

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

**AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUMHOMEOSZTÁZIS
SZABÁLYOZÁSA HUMÁN IMMORTALIZÁLT
KERATINOCYTÁKON**

Gönczi Mónika



Témavezető: Dr. Csernoch László

**DEBRECENI EGYETEM
ORVOS- ÉS EGÉSZSÉGTUDOMÁNYI CENTRUM
ORVOSTUDOMÁNYI KAR
ÉLETTANI INTÉZET
DEBRECEN, 2003**

TARTALOMJEGYZÉK

I. BEVEZETÉS

I.1. A kültakaró felépítése, funkciója és jellemzői	1
I.2. Jelátviteli útvonalak keratinocytákon	3
I.3. Purinoreceptorok	4
I.4. A proteinkináz C rendszer jellemzői és szerepe keratinocytákon	8
I.5. Belső raktárak által vezérelt csatornák (Store Operated Channels, SOC)	10
I.6. Mechanoszenzitív csatornák (MSC)	12
I.7. Szabadgyökök, oxidáns anyagok, NO és peroxinitrit	15

II. CÉLKITŰZÉSEK	17
------------------------	----

III. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

III.1. Sejtenyésztés	18
III.2. Intracelluláris kalciumkoncentráció mérés	19
III.3. Membránpotenciál regisztrálása konvencionális mikroelektrodával	21
III.4. Feszültség- és áram-clamp mérések	22
III.5. Western-blot analízis	22
III.6. Élő sejtszám meghatározása	23
III.7. Immunfluoreszcens vizsgálatok	24
III.8. Statisztikai analízis	25

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. A proteinkináz C rendszer hatása HaCaT keratinocyták transzmembrán kalciumáramaira.	26
IV.1.1. PMA előkezelés hatása az extracelluláris térből történő kalciumbeáramlásra	26
IV.1.2. PMA kezelés hatása a CPA-val indukált kalciumbelépésre	27
IV.1.3. PMA előkezelés hatása keratinocyták PKC izoenzimmintázatára proliferáló sejteken	28
IV.1.4. A kapacitív kalcium beáramlás módosulása konfluens sejtekben	29
IV.1.5. PMA kezelés hatása a PKC izoenzimmintázatra differenciálódó keratinocytákon	31
IV.2. Mechanoszenzitív csatornák szerepe a membránpotenciál kialakításában és a proliferáció szabályozásában in vitro HaCaT keratinocytákon.	32
IV.2.1. A hidrosztatikai nyomás hatása a keratinocyták elektrofiziológiai jellemzőire	33
IV.2.2. Hipotóniás oldatok hatása a membránpotenciálra	34
IV.2.3. Az ozmolaritás változásának hatása a membránon átfolyó áramokra	36

IV.2.4. A hipotóniás oldatok által okozott hiperpolarizáció függ az extracelluláris Cl ⁻ -ionok jelenlététől	37
IV.2.5. Hipotóniás stressz hatása az intracelluláris kalciumkoncentrációra	38
IV.2.6. Az ozmotikus stressz hatása a keratinocyták proliferációjára és differenciálódására	40
IV.3. Intracelluláris kalcium függő szabályozó folyamatok szerepe HaCaT keratinocyták oxidatív stresszel szembeni érzékenységében.	42
IV.3.1. Peroxinitrit hatása a kalcium influx mechanizmusokra keratinocytákon	43
IV.3.2. A SIN-1 intracelluláris kalciumkoncentrációra kifejtett hatása HaCaT keratinocytákon	45
V. MEGBESZÉLÉS	
V.1. Kapacitatív kalciumbeáramlás HaCaT keratinocytákon	47
V.2. PKC izoenzimintázat módosulása a differenciálódás előrehaladtával	48
V.3. Az IP ₃ -útvonalhoz kapcsolódó tényezők jellemzői proliferáló és differenciálódó keratinocytákon	50
V.4. Mechanoszenzitív csatornák szerepe tenyésztett keratinocyták elektrofiziológiai tulajdonságaiban és kalciumhomeosztázisában	51
V.5. Hipotóniás stressz hatása a keratinocyták proliferációjára és differenciálódására	54
V.6. Peroxinitrit és SIN-1 hatása keratinocytá sejtvonalon	56
VI. ÖSSZEFOGLALÁS	58
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	61
IRODALOMJEGYZÉK	62
KÖZLEMÉNYEK	72
AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ, NYOMTATÁSBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK KÜLÖNLENYOMATAI	74

I. BEVEZETÉS

I.1. *A kültakaró felépítése, funkciója és jellemzői*

A bőr szervezetünk egyik legfontosabb szerve a külvilágból érkező ingerek felvételében, valamint a környezet károsító anyagaival és hatásaival szembeni védekezésben. Ez a mechanikai és kémiai szempontból ellenálló szerv az egyedfejlődés során a külső csíralemez sejtjeiből alakul ki. A testfelszíntől befelé haladva három rétegből, a külső epidermiszből, a középső irharétegből (dermis vagy corium) és az alatta lévő, főleg zsírszöveti állományból (subcutis) épül fel. Míg a külső réteg sejtjei a bőr barrier funkciójának kialakításában fontosak, addig az irharéteg az előző sejtek táplálásában vesz részt gazdag vérellátásának köszönhetően. Emellett a dermis fontos szerepet játszik a külvilág ingereinek felvételében és azoknak a központi idegrendszer felé történő továbbításában is különböző érzékelő apparátusok (receptorok és szabad idegvégződések) révén. A dermis jelentősége nem elhanyagolható a külső ártalmas behatásokkal szembeni védekezés során sem, amelyet különböző funkciójú sejtjei biztosítanak. Ezek részben a megfelelő rugalmasságot adó kollagént (fibroblastok és fibrocyták), és az allergiás folyamatokban szerepet játszó hisztamint termelik (hízósejtek), illetve fagocitózisra képesek (histiocyták). Az irharéteg sejtközötti állománya jelentős mennyiségű víz megkötésére képes. A véretek speciális elhelyezkedése, valamint a subcutis tulajdonságai biztosítják azt, hogy a bőr a szervezet hőháztartásának szabályozásában is részt vesz. A kültakaró legalsó rétege emellett a mechanikai védelemben és az energiaraktározásban is bekapcsolódik.

Kísérleteink elsősorban az epidermisz sejtjeinek vizsgálatára irányultak. Az emberi bőrben ezek a sejtek elszarusodó, többrétegű laphámmá szerveződnek. Az epidermisz 5 sejtrétegből épül fel, ezek kívülről befelé haladva a következők: az

elszaruosodó sejtek rétege (stratum corneum), a fénylő sejtek rétege (stratum lucidum), a szemcsés sejtek rétege (stratum granulosum), a nyúlványos sejtek rétege (stratum spinosum) és a hengeres sejtek csoportja (stratum bazale vagy stratum germinativum). Tulajdonképpen minden réteg keratinocytákból épül fel, ám ezen sejtek rétegenként eltérő felépítésűek, eltérő osztódási (proliferációs) képességgel rendelkeznek, más-más funkciókat látnak el és különböző fejlettségi (differenciáltsági) állapotúak.

Az alsó, hengeres sejtek nagy proliferációs képességgel rendelkeznek, folyamatos osztódásuk révén utánpótlást biztosítanak a felsőbb rétegek számára. A nyúlványos sejtek rétegében nemcsak a sejtek alakja módosul a kiindulási állapothoz képest, hanem egyre nagyobb mennyiségben termelődnek a keratinocyták differenciálódását jelző anyagok (keratin-1, keratin-10) is. A szemcsés sejtek elnevezésüket onnan kapták, hogy citoplazmájukban igen nagy számban található olyan képletek, melyek fénymikroszkópban apró szemcséknek látszanak. Ezek olyan sejtorganellumok (poliriboszómák, endoplazmatikus retikulum, Golgi-apparátus és lizoszómák), melyekben a riboszómákban elkészült fehérjék (involukrin, fillagrin, loricrin) poszttranszlációs átalakulási folyamatai zajlanak. Mindezek megléte intenzív metabolikus folyamatokat is jelez. A következő rétegben a nagy mennyiségben felhalmozódó keratin szinte teljesen elfedi a sejtorganellumokat, a sejt belsejének törésmutatója megváltozik és tulajdonképpen egy egynemű, egyetlen fényes egységnek látszó képletet kapunk, amikor metszetben vizsgáljuk az epidermisznek ezt a rétegét. Ezzel együtt elindulnak azok a folyamatok is (pl. a transzglutamináz aktivitás fokozódása), amelyek a különböző anyagokat szintetizáló és a sejtet fenntartó mechanizmusok megszűnését eredményezik. Ez a sejtréteg a kültakaró legfelső részét alkotja, ahol elhalt, szaruanyaggal telített sejtmaradványokat találunk. Ez az állomány a külső környezetből származó hatások miatt, illetve a bőr alsóbb rétegeiből felszínre jutó

sejtek taszító hatásának következtében leválik, lehámlik a testfelszínről. Ennek köszönhető a bőr folyamatos megújulása, aminek következtében kültakarónk biztosítja az állandó védelmet és a külvilággal való kapcsolattartást.

A hámréteg vastagságát, benne a sejtek osztódását és szintetizáló folyamatait számos tényező befolyásolja (életkor, fokozott mechanikai igénybevétel, kórokozók és vegyi anyagok jelenléte). Ugyancsak az epidermiszhez kötött a pigmenttermelés is, amit speciális sejtek, a melanocyták végeznek, melyek ezáltal hatásosan védik a szervezetet a bőr mélyebb rétegeibe hatoló és ott gyulladást keltő ultraibolya (UV) sugarakkal szemben.

I.2. Jelátviteli útvonalak keratinocytákon

A keratinocyták mellett, hogy a hámszövet alkotórészeként természetes barrier funkciót töltenek be, immunológiai szereppel is bírnak, amelyet többek között különböző citokinek (pl. interleukinok) szintézise jelez. Sejtfelszíni antigéneket (fő hisztokompatibilitási komplex, MHC-II) prezentálnak, képesek migrációra és fagocitózisra, amely előnyös tulajdonság a fertőző ágensekkel szembeni védekezés során. Citoplazmájukban növekedési faktorok (epidermális növekedési faktor, EGF) termelése zajlik, de a felszíni membránjukban lévő specifikus receptorok jelenléte miatt reagálnak is ezekre az anyagokra. Részt vesznek a sérüléseket követő sebgyógyulás kivitelezésében, de fontosak a hiperproliferatív bőrbetegségek (psoriasis) kialakításában is.

A jelátviteli folyamatok széles skáláját írták már le a keratinocytákon. Mind az inozitol-triszfoszfát (IP₃) rendszert, mind a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP)- és a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) útvonalat aktiváló anyagok hatnak ezeken a sejteken. Megtalálhatók rajtuk olyan sejtfelszíni receptorok is, amelyek tirozin-kináz

aktivitással rendelkeznek. A foszfatidil-inozitol (PI) útvonalat aktiváló szerek közé tartozik keratinocytákon az adenzin-trifoszfát (ATP) és a bradykinin (ez utóbbi a keratinocyták DNS szintézisét fokozza), előbbi szerepéről és jellemzőiről a bevezetés későbbi részében (ld. I/3.) részletesebben is szó lesz. A katekolaminok és a H₂-receptorhoz kapcsolódó hisztamin G-proteinek közvetítésével az adenilát-cikláz enzimet aktiválják, ezáltal fokozódik a sejt citoplazmájában a cAMP mennyisége, mely elsősorban a proteinkináz A (PKA) enzimszisztéma szabályozásában játszik szerepet. A guanilát-cikláz szolubilis formájának megléte szükséges ahhoz, hogy keratinocytákon a NO vagy az arachidonsav hatását ki tudja fejteni. Ez utóbbi anyag nagyobb mennyiségét írták le psoriasis esetében. Ugyanezen hiperproliferatív bőrbetegségben mutatták ki az EGF és a Transforming Growth Factor- α (TGF- α) overexpresszióját is. Mindkét anyag specifikus receptora tirozin-kináz aktivitással rendelkezik és ugyanez jellemző a különböző citokinek (például interleukinok) receptoraira is.

