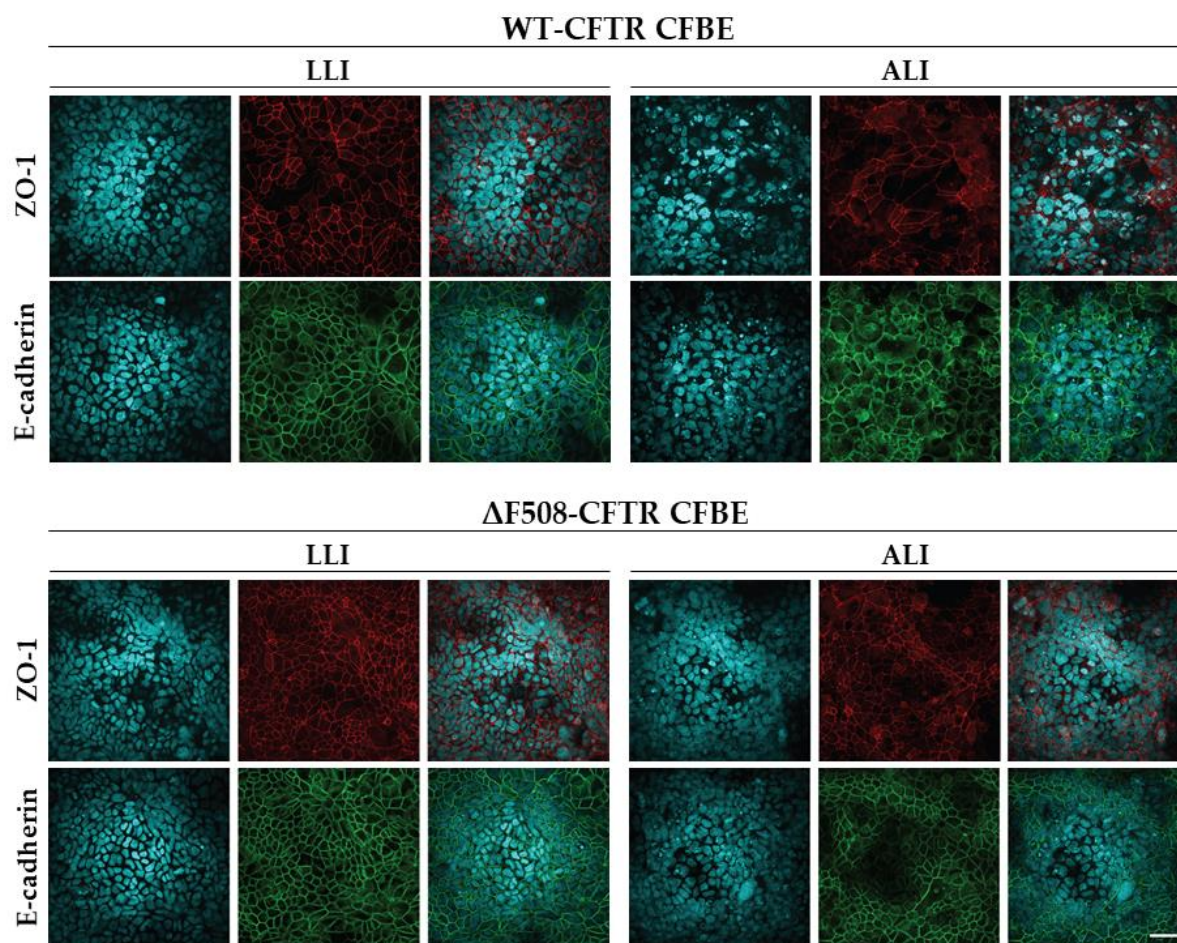


Figure S2. Immunostaining of junctional proteins ZO-1 and E-cadherin in CFBE cells cultured at liquid-liquid interface (LLI) and air-liquid interface (ALI). Green and red color: immunostaining for junctional proteins. Cyan color: staining of cell nuclei. Bar: 40 μ m.

2. The effect of cytokines on the barrier integrity of CFBE monocultures

The 6-hour treatment with TNF α (50 ng/ml) and IL-1 β (25 ng/ml) cytokines did not alter significantly the TEER values (Figure S3A) or permeability of CFBE monocultures for albumin (Figure S3B). The changes in the permeability values of WT-CFTR CFBE cells for the small hydrophilic marker fluorescein were minimal, especially compared to changes seen in the co-culture models (Figure 4). It is important to note that both cell lines formed tight barriers which were reflected in the very low permeability values (P_{app} for fluorescein: $0.30 \pm 0.02 \times 10^{-6}$ cm/s).

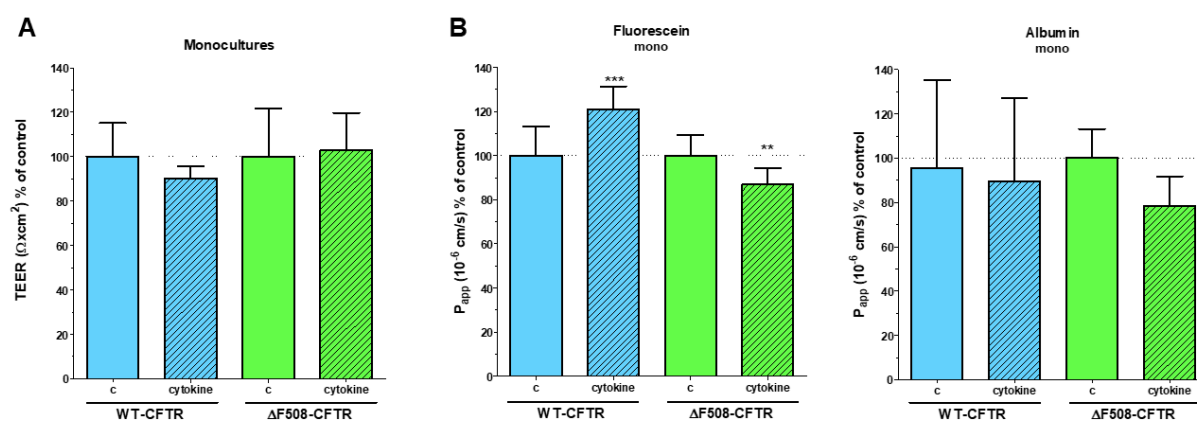


Figure S3. Transepithelial electrical resistance (A) and permeability values (B) of monocultures after 6-hour cytokine treatment. Values are presented in the percentage of control groups. Means $\pm$ SD, $n = 4/\text{group}$. Statistical analysis: 2-way ANOVA followed by Bonferroni test. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared to the control groups.

3. The effect of sodium bicarbonate on CFBE cell viability

After 1-hour bicarbonate treatment only the highest, 200 mM concentration decreased the impedance of CFBE cells (Figure S4A). After 24 hours the cell of index of WT-CFTR CFBE cells was lower in the 50 and 100 mM bicarbonate treatment groups (Figure S4B) suggesting that cells expressing wild type channels are more sensitive to bicarbonate. In Δ F508-CFTR CFBE cells the same cell index values were measured in the control and the 50 and 100 mM bicarbonate treatment groups at both short and long term time points which indicate a beneficial effect of the bicarbonate.

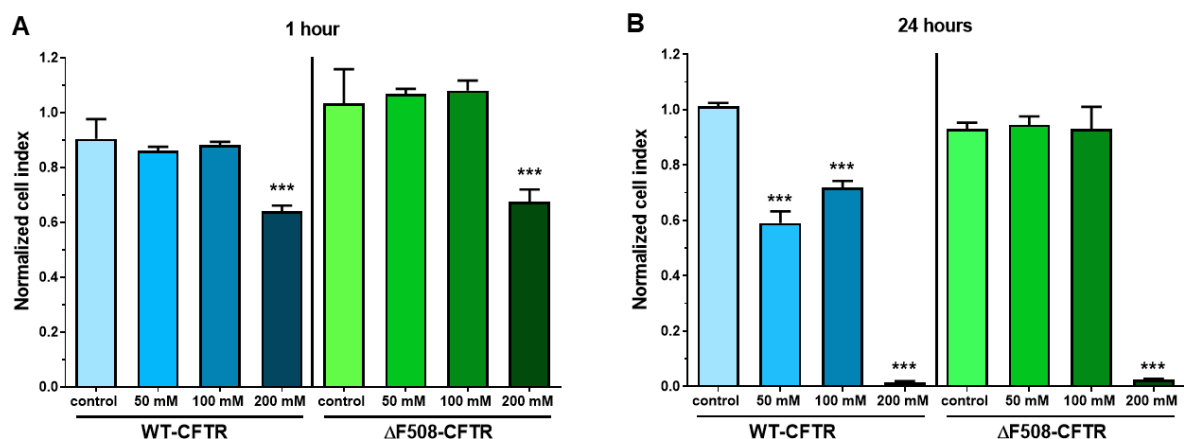


Figure S4. Impedance measurements of WT-CFTR CFBE (A) and Δ F508-CFTR CFBE (B) cells after treatment with culture medium containing different concentrations of sodium bicarbonate (50, 100, 200 mM). Culture medium in the control groups contains 26 mM sodium bicarbonate. The effects of bicarbonate on the impedance were shown as normalized cell index. Values are presented as means $\pm$ SD, n = 11-13. Statistical analysis: ANOVA and Bonferroni test. *** P <0.001 compared to the control groups.

4. The effect of bicarbonate on the barrier integrity of CFBE monocultures

TEER values of the CFBE cell layers decreased after 1-hour bicarbonate treatment (WT-CFTR: 57% of the control, Δ F508-CFTR: 73% of the control), but the resistance values returned to the level of the control group in WT-CFTR CFBE cells by 24 hours (Figure S5A). In case of Δ F508-CFTR CFBE cells resistance decreased further and at the 24-hour time point it was 62% of the TEER in the control group. Permeability values remained fairly constant for both tracers in all groups indicating tight barrier properties, except Δ F508-CFTR CFBE cells where 1.5 times higher fluorescein permeability could be observed after 24-hour treatment. These data support our observation that sodium bicarbonate at 100 mM concentration does not disturb the barrier properties of CFBE cells.

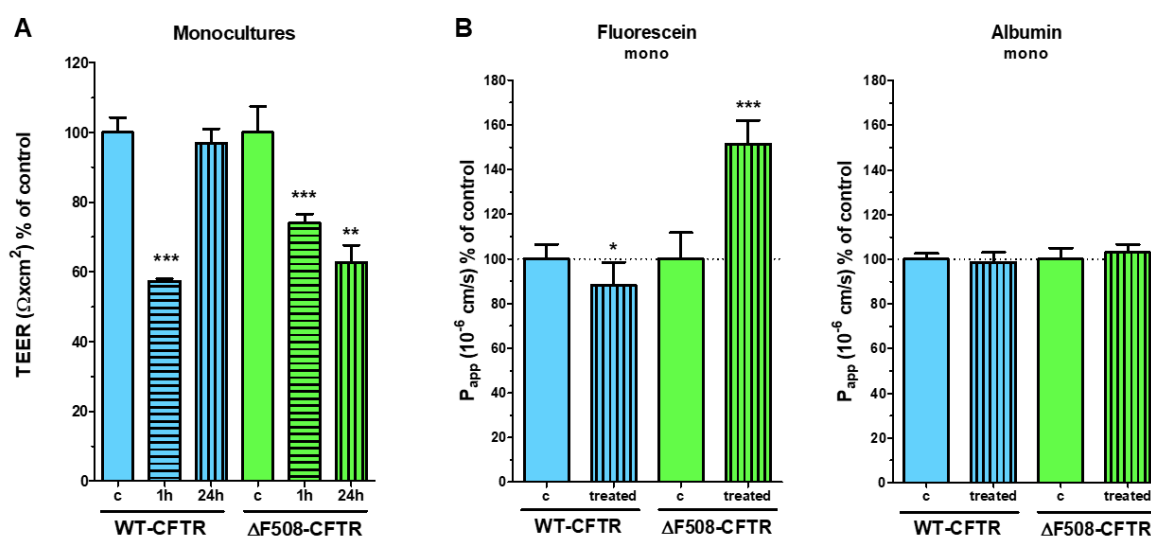


Figure S5. The effect of sodium bicarbonate on the barrier integrity of CFBE cells in monoculture. Transepithelial electrical resistance values at 1 and 24- hour time points (A) and permeability values (B) of the monoculture models after treatment with culture medium containing 100 mM sodium bicarbonate. Values are presented in the percentage of control groups. Means $\pm$ SD, n = 4/group. Statistical analysis: 2-way ANOVA followed by Bonferroni test. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 compared to the control groups.

