

Egyetemi doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

A külső károsító tényezők hatása a HaCaT keratinociták kalcium homeosztázisára

Dr. Ruzsnavszky Olga

Témavezető:

Prof. Dr. Csernoch László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

Élettan és Neurobiológia Ph.D. program

DEBRECEN

2013

A külső károsító tényezők hatása a HaCaT keratinociták kalcium homeosztázisára

Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Ruzsnavszky Olga általános orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája
(Élettan és Neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Prof. Dr. Csernoch László, az MTA doktora

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Szentmiklósi József, Ph.D.
Dr. Ivanics Tamás, Ph.D.

A doktori szigorlat időpontja: 2013. szeptember 11.

Az értekezés bírálói:

Dr. Széll Márta, az MTA doktora
Dr. Krasznai Zoltán, kandidátus

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Virág László, az MTA doktora
tagok: Dr. Széll Márta, az MTA doktora
Dr. Krasznai Zoltán, kandidátus
Dr. Ivanics Tamás, Ph.D.
Dr. Szentmiklósi József, Ph.D.

Az értekezés védésének időpontja: 2013. szeptember 11.

Bevezetés

Az epidermis

A bőr a szervezetet a külvilág káros hatásaitól védő barrier, érzékszerv, részt vesz a hő és energiaháztartásban, az immunrendszer megfelelő működésében. A bőrben képződik ultraibolya fény hatására a kolekalciferol, más néven D3 vitamin. A bőr három, önmagában is összetett rétegből épül fel, ezek a hám (epidermis), irha (dermis vagy cutis) és a bőralja (subcutis). A hám az ectodermából fejlődik, nem tartalmaz ereket és idegeket, az anyagcseréje az irha felől passzív diffúzóval történik. Az elszarusodása az embrionális fejlődés 3. hónapjában indul meg. A hám bazális rétege összejt jellegű, pluripotens sejtekből áll. Mitosis után az egyik leánysejt a keratinociták utánpótlásául szolgál, míg a másik a basalis rétegben marad és megőrzi pluripotens jellegét. Az embrionális fejlődés 10-12. hetében neuroectodermális eredetű sejtek vándorolnak az epidermisbe, és ott melanodendrocitákká alakulnak. Ezek a melanociták elődei, amelyek a melanint fogják termelni. A melanociták nyúlványos sejtek, amelyek nyúlványaik révén adják át a keratinocitáknak a megtermelt melanint, amit a keratinociták aktív fagocitosisal vesznek fel, majd a sejtmagjuk felett sapkaszerűen halmoznak fel.

A HaCaT sejtek a normál humán keratinociták széles körben alkalmazott modelljei. Nem tartalmazznak melanint, amely védené őket az UV sugárzás károsító hatásától.

Az UV-B sugárzás

A fény az elektromágneses sugárzás egy része. Az UV-B sugárzás (280-315 nm) része a természetes napfénynek, eléri a földfelszínt. Az UV-B-sugarak nagy részét kiszűri az ablaküveg, azonban a víz nem. Ezt a sugártartományt sok diagnosztikai és terápiás célból készített fényforrás emittálja. Az UV-B sugárzásnak alapvető szerepe van abban, hogy az epidermiszben D3-vitamin képződik. Azonban számos negatív hatása is van a szervezetre, amely a bőr akut

és krónikus károsításában nyilvánul meg. Az UV-B biológiai hatásának tudható be a napégés (erythema), amelyet a proszttaglandin közvetít és 12-24 óra után jelenik meg. Irritálja a kötőhártyát és a corneát. Az UV-B-sugárzás által az epidermális sejtekre, kötőszövetre és kapillárisokra kifejtett károsító hatás magában foglalja a DNS-, RNS-, protein- és sejtmembránpusztítást, amelyek jelentős szerepet játszanak a carcinogenesisben.

A keratinociták szerepe a primer sebgyógyulásban

A sebgyógyulás első napján a seb területén megjelennek a citokineket termelő makrofágok, amelyek a szövetreakciót szabályozzák. A sebszáron levő hámsejtek mobilizálását megelőzi a sejtek között meglevő integrin-közvetített kapcsolatok fellazulása és felbomlása, helyettük új, átmeneti kötések alakulnak ki. A hámsejtek először ellapulnak, hogy minél nagyobb területet tudjanak beborítani, majd elindulnak a sebszélek felől. A mozgásuk sebessége kb. 0,5 mm/nap. A hámsejtek osztódását az EGF (epidermal growth factor) és a KGF (keratinocyte growth factor) serkenti. A glükokortikoid többlet és a diabetes jelentősen csökkenti a KGF termelését, ezáltal hátráltatja a sebgyógyulást.

Keratinociták purinerg szignalizációja

Az élő szervezetekben a purinerg vegyületek többféle szerepet töltenek be, egyrészt a DNS-ben található alapvető molekulák, illetve nagy energiájú kötéseik révén energiatároló molekulák is. Azt hogy az extracellulárisan megjelenő adenzinvegyületeknek is van hatásuk, csak a 1929-ben írták le. Az ATP az extracelluláris térbe vagy kotranszmitterként, vagy pusztuló sejtekből kiszabadulva jut, valószínűleg az utóbbi miatt a legtöbb kezdetleges életformánál az ATP és a származékai "vészjelző" anyagok. A purinerg receptorok olyannyira elterjedtek az élő szervezetekben, hogy szinte lehetetlen olyan sejtet találni, amelyik nem érzékeny az ATP-re vagy valamelyik analógjára. Az extracellulárisan megjelenő ATP-nek különböző funkciói

lehetnek. Kötődhet a sejtfelszíni ionotróp P2X és metabotróp P2Y purinoreceptorokhoz, részt vehet ektokinázok általi foszforilációs reakciókban, vagy degradálódhat sejtfelszíni enzimek révén. A purinerg jelátviteli rendszer purinokat és pirimidineket használ kémiai jelátvivőként.