I.3. *Purinoreceptorok*

Az ATP-ről már számos közleményben leírták, hogy kotranszmitterként szabadul fel az idegvégződéseknél (például a gyomor-bél traktusban, szimpatikus és paraszimpatikus szinapszisokban). Az epidermiszben elsősorban sérüléseket követően nő meg a koncentrációja, hiszen mind a keratinocytákban, mind a kültakaró kötőszöveti állományában található hízósejtekben nagy mennyiségben van jelen ez az adenzinvegyület. Ráadásul a sérült érszakasznál felgyülemelő, és a vérzéscsillapításban elengedhetetlen szerepet játszó vérlemezkék granulumaiból is jelentős koncentrációban szabadul fel ATP.

Megállapították, hogy purinszármazékok hatására vagy csökken a neurotranszmitter felszabadulása, vagy fokozódik az ingerületátadás. Feltételezték tehát

(Burnstock, 1972), hogy kétféle specifikus receptor (ún. purinoreceptor) létezik, az egyik elsősorban a preszinaptikus felszabadulás szabályozásában játszik fontos szerepet, s a negatív feedback mechanizmus egyik tagja (P_1 purinoreceptor), míg a másik csoportba tartozó jelfogó molekulák elsősorban a posztszinaptikus membránban találhatók és stimuláló hatásúak az ingerületáttevődési folyamatban (P_2 purinoreceptorok). Aktiválhatóságuk tekintetében is elkülöníthetők a két populáció tagjai, hiszen a P_1 receptornak az adenzin az endogén agonistája, működése az adenilát-cikláz enzimhez kötött és a metilxantinok alacsony koncentrációban kompetitív gátlószerei.

A P_2 receptorok csoportjánál ezzel szemben aktiváló hatást elsősorban az ATP és az ADP fejt ki. E csoporton belül további 2 alcsoportot (Burnstock és Kennedy, 1985) lehet megkülönböztetni (1. ábra): vannak olyan tagok, melyek ligandkötő ioncsatornaként funkcionálnak (P_{2X} ionotróp receptorok), míg mások 7 transzmembrán domént tartalmazó, receptor funkciót betöltő egysége G-protein közvetítésével képes az agonisták által kiváltott válasz kialakítására (P_{2Y} metabotróp receptorok).

A P_{2X} ionotróp receptorok (North, 2002) két olyan doménnel rendelkeznek, melyek átívelik a sejtmembránt. A molekula egy ciszteinben gazdag, nagy extracelluláris hurkot is tartalmaz. Az eddig azonosított 7 altípus szöveti, szervi lokalizációja igen változatos (központi idegrendszer szenzoros magvai és egyéb területei, mikroglia sejtek, simaizom, thymus, vérerek, mellékvesevelő, uterus mirigysejtei, ovárium granulosa sejtjei, bronchus epitélium, here, nyálmirigyek acinus sejtjei stb.). Működésüket tekintve ligandfüggő kationcsatornák, melyek Ca^{2+} -ra és Na^+ -ra vonatkoztatott permeabilitása az egyes altípusoknál eltérő. Aktivációjuk, illetve deszenzitizációjuk változatos képet mutat. ATP-vel szembeni érzékenységük szintén nem azonos és emellett számos más agonistát (2-metilthio-ATP, 2-kloro-ATP, ADP,

ATP γ S, α,β -metilén-ATP) leírtak már. Minden egyes tag esetében hatásos néhány természetes antagonistá (suramin, piridoxál foszfát-6-azo(benzén-2,4-diszulfonsav)).

A P_{2Y} metabotróp receptorok G-proteineken keresztül képesek további enzimeket aktiválni, melyek közül leginkább a G_P-kapcsolt foszfolipáz C (PLC) útvonal ismert a purinoreceptorokkal kapcsolatban, habár felmerült annak a lehetősége is, hogy egyes receptorok a G_I-típusú proteinen keresztül az adenilát-cikláz enzim gátlását okozzák. A receptormolekulák háromdimenziós szerkezete még nem teljesen ismert, bár számos laboratóriumban már sikerült azonosítani bizonyos altípusoknál az ATP- és foszfát-kötőhelyet. Közleményekben eddig 8 altípust írtak le, amelyek előfordulása a szervezetben a P_{2X} receptorokhoz hasonlóan nagyon változatos (simaizom, vérerek endotél sejtjei, endokrin és exokrin mirigysejtek, hepatocyták, neutrofil granulocyták és lymphocyták, gliasejtek, központi idegrendszer különböző sejtjei, stb.). Az ATP, a 2-metilthio-ATP és az ADP mindegyik tagnál hatásos agonista, míg az UTP, az α,β -metilén-ATP és a 2-MeSATP csak bizonyos altípusoknál és ott is eltérő affinitással képes a receptort aktiválni. Minden esetben hatásos gátlószernek bizonyult a suramin és a reaktív blue-2. Farmakológiai befolyásolhatóságuk azonosítását megnehezíti, hogy a legtöbb vizsgált szövet- vagy sejtfeleségen nem csak egy altípus van jelen. Ma azonban már rendelkezésre állnak specifikus, az egyes altípusok ellen nyúlban termeltetett antitestek, melyek segítségével viszonylag egyszerűen lehet azonosítani az adott sejten megtalálható receptorformákat.

Számos közleményben bizonyították (Pillai és Bikle, 1992), hogy keratinocytákon az ATP specifikus purinoreceptorához kapcsolódva a PLC enzimet aktiválja, ezen keresztül az intracelluláris térben megnöveli az IP₃ és a diacilglicerol (DAG) koncentrációját. Az endoplazmatikus retikulum (ER) ezekben a sejtekben belső kalciumraktár funkciót is ellát, felszínén IP₃-receptorokat találunk, amelyeken keresztül,

a megfelelő agonistával (IP_3) történő aktiválás után, kalcium lép ki a citoplazmába, megnövelve a sejten belüli kalciumkoncentrációt ($[Ca^{2+}]_i$). Számos sejttípusban az intracelluláris kalciumkoncentráció illetve annak megváltozása fontos szabályozó szerepet tölt be különböző sejtfolymatokban (pl. proliferáció és differenciálódás). Keratinocytákban a kalciumszint kismértékű, rövid idejű (tranziens) emelkedése a sejtosztódást serkenti, míg a hosszú ideig fennmaradó, magas $[Ca^{2+}]_i$ a végső fejlődési stádium felé viszi a sejteket (Bikle és Pillai, 1996). Az $[Ca^{2+}]_i$ változása emellett a kalcium-dependens enzimek szempontjából sem elhanyagolható, hiszen ezen katalizátorok szabályozó szerepe jelentős az adott sejt állapotának, funkciójának kialakításában. A folyamat során az IP_3 mellett felszabaduló DAG a proteinkináz C (PKC) enzimek aktiválásában kap kitüntetett szerepet (ld. I/4.).

Intézetünkben korábban már történtek mérések $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést kiváltó anyagokkal keratinocytákon. Mint azt Bíró és munkatársai (1998) megállapították a rövid ideig alkalmazott ATP és bradikinin ismételhető, tranziens jellegű $[Ca^{2+}]_i$ -növekedést okoz az immortalizálódott keratinocytákból származó HaCaT sejtvonal esetében. A kialakult válaszok alapján a sejteket két különálló csoportba tudták besorolni: a keratinocyták 53%-ánál a meghatározott időközönként ismételt ATP stimulust követően egyre kisebb amplitúdójú $[Ca^{2+}]_i$ -változást tapasztaltak. A sejtek másik részében az ismételten kiváltott tranziensek között szignifikáns különbséget nem regisztráltak. Az első populációban az intracelluláris kalciumszint-emelkedések félértékszélessége nagyobb, míg a felszálló szár meredeksége kisebb volt, mint a másik csoportnál. A bradikinin esetében a sejtek egy részében deszenzitivizációt tapasztaltak. Az eredmények tehát arra utaltak, hogy a keratinocyták sejtfolymataiban bekövetkező változások nem egységesekek a foszfinozitol mechanizmust aktiváló különböző agonisták esetében.

I.4. A proteinkináz C rendszer jellemzői és szerepe keratinocytákban

A PKC rendszer elemei a szerin/threonin kinázok csoportjába tartoznak, amelyek központi szabályozó szerepet játszanak számos sejtípus működésében (Nishizuka, 1988, 1992; Ohno és mtsai, 1991). Jelenleg 11 különböző izoenzimet ismerünk (2. ábra), amelyeket a kalcium- és forbolészter-dependens, „klasszikus” (PKC α , β I, β II, és γ , mint cPKC-k), a kalciumtól független „új típusú” (PKC δ , ϵ , η , és θ , mint nPKC-k), a kalcium- és forbolészter-independens „atípusos” (PKC ζ és λ /I, mint aPKC-k) családokba osztották be. Külön „csoportba” tartozik a PKC μ izoenzim. A fent említett anyagokkal (kalcium, forbolészter) való aktiválhatóságuk a szekvenciájukban megtalálható specifikus kötőhelyek meglétével magyarázható, míg ezen domének hiányában az adott anyag nem szükséges az enzim működéséhez. Az izoenzimformák jellegzetes eloszlási mintázatot mutatnak a különböző sejtekben, és a proliferációban illetve differenciálódásban betöltött szerepük is eltérő (Ohno és mtsai, 1991; Goodnight és mtsai, 1994, 1995). Ismert az is, hogy egy adott válasz kialakítása nem csak bizonyos PKC izoformák aktiválódásához kötött, hanem a különböző típusok akár antagonisztikus hatásúak is lehetnek (Mischak és mtsai, 1993; Murray és mtsai, 1993; Brodie és mtsai, 1998), ami az egyes izoenzimek eltérő szabályozó funkciójára utal.

Az intézetünk által publikált (Papp és mtsai, 2002) és az irodalomban számos helyen megtalálható eddigi eredmények alapján kijelenthetjük, hogy a PKC rendszernek kulcsszerepe van a keratinocyták osztódási- és fejlődési folyamataiban is. Mind normál humán epidermális sejteken (NHEK), mind egérből származó keratinocytákon számos enzimforma expresszálódik. Az α , β , γ , δ , ϵ , η és ζ izoenzimek jelenléte jól dokumentált (Dlugosz és mtsai, 1992; Fischer és mtsai, 1993; Denning és mtsai, 1995; Lee és mtsai, 1998), míg egyes izoformákat (PKC β , γ és η) csak bizonyos, nem humán eredetű keratinocytán mutattak ki (Fischer és mtsai, 1993; Rennecke és mtsai, 1996).

Megfigyelték azt is, hogy a PKC izoenzimek expressziós szintje és a jelenlévő formák sejten belüli (szubcelluláris) lokalizációja módosul a kalcium- és a magas sejtszám által indukált differenciálódás során (Denning és mtsai, 1995; Lee és mtsai, 1998). Ezen változások az enzimek aktivációját kísérő folyamatok. Intézetünkben azt az eredményt kapták, hogy a PKC rendszer aktivitásának forbol 12-mirisztát 13-acetáttal (PMA) történő módosítása a proliferációt csökkentette, ezzel egyidőben pedig terminális differenciálódást indukált HaCaT sejtvonalon. Ezt az irodalomban már leírták egérből származó epidermális sejteken, valamint NHEK sejteken is. A proteinkináz C aktivitás gátlása egy specifikus inhibitorral, a GF109203X anyaggal, megváltoztatja a különböző differenciálódási markerek szintjét és a sejtosztódást segíti elő. Mindezen megfigyelések alapján feltételezik (Papp és mtsai, 2002), hogy az endogén (konstitutív) PKC aktiváció szintén befolyásolja a sejtben zajló folyamatokat.