In concordance with data obtained on co-cultures (Figure 10) the 24-hour bicarbonate treatment did not visibly change the staining pattern of the sodium bicarbonate-treated groups in CFBE bronchial epithelial cells in monoculture (Figure S6). A tight barrier was visualized by the localization of the junctional proteins, cell-cell connections formed pericellular belts in the control groups. No major morphological change could be observed for the treatment groups.

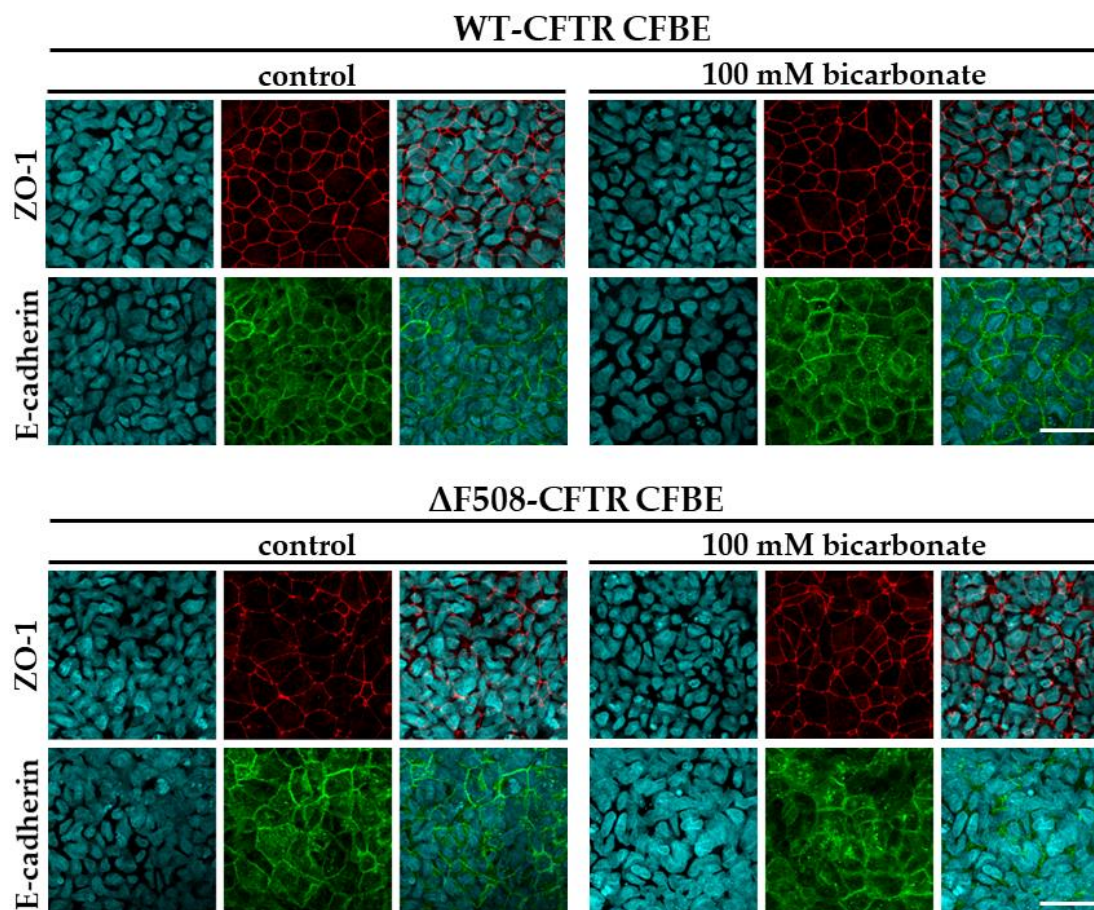


Figure S6. The effect of sodium bicarbonate on the junctional morphology of CFBE cells in monoculture. Immunostaining of the monoculture models for junction proteins zonula occludens-1 (ZO-1) and E-cadherin after treatment with culture medium containing 26 mM (control group) or 100 mM bicarbonate treatment (24 h). Red color: immunostaining for ZO-1. Green color: immunostaining for E-cadherin. Cyan color: cell nuclei. Bar: 40 μ m.

II. Publikáció



Article

Dual Action of the PN159/KLAL/MAP Peptide: Increase of Drug Penetration across Caco-2 Intestinal Barrier Model by Modulation of Tight Junctions and Plasma Membrane Permeability

Alexandra Bocsik ¹, Ilona Gróf ^{1,2}, Lóránd Kiss ^{1,3}, Ferenc Ötvös ⁴ , Ottó Zsíros ⁵,
Lejla Daruka ^{2,6}, Livia Fülöp ⁷ , Monika Vastag ⁸, Ágnes Kittel ⁹, Norbert Imre ⁷,
Tamás A. Martinek ⁷, Csaba Pál ⁶, Piroska Szabó-Révész ¹⁰ and Mária A. Deli ^{1,*}

¹ Institute of Biophysics, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, H-6726 Szeged, Hungary; bocsik.alexandra@brc.mta.hu (A.B.); ilona.grof@brc.mta.hu (I.G.); kiss.lorand@med.u-szeged.hu (L.K.)

² Doctoral School in Biology, Faculty of Science and Informatics, University of Szeged, H-6726 Szeged, Hungary; daruka.lejla@brc.mta.hu

³ Department of Pathophysiology, University of Szeged, H-6701 Szeged, Hungary

⁴ Institute of Biochemistry, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, H-6726 Szeged, Hungary; otvos.ferenc@brc.mta.hu

⁵ Plant Biology, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, H-6726 Szeged, Hungary; zsiros.otto@brc.mta.hu

⁶ Synthetic and Systems Biology Unit, Institute of Biochemistry, Biological Research Centre, Hungarian Academy of Sciences, H-6726 Szeged, Hungary; pal.csaba@brc.mta.hu

⁷ Department of Medical Chemistry, University of Szeged, H-6720 Szeged, Hungary; fulop.livia@med.u-szeged.hu (L.F.); imre.norbert@med.u-szeged.hu (N.I.); martinek.tamas@med.u-szeged.hu (T.A.M.)

⁸ Division of Pharmacology and Drug Safety Research, Gedeon Richter Plc., H-1103 Budapest, Hungary; m.vastag@richter.hu

⁹ Institute of Experimental Medicine, Hungarian Academy of Sciences, H-1450 Budapest, Hungary; kittel@koki.hu

¹⁰ Department of Pharmaceutical Technology, University of Szeged, H-6720 Szeged, Hungary; revesz@pharm.u-szeged.hu

* Correspondence: deli.maria@brc.mta.hu; Tel.: +36-62-599602

Received: 10 December 2018; Accepted: 5 February 2019; Published: 10 February 2019



Abstract: The absorption of drugs is limited by the epithelial barriers of the gastrointestinal tract. One of the strategies to improve drug delivery is the modulation of barrier function by the targeted opening of epithelial tight junctions. In our previous study the 18-mer amphiphilic PN159 peptide was found to be an effective tight junction modulator on intestinal epithelial and blood–brain barrier models. PN159, also known as KLAL or MAP, was described to interact with biological membranes as a cell-penetrating peptide. In the present work we demonstrated that the PN159 peptide as a penetration enhancer has a dual action on intestinal epithelial cells. The peptide safely and reversibly enhanced the permeability of Caco-2 monolayers by opening the intercellular junctions. The penetration of dextran molecules with different size and four efflux pump substrate drugs was increased several folds. We identified claudin-4 and -7 junctional proteins by docking studies as potential binding partners and targets of PN159 in the opening of the paracellular pathway. In addition to the tight junction modulator action, the peptide showed cell membrane permeabilizing and antimicrobial effects. This dual action is not general for cell-penetrating peptides (CPPs), since the other three CPPs tested did not show barrier opening effects.

Keywords: absorption enhancer; antimicrobial peptide; Caco-2; claudin; cell-penetrating peptide (CPP); drug delivery; intestinal epithelial cells; KLAL; PN159; tight junction modulator

1. Introduction

The oral administration of medicines is the most common method in drug therapy because of its easy administration and good patient compliance. However, the absorption of several drugs is limited in the gastrointestinal tract by the barriers composed of epithelial cell layers [1]. Since the non-invasive delivery of orally administered hydrophilic drugs or biopharmaceuticals to the systemic circulation is still a challenge, several strategies and molecules have been investigated as penetration enhancers, including biosurfactants, sucrose esters and peptides [1–3].

Tight junctions (TJs) between epithelial cells form the anatomical basis of the intestinal barrier which is one of the main biological barriers in our organism and the body's largest interface with the external environment [1]. These TJs, located in the apical regions of cells, close the intercellular gap and thus determine the paracellular permeability and the tightness of the epithelial barriers [1, 4]. The absorption level and rate across biological barriers depends on the composition of cellular membranes, the anatomical structures, and the expression pattern of TJ proteins and transporters in the cell membrane [5]. TJs are complex structures composed of integral membrane proteins including among others the occludin protein and the claudin family [6].

One of the basic strategies to improve drug delivery is the modulation of barrier function by the targeted opening of TJs [1]. Peptides which act directly on TJs and modulate their permeability are potential candidates to increase the absorption of hydrophilic or large therapeutic molecules in a non-invasive manner [1,7]. In our recent work six TJ modulator peptides acting on different targets were compared using culture models of the intestinal and the blood-brain barriers [8]. All the six peptides induced reversible opening of TJs but barrier selectivity and differences in efficacy were observed. We found the PN159 as the most effective TJ modulator peptide on both barrier models [8]. This peptide was identified as a TJ modulator on cultured human bronchial epithelial cell layers in 2005 [4]. PN159 peptide effectively increased the permeability of respiratory epithelium both in culture and animal experiments [9]. The specific target proteins of the peptide were unknown, but we demonstrated that PN159 interacts with the extracellular loops of integral membrane TJ proteins claudin-1 and -5 [8].

The amino acid sequence of the 18-mer PN159, KLALKLALKALKAALKLA-amide, contains several KLA motifs, and therefore it is also named as KLA or KLAL peptide [10]. The other name of this peptide is MAP, which stands for model amphipathic peptide [11,12]. The structure of the lipid vesicle-bound PN159 peptide is mostly α -helical [10] and strongly interacts with biological membranes [10,13]. Cell-penetrating peptides (CPPs) are a group of short natural or synthetic peptides with 5–30 amino acids, which by crossing cellular membranes can transport into cells a wide range of small and macromolecules, including nucleic acids, proteins, imaging agents [14]. Based on their physical-chemical properties, CPPs can be classified into groups. The most investigated CPPs belong to the amphipathic class. These peptides contain hydrophilic and hydrophobic motifs and are especially rich in lysine, arginine, leucine and alanine. Examples include the PN159 peptide [10,11]; the cyclic φ -peptide [15] and Pep-1 [16]. Among the cationic CPPs penetratin [17] or polyarginine peptides [18] are extensively investigated.

CPPs are structurally similar to antimicrobial peptides, which are important defense elements of the innate immunity, and accordingly, they show an antimicrobial effect against pathogens [19]. Bacterial resistance is a growing clinical problem, as it was highlighted by the Infectious Diseases Society of America publishing the list of ESKAPE pathogens (*Enterobacter species*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterococcus faecium*) [20]. This group of microbes causes the large majority of nosocomial infections throughout the world.

The combat antibiotic resistance, CPPs can be promising alternative molecules, since increased sensitivity (collateral sensitivity) for antimicrobial peptides were found in antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains [21].

As a culture model of the intestinal epithelial barrier, we used in our study the Caco-2 human cell line resembling the epithelium of the small intestine both from structural and functional aspects [22]. The cells have polarized cell morphology, grow in monolayer, possess microvilli, form TJs, express nutrient and efflux transporters, and show good correlation with in vivo data [23,24]. Caco-2 epithelial cells are routinely used in drug permeability studies [24,25].