Egészséges humán epidermális keratinocitákban kimutatták a P2Y₁, a P2Y₂, a P2X₅ és a P2X₇ receptorokat. A P2Y₁ és P2Y₂ receptorok a stratum basale sejteiben voltak kimutathatóak, így jelenlétük összefüggésbe hozható a sejtek proliferációjával. A P2X₅ receptort a stratum spinosum sejteiben, míg a P2X₇ receptort a stratum corneumban mutatták ki. Jelenlétük összefügghet keratinociták differenciálódásával, illetve az apoptotikus sejthalállal.

Protein kinázok és foszfoprotein foszfatazok

A protein kinázok által létrehozott reverzibilis fehérjefoszforiláció fontos szerepet játszik az extracelluláris jelre adott sejtválasz kialakulásában. A foszforiláció általában az ATP terminális foszfátcsoportjának terhére megy végbe. A fehérjék foszforilált állapotát a foszfoprotein foszfatazok (PP) szüntetik meg, a foszfátcsoport hidrolitikus hasításával. Az eukarióta sejtek génállományának 2-3%-a protein kinázokat és foszfoprotein foszfatazokat kódol. A sejten belüli fehérjék nagyjából 30%-a képes foszforilálódni protein kinázok segítségével. A szerin treonin csoportok foszforilációja jóval gyakoribb, mint a tirozin oldalláncoké.

A foszfoprotein foszfatazokat aszerint csoportosítják, hogy a foszfátcsoportot milyen aminosav oldalláncról hasítják le. Ezek szerint megkülönböztethetünk szerin/treonin foszfoprotein foszfatazokat és tirozin foszfoprotein foszfatazokat. A szerin/treonin foszfoprotein foszfatazoknak több csoportját különböztethetjük meg, a PP1, PP2A, PP2B és PP2C csoportokat, illetve a nemrég felfedezett PP4, PP5, PP6 és PP7 csoportokat.

Szerin/treonin foszfataz inhibitorok

Kísérleteinkben kétféle szerin/treonin foszfoprotein foszfatáz inhibitor használtunk. Az okadánsavat tengeri szivacsból a *Halichondria okadai*-ból izolálták először, valójában tengeri algafélék termelik. Az okadánsav gátolja a protein szerin/treonin foszfatáz 1, 2A és 2B alcsoportjait, leghatékonyabban a 2A csoportot, majd az 1-et és legkevésbé a 2B-t.

A másik általunk használt szerin/treonin foszfatáz inhibitor a kalikulin-A volt. A kalikulinokat elsőként a *Discodermia calyx* tengeri szivacsból vonták ki. A kalikulin A erősebb szerin/treonin foszfatáz inhibitor az okadánsavnál. Míg az okadánsav főleg a PP2A csoportot gátolja, és kisebb hatással van a PP1-re, addig a kalikulin A mindkét csoport hatékony gátlószere. Sem a kalikulin A, sem az okadánsav nincs hatással a savas vagy alkalikus foszfatázokra, illetve a foszfortirozin protein foszfatázokra.

Célkitűzések

A bőr a szervezetet a külvilág káros hatásaitól védő, főként keratinocitákból álló barrier. Kísérleteinkben meg kívántuk vizsgálni két fizikai károsító tényező, az UV-B sugárzás valamint a mechanikai sértés (karcolás) hatását keratinocitákra.

- Kísérleteink első részeként megvizsgáltuk az UV-B sugárzás hatását a HaCaT keratinociták életképességére.
- Meg kívántuk vizsgálni az UV-B sugárzás hatását a keratinociták purinoreceptor expressziójára és kalcium homeosztázisára.
- Kíváncsiak voltunk a P2X₇ receptorhoz kötött, ATP-vel kiváltható apoptózis mértékére.

Kísérleteink további részében a HaCaT keratinocitákon spontán intracelluláris kalcium tranzienseket figyeltünk meg.

- Célul tűztük ki e kalcium tranziensek jellemzését,
- mechanikai sértés és foszfataz inhibitorok hatására történő változásának vizsgálatát.
- Meg kívántuk vizsgálni a foszfataz inhibitorok hatását a sebgyógyulás folyamatára és a sejtek migrációjára.

Anyagok és módszerek

HaCaT keratinociták tenyésztése

A HaCaT keratinocitákat Dulbecco által módosított Eagle mediumban (DMEM) tenyésztettük, amit 10% borjúsérummal, 2 mmol/L L-glutaminnal, illetve antibiotikumokkal (50 NE/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin) és antimikotikummal (1,25 µg/ml Fungizon) egészítettünk ki. A sejteket 37°C-ra beállított, 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban tenyésztettük.

RT-PCR

Az RT-PCR analízishez a tenyészetekből teljes RNS-t izoláltunk Qiagen RNeasy® Mini Kit segítségével. Az így nyert RNS-mintából Omniscript reverz transzkripció kit felhasználásával, oligo(dT) primerek segítségével cDNS-t készítettünk. A specifikus cDNS-szekvenciák amplifikációjához használt primereket az interneten hozzáférhető nukleotid-szekvenciák alapján állítottuk elő. A PCR-mintákat végül 1,5%-os agarózzgelen vizsgáltuk, etídium-bromiddal megfestve. Az eredmények kvantitatív elemzését ImageJ programmal végeztük.