A normál humán keratinocyták modelljeként elfogadott HaCaT sejteken már történtek vizsgálatok ezen szabályozó rendszer feladatának feltérképezésére. A PKC izoenzimek gátlása morfológiai változásokat eredményez a tenyésztett sejteknél, azzal együtt, hogy megváltoztatja a differenciálódási markerek mennyiségét is (Hegemann és mtsai, 1992). Valószínű, hogy a sejtvonal fokozott proliferációs képessége együtt jár a PKC δ szintjének módosulásával (Geiges és mtsai, 1995). Ezen ismeretek ellenére az izoenzimek sejtosztódási- és differenciálódási folyamatokban, a sejtmembránban található különböző receptorok és ioncsatornák működésében, valamint a kalciumhomeosztázist befolyásoló eseményekben betöltött szerepe még nem teljesen ismert.

I.5. Belső raktárak által vezérelt csatornák (*Store Operated Channels, SOC*)

Minden sejt, így a keratinocyták életében és működésében is az egyik legfontosabb szabályozó tényező a sejt környezetének és citoplazmájának a kalciumszintje. Az $[Ca^{2+}]_i$ növekedése kalcium-dependens enzimek aktiválása révén képes megváltoztatni a sejt metabolikus folyamatait, befolyásolhatja a transzkripciós eseményeket és képes megváltoztatni a sejtmembrán csatornáinak, receptorainak az állapotát. Az intracelluláris tér kalciumkoncentrációja növekedhet a belső raktárakból történő kalciumfelszabadulás révén, amelyet megfelelő receptorok (pl. P_{2Y}) aktiválása, valamilyen másodlagos hírvívó molekula (pl. IP_3) keletkezése és ez utóbbinak a belső kalciumraktár (endoplazmás retikulum) membránjának specifikus receptorához (pl. IP_3 -receptor) történő kötődése előz meg. Másrészt viszont az extracelluláris térből is juthat be kalcium az intracelluláris térbe különböző specifikus vagy nem specifikus csatornákon keresztül. Ezek a csatornák lehetnek ionotróp receptorok (pl. P_{2X} receptor), feszültségfüggők (pl. feszültségfüggő kalciumcsatorna), illetve aktiválhatják őket a citoplazmában lezajló változások (pl. $[Ca^{2+}]_i$ növekedése).

Az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*) szemében található specifikus fehérje (Tranziens Receptor Potenciált, TRP-t létrehozó fehérje) vizsgálata során jutottak el ahhoz a felfedezéshez, hogy a felvillanó fény hatására aktiválódó fehérje Ca^{2+} -ot és más kationokat enged be az adott sejtbe, depolarizálva azt. A további vizsgálatok során kiderült, hogy ezek a fehérjék 6 transzmembrán szegmenssel rendelkező ioncsatornák, s így a feszültségfüggő, Shaker típusú K^+ -csatornával, a hiperpolarizációval indukált-ciklikus nukleotidok által nyitott (HCN) csatornákkal, a ciklikus nukleotidokkal aktiválható (CGN) csatornákkal, valamint a policisztinekkal (PKD) állnak rokonságban. A PLC- γ szerepe és az, hogy a belső raktárakból történő kalciummobilizálás milyen módon képes aktiválni a membránon keresztül történő kalciumbelépést az intracelluláris

térbe (kapacitív kalcium beáramlás, CCE) egyelőre nem kellően tisztázott. Abban az esetben, ha ez a csatorna elsősorban Ca^{2+} -ionokat enged be a külső térből, akkor az általa létrehozott áramot I_{CRAC} -nek (Calcium Release Activated Calcium Current) nevezzük. Hasonló jelenséget számos sejtfeleségen tapasztaltak már (Lewis, 2001; Clapham, 2002) és úgy tűnik, hogy a csatornák működése összefüggésben van a kalciumraktárak $\text{PLC}\beta$ által mediált kiürülésével, a G-proteinek aktiválódásával, valamint a $\text{PLC}\gamma$ által katalizált foszforilációs mechanizmusokkal. A kalciuminflux első része egy intenzív, receptor által közvetített, tranziens intracelluláris kalciumszint emelkedésnek felel meg, amit egy magas platóval rendelkező, elhúzódó ionbeáramlás (kalciumbeáramlás) követ. Ez utóbbi mértéke, nagysága az extracellulárisan jelenlévő kalcium függvénye. A kalciumbelépési mechanizmusokat kialakító elemek jelentős részét a belső raktárak által vezérelt csatornák (Store Operated Channels, SOC) képviselik.

Több sejten történtek kísérletek a fent említett mechanizmusok és a proteinkináz C rendszer kapcsolatának tanulmányozására. Humán T-sejteken (ahol szinte elsőként írták le a Calcium Release Activated Calcium (CRAC)-csatornák meglétét) azt tapasztalták, hogy forbolészter (pl. PMA) kezelés hatására nőtt a csatornák száma, s ezt fiziológias körülmények esetén, T-sejt aktiváció során is kimutatták (Fomina és mtsai, 2000). Hasonló eredményeket kaptak inzulint szekretáló sejtvonal (Bode és mtsai, 1994), alveoláris makrofágok (Sun és mtsai, 1999) és patkány mikroglia (Hahn és mtsai, 2000) sejteknél is. Ellentétes hatásokról is beszámoltak a PKC rendszer aktiválásakor mezangiális sejteken (Mene és mtsai, 1997), HL-60 promyelocytákon (Lee és mtsai, 1997) és kínai hörcsög petesejtjein (Petersen és mtsai, 1994).

Intézetünkben már történtek kísérletek a kalciumfelszabadulás által indukált kalciumbeáramlás vizsgálatára (Csernoch és mtsai, 2000). A publikált eredmények

szerint ATP hosszan tartó adagolása HaCaT sejteken kétfázisú $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedéseket váltott ki extracelluláris kalcium jelenlétében. Az első komponens az intracelluláris raktárból történő kalciumfelszabadulás eredménye volt, hiszen abban az esetben is megfigyelték, amikor az extracelluláris oldatot $CaCl_2$ nélkül, etilén-glikol-bis-N,N,N',N'-tetraecetsav (EGTA) hozzáadásával készítették el. A második fázist csak külső kalcium jelenlétében detektálták, ráadásul az ott megfigyelt $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés mértéke annál nagyobb volt, minél magasabb volt az alkalmazott extracelluláris oldat kalciumtartalma. Mindezen megfigyelésekből a szerzők arra következtettek, hogy az ATP hatására kialakuló válasz második részét az adenzin vegyületre nem specifikus mechanizmusok hozták létre. Azaz az intracelluláris raktárból történő kalciumfelszabadulás a sejtfelszíni membránon át zajló kalciumbeáramlási folyamatokat indukált. Ugyanezt az eredményt kapták abban az esetben is, amikor a kalciumraktárt egy Ca^{2+} -ATP-áz gátlószerrel (ciklopiazonsav, CPA) ürítették ki. Valószínű tehát, hogy keratinocytákon szintén megtalálhatók a kalciumfelszabadulással indukálható kalciumbelépési mechanizmusok.

I.6. *Mechanoszenzitív csatornák (MSC)*

A mechanoszenzitivitás általános jellemzője az élő szervezeteknek és sejteknek. A mechanikai ingerek felfogása és azoknak a sejt belseje felé történő közvetítése a mechanoszenzitív ioncsatornához kötött, amelyek jelenlétét számos sejt típuson leírták (Sackin, 1995). Elnevezésük onnan ered, hogy a csatornák nyitvatartási valószínűsége megváltozik a membránt ért mechanikai hatás következtében. Amennyiben a membrán mechanikai deformációjának hatására a csatornák hosszabb ideig vannak nyitott állapotban stretch-aktivált csatornákról (SAC) beszélünk. Ezzel szemben, ha a zárt állapot időtartama növekszik meg, akkor stretch-inaktivált csatornákkal (SIC) van

dolgunk. Pontos funkciójukat még nem határozták meg, változatos előfordulásuk azonban arra enged következtetni, hogy sokféle szabályozó folyamat részesei. Megtalálhatók a hallórendszerben, a mechanoreceptoroknál, az izomorsóban, az endotéliumban és más neuroszenzoros egységeknél (Sachs és Morris, 1998). Kimutatott jelenlétük nem-excitábilis sejteken, mint a vér- és epitelsejtek felszínén, ezek szintén képesek mechanikai stimulusokra válaszolni. A mechanikai ingereket átalakító berendezések még nem teljesen karakterizáltak, de működésük szorosan összefügg a citoskeletonnal (aktinhoz és tubulinhoz kötött transzporterek), valamint sejt felszíni proteinekkal (integrinek) és más ioncsatornákkal. MSC csatornát már sikeresen klónoztak baktériumból és *C. elegans*-ból (Sachs és Morris, 1998). A rövid (kb. 15 kDa) alegységek, amelyeket az *MscL* gén kódol, multimer formába rendeződnek a sejt centrális régiójában és innen kerülnek a sejtmembránba. Aktiválódásuk nemcsak a sejt térfogatának megváltozása esetén jöhet létre, hanem a membrán feszülésében bekövetkező változás hatására is.

Az eddig rendelkezésre álló információk alapján a mechanoszenzitív csatornákat 5 csoportra osztották. Az *SA-kation csatornák*, mint azt elnevezésük is mutatja, kationokra szelektívek, single channel konduktanciájuk Na^+ -ra illetve K^+ -ra 25 ill. 35 pS. Jelentős permeabilitást mutatnak divalens kationokra, így Ca^{2+} -ra. Előfordulnak a corneában, neuroblasztóma sejteken, a plexus chorioideusban, vesesejteken, aorta endotelsejtjein, kétélűek simaizmában. A sejtterefogat szabályozásában, a morfogenezisben, az endotelsejtek nyíróerőre adott válaszában kialakításában és növényi sejtek geotrófikus válaszaiban is részt vesznek. Az *SA-K⁺ csatornák* elsősorban K^+ -ra permeábilisak (SAKs), de kalciummal szemben mutatott érzékenységük alapján 2 újabb csoportra oszthatók. A Ca^{2+} -inszenzitív forma single channel konduktanciája 33 pS, 2 nyitott és 3 zárt állapota ismert. Ezt a formát először puhatestűek

szívizomsejtjein azonosították A Ca^{2+} -szenzitív alak mechanikai hatásra maxi-kálium áramot hoz létre, amely meredek feszültség- és kalciumfüggést mutat. Az *SA-anion csatornák* közel sem olyan gyakori előfordulásúak, mint az előző két család tagjai. Magas, 300 pS single channel konduktanciát mutatnak, működésük kémiai anyagokkal is befolyásolható. A következő a *nem szelektív SA-csatornák* csoportja, amely ritkán fordul elő eukariótákban és hipozmotikus oldattal aktiválható. Kalciummal és monovalens kationokkal szemben permeábilis, 36 pS konduktanciával jellemezhető. Az utolsó csoportot a *Stretch-Inaktivált (SI) csatornák* alkotják, amelyeket izomdisztrófiás egerekben írtak le. Valószínűleg ezek SA-tól eltérő nyitvatartási valószínűsége és kalcium iránti érzékenysége a felelős az mdx-egerek myotubulusainál megfigyelhető alacsony intracelluláris kalciumszintért.

Sok anyagot azonosítottak már, melyek képesek aktiválni illetve gátolni mechanoszenzitív csatornákat, de csoportspecifikus vegyületet eddig nem dokumentáltak. A gadolínium a La^{3+} -hoz hasonló trivalens kation, amely 100 μM -os koncentráció felett hatásosan gátolja elsősorban a SAK-ot, de emellett a feszültségfüggő kalciumcsatornák aktivitását is csökkenti. Hatását egyrészt a nyitott csatorna megfelelő helyéhez kötődve fejti ki, másrészt nagyobb mennyiségben denaturációt is okozhat. Ugyancsak inhibitor hatású az amilorid pl. cochleáris szőrsejteken, *Xenopus* oocytáinak SAC csatornáin, puhatestű neuronok SAK-jain. Valószínű, hogy itt több molekula bekötődése szükséges a gátló hatás kialakításához. A kation típusú antibiotikumok (streptomycin, neomycin, gentamycin, amikacin, kanamycin) a mechanotranszdukción kívül kalciumcsatornák működését is gátolják, SAC esetében pedig egy szubkonduktancia állapotot alakítanak ki, így csökkentve a csatorna vezetőképességét. Kötőhelyük a csatorna membránon átívelő szakaszán található, a gátló hatás kialakulása

pedig erősen feszültségfüggő folyamat. A különböző peptidek (mérgek) blokkoló hatása leginkább hisztokémiai kísérletekkel vizsgálható.