Crucial parameters for absorption enhancers include their safety, reversibility and efficacy. There are no data available about the effectiveness and safety of PN159 peptide on the intestinal barrier, so our primary goal was to test the TJ modulator peptide for these aspects. Therefore, the aim of the study was to (i) determine the influence of long-time and concentration-dependent effects of treatments with PN159 peptide on intestinal epithelial cell viability, barrier function and recovery; (ii) test the effect of PN159 peptide on drug penetration across the intestinal barrier model; (iii) identify further potential targets of this TJ modulator peptide by molecular modelling; (iv) measure the cell uptake of the PN159 in intestinal epithelial cells and its antimicrobial activity on ESKAPE pathogens; and (iv) test other CPPs for the TJ modulator effect.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

All reagents were purchased from Sigma-Aldrich Ltd. (Budapest, Hungary) except for those specifically mentioned.

2.2. Peptide Synthesis

PN159 peptide (KLALKLALKALKAALKLA-amide) [4,10], and Pep-1 (Chariot) peptide (KETWWETWTEWSQPKKKRKV-amide) were synthesized manually on a 0.5 mmolar scale with the use of standard Fmoc-chemistry on a Rink-amide resin. Couplings were performed in DMF with three-fold excess of DCC, HOBt, and Fmoc-amino acids for 3 h at ambient temperature. In the case of octaarginine (RRRRRRRR-amide, R8) three-fold excess of HATU and six-fold excess of DIPEA was used. Fmoc deprotection was performed in 20% piperidine/DMF mixture for 20 min. The peptides were cleaved from the resin by incubating them with the mixture of TFA/water/triisopropylsilane (48:1:1 volume ratio), precipitated with diethyl-ether and lyophilized. Crude peptides were purified using a Shimadzu semi-preparative high-performance liquid chromatography (HPLC) instrument equipped with a Phenomenex JupiterC18 column, in the following solvent system: (A) 0.1% aqueous TFA and (B) 0.1% TFA in 80% aqueous acetonitrile, in a linear gradient mode. Analysis and purity control were carried out on an analytical HPLC instrument (HP Model 1100 liquid chromatograph equipped with a Phenomenex Jupiter C18 column). Quality control of the peptides was done by performing mass spectrometric measurements on a FinniganTSQ-7000 triple quadrupole mass spectrometer in positive ion mode.

The cyclic ϕ -peptide (cyclo[CGGFWRRRRGE(ϵ Aca)G]) was also synthesized manually on a 0.5 mmolar scale with the use of Boc-chemistry on a MBHA-HCl resin, by applying a native chemical ligation strategy. Couplings were performed in DMF with three-fold excess of DIC, HOBt, and Boc-amino acids for 3 h at ambient temperature. Boc deprotection was performed in TFA/DCM (1:1 volume ratio) mixture for 20 min. The peptide was cleaved from the resin by the standard HF method. Native chemical ligation was performed with 2% thiophenol in an ammoniumacetate solution (0.1 M) at room temperature for 12h. Cyclic crude peptide was purified and analyzed as described above.

2.3. Cell Culture

The human Caco-2 intestinal epithelial cell line was purchased from ATCC (cat.no. HTB-37). Caco-2 cells were grown in DMEM/HAM's F-12 culture medium with stable glutamine (Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, USA) and 50 µg/mL gentamycin in a humidified incubator with 5% CO₂ at 37 °C. All plastic surfaces were coated with 0.05% rat tail collagen in sterile distilled water before cell seeding.

2.4. Peptide Treatment

The PN159 peptide stock solution (5 mM) was prepared freshly in sterile DMSO. Treatment solutions were further diluted in Ringer-Hepes (150 mM NaCl, 6 mM NaHCO₃, 5.2 mM KCl, 2.2 mM CaCl₂, 0.2 mM MgCl₂, 2.8 mM D-glucose, 5 mM Hepes; pH 7.4) or cell culture medium. Final concentrations of the peptide in treatment solutions were as follows: 1, 3, 10, 30 and 100 µM for cell viability assays; 1, 3, 10 and 30 µM for the barrier integrity assays and 10 µM for the recovery measurements.

The stock solutions of the three reference CPPs were the following: Pep-1: 1 mM in distilled water (DW); R8: 1 mM in DW; φ -peptide, 5 mM in DW and 2.5% DMSO. The 100 µM working solutions were dissolved in cell culture medium or Ringer-Hepes buffer. We prepared all solutions freshly in sterile conditions.

2.5. MTT Assay

For the cell viability assays Caco-2 epithelial cells were seeded to 96-well plates at the density of 6×10^3 cells/well (Orange Scientific) and cultured for 3–5 days. Confluent cultures were treated with PN159 peptide (1, 3, 10, 30 and 100 µM) in phenol red free DMEM (Life Technologies, Gibco, Carlsbad, CA, USA) for 1-h. This viability assay was performed at three different time points: (i) immediately after the 1-h treatment, (ii) at one-day recovery, (iii) at one-week recovery. To determine 100% toxicity, cells were incubated with 1 mg/mL Triton X-100 detergent. After treatment the medium was changed and 0.5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution was added to the cells for 3 h. During the incubation cells were kept in a CO₂ incubator. The metabolic activity of cells is reflected by the conversion of the yellow MTT dye to purple formazan. Formazan crystals were dissolved in DMSO and the amount of converted dye was determined by measuring absorbance at 595 nm wavelength with a microplate reader (Fluostar Optima, BMG Labtechnologies, Ortenberg, Germany). Cell viability and/or metabolic activity was calculated as percentage of dye conversion by non-treated cells.

2.6. Impedance Measurement

Kinetics of epithelial cell reaction to PN159 peptide treatment was monitored by impedance measurement at 10 kHz (RTCA-SP instrument, ACEA Biosciences, San Diego, CA, USA). Impedance measurement is non-invasive, label-free and real time, and linearly correlates with adherence, growth, number and viability of cells [2,26]. For background measurements 50 µL cell culture medium was added to the wells, then cells were seeded at a density of 6×10^3 cells/well to the coated 96-well plates with integrated gold electrodes (E-plate 96, ACEA Biosciences). Cells were cultured for 5–7 days in a CO₂ incubator at 37 °C and monitored every 10 min until the end of experiments. Cells were treated with PN159 peptide solutions at 1, 3, 10, 30 and 100 µM concentrations at the beginning of the plateau phase of growth and the effects were followed for 1-h or 24 h. To measure cell recovery, peptide solutions were changed to culture medium and the impedance was monitored for one week. Culture medium was changed every 2 days. Caco-2 cells were also treated with the three selected CPPs, Pep-1, R8 and φ -peptide, at 100 µM concentrations at the beginning of the plateau phase of cell growth for 24-h. Triton X-100 detergent (1 mg/mL) was used as a reference compound to induce cell death.

Cell index was defined as $R_n - R_b$ at each time point of measurement, where R_n is the cell-electrode impedance of the well when it contains cells and R_b is the background impedance of the well with the medium alone.

2.7. Measurement of the Electrical Resistance of Caco-2 Cell Layers

For the measurement of barrier integrity Caco-2 cells were seeded onto culture inserts (Transwell 3460, polyester membrane, 0.4 μm pore size, Corning Costar) and cultured for three weeks [2,24]. Transepithelial electrical resistance (TEER) reflects the tightness of the intercellular junctions. TEER was measured by an EVOM volt-ohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA) combined with STX-2 electrodes, and was expressed relative to the surface area of the monolayers ($\Omega \times \text{cm}^2$). Resistance of cell-free inserts ($130 \Omega \times \text{cm}^2$) was subtracted from the measured values. TEER values were measured before and right after permeability experiments). TEER values indicated the integrity and paracellular permeability of cell layers for ions. The TEER of Caco-2 monolayers was $1302 \pm 49 \Omega \times \text{cm}^2$ (mean $\pm$ SD; $n = 46$) after 3 weeks culturing. For the recovery experiment, after changing the 10 μM peptide solutions to culture medium, TEER was monitored for one day.

2.8. Penetration of Marker and Drug Molecules across Caco-2 Cell Layers

In the permeability experiments inserts with Caco-2 cell layers grown for 3 weeks were transferred to 12-well plates containing 1.5 mL Ringer–Hepes buffer in the lower (basal or acceptor) compartments. In the upper or apical compartments culture medium was replaced by 0.5 mL buffer containing peptide solutions: PN159 peptide at 1, 3, 10 and 30 μM concentrations and CPPs at 100 μM concentration. Permeability marker molecules albumin (1 mg/mL; Mw: 65 kDa) labeled with Evans blue (167.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and fluorescein (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Mw: 376 Da) were added 30 min later. The incubation with permeability markers in the presence of PN159 peptide lasted for 30 min. In case of CPPs the incubation time with fluorescein was 1-h. Samples were collected from both compartments and the concentrations of the marker molecules were determined by a fluorescence multi-well plate reader (Fluostar Optima; excitation wavelength: 485 nm, emission wavelength: 535 nm in the case of fluorescein and excitation wavelength: 584 nm, emission wavelength: 680 nm in the case of Evans-blue labeled albumin). Fluorescein isothiocyanate (FITC)-labelled dextran marker molecules (Table 1) were used at 1 mM concentrations, and fluorescence intensities of collected samples were measured using a Fluorolog FL3-22 (Horiba Jobin Yvon, Paris, France) spectrofluorometer using 492 nm excitation wavelength, 515 nm emission wavelength, and 0.5 s integration time. Drugs were used at 10 μM concentrations and samples were measured by HPLC as described below. The apparent permeability coefficients (P_{app}) were calculated as described previously [8,24]. Briefly, cleared volume was calculated from the concentration difference of the tracer in the basal compartments ($\Delta[C]_B$) after 30 min and apical compartments at 0 h ($[C]_A$), the volume of the basal compartment (V_B ; 1.5 mL) and the surface area available for permeability (A ; 1.1 cm^2).

Table 1. The amino acid sequences of the tested cell-penetrating peptides.

CPPs	Amino Acid Sequence	References
PN159 (KLAL/MAP)	KLALKLALKALKALKLA-amide	[4,10]
Pep-1	KETWWETWWTEWSQPKKKRKV-amide	[16]
R8	RRRRRRRRR-amide	[18]
ϕ -peptide	cyclo[CGGFWRRRRGE(ϵ Aca)G]	[15]

2.9. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) Analytical Procedures

Analytical measurements were performed on a Merck-Hitachi LaChrom HPLC system equipped with an ultraviolet (UV) and fluorescence detector (Merck, Darmstadt, Germany). All reagents used were of analytical reagent grade. Atenolol and verapamil were determined by using a Gemini C18 column (150 $\times$ 3 mm, 5 μm , 110 $\text{\AA}$; Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA) operated at 0.5 mL/min

flow rate, maintained at 35°C. For atenolol measurements isocratic elution was applied with a mixture of 300 mL methanol, 400 mL 100 mM ammonium acetate, 20 mL 10% ammonium-hydroxide and 2 mL 0.1 M ethylenediaminetetraacetic acid. The mobile phase for verapamil consisted of 350 mL methanol with 250 mL 20 mM ammonium acetate and 2 mL 10% trifluoroacetic acid with isocratic elution, at 0.5 mL/min flow rate. UV detection for atenolol was performed at 270 nm while for verapamil the 230 nm wavelength was adjusted. The calibration curve was linear ($r^2 = 0.9999$) over a range of 0.01–1.5 μM for atenolol. The calibration curve for verapamil also showed a good linearity within the examined concentration range of 0.01–1 μM ($r^2 = 0.9952$). In both cases 10 μL sample was injected into the chromatographic system. Samples at higher than 1 μM atenolol and verapamil concentrations were 10 $\times$ diluted with Ringer–Hepes solution.

HPLC measurement of quinidine was performed using a YMC Pack Pro C18 column (RS 150 $\times$ 2.1 mm, 5 μm , 80 Å; YMC America Inc., Allentown, PA, USA) equipped with a guard column operated at 0.2 mL/min flow rate. The chromatographic column was maintained at 40 °C and the 5 μL sample was injected onto the column. The elution of quinidine was performed with a buffer containing a mixture of 100 mL methanol, 250 mL 0.1% ammonium acetate, and 4 mL 10% trifluoroacetic acid. Quinidine was quantified at 250/430 nm excitation/emission wavelengths. The calibration curve was linear over the quantitation range of 0.01–1 μM ($r^2 = 0.9984$).

HPLC measurement of cimetidine was performed using a Gemini NX column (150 $\times$ 4.6 mm, 3 μm) equipped with a guard column operated at 0.8 mL/min flow rate. The column temperature was maintained at 40 °C and a 20 μL sample was injected onto the chromatographic system. A buffer comprising of 15% acetonitrile and 85% 100 mM ammonium acetate was utilized for the isocratic elution of cimetidine. UV detection was set at 228 nm. The calibration curve was linear ($r^2 = 0.9999$) over the range of 0.01–10 μM .