Western-blot analízis

A teljes sejt lizátumokat Western-blot analízissel vizsgáltuk. A Western-blot vizsgálathoz használt mintákat szonikálással feltártuk, majd 1/5 térfogatú, ötszörös töménységű elektroforetikus mintapuffer hozzáadásával kezeltük és 10 percig 100 °C-on főztük. A fehérjéket elektroforézis segítségével nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat PBS-ben oldott sovány tejpor 5%-os oldatával blokkoltuk, majd a primer antitesttel az egy éjszakán át (4 °C-on) tartó inkubációt követően a membránokat torma peroxidázzal konjugált szekunder IgG-vel inkubáltuk. A jeleket kemilumineszcenciás reakcióval detektáltuk.

A keratinociták UV-B-vel történő besugárzása

Kísérleteinkben a HaCaT keratinocitákat a tápoldat eltávolítása után a besugárzás idejére 0,5 ml PBS-ben tartottuk. A besugárzáshoz szélessávú UV-B sugárzást használtunk 1 percig, 40 mJ/cm² dózisban.

Életképesség vizsgálata

A sejtek életképességének meghatározását MTT assay-vel mértük, melynek alapja, hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzime a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid tetrazólium gyűrűjét oldhatatlan, színes formazánná alakítja, így annak mennyisége kolorimetriásan meghatározható. A kontroll és az UV-B-vel kezelt tenyészeteket a kezelés után 8, 12, 16, 24, 30, 36 és 48 órával 2 órán keresztül 0,5 mg/ml MTT-vel inkubáltuk, majd a formazán kristályok koncentrációját kolorimetriásan, 570 nm-es hullámhosszon határoztuk meg. A formazán mennyisége az élő sejtek számával arányos. A kapott adatokat átlag $\pm$ standard hiba formájában ábrázoltuk.

Apoptózis vizsgálata

Az apoptózis mértékének vizsgálatára a Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI kitet használtuk. A teljes sejtmennyiség mérésére a CyQUANT® Cell Proliferation Assays kitet használtuk. Apoptózis kiváltására 48 órán keresztül 180 μ M ATP-oldatban tartottuk a sejteket, amelyet 12 óránként cseréltünk. A fluoreszcencia intenzitását FLIPR készülékkel mértük 485 nm-es gerjesztő és 530 nm-es emissziós hullámhosszokon. Az apoptotikus sejtek számát az összes sejt mennyiségére normalizáltuk.

Egyedi sejteken történő fluoreszcens, intracelluláris [Ca²⁺]-mérés

A sejtek intracelluláris [Ca²⁺] változásait Fura-2-AM fluoreszcens Ca²⁺-kötő festék segítségével mértük. A feltöltést 37 °C-on, termosztátban, 60 percen

át végeztük. A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztését a Photon Technology International (PTI) Delta ScanTM kettős monokromátoros berendezés biztosította. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en interferenciaszűrő közbeiktatásával egy fotoelektron-sokszorozó (PMT) segítségével detektáltuk. A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcencia-értékek hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$) az alábbi egyenlet alapján számítottuk ki az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -t:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D \cdot \beta \cdot (R - R_{min}) / (R_{max} - R).$$

A sejteket folyamatosan perfundáltuk normál Tyrode-oldattal egy külső perfúziós rendszer segítségével, és a 180 μ M ATP-t tartalmazó mérőoldatot egy lokálperfúziós rendszeren keresztül adagoltuk közvetlenül a vizsgálni kívánt sejtekre.

Konfokális mikroszkópos mérések

Vizsgálatainkban a Zeiss LSM LIVE lézer-pásztázó mikroszkópot használtuk Fluo-4 fluoreszcens Ca^{2+} -kötő festékkel feltöltött HaCaT keratinociták Ca^{2+} tranzienseinek nyomon követésére. Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$, és így a festék által kötött Ca^{2+} mennyiségének emelkedésekor a festék fluoreszcenciája fokozódik, ami fényintenzitás növekedésként detektálható. A fluoreszcencia-intenzitás változását x-y felvételek készítésével vizsgáltuk.

A festéket argonion-lézerrel gerjesztettük (488 nm), és a fluoreszcencia intenzitást 500–570 nm-es áteresztő szűrő segítségével detektáltuk. A felvételeket egy, az intézetünkben fejlesztett program segítségével elemeztük ki. A felvételek fluoreszcenciáját (F) az alap fluoreszcenciára (F_0) normalizáltuk, majd a tranziensek amplitúdóját $\Delta F/F_0$ -ként határoztuk meg.

Time-lapse felvételek

A time-lapse felvételek nagy érzékenységgű videokamerával összekapcsolt inverz mikroszkóp alatt készültek egy direkt ehhez a rendszerhez épített

képfelvevő számítógépes rendszer segítségével. A sejt kultúrákról percenként készült felvétel. A mérések 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban készültek.

Migrációs assay

A sejtek migrációját Boyden kamrában, fibronectinnel bevont (FN) “Quantitative Cell Migration Assay” segítségével vizsgáltuk. A sejtek 18 órán keresztül inkubálódtak 50 nM OA vagy 10 nM CLA jelenlétében, illetve hiányában. A sejtek migrációját a membrán másik oldalára plate reader segítségével, 540 nm-es hullámhosszon a festékkel feltöltött sejtek optikai denzitását felhasználva határoztuk meg.

Eredmények

Az UV-B besugárzás hatása a HaCaT keratinociták életképességére

Kísérleteinkben MTT-assay segítségével kimutattuk, hogy a 40 mJ/cm² dózisú UV-B besugárzás csökkenti az élő sejtek számát. A besugárzástól eltelt idő előre haladtával azonban nem csak a sejtszám csökken, hanem morfológiai változások – zsugorodás és a nyúlványaik elvesztése – is megfigyelhetővé válnak a sejteken.