Mivel a humán keratinocyták szinte állandó mechanikai stressznek vannak kitéve, számos kutató számára, beleértve a mi munkacsoportunkat is, érdekesnek tűnt megvizsgálni az ilyen típusú hatásokra kialakuló, a sejt válasza során bekövetkező változásokat. Patch-clamp vizsgálatok segítségével kation- és anionszelektív csatornákat azonosítottak keratinocytákon (Galiotta és mtsai, 1991). Konduktanciájuk alacsony (18 pS) illetve magas (150-200 pS) lehet, a kalciumkoncentrációra általában érzékenyen reagálnak vagy feszültségfüggést mutatnak. Feltételezhető, hogy a mechanikai behatásokra reagáló csatornák összefüggésbe hozhatók a membránpotenciál megváltozásával is adott körülmények között (simaizomsejtek stretch-indukálta depolarizációja, könnymirigyek Ca^{2+} -dependens K^+ és Cl^- áramainak szerepe a hipotóniás oldattal indukált térfogatszabályozásban).

I.7. Szabadgyökök, oxidáns anyagok, NO és peroxinitrit

A reaktív oxigén vegyületeknek (ROS) szerteágazó szerepe van a normál és patológiás folyamatokban. Összefüggésbe hozhatók a tumorgenezissel, az öregedéssel, valamint a neurológiai betegségek széles körével (Alzheimer kór és Parkinson kór). Minden sejtre jellemző a szabadgyökök szintézise a normál metabolikus folyamatok során. Valószínűleg számos citokin, hormon és növekedési faktor fokozza ezen oxidáns anyagok azonnali, tranziens vagy hosszan elnyúló expresszióját. A szervezet növekedése során is fontos a reaktív oxigén, hiszen másodlagos hírvivőként különböző enzimek, transzkripció faktorok, növekedési faktorok termelését befolyásolja, valamint apoptózist képes kiváltani. Összehasonlítva a fagocitákkal, amelyekben az erősen szabályozott, sejtspecifikus NADPH oxidációs rendszer jelentős szerepet kap, a

bekebelezést nem végző sejtek alacsony mennyiségű ROS-t termelnek. Több, reaktív oxigénmolekulákat szintetizálni képes organelumot írtak már le az irodalomban. Ilyen, egyebek között, a sejtmembrán, a mitokondrium, az endoplazmatikus retikulum és a peroxiszóma., amelyekben számos különböző enzim játszik szerepet ezen folyamatokban (NAD(P)H oxidáz, citokróm oxidáz, citokróm P450, xantine oxidáz, monoamin oxidáz, ciklooxigenáz és lipoxigenáz).

A szuperoxid anion (O_2^-) és a nitrogén-monoxid (NO) reakciójával kialakuló peroxinitrit anion ($ONOO^-$) és ennek konjugált savas formája, a peroxinitrites sav ($ONOOH$, $pK_A=6,8$) *in vivo* kísérletekben potenciális oxidáns anyagoknak bizonyultak. Fiziológias pH értéknél a peroxinitrit 80%-a anionos formában van jelen. A biológiai féléletideje igen alacsony ($<0,1$ s). A peroxinitrit (PN) közvetlenül képes oxidálni különböző biomolekulákat, például fehérjék szulfátcsoportjait. A CO_2 -al végbemenő reakciója során nitrosoperoxokarbonát ($ONO_2CO_2^-$) alakul ki, amely egy köztes termék a peroxinitrit biológiai rendszerekben végbemenő bomlási folyamata során.

Mivel a PN erősebb oxidáló hatással rendelkezik, mint a prekursorai (az O_2^- és a NO), néhány patológias állapot összefüggésben állhat a peroxinitrit fokozott termelődésével. A vegyület jelenlétét kimutatták már ischémiás-reperfúziós rendszerekben, neurodegeneratív betegségekben, kardiovaszkuláris elváltozásokban, atheroszklerózisban és más gyulladáshoz vezető folyamatokban (Hattori és mtsai, 1996; Cotton és mtsai, 1999; Rawlingson és mtsai, 2000; Szabó és mtsai, 2001; Virág és mtsai, 2002).

A PN citotoxikus hatásának kialakulásához vezető útvonal még nem teljesen világos. Mindenesetre megfigyelhető ezen folyamatok során a poli-ADP-ribóz-szintetáz (PARS) aktivációja, amely képes a poli-ADP-ribóz-t a DNS-sel illetve a megfelelő fehérjével összekötni. Az enzim működése egyben az intracelluláris tér NAD^+ és ATP koncentrációjának drasztikus csökkenését okozza, s ez nekrotikus sejthalálhoz vezet. Ez

a citotoxikus hatás kapcsolatban áll a mitokondriumban zajló biológiai oxidáció gátlásával, valamint a kaszpáz-3 enzim aktiválásával. Tekintettel arra, hogy a sejt károsodásában igen jelentős szerep tulajdonítható az oxidáns vegyületek által indukált intracelluláris kalcium mobilizációnak is (Nicotera és mtsai, 1998), vizsgálni akartuk a PN-nek ezen paraméterre kifejtett hatását HaCaT sejteken. In vitro kísérletekben a PN gyakori prekursora a 3-morfolinosisidnonimine hidroklorid (SIN-1), így célunk volt ezen vegyülettel indukálható változások tanulmányozása is. Ez utóbbi anyagból spontán módon NO szabadul fel, amikor oldatba kerül. A NO aktiválja a guanilát-cikláz enzimet, így emeli a cGMP szintet. A SIN-1 vazodilatátor hatású vegyület, ezenkívül gátolja a vérlemezkék aggregációját is.

II. CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a purinerg jelátviteli mechanizmus jellegzetességeit kívántuk vizsgálni proliferáló – prekonfluens – és differenciálódó – konfluens – HaCaT sejteken. Ezzel párhuzamosan tanulmányoztuk a proteinkináz C rendszer ezen sejt folyamatokban betöltött szabályozó szerepét is. Mivel az intracelluláris raktárakból történő kalciumfelszabadulás fontos szerepet tölt be a sejtosztódásban és a differenciálódásban, elsőként a belső raktárak által vezérelt, a sejtmembránban elhelyezkedő csatornák működésének, és foszforilációs úton történő szabályozásának vizsgálatát kívántuk elvégezni.

Méréseink következő részében szintén a plazmamembránban elhelyezkedő, és a sejtciklust befolyásolni képes mechanoszenzitív csatornáknak a vizsgálatát tűztük ki célul. Méréseink során arra voltunk kíváncsiak, hogy ezen csatornák mely típusa/típusai találhatóak meg a keratinocytákon, melyeket aktiválja ezek közül a hipotóniás stressz, mint mechanikai inger, és végezetül, hogy a PKC rendszer befolyásolja-e a rajtuk átfolyó áramot. Fontosnak tűnt megvizsgálni azt is, hogy a hipotóniás stressz megváltoztatja-e az intracelluláris kalciumkoncentrációt, és ha igen, módosulnak-e ezáltal a sejtek osztódási és differenciálódási tulajdonságai.

Végezetül a sejtciklus egyes lépéseit ugyancsak érintő oxidatív hatású anyagok intracelluláris kalciumszintre kifejtett hatását kívántuk megvizsgálni. Tanulmányoztuk, hogy a citoplazma kalciumtartalmának különböző nagyságú és különböző ideig tartó megemelkedése milyen szereppel bír a sejtek számát csökkentő apoptotikus és nekrotikus folyamatok megindításában.

III. ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

III.1. *Sejtenyésztés*

Kísérleteinket alacsony Ca^{2+} -koncentrációjú oldatban és 38°C -on történő tenyésztés hatására immortalizálódott humán keratinocytá sejtvonalon, ún. HaCaT sejteken végeztük (3. ábra). A sejtvonalt egy melanomában szenvedő férfi egészséges, nem infiltrálódott bőrterületéről származik (Boukamp et al, 1988). A sejtek bizonyítottan nem szenvedtek daganatos elváltozást, spontán proliferációs képességük azonban megnövekedett. Fenntartják differenciálódási képességüket is, amit számos differenciálódási marker (keratin-1, keratin-10, involucrin és fillagrin) szintézise mutat (Ryle et al, 1989). A HaCaT sejteket a normál humán keratinocyták jellegzetességeinek feltérképezéséhez mint modellrendszert használják.

A HaCaT sejtek tenyésztése 5% CO_2 tartalom mellett 37°C -ra termosztált körülmények között, endotoxin-mentes Dulbecco's Modified Eagle's Mediumban (DMEM, Sigma) történt. A tápoldatot 10% főtális borjúsavóval (FCS), 2 mM L-glutaminnal, 50 U/ml penicillin, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin és 1,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ fungizone oldattal egészítettük ki.

A sejt kultúrákat körülbelül 20%-os konfluenciával indítottuk, így a sejtek átlagosan a 6. tenyésztési napon nőttek be teljesen a tenyésztőedény aljára, majd ezután a magas sejtdenzitás által indukált differenciálódási fázisba léptek.

A konfluencia elérésekor a sejteket háromszor átmostuk pufferoldattal (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 6,9 mM NaHCO_3 , 0,5 mM Na_2EDTA , 1g/l glükóz, pH 7,4), majd 37°C -on 0,00125%-os tripszinnel emésztettük. A reakció leállítására, valamint a receptor-pusztulás megakadályozására háromszoros mennyiségű DMEM oldatot adtunk az elegyhez. A tenyésztőedény faláról így módon leemésztett sejteket 1000 g-n 10 percig

centrifugáltuk és a megfelelő mennyiségű ($1-2 \times 10^5$ /ml) sejtet savkezelt, hőlégsterilizált fedőlemezre (Menzel-Glaser, Spektrum-3D, 32 mm átmérő és 0,07 mm vastagság) szélesztettük ki. A kísérleteket megelőzően a sejteket DMEM tápoldatban, termosztált körülmények között tartottuk.

A proteinkináz C izoenzimek szerepének vizsgálatához a fedőlemezen kitapadt sejteket forbol 12-mirisztát 13-acetát 100 nM-os koncentrációjú oldatával kezeltünk elő kb. 16 órán át. Ezt az anyagot az irodalomban leírt kísérlet alapján választottuk ki, mivel a PMA kezelés PKC izoenzimek aktiválódását, illetve szintjének csökkenését (down regulation, „lefelé szabályozás”) okozza számos vizsgált sejt típuson.

Kísérleteink egy részében olyan sejteket használtunk, amelyek elérték, illetve meghaladták a 70%-os konfluenciát. Ilyen körülmények között a sejtek összefüggő, legalább 100 sejtből álló „szigeteket” hoztak létre (3. ábra). Ebben az esetben, az optikai mérések során, a háttér fluoreszcenciájának meghatározását a sejtmentes részekben, míg a különböző anyagok hatásának vizsgálatát a szigetek közepén elhelyezkedő keratinocytákon végeztük el.

III.2. Intracelluláris kalciumkoncentráció mérés

Az intracelluláris kalciumkoncentrációban bekövetkező változásokat kalcium-érzékeny, fluoreszcens festék segítségével követtük nyomon. Ennek érdekében a fedőlemezre kitapadt sejteket 37°C -on, 1 órán keresztül $5 \mu\text{M}$ Fura-2-acetoximetilészterrel (Fura-2 AM, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) töltöttük fel. A méréseket megelőzően a keratinocytákat fél órán át normál Tyrode oldatban (137 mM NaCl, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 11,8 mM HEPES-NaOH, 1g/l glükóz, pH 7,4) tartottuk szobahőmérsékleten, s ezalatt a festék egyenletesen eloszlott az intracelluláris térben.