2.10. Electron Microscopy

Cells grown on culture inserts were treated with 10 μM PN159 peptide for 30 min and fixed immediately after treatment or after a 1-day recovery. Cells were briefly washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with 3% paraformaldehyde containing 0.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer (pH 7.4) for 30 min at 4 °C. After washing with the buffer several times, cells were postfixed in 1% OsO_4 for 20 min. Following a rinse with distilled water, the cells were block stained with 1% uranyl acetate in 50% ethanol for 20 min, dehydrated in graded ethanol and after the last step of dehydration inserts were placed in the 1:1 mixture of ethanol and Taab 812 (Taab; Aldermaston, Berks, UK) for 10 min at 30°C. Finally, the membranes of the culture inserts with the cells were removed from their support and embedded in Taab 812. Polymerization was performed overnight at 60°C. Ultrathin sections were cut perpendicularly for the membrane using a Leica EM UC6 ultramicrotome (Nussloch, Germany) and picked up on formvar-coated single-slot copper grids. The sections were examined using a Hitachi 7100 transmission electron microscope (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) and a side-mounted Veleta CCD camera (Olympus Soft Imaging Solutions). Altogether, 105 non-overlapping images from the 3 groups at the same magnification were analyzed for the presence or absence of tight junctions (control group $n = 28$; PN159 group $n = 42$; recovery group $n = 35$).

2.11. Immunohistochemistry

Morphological changes in interepithelial junctions after treatment with different concentrations of CPPs (100 μM) and PN159 peptide (1, 3, 10, 30 and 100 μM) were followed by immunostaining for claudin-1 integral membrane tight junction protein, β -catenin and zonula occludens protein-1 (ZO-1) cytoplasmic linker proteins. F-actin was stained by fluorescently labeled phalloidin. Treatments lasted for 1 h. After peptide treatment cell layers were washed with PBS and fixed with a 1:1 mixture of ice cold acetone and methanol for 2 min. Cells were blocked with 3% bovine serum albumin in PBS and incubated with primary antibodies mouse anti-claudin-1 and -4, rabbit anti-ZO-1 and rabbit anti- β -catenin (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) overnight. Fluorescent Atto 647N-phalloidin

(ATTO-TEC GmbH, Germany) lasted for 1 h. Incubation with Alexa Fluor-488-labeled anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies (Life Technologies, Invitrogen, USA) lasted for 1 h. Bis-benzimide dye (Hoechst 33342) was used to stain cell nuclei. After mounting (Fluoromount-G; Southern Biotech, Birmingham, AL, USA) the samples staining was visualized by a Leica TCS SP5 confocal laser scanning microscope (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and Visitron spinning disk confocal system (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany).

2.12. Circular Dichroism (CD) Spectroscopy

Far-UV circular dichroism (CD) spectra of the peptides were recorded at 25 °C temperature on a J-810 spectropolarimeter (JASCO International Co. Ltd., Tokyo, Japan). The CD spectra were measured between 260 nm and 185 nm with an optical pathlength of 1 mm, at a peptide concentration of 0.1 mg/mL in Milli-Q water diluted directly from powder. The bandwidth was 2 nm and data pitch 0.5 nm, the scan speed was set to 100 nm/min and the integration time was 1 sec. Ten spectra were accumulated and plotted. The data were analyzed by CDSSTR method [27]. To test the thermostability of the peptide structure the CD spectra were recorded between 25 °C and 55 °C temperature with a ramp rate of 5 °C/min on a JASCO J-810 spectropolarimeter by using a Peltier sample holder. The CD spectra were measured immediately between 260 and 185 nm with an optical pathlength of 1 mm, the peptide concentration was 0.1 mg/mL in Milli-Q water. The bandwidth was 2 nm and data pitch 1 nm, the scan speed was set to 100 nm/min, and the integration time was 1 sec. Five spectra were accumulated and plotted.

2.13. Molecular Modelling

Protein structures were obtained by homology modeling using the MODELLER program package [28]. First, the structure of mouse claudin-15 was completed by homology modelling because its X-ray structure file is lacking the fragment of residues from 34 to 41 [29]. Human claudins 1, 4 and 7 were homology modeled using the completed mouse claudin-15 as a template. The protein homology models were further relaxed by a short (400 ns) molecular dynamics simulation in which the proteins were embedded in a 95 by 95 Å POPC bilayer-water system containing 150 mM NaCl. Molecular dynamics simulations were performed by the program NAMD [30], using the CHARMM27 molecular force field with CMAP correction. The results were visualized by VMD v1.9.1. [31]. The docking studies were performed by the CABS docking server [32] and the resulting C-alpha traces were reconstructed by MODELLER using the python script supplied by the server homepage.

2.14. Visualization of the Uptake of PN159 Peptide in Caco-2 Cells

The Caco-2 cells were grown on glass bottomed petri dishes coated with collagen to visualize the cellular uptake of the Bodipy FL maleimide labeled (BODIPY FL N-(2-aminoethyl) maleimide, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA) PN159 peptide. The cells were treated with peptide at concentrations of 1, 3 and 10 µM for 5 min. To stain the cell nuclei the H33342 dye (1 µg/mL) was used before peptide treatment for 10 min. After peptide incubation the living cells were washed three times with Ringer–Hepes buffer supplemented with 1% fetal bovine serum (FBS) and examined immediately with a Visitron spinning disk confocal system.

In the case of the co-localization analysis the labeled PN159 peptide was used in 10 µM for 5 min. Then the cellular uptake cells were fixed and immunohistochemistry was performed for claudin-4. The samples were mounted and visualized by a Leica TCS SP5 confocal laser-scanning microscope.

2.15. Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) on Microbial Pathogens

We tested the spectrum of activity of PN159 on a set of five sensitive ESKAPE pathogens: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Acinetobacter baumannii* (ATCC 17978), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* spp. *cloacae* (ATCC 13047); and one vancomycin resistant ESKAPE pathogen, *Enterococcus faecium* (ATCC 700221). The MIC of PN159 on the

6 sensitive and resistant ESKAPE pathogenic strains was determined in cation-adjusted Muller–Hinton broth. For *Enterococcus faecium*, which does not grow in Muller–Hinton broth, Brain–Heart–Infusion broth was used. Minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by using a standard serial broth dilution technique [33]. Briefly, 11-step serial dilutions were prepared in 96-well microtiter plates with three biological replicates per strain. Pathogens were inoculated into each well at a density of 5×10^5 bacteria/mL, and the plates were incubated at 37 °C. Plates were shaken at 300 rpm during incubation for 18 h. Cell growth was monitored by measuring the optical density (OD600 value, Synergy 2 microplate reader BioTek Instruments Inc, Winooski, VT, USA). MIC was defined as complete growth inhibition (i.e., $OD_{600} < 0.05$). As reference compounds we tested the antimicrobial activity of three bactericidal drugs with different modes of action. Cefoxitin inhibits the cell wall synthesis, gentamicin (Applichem GmbH, Darmstadt, Germany) is a 30S ribosomal subunit inhibitor, while ciprofloxacin is a gyrase inhibitor. The highest tested concentrations were 100 µg/mL in the case of cefoxitin and gentamicin, and 10 µg/mL for ciprofloxacin.

2.16. Statistical Analysis

For statistical analysis Graph Pad Prism 5.0 software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used. All data presented are means $\pm$ SD. Values were compared using analysis of variance followed by Dunnett's test. Changes were considered statistically significant at $p < 0.05$. All measurements were repeated three times and the number of parallel samples was minimum three.

3. Results

3.1. Concentration-Dependent Effect of PN159 Peptide on Epithelial Cell Viability

The colorimetric endpoint MTT test was performed after a 1-h treatment with different PN159 peptide concentrations at three different time points: (i) immediately after the 1-h treatment, (ii) at one-day recovery and (iii) at one-week recovery (Figure 1A). Low concentrations of the peptide (1–10 µM) did not decrease cell viability, while cell damage was found at higher, 30 and 100 µM concentrations. The cytotoxic effect of PN159 at 100 µM concentration was not reversible after one day or even one week. The kinetics of PN159 effects on Caco-2 cells were followed by real-time impedance measurements after 1-h (Figure 1B) or one-day treatment (Figure 1C). In both conditions only the two highest peptide concentrations decreased the cell impedance indicating cell damage, similarly to the results of the MTT assay.

Based on both tests, PN159 peptide treatment for 1-h was non-toxic at 10 µM or lower concentrations, reversible at 30 µM and toxic at the highest 100 µM concentration. The results obtained by MTT test and impedance measurement on Caco-2 cells were similar (Figure 1) and indicated that all the used concentrations of PN159 peptide were safe, except the 100 µM. Because of its toxicity, the 100 µM concentration was not used in further experiments.

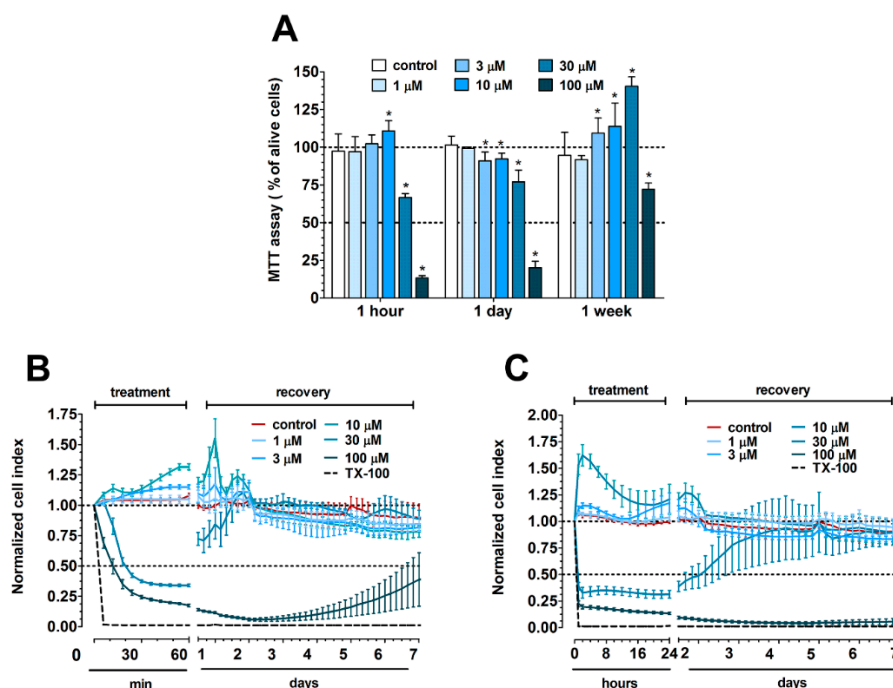


Figure 1. (A) MTT assay after 1-h treatment with PN159 peptide on Caco-2 cells followed by 1-h, 1-day or 1-week recovery. The MTT values are given as percent of the control group (100% viability). Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 3-8$. Statistical analysis: analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett test, $p < 0.05$ as compared with the control groups. (B) Impedance measurements after 1-h treatment and (C) 1-day treatment followed by a recovery phase of 1-week. The effects of PN159 peptide on the impedance were shown as normalized cell index. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 3-8$.

3.2. Concentration-Dependent Effect of PN159 Peptide on Intestinal Epithelial Barrier Integrity

All tested concentrations of the PN159 peptide significantly decreased the resistance of epithelial cell layers after a 1-h treatment (Figure 2A). The two highest concentrations, 10 and 30 μ M, opened the paracellular barrier the most, causing 80–90% decrease in TEER. In concordance, these two highest concentrations of PN159 showed the most effective permeability enhancer activity for both fluorescein and albumin (Figure 2B). Because the peptide was safe for the cells but effectively opened the barrier at 10 μ M, this concentration was selected to reveal the kinetics of the reversibility of barrier opening, and to investigate its effects on drug penetration.