ATP adagolás hatása a keratinociták [Ca²⁺]_i-jára

A HaCaT keratinociták extracelluláris ATP adagolására intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedéssel válaszolnak. Kísérleteinket egy nappal az UV-B besugárzás után végeztük. Megfigyeléseink alapján a purinerg szignalizáció UV-B besugárzás hatására megváltozik a sejteken. A besugárzott sejtekben a kalcium tranziensek amplitúdója kisebb volt, és a kalcium tranziens kialakulása után az [Ca²⁺]_i lassabban tért vissza a nyugalmi értékre, mint a kontroll sejtekben. Emellett a besugárzott sejtekben alacsonyabb volt a nyugalmi kalcium szint, és a tranziensek felszálló szárának meredeksége is. Ezek az eltérések minden esetben szignifikánsnak bizonyultak.

Purinerg receptorok kimutatása HaCaT sejteken az UV-B sugárzás függvényében

Munkacsoportunk előző közleményeiben bemutattuk, hogy a HaCaT keratinocitákon a P2X₁, P2X₃, P2X₇ és P2Y₂ purinoreceptorok megtalálhatóak és fontos szerepet töltenek be a kalcium homeosztázisban. Western-blot analízissel megvizsgáltuk a purinoreceptorok kifejeződését a besugárzástól eltelt idő (8, 12, 24, 36 óra) függvényében. Az P2X₁ receptor esetében azt találtuk, hogy – a kontroll sejtekhez viszonyítva, a 8 órás időponttól eltekintve – a besugárzott sejtekben minden vizsgált időpontban csökkent a receptor fehérje

szintű kifejeződése. A P2X₃ receptor esetében a besugárzás után egy extra sáv jelent meg a Western bloton. Ez az extra sáv utalhat arra, hogy a receptorok egy része degradálódott az UV-B sugárzás hatására. A P2X₇ receptort vizsgálva az intakt receptorra jellemző, 80 kDa-os sávot csak a kontroll sejtekben tudtuk kimutatni. Besugárzott sejtek esetén csak egy 20 kDa-os sáv jelent meg, amely megfelelhet a P2X₇ receptor monomer formájának.

A P2Y₂ receptor szintje 8 órával a besugárzás után az UV-B sugárzásnak kitett sejtekben szignifikánsan magasabb volt, Azonban az idő múlásával már szignifikánsan kevesebb fehérjét tudtunk a besugárzott sejtekben kimutatni.

P2X₇ receptor mRNS-éből – a 24 órás időponttól eltekintve – a besugárzott sejtekben kevesebb volt. UV-B kezelés után a P2Y₂ receptor mRNS szintje 8 órával a besugárzás után nem változott, majd csökkent, és a kísérlet végére gyakorlatilag eltűnt a sejtekből. A denzitometriás analízis elvégzéséhez a belső kontrollként használt GAPDH-ra normalizáltuk a kapott értékeket.

UV-B sugárzás hatására bekövetkező apoptózis vizsgálata

Az ATP nélkül kialakuló apoptózis mértéke a besugárzott sejtek esetében alacsonyabb volt ($78 \pm 19\%$, $n=8$), azonban ez a különbség nem volt szignifikáns ($p>0,2$). Az ATP-vel indukált apoptózis mértéke azonban már szignifikánsan kisebbnek bizonyult az UV-B-vel kezelt sejtek esetén, összehasonlítva a kontroll, besugárzást nem kapott sejtekével ($61 \pm 22\%$, $n=8$; $p<0,02$). Ez a megfigyelés összhangban lehet azzal a megfigyelésünkkel, hogy UV-B sugárzás hatására a működőképes P2X₇ receptorok eltűnnek a sejtekből.

HaCaT keratinociták spontán kalcium oszcillációinak jellemzése

További kísérletünk során HaCaT keratinocitákon spontán kalcium tranzienseket figyeltünk meg. A sebgyógyulással kapcsolatban a kalcium oszcillációk változásait fizikai károsítás (karcolás) közvetlen szomszédságában elhelyezkedő sejteken vizsgáltuk. Kísérleteinkben vizsgáltuk továbbá két

különböző foszfatáz inhibitor (CLA és OA) hatását a sebgyógyulásra és a sejtkultúrák kalcium homeosztázisára.

Konfluens HaCaT keratinocita tenyészetekben a sejteken lassú ismétlődő spontán $[Ca^{2+}]_i$ tranzienseket figyeltünk meg konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével. 200 μ M tetrakain – amely csak a RyR-ra van gátló hatással – nem változtatta meg sem az oszcillációt mutató sejtek százalékos arányát, sem az oszcillációk frekvenciáját. Másrészt viszont az IP₃R gátlószer Xestospongin C, és az IP₃R-t és a RyR-t egyaránt gátló 1 mM koncentrációjú tetrakain szignifikánsan csökkentette mind az oszcillációt mutató sejtek arányát, mind az oszcillációk frekvenciáját. 10 μ M thapsigargin – ami a SERCA gátlásán keresztül az ER Ca^{2+} -raktárának kiürülését váltja ki – szintén szignifikánsan csökkentette az oszcillációt mutató sejtek arányát, és az oszcillációk frekvenciáját is.

Az oszcillációt mutató sejtek aránya

Karcolt kontroll tenyészetek karc melletti sejtjeit vizsgálva az oszcillációt mutató sejtek százalékos aránya szignifikánsan csökkent a karcolatlan tenyészetekhez képest. Karcolt CLA-val illetve OA-val kezelt tenyészetek esetén ez a szignifikáns csökkenés szintén megfigyelhető volt a karc nélküli megfelelőjükhöz képest. Más részről viszont megfigyelhető volt, hogy az oszcilláló sejtek aránya a foszfatázgátlóval kezelt tenyészetek esetén magasabb volt, mind karcolás előtt, mind karcolás után. Ezen megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy bár sem a CLA sem az OA nem befolyásolja a karcolás hatását, mindkettő beavatkozik a spontán kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ változásokért felelős alapmechanizmusokba.