A fedőlemezen kitapadt, festékkel feltöltött sejteket fluoreszcens invertáló mikroszkóp (Diaphot, Nikon, Japán, 4. ábra) tárgyasztalára helyeztük egy erre a célra kialakított speciális mérőkádban. A festéket váltakozó, 340 és 380 nm-es hullámhosszúságú fényel világítottuk meg, melyet a Xenon lámpa fényéből egy sugárosztó és két monokromátor segítségével állított elő a mérőrendszer (DeltaScan, Photon Technology International, USA). A kibocsátott fényt 510 nm-en detektáltuk egy fotoelektron sokszorozóval, 10 Hz-es mintavételezési frekvenciával. Az $[Ca^{2+}]_i$ -változásokat a 340 (F_{340}) és 380 (F_{380}) nm-en mért fluoreszcencia intenzitások hányadosából ($R=F_{340}/F_{380}$) határoztuk meg a Grynkiewicz és mtsai. (1985) által leírt módon, in vivo kalibrációs adatok segítségével:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d * \left\{ (R - R_{min}) / (R_{max} - R) * S_{f2} / S_{b2} \right\},$$

ahol K_d a disszociációs állandó, R_{min} és R_{max} a fluoreszcencia hányados azon értékei, amikor a festék kalciumot nem köt, illetve kalciummal telített, S_{f2}/S_{b2} a szabad és kalciumot kötött festék fluoreszcenciájának hányadosa 380 nm-en. A ráciometrikus $[Ca^{2+}]_i$ -meghatározás előnye, hogy eltekinthetünk a sejtbe jutott festék koncentrációjától, valamint a megvilágító fény intenzitásától. Kalibrációs kísérletek segítségével határoztuk meg a maximális- és minimális $[Ca^{2+}]_i$ mellett mért, rendszer-specifikus fluoreszcencia hányadosokat: $R_{min}=0,42$; $R_{max}=8,6$. A Ca^{2+} -Fura-2 komplex általunk használt disszociációs állandójának értékét az előbbi mennyiségek felhasználásával számoltuk ki: $K_d=76$ nM; $S_{f2}/S_{b2}=15,3$.

Az alkalmazott anyagok adagolása változtatható sebességű perfúziós rendszerrel történt, amit egy lokális perfúziós rendszerrel egészítettünk ki. Ez utóbbi segítségével a vizsgálandó anyagokat közvetlenül a sejtek közelébe tudtuk juttatni. A kísérletek normál Tyrode illetve kalciummentes Tyrode oldatok folyamatos perfúziója mellett

történtek, mely utóbbi hasonló összetételű, mint a normál oldat annyi különbséggel, hogy nem tartalmaz CaCl_2 -ot, illetve 1 mM EGTA-val egészítettük ki.

A fluoreszcens kalciummérések során használt hipozmotikus oldatokat a NaCl mennyiségének csökkentésével (TY75 és TY50) állítottuk elő (lásd III.3.)

Az oxidatív stressz (peroxinitrit és SIN-1) hatásának vizsgálata során az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -méréseknél normál Tyrode illetve kalciummentes Tyrode oldatot használtunk. Az erősen oxidatív hatású peroxinitritet módosított (glükóz- és Hepes mentes) Tyrode oldatban (pH 11) oldottuk fel közvetlenül a mérés előtt (az alkalikus pH megakadályozta az oxidáns anyag lebomlását). A SIN-1-et hasonló összetételű közegben alkalmaztuk, amelynek pH-ja 7,5 volt. Az oldószerként használt módosított Tyrode oldat hatását szintén teszteltük. A szereket ebben az esetben is a lokális perfúziós rendszer segítségével juttattuk el az aktuálisan vizsgálni kívánt sejt környezetébe.

III.3. Membránpotenciál regisztrálása konvencionális mikroelektóddával

Az elektrofiziológiai mérések ezen részében boroszilikát üvegapillárisokból (Bio Logic, Germany) nagy ellenállású (20-30 M Ω) konvencionális mikroelektrodákat készítettünk, amelyeket 3 M-os KCl oldattal töltöttük fel. A kísérlet során a Cl^- koncentráció változásának kivédése érdekében módosított Tyrode (TY) oldatot (68,5 mM NaCl, 68,5 mM Na-glutamát, 5,4 mM KCl, 0,5 mM MgCl_2 , 1,8 mM CaCl_2 , 11,8 mM Hepes-NaOH, 1g/l glükóz, pH 7,4) használtunk a nyugalmi membránpotenciál meghatározásához, majd lecseréltük az extracelluláris oldatot 75 illetve 50%-os hipotoniás oldatra (TY75 és TY50), mely az eredeti Tyrode (TY) oldat Na-glutamát tartalmának felét (TY75) tartalmazta, vagy az teljesen hiányzott az oldatból (TY50).

Az 1 kHz-en mintavételezett elektromos jeleket Axoclamp 2B erősítő (Axon Instruments) segítségével regisztráltuk, majd analóg-digitális átalakítás után (Digidata 1200, Axon Instruments, CA, USA) a kapott adatokat a pClamp 6.0.4. szoftverrel (Axon Instruments) értékeltük ki.

III.4. Feszültség- és áram-clamp mérések

Az elektrofiziológiai mérések ezen részében alacsony (2-3 M Ω) ellenállású, K⁺-aszpartát alapú oldattal (110 mM K-aszpartát, 20 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM Hepes, 2 mM MgATP, pH 7,3) feltöltött pipettákat használtunk, amelyeket az előzőekben már ismertetett boroszilikát üveg kapillárisból készítettünk. A méréseket a patch-clamp technika teljes-sejtes (whole-cell) konfigurációjában végeztük. A sejtek ionáramait a mérőrendszer feszültség-rögzítéses (voltage-clamp) módozatának alkalmazásával, míg a membránpotenciál-változásokat az áram-rögzítéses (current-clamp) üzemmódban követtük nyomon az Axopatch 200A erősítő (Axon Instruments) segítségével (5. ábra). A sejtek passzív elektromos paramétereinek (kapacitás) meghatározásához 40 ms hosszú, -40 mV-os tartó (holding) potenciálról induló, 5 mV-os depolarizáló impulzust használtunk. A sejtek lineáris kapacitása 20-40 pF-nak adódott a kísérletekben. Az alkalmazott oldatok cseréjét állandó sebességű perfúziós rendszerrel oldottuk meg. A mérések során használt hipozmotikus oldatok a konvencionális mikroelektródás technikával végzett kísérleteknél ismertetett módon készültek, míg a teljes NaCl tartalom Na-glutamáttal történő helyettesítésével kaptuk a Cl⁻-mentes TY és Cl⁻-mentes TY50 oldatokat.

III.5. Western-blot analízis

A tenyésztőedényben legalább 70%-os konfluenciát elért sejteket foszfát puffer oldattal (PBS) mostuk át jégen, majd homogenizáló pufferben (20 mM Tris-HCl, 5 mM

EGTA, 1 mM 4-(2-aminoetil) benzonszulfonil fluorid, 20 mM leukopeptin, pH 7,4; Sigma) szedték fel. A sejtek ultrahangos feltárása (szonikálás) után a proteintartalmat BCA protein assay segítségével határoztuk meg (Pierce, Rockford, IL, USA). A teljes sejtlizátumot SDS-PAGE pufferoldatban oldottuk és 10 percig forraltuk 100°C-os vízfürdőben. 20-30 µg proteinmennyiséget adagoltunk a 8%-os SDS-PAGE gél egy-egy mélyedésébe, majd futtatás után nitrocellulóz membránra (Bio-Rad, Wien, Ausztria) vittük fel. A reakciót 5%-os, PBS-ben oldott tejjel blokkoltuk, majd a megfelelő elsődleges antitest hígítással kezeltük a membránt. Az általunk vizsgált PKC izoenzimek (PKC α , ϵ , η , δ , β és ζ ; Sigma) nyúlban termeltetett, a differenciálódási marker involucrin pedig egérben termeltetett elsődleges antitestekhez specifikusan kötődött. Az elsődleges antitestek ellen kecskében termeltetett, peroxidáz-konjugált másodlagos antitesteket (Bio-Rad) immunoreaktív módon tettük láthatóvá fényérzékeny filmen (AGFA, Brussels, Belgium), az ECL Western-blot detektáló egységben leírt módon (Amersham, Little Chalfont, Anglia).

III.6. Élő sejtszám meghatározása

Az élő sejtszám meghatározását 3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]2,5-difeniltetrazolium bromid (MTT assay, Sigma) segítségével végeztük. A sejteket 5000 sejt/well denzitásban szélesztettük 96 lyukú tenyésztőedényben és kezeltük a vizsgálni kívánt oldatokkal. Minden esetben 4 párhuzamos mérést végeztünk. Az assay során a sejteket 0,5 mg/ml MTT por oldatával inkubáltuk 3 órán keresztül, 37°C-ra termosztált körülmények között, majd a tetrazólium sóból képződött formazán kristályok koncentrációját (mely az élő sejtszám indikátorának tekinthető) kolorimetriás úton határoztuk meg.

A hipotóniás stressz proliferációra és differenciálódásra kifejtett hatásának vizsgálata során három, különböző mértékben módosított oldatot használtunk. A hipotóniás tenyésztőoldat előállításakor a normál tenyésztőoldathoz (DMEM illetve fenol-vörös mentes RPMI oldat ≈ 300 mosmol/l, NS) steril desztillált vizet adtunk olyan mennyiségben, hogy az így létrehozott elegy (LS50) ozmolaritása megfelelt a TY50 ezen paraméterének (≈ 150 mosmol/l). Ez természetesen együtt járt az oldatban lévő szérumszám csökkenésével is. Így fontosnak tartottuk azt is, hogy az ozmolaritás változtatása nélkül, a szérumszám csökkentésének a hatását is megvizsgáljuk a sejtek növekedésére és fejlődésére. Ennek érdekében az általunk használt harmadik oldat 50-50%-ban tartalmazott normál tenyésztő oldatot és steril Tyrode oldatot, így az elegy ozmolaritása nem csökkent (≈ 300 mosmol/l), viszont a szérumszám koncentrációja a normál érték fele volt (LS).

III.7. *Immunfluoreszcens vizsgálatok*

A HaCaT sejtenyészetet foszfátpuffert tartalmazó jéghideg sóoldattal háromszor átmostuk, majd 5 perces acetonos fixálást végeztünk 4°C -on. A fixálási folyamatot 30 percen keresztül alkalmazott 0,6% Triton X-100-at és 1% BSA-t tartalmazó oldattal blokkoltuk. Ezután a sejteket nyúlban termeltetett anti-PKC antitesttel, valamint purinoreceptor ellenes antitesttel inkubáltuk 2 órán keresztül (általában 1:50-100-as hígítást használtunk a blokkoló oldatban). A mintákat ezt követően 1 órán át az elsődleges antitest ellen kecskében termeltetett, FITC-konjugált antitesttel, illetve szintén 1 órán át propidium-jodiddal inkubáltuk. Az előbbi a specifikusan jelenlévő PKC izoenzimeket (6. ábra) illetve purinoreceptorokat teszi láthatóvá, míg az utóbbi a sejtmagok megfestésére szolgál. A specifikus antitestekkel és fluoreszcens festékekkel megjelölt sejteket fluoreszcens mikroszkóppal (Zeiss) vizsgáltuk.

III.8. Statisztikai analízis

Az ábrákon az átlagokat és az azokhoz tartozó standard hibát (SEM) tüntettük fel. A kísérleti csoportok közötti statisztikai szignifikanciaszintet kétmintás t-próba segítségével határoztuk meg, ahol a szignifikanciahatár $p < 0,05$ volt. Ezt az ábrákon *-gal jelöltünk. A görbék egy-egy kísérletből származó reprezentatív eredményeket mutatnak be.