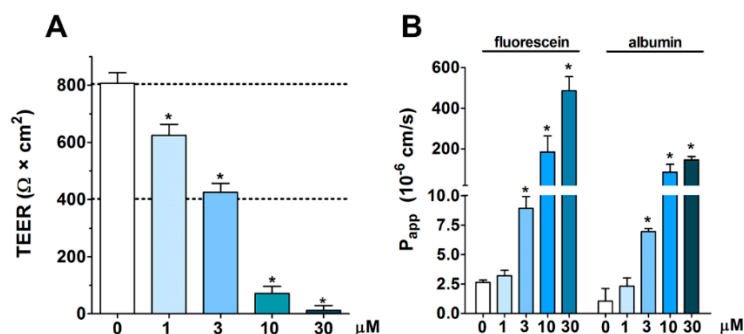


Figure 2. Effect of 1-h PN159 treatment on barrier integrity of Caco-2 cell layers. (A) Transepithelial electrical resistance (TEER). (B) Permeability for fluorescein and albumin marker molecules (P_{app} A-B 10^{-6} cm/s). Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 3-8$. Statistical analysis: ANOVA followed by Dunnett's test, $p < 0.05$ as compared with the control groups.

3.3. Reversible Effect of PN159 Peptide on the Opening of the Paracellular Cleft

The effect of PN159 peptide was very rapid, the electrical resistance dropped already to 42% of the control value after 1-min treatment (Figure 3A). The decrease of TEER continued until the end of the 30-min treatment (5 min: 16%, 15 min: 2.7%, 30 min: 1.4% of the control value). After the removal of the peptide the barrier function of Caco-2 cells was restored about 44% of the control value at six hours and a complete recovery could be observed at the 20 h timepoint. Intact TJs providing the morphological basis of barrier functions were visualized between Caco-2 epithelial cells in the control group by transmission electron microscopy, but no junctions were observed following treatment with PN159 peptide (Figure 3B). The disappearance of intercellular TJs was reversible, because after 1-day recovery the ultrastructure of epithelial junctions became similar to control cells. No open TJs were observed in the control or recovery groups by checking the electron micrographs (28–42 images/groups).

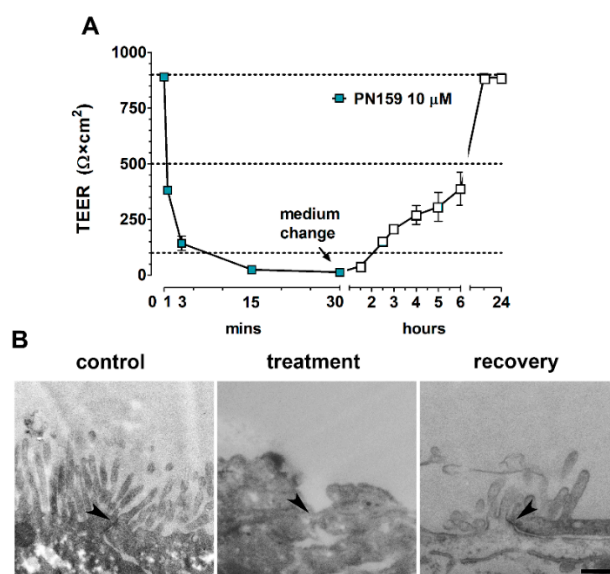


Figure 3. Reversible effect of PN159 peptide (10 μM , 30-min treatment, 24-h recovery) on Caco-2 cells. (A) Kinetic analysis of transepithelial electrical resistance (TEER) after PN159 peptide treatment. (B) Transmission electron micrographs of cell–cell connections (arrowheads); bar = 400 nm.

3.4. Effects of PN159 Peptide on the Penetration of Dextran Marker Molecules and Drugs

All these previous functional and morphological results pointed to the TJ opening effect of PN159 in Caco-2 cells which potentially can be exploited to increase drug penetration across the intestinal barrier. The permeability of Caco-2 monolayers was measured in the apical to basal (intestine to blood) direction for four water-soluble dextran marker molecules of different sizes (4–40 kDa) and four drugs, the hydrophilic atenolol and cimetidine, and the lipophilic quinidine and verapamil (Table 2). All four drugs are substrates of active efflux transporters [24]. The apparent permeability coefficients of the large fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FD) macromolecules were very low in control conditions but they were elevated by 159–400 fold following PN159 treatment. The highest increase was measured in the case of FD-40, the largest macromolecule. In control conditions the permeability of atenolol and cimetidine was the lowest from the tested molecules, while the highest penetration was measured for quinidine and verapamil on Caco-2 cells. PN159 treatment caused more than 30-fold change for atenolol and cimetidine which penetrate slowly across the cells layers. The peptide increased about 2 fold the permeability of the intestinal culture model for the lipophilic quinidine and verapamil, which already showed a good penetration.

Table 2. Apparent permeability coefficients of dextran marker molecules and drugs in the apical-basal direction (P_{app} A-B, 10^{-6} cm/s) in control and PN159 treated cultures. The differences between control and treated groups were expressed in fold changes. FD, fluorescein isothiocyanate-labeled dextran.

Markers and Drug	Control	PN159	Fold Change
FD-4	0.021 ± 0.001	4.2 ± 0.1	200.0
FD-10	0.025 ± 0.010	4.8 ± 0.7	192.0
FD-20	0.022 ± 0.002	3.5 ± 1.0	159.0
FD-40	0.015 ± 0.003	6.0 ± 0.3	400.0
atenolol	1.2 ± 0.3	36.3 ± 1.9	30.0
cimetidine	0.9 ± 0.2	34.5 ± 4.5	38.3
quinidine	45.0 ± 13.3	72.6 ± 2.4	1.6
verapamil	46.2 ± 3.9	86.7 ± 18.8	1.9

3.5. The Effect of PN159 Peptide on the Staining of Junctional Proteins and F-Actin

The concentration-dependent effects of the peptide on epithelial barrier integrity in Caco-2 cells were confirmed by the immunostaining of junctional proteins claudin-1, ZO-1 and β -catenin, and the labeling of the actin cytoskeleton (F-actin) (Figure 4). The 1 μ M concentration of the peptide caused a slight effect on cell morphology. At higher than 3 μ M concentrations significant changes were observed both in the junctional protein pattern and in the actin cytoskeleton organization. Claudin-1 was the junctional protein most sensitive to the peptide treatment. PN159 at a concentration of 10 μ M caused a drastic change in actin cytoskeleton and epithelial junctional morphology, with a visible opening of intercellular junctions.

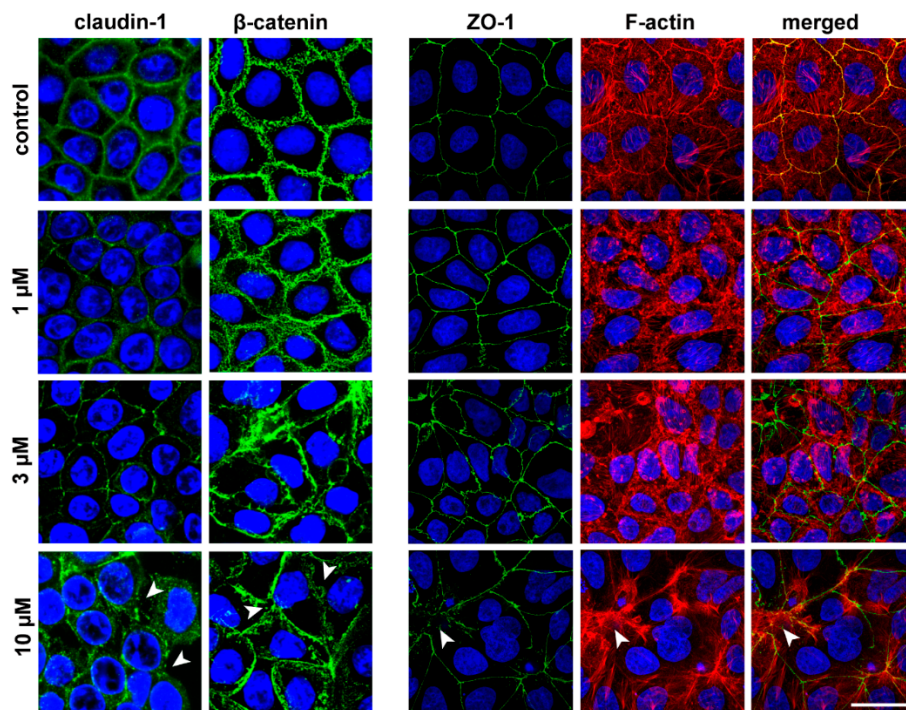


Figure 4. Effects of PN159 peptide on junctional morphology of Caco-2 cells. Immunostaining for claudin-1, β -catenin and zonula occludens-1 (ZO-1) junctional proteins and fluorescent staining for F-actin are shown in control conditions or after 1-hour peptide treatment. Green color: immunostaining for ZO-1, β -catenin and claudin-1. Blue color: staining of cell nuclei. Red color staining of F-actin. Bar = 20 μ m. Arrowheads indicate the opened junctions between the cells.

3.6. Molecular Modeling of Human Claudin Proteins and Docking of PN159 Peptide

According to the CD spectra obtained, the secondary structure of PN159 peptide contains 11% α -helix, 31% β -sheet, 24% turns and 34% unordered structure (Figure 5A). This secondary structure of PN159 peptide was stable between 25 and 55 °C (Figure 5B). In concordance with the result of CD spectra, similar secondary structure motifs were found by molecular modeling (Figure 5C).

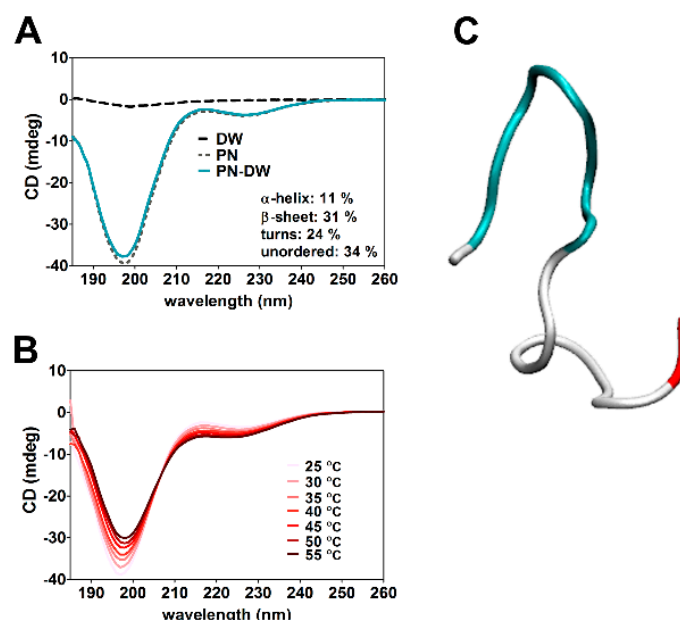


Figure 5. (A) Circular dichroism (CD) spectroscopy of PN159 peptide at 25 °C. (B) Thermostability measurement of the peptide structure. (C) Structure of PN159 by molecular modeling. Blue color: turn motifs; White color: coil-coil motifs; Red color: C-terminal region.

Claudin protein structures were obtained by homology modeling using the MODELLER program package (Figure 6A). Docking of PN159 peptide to full length homology modeled human claudin-1, -3, -4, and -7 monomers, highly expressed in Caco-2 cells [34] was performed on the CABS server (Figure 6B). Favorable docking poses located around extracellular loops ECL1 and ECL2 were sought by both energetic and geometric considerations and analyzed in all docking trajectories. Docking energies (“total energy”) were decomposed to “ligand energy”, “interaction energy” and “receptor energy” parts (Table 3). Correct docking poses were expected to have low values not only for the total energies, but as low as possible for all energy components simultaneously. Thus, the “ligand energy”, “interaction energy” and “total energy” values were investigated. Based on the modeling, energetically highly favorable interactions were found between PN159 and the ECLs of claudin-1, -4 and -7, but not for claudin-3 (Table 3). Docked poses of PN159 with ECLs of claudin-1, -4 and -7 are shown on Figure 6B.

Table 3. Docking energy components of PN159 to selected human claudin monomers. E_{tot} , total energy; E_{lig} , ligand energy; E_{int} , interaction energy.