Kontroll karc melletti sejtek esetén nemcsak a spontán oszcillációt mutató sejtek százalékos aránya, hanem a kalcium oszcillációk frekvenciája is szignifikánsan alacsonyabb a karc nélküli kontroll sejtekkel összehasonlítva. A foszfatáz inhibitorok jelenléte nem befolyásolja szignifikánsan a kialakuló

oszcillációk frekvenciáját. Mindazonáltal hasonló tendencia volt megfigyelhető kezeletlen és CLA-val valamint OA-val kezelt sejtek esetén, vagyis a kalcium tranziensek frekvenciája alacsonyabb volt a karcolás mellett elhelyezkedő sejtek esetén, a karc nélküli sejteken mért adatokkal összehasonlítva. Továbbá a foszfátázgátlók jelenléte szintén növelte az oszcillációk frekvenciáját mind karcolt mind karcnélküli tenyészetekben a foszfátázgátlóval nem kezelt sejtekhez képest, bár ezek az eltérések nem bizonyultak szignifikánsnak. A kalcium oszcillációkat mutató, karc mellett elhelyezkedő sejtek aránya foszfátázgátlók jelenlétében magasabb volt, mint foszfátázgátlóval nem kezelt sejtekben.

A foszfátáz inhibitorok és a karcolás hatása a HaCaT keratinociták nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jára

A karc melletti sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja szignifikánsan magasabb volt a karcnélküli tenyészetek sejtjeiéhez képest a foszfátázgátlóval nem kezelt, illetve a CLA-val és OA-val kezelt tenyészetek esetében is. A foszfátázgátlók jelenléte vagy hiánya nem befolyásolta szignifikánsan a sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ját.

A kalcium tranziensek jellemzése

Karcolás nélküli kultúrákban a spontán kalcium tranziensek amplitúdója foszfátázgátlók jelenlétében szignifikánsan magasabb volt, mint kontroll tenyészetekben, míg a karc melletti sejtek adatainak elemzése esetén ilyen eltérés nem volt megfigyelhető.

Kontroll és OA-val kezelt karcmelletti sejtek tranzienseinek FTHM értékei szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a karcmentes területekről származók. Ez a különbség CLA-val kezelt sejtek esetén nem volt statisztikailag szignifikáns. Karcolás nélküli tenyészetekben a CLA kezelés csökkentette, míg az OA-val történő kezelés növelte az FTHM értékeket. A karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben a CLA-val történő kezelés szignifikánsan csökkentette,

míg az OA-val történő kezelés a kontrollhoz viszonyítva nem változtatta meg az FTHM értékeket.

A karcolás hatása kontroll tenyészetekben mindkét vizsgált paraméter esetén hasonló volt, vagyis az amplitúdó és az FTHM is növekedett. Foszfatazgátló kezelés hatására ezek az értékek (kivéve a CLA kezelés hatását az FTHM-re) szintén fokozódtak.

Time-lapse kísérletek a foszfatazgátlók hatásának kimutatására

A kontroll sejtek egyből elkezdtek benőni a karcolt területet, és a kísérlet 17. órájára teljesen ki is töltötték azt. Ezzel szemben a CLA-val és OA-val kezelt sejtek hasonló időtartam alatt nem voltak képesek kitölteni a karcolt területet, sőt, mi több, az OA-val kezelt sejtek a kísérlet végére elvesztették a nyúlványaikat, illetve a szomszédos sejtekkel való kapcsolatukat. Hasonló elváltozásokat CLA kezelés hatására nem figyeltünk meg.

Boyden kamrában végzett kísérletek a keratinociták migrációjának vizsgálatára

50 nM koncentrációban történő OA kezelés nagyjából 80%-kal csökkentette a kemoattraktánsok által kiváltott migráció mértékét. Ehhez hasonlóan a 10 nM CLA kezelésnek szintén erőteljes gátló hatása volt a sejtek vándorlására, körülbelül 90%-kal csökkentve a sejtek vándorlását.

Megbeszélés

Kísérleteinkben megvizsgáltuk a purinerg receptorok expressziós mintázatának változását UV-B sugárzás hatására, illetve, hogy ez hogyan befolyásolja a keratinociták kalcium homeosztázisát.

A programozott sejthalál eseményei közül az első lépések egyike az intracelluláris kalcium koncentráció megemelkedése a sejtekben. Előző tanulmányok kapcsolatot mutattak ki a purinoreceptorok, ezeken belül is a P2X₇ receptorok aktivációja és az apoptotikus sejthalál beindulása között. *In vivo* az e purinoreceptorok aktivációjához szükséges ATP származhat más, halott sejtekből, vagy fiziológiásan felszabadulhat idegsejtekből, uroepitél sejtekből, illetve endotélsejtekből. A A431 humán laphám eredetű carcinoma sejtvonalon a mikromólos koncentrációban alkalmazott ATP mitogén és emeli a sejtek intracelluláris kalcium koncentrációját. Az ATP az MCF-7 emlőrák eredetű sejtvonalban és a humán petefészek eredetű tumorsejtekben szintén fokozza a sejtek proliferációját. Magas koncentrációban alkalmazott ATP (1-5 mM) és BzATP (a P2X₇ receptor specifikus agonistája) szignifikánsan csökkentette az A431 sejtek számát. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy UV-B besugárzás után a P2X₇ receptor nem mutatható ki a keratinocitákban, illetve az mRNS-ének szintje is csökken. Ez magyarázhatja, hogy a besugárzás miatt károsodott, de azt túlélő sejt képessége az apoptózis beindítására csökken. Ez a változás elősegítheti a malignus átalakulás kialakulását azáltal, hogy a károsodott DNS-sel rendelkező sejtek kevésbé eliminálódnak.