IV. EREDMÉNYEK

IV.1. *A proteinkináz C rendszer hatása HaCaT keratinocyták transzmembrán kalciumáramaira.*

Saját kísérleti tapasztalataink (Bíró és mtsai, 1998; Gönczi és mtsai, 2002) és irodalmi eredmények is arra utaltak, hogy humán keratinocyták intracelluláris kalcium koncentrációjának változása kapcsolatban van a változó extracelluláris kalcium mennyiséggel in vitro és in vivo egyaránt. Humán keratinocytákon már leírták, hogy a PI-út vonal aktiválása ATP-vel, illetve a kalcium raktárak kiürítése képes beindítani a SOC csatornákat (Csernoch és mtsai, 2000). Ez a beáramlás jelentősen csökken pl. psoriasisos sejtek esetében, ami feltételezi, hogy a kapacitív kalcium beáramlás szabályozó szereppel bír az $[Ca^{2+}]_i$ szabályozásában. Számos sejt típuson már azt is leírták, hogy nemcsak az $[Ca^{2+}]_i$ változása, hanem a PKC rendszer aktiválása is képes befolyásolni a SOC-on keresztüli kalcium bejutást a sejtekbe. A PKC aktiválása forbol 12-mirisztát 13-acetáttal gátolta a kapacitív kalcium bejutást mezangiális sejteken, kínai hörcsög petesejtjein és HL-60 promyelocytákon, míg az enzimrendszer aktivitásának hosszantartó PMA kezeléssel történő csökkentése (down regulation) ellentétes hatást alakított ki.

IV.1.1. *PMA előkezelés hatása az extracelluláris térből történő kalciumbeáramlásra*

A PI rendszer 30 másodpercig tartó ATP adagolással történő ismételt aktiválása tranziens jellegű $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedéseket okozott a vizsgált sejteken, amely során az egymást követő változások amplitúdója kismértékű csökkenést mutatott (7A és 8A ábra). Az intracelluláris kalciumkoncentráció a tranziensek után az eredeti értékre állt vissza ($[Ca^{2+}]_{nyug}$), a nyugalmi intracelluláris kalciumkoncentráció változása

($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nyug}}$) elhanyagolható volt a kontroll, kezeletlen sejtek esetében (8B ábra). Az extracelluláris térből történő kalciummegvonás után jelentősen csökkent az ATP-vel kiváltott tranziensek nagysága (7C ábra és 1. táblázat), ami valószínűsíti, hogy az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedések kialakításában mind a belső raktárakból felszabaduló, mind a külső térből beáramló kalcium részt vesz. Amennyiben a sejteket a mérés előtt 16-18 óráig PMA (100 nM) kezelésnek tettük ki, elsőként azt figyelhettük meg, hogy sem a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nyug}}$ (79 ± 4 vs. 80 ± 4 nM, kontroll és előkezelt sejteknél, $n=20$) értéke, sem a tranziensek alapvető kinetikai jellemzői nem mutattak változást a kontroll sejtekhez képest. Ez arra utal, hogy a PKC izoenzim aktivitásának módosítása nem játszott jelentős szerepet a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -nak, illetve a PI rendszer egyes elemeinek a közvetlen szabályozásában.

Ezzel szemben a PMA-kezelt sejteknél az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kalciumtranziensek után nem tért vissza teljesen a kiindulási értékre, hanem jelentős, átlagosan több, mint 20 nM-os $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nyug}}$ -változást tapasztaltunk minden tranziens követően (7B és 8B ábra). A PMA kezelés ezen hatása kalciummentes körülmények között elmaradt (7C és 8B ábra), azaz feltételezhető, hogy a $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{nyug}}$ változásához szükséges a külső térben kalciumionok jelenléte, amelyek a sejtmembrán speciális fehérjéin (pl. SOC csatornák) keresztül képesek bejutni a sejt belsejébe.

IV.1.2. PMA kezelés hatása a CPA-val indukált kalciumbelépésre

Előzetes eredményeinkből ismert, hogy az ATP-vel kiváltott, intracelluláris raktárakból történő kalciumfelszabadulás kalciumbeáramlást indukál a sejtet körülvevő környezetből. A továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a PMA kezelésnél megnövekedett kalciumbeáramlást a jelenlévő SOC csatornák fokozott aktivációja okozza-e. Ennek vizsgálatára a kísérletekben ciklopiazonsavat alkalmaztunk, amely a

kalcium-ATP-áz specifikus blokkolószereként képes a belső kalciumraktárak kiürítésére kalciummentes extracelluláris oldatban. 10 μM CPA adagolásával az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tranziens emelkedését váltottuk ki mind kontroll, mind PMA-kezelt sejteken (9. ábra). Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változás amplitúdója és a CPA-val kiváltott tranziens maximális felszállási meredeksége nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll- és PMA-kezelt sejtek eredményeit összehasonlítva (1. táblázat), ami arra utal, hogy a forbolészter nem változtatja meg a raktározott kalcium mennyiségét. A kalcium-ATP-áz gátlószereinek folyamatos jelenlétében az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ visszatért a kiindulási értékre, ami a belső raktárak teljes kiürülését demonstrálta. Ezt követően, ha a külső térbe visszaadtuk a kalciumot, akkor mindkét sejtpopulációnál az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ újabb megemelkedését tapasztaltuk. Ez csak akkor jöhetett létre, ha a raktárak által vezérelt SOC csatornák kinyíltak és rajtuk keresztül beáramlott a kalcium az extracelluláris közegből. Az ily módon létrejött kalciumkoncentráció emelkedés sebességében jelentős eltérést tapasztaltunk a kontroll és az előkezelt sejtek között (9. ábra és 1. táblázat). Az előkezelt sejtek esetében ez az érték $\approx 47\%$ -al volt magasabb, mint kontroll sejteknél, mely a SOC csatornák fokozott aktivációs állapotára utal a PMA-val kezelt sejtek esetében.

IV.1.3. PMA előkezelés hatása keratinocyták PKC izoenzimmintázatára proliferáló sejteken

Mivel a forbolészter kezelés a különböző proteinkináz C izoenzimeket aktiválja, ésszerűnek tűnt megvizsgálni, hogy mely izoenzim(ek) vehetnek részt az általunk vizsgált folyamatokban, illetve a megfigyelt változások kialakításában. Ezért kontroll és PMA-kezelt sejtek esetében egyaránt Western-blot analízist végeztünk, ahol a különböző izoenzimekre specifikus antitesteket használtuk az azok szintjében bekövetkező esetleges változások kimutatására. Az általunk vizsgált HaCaT sejtek

tartalmazták mindazon PKC izoenzimeket (a klasszikus csoportba tartozó PKC α -t, az új típusú δ , ϵ és η -t, valamint az atípusos ζ -t), amelyeket a normál humán keratinocytákon leírtak. Ezenkívül azt is vizsgáltuk, hogy a psoriasisos bőrben leírt, klasszikus csoportba tartozó PKC β , jelen van-e a HaCaT sejtekben, amely felelős lehet a sejtvonal hiperproliferációs tulajdonságáért. Mint az a 10. ábrán jól látható, ez utóbbi izoforma is nagy mennyiségben van jelen az általunk vizsgált sejtekben, amelyeket először ún. prekonfluens, azaz osztódó stádiumban vizsgáltunk. Mint azt a Western-blot eredmények mutatják, a PMA előkezelés specifikusan csak a PKC α szintjének csökkenését okozta, míg a többi izoenzim szintjében lényeges változást nem tapasztaltunk.

IV.1.4. *A kapacitív kalcium beáramlás módosulása konfluens sejteken*

Kísérleteink következő szakaszában azt vizsgáltuk, hogy a sejtek differenciálódási állapota befolyásolja-e a SOC csatornákat illetve azok PKC rendszer iránti érzékenységét. Ehhez az előzőekben ismertetett kísérleti protokollokat megismételtük olyan sejteken is, amelyek a fedőlemezen összefüggő réteget képeztek, azaz a megnövekedett sejtszám által indukált differenciálódás került előtérbe az eddigi fokozott osztódással szemben.

Konfluens sejteken az ismételt ATP adagolás kalciumtranziensek kialakulását eredményezte (11. ábra). Az egymást követő $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedések amplitúdója csökkenő tendenciát mutatott, hasonlóan a prekonfluens sejteknél tapasztaltakhoz (11A és 12A ábra). A tranziensek időbeliségében szembetűnő eltérések voltak a két populációban. Az izolált sejteknél kialakuló gyors felszálló szarát konfluens sejtek esetén egy lassú fázis előzte meg (11. ábra). Emellett az első, ATP-vel indukált tranziens követően a nyugalmi kalciumkoncentráció magasabb volt, mint a kiindulási

érték, ám ez a változás a többi tranziens $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés után nem volt megfigyelhető (12B ábra). A $[Ca^{2+}]_i$ -ban megfigyelhető különbségek számszerűsítésére összehasonlítottuk az első ATP adagolással kiváltott tranziensek amplitúdóját prekonfluens és konfluens sejteken. Differenciálódó keratinocytákon magasabb értékeket kaptunk (155 ± 19 nM), mint az osztódó sejtek (116 ± 8 nM) esetében.

A konfluens sejteket PMA-val előkezelve nem tapasztaltunk változást sem a $[Ca^{2+}]_{nyug}$ -ban, sem a kiváltott tranziensek kinetikájában, bár az előkezelt sejteken a tranziensek első, lassú fázisa még kifejezettebb volt (11B ábra). Az első tranziens követően szintén megfigyelhettük a nyugalmi kalciumkoncentráció emelkedését, ám ez jelentősen kisebb mértékű volt, mint proliferáló HaCaT sejteken (12B ábra). Mindezekből arra következtethetünk, hogy a PMA kezelés kapacitív kalcium beáramlást fokozó hatása módosul, amikor a sejtek összefüggő réteget képeznek.

A SOC csatornák jelenlétének és működésének vizsgálatára a CPA-s kísérleteket is megismételtük a differenciálódó sejteken. Mint azt a 13A ábra mutatja, a ciklopizonsav adagolása itt is az $[Ca^{2+}]_i$ tranziens jellegű emelkedését okozta, amely a belső kalciumraktárak kiürülését szemlélteti. A változások mennyiségi és kinetikai paramétereiben nem különböztek lényegesen a prekonfluens sejteken mértéktől, ami azt valószínűsíti, hogy a sejtek előrehaladott differenciálódási állapota nem módosítja az intracelluláris raktárakat (2. táblázat). Az előzőekhez hasonlóan, a PMA előkezelés ebben az esetben sem változtatta meg a CPA által indukált kalciumtranziens (13B ábra).

A belső raktárak által vezérelt csatornákon keresztül létrejövő kalciumbelépés kinetikájában azonban különbségeket figyelhettünk meg a prekonfluens sejtekhez viszonyítva. Az extracelluláris tér kalciumtartalmát megnövelve, az osztódó sejteken megfigyelt folyamatos $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés (9. ábra) helyett konfluens sejteknél egy korai

csúcspont elérése után rögtön elkezdődött az $[Ca^{2+}]_i$ nyugalmi értékre történő visszatérése (13A ábra). A kalciumbeáramlás megszűnése, illetve annak jelentős csökkenése deszenzitizáció kialakulására utal, vagy a beáramlási mechanizmusok erőteljes inaktivációját mutatja. Az $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező változások kvantitatív jellemzőit a 2. táblázat foglalja össze. Proliferáló sejtek esetében a kapacitív kalcium beáramlás közel állandó volt, ezt jól szemlélteti az az adat, amely szerint a teljes $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés kb. kétszerese volt a folyamat első felében bejutott kalcium mennyiségének. Ez a hányadosérték differenciálódó sejtek esetében nem érte el az 1-et sem, amiből arra következtethetünk, hogy az influx folyamatának második felében differenciálódó sejteknél jelentős ionbeáramlás már nincs. Valószínűleg ezzel van összefüggésben az is, hogy a kezdeti beáramlás sebessége magasabb a konfluens sejteknél (1. és 2. táblázat), azaz ott a raktárak feltöltődése a külső térből rövidebb idő alatt, nagyobb sebességgel történik. A forbolészterrel történő kezelés nem változtatta meg jelentősen a folyamat kinetikáját (13B ábra és 2. táblázat), amely a PKC rendszer kisebb szerepére utal konfluens sejtek esetében.