Energy	Claudin-1	Claudin-3	Claudin-4	Claudin-7
E_{lig}	−34	−17	−61	−32
E_{int}	−63	−59	−79	−186
E_{tot}	−1228	−1163	−1229	−1798

The amino acid sequence of ECL1 and ECL2 of the three claudins which showed interaction with the TJ modulator peptide were compared and the most important amino acids which interact with PN159 were identified (Figure 6C). Four residues in ECL1, the polar Q44 and S/N/D53, the

hydrophobic V55 and L71, and in ECL2 the polar N/Q156 participate in major interactions with the peptide. Q44 and V55 residues of claudin-1 and -7 form a binding pocket for L11 of the peptide, and the same two residues of claudin-4 bind L6 and K9 (Figure 6C). The polar S/N/D53 and L71 of claudin-4 and -7 interact with K5, while the same amino acids of claudin-1 bind K12. The N/Q156 amino acid of ECL2 of all three claudins interacts with lysine: in the case of claudin-1 this is L17 of PN159, for claudin-4 L2, and for claudin-7 L6, L8, L15, L17. Based on the docking results, lysine, especially K1 and K5 and leucine L6 and L17 of PN159 interact with all three claudins examined (Figure 6D). After docking of the peptide disappearance of β -strands in ECLs of claudins was observed (Figure 6B), which seems to be correlated with the strength of interaction (Table 3). Comparing the docking energy values of PN159 to claudins the following rank order in the strength of interaction can be established: claudin-3 < claudin-1 < claudin-4 < claudin-7. The energy values from modeling are shown in Table 3.

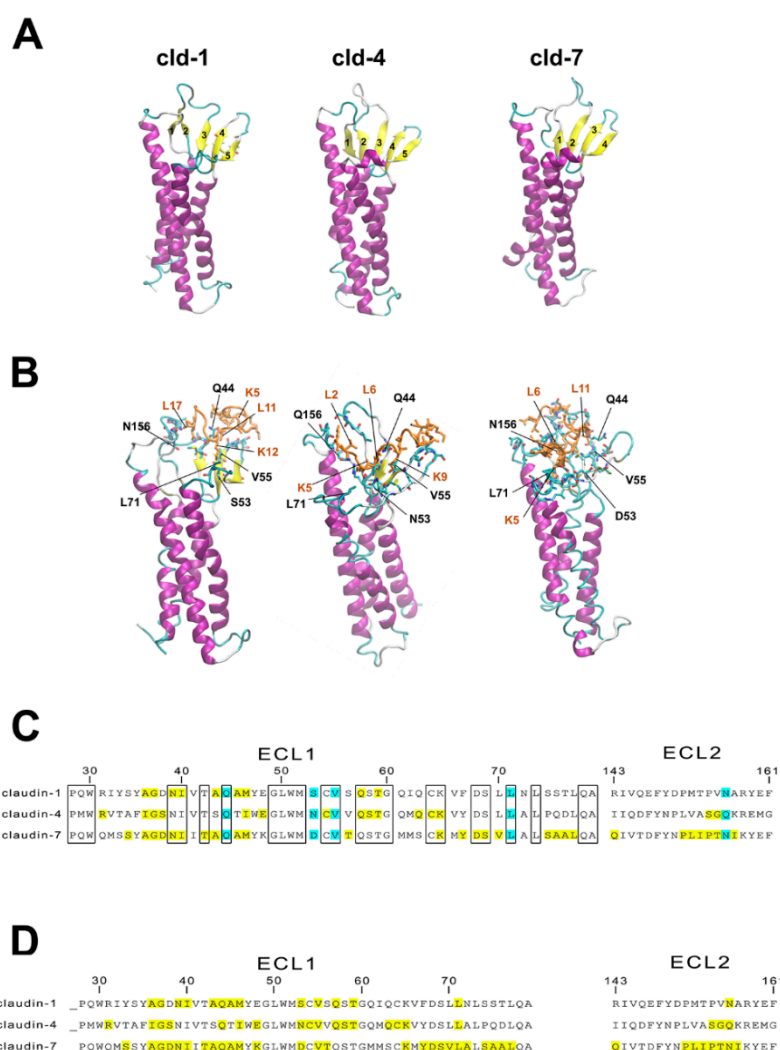


Figure 6. (A) Modeling human claudin-1, -4, -7 proteins. (B) Docking of PN159 peptide to claudin proteins. Interacting residues are shown as sticks. Orange color: PN159 peptide; Yellow color: β -strands; purple color: α -helices of claudins. (C) Amino acid sequence of ECL1 and ECL2 of human claudin monomers 1, 4 and 7. Conserved amino acids are indicated in the boxes. The amino acids which interact with PN159 according to docking studies are marked by yellow and light blue. Blue color indicates interaction between the amino acids of claudins and PN159 peptide at the same position in all three claudins. ECL: extracellular loop. (D) Interaction between PN159 peptide and human claudin monomers 1, 4 and 7. Amino acids of PN159 peptide which interact with the claudins according to docking.

3.7. Cell-Penetrating Effect and Uptake of PN159 Peptide in Epithelial Cells

Besides the junctional effects, changes in the cell membrane integrity were also examined by ethidium homodimer-1 (856.77 Da) staining of Caco-2 epithelial cells after 24-h treatments in the concentration range of 1 to 10 μ M. Only the highest PN159 concentration caused plasma membrane entry of the red fluorescent dye, which stained cell nuclei (Figure 7A).

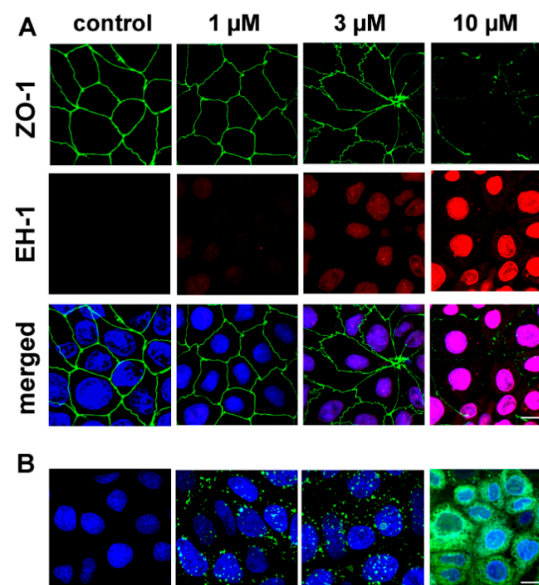


Figure 7. (A) Fluorescent staining of junctional protein zonula occludens-1 and double staining of cell nuclei in Caco-2 cells after 1-h treatment with PN159 peptide. Green color: immunostaining for ZO-1. Red color: staining by ethidium homodimer-1 (EH-1), indicating increased membrane permeability. Blue color: staining of all cell nuclei by H33342. Bar = 10 μ m. (B) Confocal microscopy images of living Caco-2 epithelial cells incubated with Bodipy FL labeled PN159 peptide in different concentrations for 5 min at 37°C. Green color: BodipyFL-PN159 peptide. Blue color: staining of cell nuclei. Bar = 10 μ m.

The uptake of the fluorescently labeled PN159 peptide, reflected by the green fluorescent signal, was visualized by confocal microscopy (Figure 7B). In Caco-2 cells treated with 1 and 3 μ M concentrations, the peptide was detectable in the cytoplasm as green dots. The cellular uptake of the peptide in cells incubated with 10 μ M concentration was more pronounced.

We confirmed the interaction of PN159 peptide with claudin-4 junctional protein by a co-localization analysis. The labeled peptide was visible in the cytoplasm and also in the cell membrane at the level of intercellular junctions immunolabeled for claudin-4 (Figure 8).

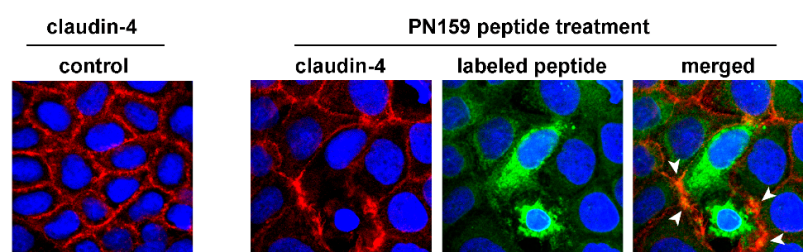


Figure 8. Caco-2 cells were treated with Bodipy FL labeled PN159 peptide (5 min), then fluorescent immunostaining of junctional protein claudin-4 and staining of cell nuclei were performed. Red color: immunostaining for claudin-4. Green color: Bodipy FL labeled PN159 peptide. Blue color: staining of cell nuclei by H33342. Bar = 10 μ m. Arrowheads indicate co-localization of claudin-4 and the labeled PN159 peptide.

3.8. Antimicrobial Effect of PN159

We tested the antimicrobial activity of PN159 peptide on six ESKAPE pathogens (Table 4) at a wide range of concentration (0.8 to 70 μ M). Among the tested bacteria *Acinetobacter baumannii* and *Enterococcus faecium* were the two most sensitive strains with MIC values below 5 μ M. The concentration of PN159 to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae* was around 10 μ M, which was in similar range where peptide effects were seen on human epithelial cells. The peptide was still effective on the vancomycin-resistant *Enterobacter cloacae* and on *Pseudomonas aeruginosa*, but at 10-times higher concentrations than in the case of the most sensitive pathogens.

As compared to the reference bactericidal antibiotic cefoxitin, PN159 was more effective in the case of *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. Gentamicin and ciprofloxacin showed strong antimicrobial activity for all ESKAPE pathogens, except *Enterococcus faecium*. This strain was resistant for all investigated antibiotics, however, PN159 efficiently inhibited its growth (Table 4).

Table 4. Antibacterial activity of PN159 peptide, cefoxitin, gentamicin and ciprofloxacin antibiotics on ESKAPE pathogens. ATCC numbers are added in brackets. MIC (μ M), minimal inhibitory concentration.

ESKAPE Pathogens (ATCC)	PN159	Cefoxitin	Gentamicin	Ciprofloxacin
<i>Acinetobacter baumannii</i> (17978)	3.6	222.6	0.6	0.94
<i>Enterococcus faecium</i> (700221)	4.4	>222.6	>143.9	>30.18
<i>Staphylococcus aureus</i> (29213)	9.2	6.9	1.1	1.89
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (10031)	13.8	3.5	0.6	0.06
<i>Enterobacter cloacae</i> (13047)	31.0	>222.6	1.1	0.06
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (27853)	46.4	>222.6	2.3	1.89

3.9. The Effect of Cell-Penetrating Peptides on Intestinal Barrier Integrity

The kinetics of the effects of three other CPPs on Caco-2 cells were followed by real-time impedance measurements (Figure 9A). The R8 and ϕ -peptides decreased the cell impedance during the 24-h monitoring which indicates a cell reaction. Changes in cell index without cytotoxic effects most probably are caused by an increase in plasma membrane ionic permeability. There was no major influence of CPPs on barrier integrity (Figure 9B,C) as compared to the effect of PN159. We observed a slightly decreased TEER in the case of R8 and ϕ -peptide and only the ϕ -peptide caused an elevated permeability for the fluorescein marker molecule. Based on these results the investigated CPPs have no significant opening effect on the intercellular junctions, which was also verified by immunostaining for junctional proteins (Figure 9D).

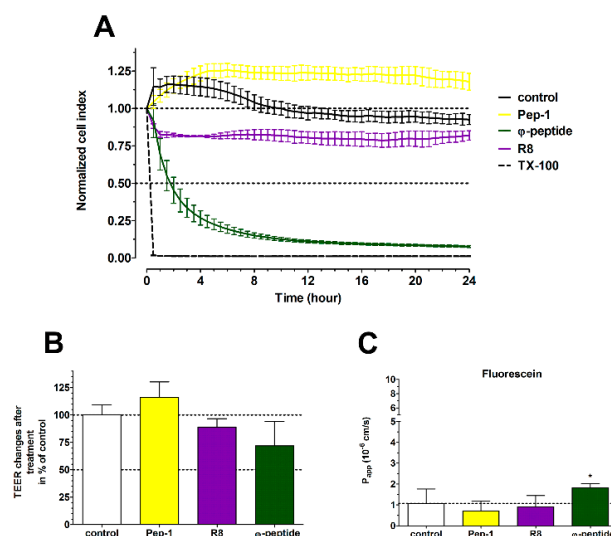


Figure 9. Cont.