Más P2X és P2Y receptorok szintén fontos szabályozói a sejtek proliferációjának és differenciálódásának. A metabotróp P2Y₁ és P2Y₂ receptorok a keratinociták proliferációját szabályozzák. A keratinociták malignus átalakulása esetén a purinoreceptor mintázat megváltozhat. Kísérleteink során azt találtuk, hogy a 40 mJ/cm²-es UV-B besugárzás csökkentette a P2X₁ és P2Y₂ receptorok szintjét, és alapvetően károsította a

P2X₇ receptorokat. A P2Y₂ receptorok a normál humán keratinocitákban és a HaCaT sejtekben összefüggésbe hozhatók a proliferáció elindításával. Kísérleteinkben bemutattuk, hogy UV-B besugárzás hatására az élő sejtek száma csökkent, ami összefügghet a P2Y₂ receptor szintjének csökkenésével. Kimutattuk, hogy a P2Y₂ receptor mRNS-e az UV-B-vel kezelt sejtekben kevesebb volt, ráadásul 36 órával a besugárzás után a receptor mRNS-e már nem volt kimutatható a sejtekben. E receptorok elvesztése együtt járhat a sejtek proliferáció vagy differenciálódás feletti kontrolljának elvesztésével, ami a sejtek malignus transzformációjához vezethet.

A purinerg receptormintázat megváltozásával együtt megváltozott a keratinocitákban az ATP adagolással kiváltott kalcium tranziensek morfológiája is. UV-B sugárzásnak kitett sejtekben a kalciumtranziensek amplitúdója és felszállási szárának meredeksége is kisebb volt, mint a kontroll sejtekben, ami összefüggésben állhat a kezelt sejtek alacsonyabb purinoreceptor expressziójával. A felszálló szár meredekségének csökkenése összefügghet azzal, hogy a nagyrészt ionotróp (P2X) válasz az UV-B sugárzást kapott sejtekben részben metabotróppá (P2Y) válik. Besugárzott sejtekben a kalcium tranziensek után a nyugalmi kalcium szintre való visszatérés is több időt vesz igénybe, mint kontroll sejtekben. Ez összefügghet azzal, hogy az UV sugárzás hatására egyéb fehérjék, mint pl. a kalcium pumpa, is degradálódhatnak. A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ az UV-B sugárzással kezelt sejtekben volt alacsonyabb.

A sebgyógyulás mechanizmusának – vagyis a seb záródásának és ezen keresztül a barrier funkció helyreállításának – egy gyakran alkalmazott modellje a keratinocita tenyészetek összefüggő rétegének megkarcolása, és az így keletkezett sebágyat a későbbiekben kitöltő, újonnan képződött sejtek vizsgálata. A protein kináz és foszfatáz enzimek az $[Ca^{2+}]_i$ változásaival együtt jelentős hatással vannak a sejt vándorlás szabályozására és a sebgyógyulásra. Az utóbbi különösen fontos a bőr esetében, amely a szervezet első védelmi vonalát alkotja. Számos kutatási eredmény ellenére még nincs egyetértés abban, hogy az $[Ca^{2+}]_i$

változásai és a foszfatázok aktivitása ugyanabban az irányban, vagy éppen egymással ellentétesen hatnak-e.

Jelen kutatási eredményeinkben kimutattuk, hogy a karcolt területekről származó sejtekben – az érintetlen területekről származó sejtekhez képest – a Ca^{2+} -oszcillációk frekvenciája szignifikánsan csökkent, illetve az oszcillációt mutató sejtek aránya is kisebb volt. Ezen oszcillációk jellegzetes paraméterei (amplitúdó, FTHM) azonban szignifikánsan nagyobbak voltak a karcolt területeken. E megfigyeléseink azt sejtetik, hogy a karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben a Ca^{2+} -felszabadulási folyamatok kevésbé gyakoriak, azonban ha kialakulnak, akkor hosszabb ideig tartanak, és nagyobb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásokat eredményeznek. Más sejtípusok – mint a Cajal, és az extraoculáris izomsejtek – szintén mutatnak az általunk megfigyelt tranziensekhez hasonló spontán kalciumszint emelkedéseket, ideértve az amplitúdójukat és az időbeli kiterjedésüket is.

Másrészről, a fehérjék foszforilációs szintjének emelése a Ser/Thr specifikus protein foszfatázok CLA-val vagy OA-val történő gátlásával növelte a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, valamint a kalcium oszcillációk frekvenciáját mind a karcolt, mind az érintetlen tenyészetek sejtjeiben. Azonban megemlítendő, hogy a karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben még így is kisebb volt az oszcillációk száma, mint a nem karcolt tenyészetekben. A foszfatázgátlók hatására történő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés összhangban áll előző kutatások eredményeivel, amelyek szerint a foszfatázok gátlása emelheti az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t és a kalcium belépését a sejtekbe, azáltal, hogy növelik a kalcium transzportban résztvevő fehérjék – úgymint a foszfolambán, a ryanodin receptor és a plazma membrán kalcium csatorna – foszforilációs szintjét. Karcolás nélküli tenyészetekben a Ca^{2+} -tranziensek jellemző paraméterei (amplitúdó, FTHM) CLA-val és OA-val történő kezelés után nagyobbak adódtak (kivéve a CLA hatását az FTHM-ra). Ezen paraméterek jelentősen megváltoztak, ha megkarcoltuk a foszfatázgátlóval kezelt sejttenyészetet. Összehasonlítva a nem karcolt tenyészetekből származó

eredményeket a karc mellett elhelyezkedő sejtek értékeivel, kizárhatjuk a foszfatázok és a karcollással kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ -változás közötti szinergista összefüggést. A karcollással kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedés mértékét nem serkentette jelentősen sem a CLA-val, sem az OA-val történő kezelés. A vizsgált paraméterek karcollás hatására megfigyelt változásai a foszfatáz inhibitorok alkalmazása után nem növekedtek, inkább vagy kisebbek lettek, vagy teljesen el is tűntek, annak ellenére, hogy a foszfatázgátlók alkalmazásának nem karcollt tenyészetekben hasonló hatása volt a vizsgált paraméterekre, mint a karcollásnak.