IV.1.5. PMA kezelés hatása a PKC izoenzimmintázatra differenciálódó keratinocytákon

A proteinkináz C izoenzimmintázat Western-blot analízise során azt tapasztaltuk, hogy konfluens sejtekben jelentősen emelkedik a PKC ϵ szintje az osztódó keratinocytákhoz képest (10. és 14. ábra). A PMA kezelés itt eltérően módosította a különböző izoformákat. Amíg prekonfluens sejteknél a PKC α szintje csökkent jelentősen, addig konfluens keratinocytákban a PKC β és ϵ lefelé szabályozódását figyelhettük meg. Ezen eredmények arra utalnak, hogy a PKC α izoenzim közvetlenül képes szabályozni a SOC csatornák számát, míg a PKC β és PKC ϵ izoenzimek

valószínűleg a csatornák kinetikai jellemzőit befolyásolják foszforilációs mechanizmusok segítségével.

IV.2. Mechanoszenzitív csatornák szerepe a membránpotenciál kialakításában és a proliferáció szabályozásában in vitro HaCaT keratinocytákon

A szervezetünkben található sejteknek általános jellemzője, hogy a felszíni membránjukban mechanoszenzitív ioncsatornák (MSC) találhatóak. A mechanikai hatásokkal szembeni érzékenység számos élettani folyamat alapvető feltétele. Fontos szerepe van például a hallás, a tapintás és proprioceptív érzékelés során, valamint szenzoros információt jelent az üreges szervek térfogatszabályozásának, a testfolyadék-összetétel változtatásának és számos esetben a növekedés szabályozásának folyamatában (Sachs és Morris, 1998). A mechanoszenzitív csatornák egy speciális csoportja szerepet kap a sejtterfogat regulációjában is (Christensen, 1987; Nilius és Droogmans, 2001). Ezen csatornák nagy része egész sor monovalens kationnal szemben permeábilis (Sackin, 1995). A csatornák másik része pedig Ca^{2+} -kat és monovalens kationokat egyaránt képes a sejtbe juttatni.

A bőr állandóan mechanikai hatásoknak van kitéve. Bizonyos területeit fokozott nyomásviszonyok, míg más részeket nyíróerők érik, mint például a gyógyuló bőrszövet szélénél található sejteket. Ezek a mechanikai erők képesek a keratinocyták proliferációs és/vagy differenciálódási folyamatait befolyásolni. In vitro humán keratinocytá sejtvonalon már kimutatták, hogy a megnövekedett membránfeszülés a citokeratin-9 és más differenciálódási markerek szintézisének fokozódását eredményezte (Görmar és mtsai; 1990). A mechanikai ingerek biokémiai szignalizációs folyamatokat indítanak el, aktiválódnak például a MAP-kináz rendszer tagjai és a β -integrinek (Kippenberger és mtsai; 2000). Ezenkívül humán keratinocytákon

kimutatták, hogy hipotóniás oldatok fokozzák a transzmembrán Cl^- -áramot (Rugolo és mtsai; 1992).

Mindezen megfigyelések alapján feltételezhető, hogy a mechanikai hatások befolyásolják az MSC csatornák nyitvatartási állapotát, illetve az ezen csatornákon keresztül létrejövő kalciumbeáramlást a sejtbe, így képesek megváltoztatni a sejtmembránpotenciálját (MP) és az intracelluláris kalciumkoncentrációt. Ezek ellenére még nincsenek közölt eredmények a hipotóniás stressz okozta MP- és $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változásokról keratinocytákon. Ráadásul arra sincs bizonyíték, hogy ezek a változások szerepet játszanak a mechanikai stresszel kiváltott proliferációs/differenciálódási változásokban.

IV.2.1. *A hidrosztatikai nyomás hatása a keratinocyták elektrofiziológiai jellemzőire*

Kísérleteink kezdeti stádiumában megfigyeltük, hogy a sejtmembránpotenciálja igen széles, -10 és -60 mV-os tartományban változott. Felmerült annak lehetősége, hogy összefüggés van a sejtmembránpotenciálja és a mérőkádban lévő folyadékszint között, mivel a kísérlet szempontjából esetleg fontos, többi tényezőt nem változtattuk.

Ezen feltételezés ellenőrzésére folyamatosan változtattuk a sejt fölötti folyadékszintet és közben regisztráltuk a keratinocyták MP-ját áram-clamp üzemmódban (15A ábra). A kiindulási folyadékszint 3 mm (alacsony oldatszint), a végső pedig 3 cm (magas oldatszint) volt. Az oldatszintet a földelést biztosító elektróda helyzete miatt 3 mm alá nem lehetett csökkenteni, mert ez megakadályozta volna a mérés kivitelezését. A sejtmembránpotenciál hiperpolarizációját tapasztaltuk (-25 mV-ról -47 mV-ra változott).

Az 15B ábra szemlélteti, hogy a mérések kezdetén a sejtek MP-ja átlagosan $-20 \pm 6,5$ mV-nak adódott alacsony oldatszint mellett. Ahogy növeltük a sejtek fölötti oldat mennyiségét, jelentős membránpotenciál-változást tapasztaltunk ($-55 \pm 12,4$ mV). Amikor csökkentettük a hidrosztatikai nyomást az oldatszint visszaállításával, a membrán depolarizációját figyelhettük meg. A pozitívabb membránpotenciál-tartományba történő elmozdulás mértéke ($35,2 \pm 12$ mV) abszolút értékben szignifikáns eltérést nem mutatott a hiperpolarizációs irányú változással összehasonlítva ($-35 \pm 9,2$ mV). Ezen tapasztalatok alapján a további elektrofiziológiai méréseket alacsony, legfeljebb 5 mm-es oldatszint mellett végeztük.

IV.2.2. Hipotóniás oldatok hatása a membránpotenciálra

Kísérleteink következő részében azt vizsgáltuk, hogy a mechanikai stressz befolyásolja-e a keratinocyták membránpotenciálját. Ennek során hipotóniás oldatokat (TY75 és TY50) használtunk. A MP-t konvencionális mikroelektrodákkal (16. ábra), valamint patch-clamp elektródák segítségével (17. ábra) detektáltuk.

A fent leírt mérési körülmények között a HaCaT sejtek nyugalmi membránpotenciálja $-29,4 \pm 3,8$ mV-nak adódott ($n=10$) nagy ellenállású, konvencionális mikroelektrodával történő regisztrálás során. Ez a stabil membránpotenciál olvasható le az 16B ábrarésről, amelyet módosított Tyrode (TY) oldat perfundálása mellett mértünk. Hipotóniás oldat alkalmazása során (TY75) a membránpotenciál rövid időn belül változásnak indult és negatívabb, stabil értéket vett fel. Fokozva a hipotóniás stressz mértékét, TY50 adagolásával, a membránpotenciál további, hiperpolarizációs irányú változását tapasztaltuk. Visszatérve a kiindulási, normál ozmolaritású oldatra a sejtek membránpotenciálja pozitívabbá vált. Mint azt a 16B ábrán megfigyelhetjük, a TY75 oldatban $9,2 \pm 1,3$ mV-os, míg a TY50-es oldatban $27,2 \pm 5,2$ mV-os

membránpotenciál-növekedést tapasztaltunk (n=10). 5 perces visszamosási időtartam alatt a MP visszatérése nem volt teljes, hiperpolarizáltabb értéket kaptunk ($-41,5 \pm 4,8$ mV), mint a kísérlet kiindulási fázisában.

Hasonló eredményekre vezettek a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában végzett kísérletek is. A nyugalmi membránpotenciál értéke ebben az esetben, módosított TY oldatban $-19,7 \pm 2,3$ mV-nak adódott, amely nem különbözött szignifikánsan az előző módszerrel mért értéktől. Hipotóniás (TY50) oldat alkalmazása esetén itt is a MP hiperpolarizációját figyelhettük meg (17A és 17C ábra). A változások időbeliségét tekintve a két kísérlet között lényeges különbség nincs, de a patch-clamp mérések során kisebb mértékű változásokat regisztráltunk ($-31,1 \pm 2,8$ mV a TY50-ben).

Mint az más laboratóriumok munkáiból (Bollag és mtsai, 1993; Le Panse és mtsai, 1994) és az intézetünkben kapott előzetes eredményekből (Papp és mtsai, közlés alatt) ismeretes, a proteinkináz C izoenzimek fontos szerepet játszanak a keratinocyták proliferációs és differenciálódási folyamataiban. Ezek a megfigyelések vezettek minket arra a feltételezésre, hogy a sejtek hipotóniás oldatokra adott válaszát módosíthatja a PKC rendszer. A 17B ábrán mutatjuk be azokat az eredményeket, amelyet proteinkináz C aktiváló szerrel (PMA) előkezelt keratinocytákon, az eddig ismertetett protokollal végeztünk el. Bár az előkezelt HaCaT sejtek nyugalmi membránpotenciálja ($-20,4 \pm 2,8$ mV) szignifikáns különbséget nem mutatott a kontroll sejtekhez képest, a csökkentett ozmolaritású (TY50) oldat adagolása nagyobb mértékű ($-38,7 \pm 3,4$ mV) MP-változást okozott. Nemcsak a membránpotenciál-változás mértéke, hanem annak időbelisége között is jelentős különbségeket tapasztaltunk. A hipotóniás oldatokban a MP gyorsabban érte el negatívabb értékét a PMA-val kezelt sejteken.

IV.2.3. Az ozmolaritás változásának hatása a membránon átfolyó áramokra

A hipotóniás oldatok által aktivált áramok tanulmányozására a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációját használtuk. A sejt nyugalmi MP-ját -40 mV-ra állítottuk be, majd -80 mV-ról induló, 600 ms hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk (18. ábra). Ugyanezt a protokollt alkalmaztuk az 50%-os hipotóniás oldat jelenlétében ugyanazon a sejten, valamint regisztráltuk az oldatcsere hatására kialakuló membránpotenciál-változást is.

A TY és TY50 oldatban mért teljes membránáramot mutatja be a 18. ábra kontroll (A) és PMA-val előkezelt (B) sejteken. Mindkét sejtpopuláció esetében az áram növekedését tapasztaltuk hipotóniás oldatban, bár az emelkedés jóval nagyobb mértékű volt előkezelt keratinocytákon. Az ozmotikus stressz áramokra kifejtett hatásának leírásához kiszámítottuk a depolarizáló impulzus, illetve a -80 mV-os előimpulzus végén mért áramok különbségét, s az így kapott értéket (I_{tot}) ábrázoltuk az alkalmazott feszültség függvényében (18C és 18D ábra). Megfigyeléseink szerint hipotóniás oldat hatására szinte minden feszültség értéknél növekedett a membránon átfolyó áram nagysága mind kontroll, mind forbolészterrel kezelt sejteken. Nagyobb depolarizáló feszültség értékek mellett az áramban bekövetkező változás kifejezettebb volt, mint negatívabb potenciálok esetében.

Ha megvizsgáljuk az I_{tot} feszültségfüggését, jól látható egy nem-lineáris komponens, amely magasabb potenciáloknál egyre kifejezettebbé válik. Ennek kiemelése érdekében az áramokból levontuk az ohmikus komponenst, majd a sejt kapacitására normalizáltuk az áramokat ($I(V_m)$; 19A-D ábra). Az így kapott eredményeket ábrázoltuk a membránpotenciál függvényében a 19E és 19F ábrán. Kontroll és PMA kezelt sejteken, a Tyrode oldatban mért, normalizált áramok között

lényeges különbség nem volt. Hipotóniás közegre áttérve az áramok jelentősen emelkedtek és ez a változás szignifikánsan nagyobb volt az előkezelt sejteken.

A kísérlet folyamán a sejtek kapacitását is nyomon követtük. Kontroll ($27,2 \pm 2$ pF; $n=31$) és PMA-val előkezelt ($27,9 \pm 2,6$ pF; $n=16$) keratinocytáknál hasonló értékeket mértünk. Hipotóniás oldatban a sejt kapacitása némileg növekedett ($28,6 \pm 2,6$ pF), ami a sejt térfogatának kismértékű növekedésére utal (kb. 5%). Ez a térfogat változás kisebb mértékű volt, mint amire számítottunk, de figyelembe kell venni azt a tény, hogy a sejtek a mérés során üvegfelületre voltak kitapadva, amely a térfogatban bekövetkező esetleges változásokat csökkentette, de természetesen nem akadályozza meg a nyíróerők hatásának kialakulását.