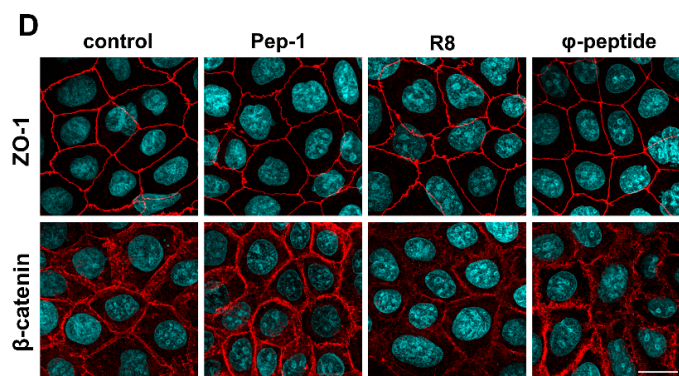


Figure 9. (A) Effects of different cell-penetrating peptides (CPPs; 100 μ M, 24 h) on Caco-2 cells followed by impedance measurements. The effects of peptides on the impedance were shown as normalized cell index. Values are presented as means $\pm$ SD, $n = 3$ –8. (B) Evaluation of barrier integrity on Caco-2 cell layers by measurement of transepithelial electrical resistance (TEER) after 1-h CPP treatment. (C) Caco-2 cell layer permeability for fluorescein marker molecule (P_{app} A-B 10^{-6} cm/s) after 1-h CPP treatment. (D) Effects of CPPs on junctional morphology of Caco-2 cells. Immunostaining for zonula occludens-1 (ZO-1) and β -catenin junctional proteins in control conditions and after 1-h peptide treatment. Red color: immunostaining for ZO-1 and β -catenin. Blue color: staining of cell nuclei. Bar = 20 μ m.

4. Discussion

We investigated for the first time the dual, TJ modulator and cell membrane actions of the PN159 peptide. PN159 was described as a TJ modulator and permeability-enhancing peptide on airway epithelial cell layers *in vitro* and *in vivo* [4], and in our previous comparative work we found it also very effective on culture models of the blood–brain and intestinal barriers [8]. The same peptide, known also as KLAL or MAP was extensively studied for its cell membrane action as a CPP [10–12,35]. However, the identity of the differently named molecule was not previously known for the researchers of the two fields. We demonstrated, that beside the cell-penetrating and antimicrobial effects, PN159 is a TJ modulator on intestinal epithelial cells and by molecular modeling new members of the claudin family were identified as its potential targets.

4.1. TJ Modulator Effect of PN159: Safety, Concentration Dependence and Reversibility

All the presented functional and morphological results point to the safe, concentration-dependent and reversible TJ opening effect of PN159 in Caco-2 cells. The effect of the peptide on epithelial cell viability was investigated for one and 24 h. We found that the peptide has no effect on cell metabolism measured by MTT test or on impedance kinetics and can be considered as safe up to 10 μ M. The changes seen after higher, 30 μ M concentration were fully reversible. The 100 μ M concentration of PN159 caused irreversible changes in both parameters on intestinal epithelial cells after either 1-h or one-day treatment. Using respiratory epithelial tissue (EpiAirway model) and MTT assay, PN159 was found to be safe at concentrations up to 100 μ M for a 1-h treatment [9]. The difference between the sensitivity of the epithelial models and also the sensitivity of the applied methods may explain the dissimilarity of these data.

We found a marked concentration-dependence of the TJ modulator effect. With the most sensitive method, TEER, we could determine that 1 μ M PN159 already opened the paracellular cleft for ions, while higher concentrations gradually decreased TEER. This TJ modulation by the effective but safe 10 μ M concentration of the peptide was fast, within minutes, but after removal of the peptide a full recovery was seen. This opening and complete recovery of the intestinal TJ structure was verified by electron microscopy in the present study and by immunohistochemistry for TJ proteins both in this and our previous work [8]. A similar concentration-dependent and reversible effect of PN159 on TEER was found on airway epithelial tissue, too [4].

The concentration dependence of the TJ modulator effect of the peptide was also detected in the permeability assay for a small and a large hydrophilic marker, fluorescein and albumin. A similarly high permeability increase with a full reversibility was measured for the same markers on both Caco-2 and blood–brain barrier culture models with the 10 μ M concentration of PN159 peptide [8]. This action of the peptide was verified by the immunostaining of junctional proteins with higher concentrations causing bigger alterations in junctional protein intensity and distribution. Other claudin-specific TJ modulator peptides act similarly on junctional protein staining as well as on permeability of epithelial and endothelial cells [36,37].

In addition, the opening of the paracellular pathway in Caco-2 monolayers was measured by four dextran markers with size between 4 and 40 kDa. The apparent permeability coefficients of the large dextran macromolecules were very low in control conditions. PN159 treatment (10 μ M) elevated the dextran penetration by 159- to 400-fold. The highest increase was measured in the case of the largest, FD-40 marker. The concentration dependency of the permeability increasing effect of PN159 was also observed on the EpiAirway model, but in the concentration range of 25 to 100 μ M. The elevation of the permeability was 10- to 30-fold for FD-4 [4] and for peptide hormones with the same size [9].

To study the effect of PN159 on drug penetration, we tested two hydrophilic and two lipophilic drugs, which are substrates of active efflux transporters [24,38]. The permeability of hydrophilic atenolol and cimetidine was very low, while high penetration was measured for the lipophilic quinidine and verapamil on Caco-2 cells in agreement with our previous study [24]. PN159 treatment caused more than 30-fold permeability elevation for atenolol and cimetidine which penetrate slowly across the cell's layers. The peptide increased about 2-fold the permeability of the intestinal culture model for the lipophilic quinidine and verapamil, which already showed a high penetration. The permeability of the slightly lipophilic plant alkaloid, galantamine (287 Da), a substrate of P-glycoprotein, was also increased 2 to 3-fold by PN159 in airway epithelial tissue model [9] confirming the peptide's penetration enhancer effect.

4.2. Tight Junction (TJ) Modulator Effect of PN159: Interaction with Claudins

In our previous study, binding of PN159 in the micromolar range to epithelial claudin-1 and endothelial claudin-5 was demonstrated by affinity measurements and confirmed by docking studies [8]. In this report we describe an additional two intestinal epithelial junctional proteins, claudin-4 and -7 which are highly expressed in Caco-2 cells [34], as potential targets of the peptide by molecular docking. All these results suggest that PN159 peptide may open cell–cell junctions by acting on claudins, the most prominent family of integral membrane junctional proteins. C-CPE and C1C2 tight junction modulator peptides were also described to target claudins. C-CPE is a fragment of *Clostridium perfringens* enterotoxin which directly binds claudin subtypes including claudin-3 and -4 and induces disintegration of tight junctions [39]. The peptidomimetic C1C2 which contains the C-terminal half of ECL1 of claudin-1 predominantly binds to claudin-1 and -5, opens the paracellular barrier in cultured cells and causes cytosolic distribution of claudin-1, -2, -3, -4, and -5 [36]. What is common in the action of these three TJ modulator peptides is that they have specific interactions with conserved amino acids of claudins [8,40], however, these peptides do not share any similarity in their amino acid sequence. The secondary structure of C1C2 consists of β -sheet stabilized by α -helix [40], the claudin-binding domain of C-CPE is a nine-stranded β -sandwich [41], while according to our CD measurements and molecular modelling PN159 also contains β -sheet in addition to α -helix. This structural similarity between the three different but claudin-targeting peptides may be linked to the TJ modulator effect.

4.3. Cell Penetration and Antimicrobial Effect of PN159

We observed a concentration-dependent cellular uptake of PN159 on intestinal barrier cells as reflected in the confocal microscope images. PN159 has a fast uptake in human melanoma cells, treatment with 1 μ M concentration already causing detectable entry of the peptide into the cells, in

concordance with our results [12]. The cellular uptake of PN159 was also verified on other four cell lines [42]. After treatment with a concentration of 10 μ M, the peptide entered the cytoplasm of cells without cytotoxic effects, similar to our data.

Most of the CPPs have antimicrobial activity due to their structural properties, especially the cationic and the amphipathic membrane active peptides [13]. Based on literature data the amphipathic PN159 effectively inhibited the growth of different microorganisms, like *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus megaterium*, *Saccharomyces cerevisiae* [10,19,43]. In this study we demonstrated the antimicrobial activity of PN159 peptide in the concentration range of 3–46 μ M on clinically relevant ESKAPE pathogens. As compared to the reference antibiotics, PN159 was more effective in the inhibition of the growth of *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas aeruginosa*. (Table 4).

Comparing our results with data from the literature, another amphipathic antimicrobial peptide, melittin, inhibited the growth of *Escherichia coli* and *Micrococcus luteus* [44] and was also tested against three of the ESKAPE pathogens. *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* were more sensitive for melittin treatment, than *Klebsiella pneumoniae*: for the inhibition of growth of *Klebsiella pneumoniae* more than 100 μ M melittin was needed [45], while in our study around 10 μ M PN159 was already effective.

PN159, as a model amphipathic CPP peptide, strongly interacts with biological membranes due to its physical-chemical properties. As a CPP, PN159 enters epithelial cells [42], enhances the membrane penetration of molecules and exerts antimicrobial effects [10,11]. Because PN159 binds different claudins and interacts specifically with their conserved amino acids, it acts as a TJ modulator [8]. It is an open question, however, if the plasma membrane and the TJ modulator actions of PN159 are connected or not.

4.4. TJ Modulator Effect of Other CPPs?

Based on these results we asked the question whether this TJ modulator ability is a unique effect of PN159 among the CPPs or not. Therefore, we have tested two other amphipathic CPPs, the widely used Pep-1 [16] and the cyclic ϕ -peptide [15], and one cationic CPP, R8 peptide [18] on the barrier integrity of Caco-2 monolayers. None of the tested CPPs had a TJ modulator effect similar to PN159. There was no change in the TEER values and only the ϕ -peptide increased the permeability of fluorescein. Since no effect was seen on junctional staining in epithelial cells treated with ϕ -peptide, the increase in permeability and decrease in the cell layer impedance may be linked to the cell membrane action of this CPP [15]. As we demonstrated by our modeling results, PN159 peptide interacts with conserved residues of the claudins investigated (Figure 6) suggesting its ability for specific interactions [8]. The amino acid sequence of PN159 results in an amphipathic helix structure [10], which is not characteristic of the other CPPs investigated in our paper. From the other three investigated peptides, R8 and ϕ -peptide have positively charged arginine clusters (Table 1) and are considered as clearly cationic CPPs [17]. Pep-1 also contains a positively charged amino acid cluster and is rich in tryptophan repeats (Table 1). Neither PN159 contains clusters of arginine or positively charged amino acids, nor tryptophan (Table 1). While we have not found a CPP with a TJ modulator effect in the current study, we cannot exclude that other membrane active peptides can have such dual action. The amphipathic antimicrobial peptide melittin enhanced the paracellular permeability for dextran marker molecules on Caco-2 cells [46]. The opening of TJs by melittin was mediated, at least partially, by the prostaglandin signaling pathway [46].

5. Conclusions

We demonstrated that PN159 (KLAL/MAP) peptide as a penetration enhancer has a dual action on intestinal epithelial cells. The peptide safely and reversibly enhances the permeability of model molecules and drugs through intestinal epithelial cell layers by opening the intercellular junctions. We identified claudin-4 and -7 junctional proteins by docking studies as potential binding

partners and targets of the peptide in the opening of the paracellular pathway. In addition to the tight junction modulator action, the peptide has a concentration-dependent cellular uptake and cell membrane permeabilizing effect, which can also contribute to its penetration-enhancing effect. This dual action is not general for cell-penetrating peptides, since the other three CPPs tested did not show barrier opening effects. Therefore, we propose the investigation of CPPs for testing their effect on paracellular permeability.

Author Contributions: Conceptualization, M.A.D., A.B. and T.A.M.; methodology, A.B., I.G. and L.K.; formal analysis, A.B. and F.Ö.; investigation, A.B., I.G., L.K., O.Z., L.D., M.V. and Á.K.; resources, L.F., N.I., T.A.M., C.P., P.S.-R. and M.A.D.; data curation, A.B. and I.G.; writing—original draft preparation, A.B., M.A.D.; writing—review and editing, A.B., I.G., L.K., F.Ö., O.Z., L.D., L.F., M.V., Á.K., N.I., T.A.M., C.P., P.S.-R. and M.A.D.; visualization, A.B., Á.K. and F.Ö.; supervision, M.A.D., P.S.-R., T.A.M., and C.P.; funding acquisition, M.A.D., T.A.M., M.V. and C.P.

Funding: This research was funded by the National Research, Development and Innovation Office of Hungary, grant number GINOP-2.2.1-15-2016-00007.