A még mindig fennálló fő kérdés, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ változásai és bizonyos fehérjék foszforilációs állapota hogy működhet közre a sebgyógyulás folyamatában a sejtek proliferációjára és migrációjára hatva. A jelenleg meglévő irodalmi adatok ellentmondásosak. Egyik oldalról leírták, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ hirtelen megnövekedése leállította a keratinociták irányított mozgását, valamint a miozin II megnövekedett foszforilációs szintje a megnövekedett stressz rost szintézissel együtt a hepatociták migrációjának csökkenését eredményezte. Másrészt a protein-szerin/threonin kináz inhibitorok fokozták a lammellipodiumok kialakulását és kiterjedését – azt a folyamatot, amelyet a keratinociták migrációjához és a seb gyógyulásához vezető események kezdeti jelének tartanak. Továbbá, a PP2A gátlása 10 nM okadánsavval a migráció mértékének növekedését eredményezte.

A sejtek mozgásához szükséges az aktin-citoszkeleton átrendeződése, amely magában foglalja az aktin-miozin stressz rostok kialakulását a 20 kDa-os miozin II könnyű lánc (MLC20) Ca^{2+} -függő foszforilációján és RhoA/Rho kináz által indukált miozin foszfatáz foszforiláción és inaktiváción keresztül. Kimutatták, hogy sebzést követően az MLC20 gyors foszforilációja megelőzi a sejtek polarizációjának megjelenését és a migrációt, amelyhez citoszolikus Ca^{2+} -beáramlás és a p38/MAPK aktivációja szükséges. Az MLC20 korai és gyors foszforilációja eredményezi a miozin IIA transzlokációját elsősorban a sejt felszínére, ahol ez az aktin-miozin kölcsönhatás a sebzett sejt membránjának

helyreállításában is részt vesz. Továbbá, a RhoA/Rho kináz működése nélkülözhetetlennek bizonyult a keratinociták kontrakciójában és irányított vándorlásában. Következésképpen azt várhatnánk, hogy a protein foszfatázok CLA-val vagy OA-val való gátlása kedvező hatással van a sejtek migrációjára az $[Ca^{2+}]_i$ növelésén keresztül, elindítva az MLC20 foszforilációját és a miozin foszfatáz szabályozó alegységének gátló foszforilációját. Mindemellett, jelen kísérleteinkben a CLA és az OA szemmel láthatóan megállította a keratinociták migrációját, mind a time-lapse, mind a Boyden-kamrás kísérletekben. A miozin foszforilációja fontos szerepet játszik a sejtek összehúzódási és elernyedési folyamataiban, különös tekintettel a nyúlványok retrakciójára, amelyhez az aktin-miozin komplex által kifejtett erő feltétlenül szükséges. A sejtek migrációjához szükséges az ismételt összehúzódási-elernyedési folyamat, illetve ehhez kapcsolódva az MLC20 ciklikus foszforilációja és defoszforilációja. Eredményeink megerősítik azt a feltételezést, hogy a foszfatázgátlók fenntartják az MLC20 foszforilált állapotát, állandósítva így az aktin-miozin komplexet, amely végül a migráció csökkenéséhez vezet.

Figyelembe véve ezeket az eredményeket, a sebzés szélén elhelyezkedő sejtekben megfigyelt csökkent kalcium oszcillációs aktivitás segítheti a keratinocitákat abban, hogy a sebzés során a sejtek között kialakult résbe vándoroljanak. Másrésről a $[Ca^{2+}]_i$ csökkenése előnyös lehet a keratinociták proliferációja szempontjából, mivel ezt a folyamatot a sejtekbe történő megnövekedett Ca^{2+} -beáramlás gátolja.



SZÉCHENYI TERV

Összefoglalás

Kísérleteinkben HaCaT keratinociták kalcium homeosztázisát vizsgáltuk fizikai károsító tényezők hatására. UV-B-besugárzás hatására az élő sejtek száma csökkent, zsugorodottá váltak, illetve elvesztették nyúlványaikat. Az UV-B sugárzás hatására csökkent a $P2X_1$ és $P2Y_2$ receptorok szintje, és alapvetően károsodtak a $P2X_7$ receptorok. A $P2Y_2$ receptorok számának csökkenése együtt járhat a sejtek életképességének csökkenésével, illetve a proliferáció vagy differenciálódás feletti kontroll elvesztésével, ami a sejtek malignus transzformációjához vezethet.

A purinerg receptor mintázat megváltozásával együtt megváltozott a keratinocitákban az ATP adagolással kiváltott kalcium tranziensek morfológiája is. A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ az UV-B sugárzással kezelt sejtekben alacsonyabb volt. Az apoptózis kiváltásáért felelős $P2X_7$ receptor UV-B sugárzás hatására degradálódott, és az ATP-vel indukált apoptózis mértéke is szignifikánsan kisebbnek bizonyult az UV-B-vel kezelt sejtek esetén, összehasonlítva a kontroll, besugárzást nem kapott sejtekkel.