Acknowledgments: The help of Zoltán Kóta during the experiments is gratefully acknowledged. We are grateful to Zsombor Kapás for his help in the preparation of the figures. The European Research Council H2020-ERC-2014-CoG 648364—Resistance Evolution (C.P.).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

References

1. Deli, M.A. Potential use of tight junction modulators to reversibly open membranous barriers and improve drug delivery. A review. *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 892–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Kiss, L.; Hellinger, É.; Pilbat, A.M.; Kittel, Á.; Török, Z.; Füredi, A.; Szakács, G.; Veszelka, S.; Sipos, P.; Ózsvári, B.; et al. Sucrose esters increase drug penetration, but do not inhibit p-glycoprotein in caco-2 intestinal epithelial cells. *J. Pharm. Sci.* **2014**, *103*, 3107–3119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Perinelli, D.R.; Vllasaliu, D.; Bonacucina, G.; Come, B.; Pucciarelli, S.; Ricciutelli, M.; Cespi, M.; Itri, R.; Spinozzi, F.; Palmieri, G.F.; et al. Rhamnolipids as epithelial permeability enhancers for macromolecular therapeutics. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2017**, *119*, 419–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Johnson, P.H.; Quay, S.C. Advances in nasal drug delivery through tight junction technology. A review. *Expert. Opin. Drug Deliv.* **2005**, *2*, 281–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chiba, H.; Osanai, M.; Murata, M.; Kojima, T.; Sawada, N. Transmembrane proteins of tight junctions. A review. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 588–600. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Krause, G.; Winkler, L.; Mueller, S.L.; Haseloff, R.F.; Piontek, J.; Blasig, I.E. Structure and function of claudins. A review. *Biochim. Biophys. Acta* **2008**, *1778*, 631–645. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Tscheik, C.; Blasig, I.E.; Winkler, L. Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions. *Tissue Barriers* **2013**, *1*, e24565. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Bocsik, A.; Walter, R.F.; Gyebrovszki, A.; Fülöp, L.; Blasig, I.; Dabrowski, S.; Ötvös, F.; Tóth, A.; Rákhely, G.; Veszelka, S.; et al. Reversible opening of intercellular junctions of intestinal epithelial and brain endothelial cells with tight junction modulator peptides. *J. Pharm. Sci.* **2016**, *105*, 754–765. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Chen, S.C.; Eiting, K.; Cui, K.; Leonard, A.K.; Morris, D.; Li, C.Y.; Farber, K.; Sileno, A.P.; Houston, M.E., Jr.; Johnson, P.H.; et al. Therapeutic utility of a novel tight junction modulating peptide for enhancing intranasal drug delivery. *J. Pharm. Sci.* **2006**, *95*, 1364–1371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Dathe, M.; Schumann, M.; Wieprecht, T.; Winkler, A.; Beyermann, M.; Krause, E.; Matsuzaki, K.; Murase, O.; Bienert, M. Peptide helicity and membrane surface charge modulate the balance of electrostatic and hydrophobic interactions with lipid bilayers and biological membranes. *Biochemistry* **1996**, *35*, 12612–12622. [[CrossRef](#)]
11. Oehlke, J.; Scheller, A.; Wiesner, B.; Krause, E.; Beyermann, M.; Klauschenz, E.; Melzig, M.; Bienert, M. Cellular uptake of an alpha-helical amphipathic model peptide with the potential to deliver polar compounds into the cell interior non-endocytically. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1414*, 127–139. [[CrossRef](#)]

12. Hällbrink, M.; Florén, A.; Elmquist, A.; Pooga, M.; Bartfai, T.; Langel, U. Cargo delivery kinetics of cell-penetrating peptides. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1515*, 101–109. [[CrossRef](#)]
13. Arouri, A.; Dathe, M.; Blume, A. The helical propensity of KLA amphipathic peptides enhances their binding to gel-state lipid membranes. *Biophys. Chem.* **2013**, *180–181*, 10–21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Copolovici, D.M.; Langel, K.; Eriste, E.; Langel, Ü. Cell-penetrating peptides: Design, synthesis, and applications. A review. *ACS Nano* **2014**, *8*, 1972–1994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Qian, Z.; LaRochelle, J.R.; Jiang, B.; Lian, W.; Hard, R.L.; Selner, N.G.; Luechapanichkul, R.; Barrios, A.M.; Pei, D. Early endosomal escape of a cyclic cell-penetrating peptide allows effective cytosolic cargo delivery. *Biochemistry* **2014**, *53*, 4034–4046. [[CrossRef](#)]
16. Morris, M.C.; Deshayes, S.; Heitz, F.; Divita, G. Cell-penetrating peptides: From molecular mechanisms to therapeutics. A review. *Biol. Cell* **2008**, *100*, 201–217. [[CrossRef](#)]
17. Guidotti, G.; Brambilla, L.; Rossi, D. Cell-Penetrating Peptides: From Basic Research to Clinics. A review. *Trends Pharmacol. Sci.* **2017**, *38*, 406–424. [[CrossRef](#)]
18. He, L.; Sayers, E.J.; Watson, P.; Jones, A.T. Contrasting roles for actin in the cellular uptake of cell penetrating peptide conjugates. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7318. [[CrossRef](#)]
19. Palm, C.; Netzereab, S.; Hällbrink, M. Quantitatively determined uptake of cell-penetrating peptides in non-mammalian cells with an evaluation of degradation and antimicrobial effects. *Peptides* **2006**, *27*, 1710–1716. [[CrossRef](#)]
20. Boucher, H.W.; Talbot, G.H.; Bradley, J.S.; Edwards, J.E.; Gilbert, D.; Rice, L.B.; Scheld, M.; Spellberg, B.; Bartlett, J. Bad bugs, no drugs: No ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. A review. *Clin. Infect. Dis.* **2009**, *48*, 1–12. [[CrossRef](#)]
21. Lázár, V.; Martins, A.; Spohn, R.; Daruka, L.; Grézal, G.; Fekete, G.; Számel, M.; Jangir, P.K.; Kintsés, B.; Csörgő, B.; et al. Antibiotic-resistant bacteria show widespread collateral sensitivity to antimicrobial peptides. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 718–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Artursson, P.; Palm, K.; Luthman, K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 27–43. [[CrossRef](#)]
23. Hubatsch, I.; Ragnarsson, E.G.; Artursson, P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 2111–2119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Hellinger, E.; Veszelka, S.; Tóth, A.E.; Walter, F.; Kittel, A.; Bakk, M.L.; Tihanyi, K.; Háda, V.; Nakagawa, S.; Duy, T.D.; Niwa, M.; et al. Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2012**, *82*, 340–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Roka, E.; Vecsernyes, M.; Bacsikay, I.; Félix, C.; Rhimi, M.; Coleman, A.W.; Perret, F. para-Sulphonato-calix[n]arenes as selective activators for the passage of molecules across the Caco-2 model intestinal membrane. *Chem. Commun.* **2015**, *51*, 9374–9376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kürti, L.; Veszelka, S.; Bocsik, A.; Dung, N.T.; Ozsvári, B.; Puskás, L.G.; Kittel, A.; Szabó-Révész, P.; Deli, M.A. The effect of sucrose esters on a culture model of the nasal barrier. *Toxicol. In Vitro* **2012**, *26*, 445–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Dichroweb, on-line Analysis for Protein Circular Dichroism spectra. Available online: dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml (accessed on 10 December 2015).
28. Sali, A.; Blundell, T.L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J. Mol. Biol.* **1993**, *234*, 779–815. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Suzuki, H.; Nishizawa, T.; Tani, K.; Yamazaki, Y.; Tamura, A.; Ishitani, R.; Dohmae, N.; Tsukita, S.; Nureki, O.; Fujiyoshi, Y. Crystal structure of a claudin provides insight into the architecture of tight junctions. *Science* **2014**, *344*, 304–307. [[CrossRef](#)]
30. Phillips, J.C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R.D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable molecular dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* **2005**, *26*, 1781–1802. [[CrossRef](#)]
31. Humphrey, W.; Dalke, A.; Schulten, K. VMD: Visual molecular dynamics. *J. Mol. Graph.* **1996**, *14*, 33–38. [[CrossRef](#)]
32. Kurcinski, M.; Jamroz, M.; Blaszczyk, M.; Kolinski, A.; Kmiecik, S. CABS-dock web server for the flexible docking of peptides to proteins without prior knowledge of the binding site. *Nucleic. Acids. Res.* **2015**, *43*, W419–W424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Wiegand, I.; Hilpert, K.; Hancock, R.E. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 163–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Veszelka, S.; Tóth, A.; Walter, F.R.; Tóth, A.E.; Gróf, I.; Mészáros, M.; Bocsik, A.; Hellinger, É.; Vastag, M.; Rákhely, G.; Deli, M.A. Comparison of a Rat Primary Cell-Based Blood-Brain Barrier Model With Epithelial and Brain Endothelial Cell Lines: Gene Expression and Drug Transport. *Front. Mol. Neurosci.* **2018**, *11*, 166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Erbe, A.; Kerth, A.; Dathe, M.; Blume, A. Interactions of KLA amphipathic model peptides with lipid monolayers. *ChemBioChem* **2009**, *10*, 2884–2892. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Staat, C.; Coisne, C.; Dabrowski, S.; Stamatovic, S.M.; Andjelkovic, A.V.; Wolburg, H.; Engelhardt, B.; Blasig, I.E. Mode of action of claudin peptidomimetics in the transient opening of cellular tight junction barriers. *Biomaterials* **2015**, *54*, 9–20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Dithmer, S.; Staat, C.; Müller, C.; Ku, M.C.; Pohlmann, A.; Niendorf, T.; Gehne, N.; Fallier-Becker, P.; Kittel, Á.; Walter, F.R.; Veszelka, S.; et al. Claudin peptidomimetics modulate tissue barriers for enhanced drug delivery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, *1397*, 169–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Hellinger, E.; Bakk, M.L.; Pócsa, P.; Tihanyi, K.; Vastag, M. Drug penetration model of vinblastine-treated Caco-2 cultures. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2010**, *41*, 96–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Sonoda, N.; Furuse, M.; Sasaki, H.; Yonemura, S.; Katahira, J.; Horiguchi, Y.; Tsukita, S. Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J. Cell Biol.* **1999**, *147*, 195–204. [[CrossRef](#)]
40. Dabrowski, S.; Staat, C.; Zwanziger, D.; Sauer, R.S.; Bellmann, C.; Günther, R.; Krause, E.; Haseloff, R.F.; Rittner, H.; Blasig, I.E. Redox-sensitive structure and function of the first extracellular loop of the cell-cell contact protein claudin-1: Lessons from molecular structure to animals. *Antioxid. Redox. Signal* **2015**, *22*, 1–14. [[CrossRef](#)]
41. Veshnyakova, A.; Piontek, J.; Protze, J.; Waziri, N.; Heise, I.; Krause, G. Mechanism of Clostridium perfringens enterotoxin interaction with claudin-3/-4 protein suggests structural modifications of the toxin to target specific claudins. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 1698–1708. [[CrossRef](#)]
42. Mueller, J.; Kretzschmar, I.; Volkmer, R.; Boissguerin, P. Comparison of cellular uptake using 22 CPPs in 4 different cell lines. *Bioconjug. Chem.* **2008**, *19*, 2363–2374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Bagheri, M.; Beyermann, M.; Dathe, M. Immobilization reduces the activity of surface-bound cationic antimicrobial peptides with no influence upon the activity spectrum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1132–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Maher, S.; McClean, S. Investigation of the cytotoxicity of eukaryotic and prokaryotic antimicrobial peptides in intestinal epithelial cells in vitro. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1289–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lam, S.J.; O'Brien-Simpson, N.M.; Pantarat, N.; Sulistio, A.; Wong, E.H.; Chen, Y.Y.; Lenzo, J.C.; Holden, J.A.; Blencowe, A.; Reynolds, E.C.; et al. Combating multidrug-resistant Gram-negative bacteria with structurally nanoengineered antimicrobial peptide polymers. *Nat. Microbiol.* **2016**, *1*, 16162. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Maher, S.; Feighery, L.; Brayden, D.J.; McClean, S. Melittin as an epithelial permeability enhancer I: Investigation of its mechanism of action in Caco-2 monolayers. *Pharm. Res.* **2007**, *24*, 1336–1345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