A karcolt területekről származó sejtekben a Ca^{2+} -oszcillációk frekvenciája szignifikánsan csökkent, illetve az oszcillációt mutató sejtek aránya is kisebb volt ezeken a területeken. Ezen oszcillációk amplitúdói és FTHM értékei azonban szignifikánsan nagyobbak adódtak a karcolt területeken. Karcolás után a karc mellett helyet foglaló sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja szignifikánsan magasabb volt mind kontroll, mind foszfátázgátlóval történő kezelés után. Egyik foszfátáz inhibitorral való kezelés sem változtatta meg szignifikánsan a keratinociták nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ját.

Migrációs kísérleteinkben, bár a nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -t egyik foszfátáz inhibitor sem változtatta meg szignifikánsan, mindkét foszfátázgátló szer csökkentette a keratinociták migrációját.

Közlemények



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/201/2013.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

Jelölt: Ruzsnavszky Olga

Neptun kód: CM1WC1

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Ruzsnavszky, O.**, Dienes, B., Oláh, T., Vincze, J., Gáll, T., Balogh, E., Nagy, G., Bátor, R., Lontay, B., Erdődi, F., Csernoch, L.: Differential Effects of Phosphatase Inhibitors on the Calcium Homeostasis and Migration of HaCaT Keratinocytes.
PLoS One. 8 (4), e61507-, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0061507>
IF:4.092 (2011)
2. **Ruzsnavszky, O.**, Telek, A., Gönczi, M., Balogh, A., Remenyik, É., Csernoch, L.: UV-B induced alteration in purinergic receptors and signaling on HaCaT keratinocytes.
J. Photochem. Photobiol. B. 105 (1), 113-118, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.07.009>
IF:2.814

További Közlemények

3. Kistamás, K., **Ruzsnavszky, O.**, Telek, A., Kosztka, L., Kovács, I., Dienes, B., Csernoch, L., Józsa, T.: Expression of anti-Müllerian hormone receptor on the appendix testis in connection with urological disorders.
Asian J. Androl. 15 (3), 400-403, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/aja.2012.135>
IF:1.521 (2011)



4. Farkas, V., Szentandrassy, N., Bárándi, L., Hegyi, B., Ruzsnavszky, F., **Ruzsnavszky, O.**, Horváth, B., Bányász, T., Magyar, J., Márton, I., Nánási, P.P.: Interaction between Ca²⁺ channel blockers and isoproterenol on L-type Ca²⁺ current in canine ventricular cardiomyocytes.
Acta Physiol. 206 (1), 42-50, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1748-1716.2012.02448.x>
IF:3.09 (2011)
5. Kosztka, L., Rusznák, Z., Nagy, D., Nagy, Z., Fodor, J., Szűcs, G., Telek, A., Gönczi, M., **Ruzsnavszky, O.**, Szentandrassy, N., Csernoch, L.: Inhibition of TASK-3 (KCNK9) channel biosynthesis changes cell morphology and decreases both DNA content and mitochondrial function of melanoma cells maintained in cell culture.
Melanoma Res. 21 (4), 308-322, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1097/CMR.0b013e3283462713>
IF:2.187
6. Oláh, T., Fodor, J., Oddoux, S., **Ruzsnavszky, O.**, Marty, I., Csernoch, L.: Trisk 32 regulates IP3 receptors in rat skeletal myoblasts.
Pflugers Arch. 462 (4), 599-610, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00424-011-1001-y>
IF:4.463
7. Oláh, T., Fodor, J., **Ruzsnavszky, O.**, Vincze, J., Berbey, C., Allard, B., Csernoch, L.: Overexpression of transient receptor potential canonical type 1 (TRPC1) alters both store operated calcium entry and depolarization-evoked calcium signals in C2C12 cells.
Cell Calcium. 49 (6), 415-425, 2011.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ceca.2011.03.012>
IF:3.766

Összesített impakt faktor: 21.933

Összesített impakt faktor: (értekezés alapján szolgáló közlemények esetén): 6.906

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2013.05.28



Az értekezés témájához kapcsolódó előadások listája:

Olga Ruzsnavszky: HaCaT keratinocytes exhibit spontaneous intracellular calcium transients, Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen 2011. June 6-7

Olga Ruzsnavszky: Effect of UV-B irradiation on the expression of purine receptors of HaCaT keratinocytes, Gene-Environment Multidisciplinary Meeting, Szeged, 2010. July 5

Az értekezés témájához kapcsolódó posztterek listája:

M. Gönczi, A. Telek, **O. Ruzsnavszky**, L. Csernoch: „Effect of UVB irradiation on calcium handling and purinoreceptor expression of HaCaT keratinocytes” (Kyoto, Japan, 2008)

A. Telek, M. Gönczi, Á. Balogh, **O. Ruzsnavszky**, É. Remenyik, L. Csernoch: „Effects of UVB irradiation on the purinergic expression pattern of the HaCaT keratinocytes” (Purine Club Meeting, Leipzig, Germany, 2007)

Ruzsnavszky Olga, Oláh Tamás, Dienes Beatrix, Vincze János, Gáll Tamás, Balogh Enikő, Nagy Gábor, Bátori Róbert, Lontay Beáta, Erdődi Ferenc, Csernoch László: HaCaT keratinocitákon megfigyelhető spontán intracelluláris kalciumtranziensek és azok módosítása sebzéssel és foszfatáz inhibitorokkal (LXXVI. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Debrecen, 2012)

Ruzsnavszky O., Balogh Á., Telek A., Gönczi M., Remenyik É., Csernoch L.: „UV-B besugárzás hatása HaCaT keratinocyták purinoreceptor expressziójára” (LXXI. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Pécs, 2007)