IV.2.4. A hipotóniás oldatok által okozott hiperpolarizáció függ az extracelluláris Cl⁻ ionok jelenlététől

Korábbi irodalmi eredmények arra utaltak, hogy a hipotóniás stressz klorid áramot aktivál keratinocytákon (Rugolo és mtsai, 1992). Vizsgáltuk tehát, hogy a kísérleteinkben a megfigyelt membránpotenciál- és áramintenzitás változásokban milyen szerepet játszanak a Cl⁻ ionok. Ennek érdekében a IV.2.3. pontokban ismertetett kísérleteket megismételtük kloridmentes extracelluláris oldatokban is (20A. és 20B ábra). Kloridmentes oldatban a sejtek kiindulási membránpotenciálja $-14,2 \pm 2,8$ mV-nak adódott ($n=6$). Kloridmentes hipotóniás oldat hatására a MP $-19,4 \pm 3,9$ mV-ra változott, amely növekedés jelentősen kisebb ($p < 0,05$), mint amit a normál Cl⁻ tartalmú oldatok esetében megfigyeltünk. Ezzel együtt a kapacitásra normált áramok hipotóniás oldatban megfigyelt növekedése elmaradt az extracelluláris klorid megvonásakor (20C ábra).

IV.2.5. Hipotóniás stressz hatása az intracelluláris kalciumkoncentrációra

Tekintettel arra, hogy a mechanoszenzitív csatornák aktivációját általában az $[Ca^{2+}]_i$ növekedése kíséri, megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott hipotóniás oldatok megváltoztatják-e a keratinocyták intracelluláris kalciumszintjét. A 21. ábra mutatja be a csökkentett ozmolaritású oldatok által létrehozott $[Ca^{2+}]_i$ -változásokat. A sejtek működőképességét a már számos, köztük hazai laboratóriumban (Pillai és Bikle, 1992; Dixon és mtsai, 1999; Csernoch és mtsai, 2000; Gönczi és mtsai, 2002) is vizsgált, a foszfatidil-inozitol rendszert aktiváló ATP adagolásával teszteltük.

Az ozmotikus stressz hatására kialakult $[Ca^{2+}]_i$ -változásokat azok időbelisége és karakterisztikája alapján két csoportba lehetett osztani. Egyes esetekben az $[Ca^{2+}]_i$ -ban bekövetkező emelkedés egy jól definiálható csúccsal rendelkezett és a kalciumkoncentráció csökkenése már a hipotóniás oldat jelenléte alatt elkezdődött. Az ilyen változásokat tranziens jellegű $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedésnek neveztük (21A és 21B ábra). Más sejteken a csökkentett ozmolaritású oldat lassan kialakuló, elhúzódó választ váltott ki, amely csak a normál oldatban szűnt meg. Ilyenkor lassú változásról beszélünk (21C és 21D ábra). A tranziens változások mind TY75, mind TY50-es oldatokban detektálhatók voltak és a sejtmembrán feszülésének nagyobb mértékű változása az $[Ca^{2+}]_i$ kifejezettebb emelkedését idézte elő. A lassú típusú változásokat csak a nagyobb mértékű ozmotikus stressz (TY50) alkalmazásakor figyeltük meg.

Ezt követően azt vizsgáltuk, hogy a PMA-val előkezelt sejteken hipotóniás oldatok alkalmazásakor megfigyelhetők-e a kontroll keratinocytákon leírtakhoz hasonló $[Ca^{2+}]_i$ -változások (21B és 21D ábra). Ezeken a sejteken szintén két csoportba osztható, tranziens és lassú intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedéseket regisztráltunk. PMA-val előkezelt sejteken a változások nagyobb mértékűek voltak, mint kezeletlen

sejteknél. Ezen túlmenően már 75%-os hipotóniás oldatban is tudtunk regisztrálni lassú típusú $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedéseket (21D ábra).

Annak bizonyítására, hogy a kontroll és a PMA-val kezelt sejtek hipotóniás oldatokban mért válaszai közötti eltérés nem az intracelluláris jelátviteli mechanizmusok megváltozása miatt alakult ki, összehasonlítottuk a két sejtpopulációnál kapott tranziensek jellemző paramétereit (22. ábra). Az ábrán feltüntettük a sejteken ATP adagolással kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedések kvantitatív jellemzőit is. Az oszlopdiagrammokat elemezve első megállapításunk az volt, hogy az adozin vegyület által kiváltott tranziensek amplitúdójában, a tranziensek felszálló szárának meredekségében és a kalciumnak az ER-ba történő visszavételezésében (utóbbit a leszálló szárra illesztett exponenciális időállandójával, τ , jellemeztük) nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kétféle sejtípus esetében. A belső raktárak kalciumpumpájának működésére utaló τ ezenkívül nem különbözött lényegesen a hipotóniás oldatokkal létrehozott, tranziens jellegű $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedések esetében sem ($p > 0,3$). Az ozmolaritás csökkentésekor kialakult tranzienseknél ugyan a felszálló szár meredeksége kisebb volt, mint az ATP által kiváltott válaszoknál, de ebben a tekintetben sem tudtunk különbséget kimutatni a kontroll és a PMA-kezelt HaCaT sejtek között. Szignifikáns változást csak a TY75 és TY50-el indukált tranziens $[Ca^{2+}]_i$ -változások amplitúdójában tapasztaltunk a kontroll sejtekhez képest (22A ábra).

Megfigyeléseink tehát rámutattak arra, hogy a hipotóniás stresszt az intracelluláris kalciumkoncentráció megemelkedése követi. A kialakuló kalciumtranziensek nagysága változik abban az esetben, ha a sejtek PKC izoenzimrendszerének aktivitását tartós PMA előkezeléssel módosítjuk. Ugyanez a különbség nem mondható el az $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedések időbeli jellemzőiről (felszállási meredekség és a kalcium visszavételezési sebessége).

Mind a kontroll, mind az előkezelt keratinocytákon végzett mérések során azt tapasztaltuk, hogy az ozmotikus stressz által okozott $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedések függték az extracelluláris kalcium jelenlététől. A 23. ábrán demonstráljuk azt az esetet, amikor a külső oldatból eltávolítottuk a kalciumot és így regisztráltuk a hipotóniás oldatok által kialakított kalciumtranzienseket. A hipotóniás oldattal kiváltott intracelluláris kalciumkoncentráció növekedés mértéke szignifikánsan kisebb volt a kalciummentes extracelluláris közegben. Ez a megfigyelés arra utalt, hogy az általunk alkalmazott hipotóniás stressz hatására, sejt felszíni csatornákon keresztül, kalciumbeáramlás indult meg a vizsgált sejtbe és ez okozta a citoplazma kalciumkoncentrációjának a megemelkedését.

IV.2.6. *Az ozmotikus stressz hatása a keratinocyták proliferációjára és differenciálódására*

Minden sejt, így természetesen az általunk használt sejt vonal esetében is nagyon fontos az, hogy a tenyésztés során a megfelelő környezet, a megfelelő oldatösszetétel biztosítva legyen. Az ideális osztódási sebesség kialakulásához és fenntartásához számos növekedési faktor (pl. EGF) szükséges, amelynek jelenlétét a tenyésztőoldat szérumszereuma biztosítja. Mivel a hipotóniás oldat elkészítésekor szükségszerűen változik az oldat szérumszereuma, s ez várhatóan befolyásolja a sejtek növekedését, kísérleteinkben azt is megvizsgáltuk, hogy a normál ozmolaritás megtartása mellett a szérumszereuma koncentrációjának csökkentése megváltoztatja-e a sejtek proliferációját.

A HaCaT sejteket folyamatosan hipozmotikus tenyésztő oldatban (LS50) tartva, a sejtek nem osztódtak (24A ábra). Ez nem a részleges szérumszereuma kivonás következménye volt, hiszen a normál (≈ 300 mosmol/l) ozmolaritású, de csökkentett szérumszereumú oldatban (LS) a sejtek növekedése folyamatos volt, bár összehasonlítva a normál

ozmolaritású, teljes szérumtartalmú (NS) tenyésztőoldatban kapott sejtszámnövekedési adatokkal, a proliferáció LS-ben is csökkent.

A sejtosztódás mértékének nyomon követésével párhuzamosan vizsgáltuk a sejtek differenciálódását is. Ennek során a terminális differenciálódási marker, az involukrin szintjének Western-blot analízisét végeztük el a 10. tenyésztési napot követően, a különböző körülmények között tartott sejtek esetében. Megfigyeltük, hogy LS oldatban a proliferáció csökkenésével egyidőben az involukrin szintje megemelkedett, ami a sejtek fokozott differenciálódását jelzi. Ezzel szemben LS50 oldatban a növekedés elmaradását nem követte a differenciálódás előrehaladása.

Másrészt viszont a hirtelen alkalmazott hipotóniás stressz elősegítette a sejtek osztódását. Ezt egyfelől abban a kísérlet sorozatban figyelhettük meg, amikor az NS-ben növekvő sejteken a tenyésztőoldatot LS-re cseréltük le. Ezen változtatás eredményeként, feltehetőleg a növekedésben elengedhetetlen szérum szintjének csökkenése miatt, a proliferáció redukcióját tapasztaltuk (24B ábra). Abban az esetben, ha LS helyett az NS-t alacsonyabb ozmolaritású oldatra (LS50, ≈ 150 mosmol/l) cseréltük le, az osztódási ráta csökkenésének mértéke szignifikánsan kisebb volt, mint az LS-ben tapasztalt változás (24B ábra). Mint az a Western-blot képen megfigyelhető, az NS oldat LS-re történő cseréje esetén a sejtszám csökkenése mellett a differenciálódási marker emelkedése is megfigyelhető volt. A hipotóniás stressz nemcsak mérsékelte a részleges szérummegvonás hatására kialakuló sejtproliferáció csökkenést, de egyúttal az involukrin termelést is csökkentette.

A hirtelen bekövetkező hipotóniás stressz proliferációt fokozó hatását egy harmadik kísérleti sorozatban is ellenőriztük. Ekkor a sejteket kezdetben alacsony szérumtartalom mellett tartottuk, majd a 6. tenyésztési napon egyrészt normál, másrészt

hipotóniás tenyésztő oldatra cseréltük le. Mindkét változtatás esetében a proliferációs ráta jelentős emelkedését tapasztaltuk (24C ábra).

Mindezen megfigyelésekből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a folyamatosan hipozmotikus hatásnak kitett sejtek valószínűleg megakadtak, megálltak a sejtciklus egyik fázisában, hiszen nem osztódtak tovább és a differenciálódási folyamatok is elmaradtak. Ezzel szemben a keratinocytákat ért hirtelen ozmotikus stressz a sejtek osztódásának fokozódását serkenti, háttérbe szorítva a differenciálódást.

IV.3. Intracelluláris kalcium függő szabályozó folyamatok szerepe HaCaT keratinocyták oxidatív stresszel szembeni érzékenységében

A nitrogén-monoxidnak (NO) ma már egyre nagyobb jelentőséget és szabályozó szerepet tulajdonítanak a keratinocytákban lezajló különböző élettani és patológiai folyamatokban (Weller, 1997; Virág és mtsai, 2002). A NO-t a nitrogén-monoxid szintetáz (NOS) enzimsaládba tartozó egyik enzim állítja elő a guaninok közé tartozó L-arginin vegyület oxidációjával (Marletta és mtsai, 1998). Ezenkívül a bőrben nem enzimatis redukcióval, a verejtékből képződő nitrit is hozzájárul a NO-termeléshez (Weller és mtsai, 1996). A NO bizonyítottan szabályozó szerepet tölt be az epidermisz vérellátásában, a melanogenezisben és a sebgyógyulásban (Warren és mtsai, 1994; Romero-Graillet és mtsai, 1996; Yamasaki és mtsai, 1998). A bőrben számos sejtípus képes megfelelő stimulusok hatására NO-t szintetizálni (Weller, 1997; Virág és mtsai, 2002). A keratinocyták, a Langerhans-sejtek, a bőrben található fibroblasztok és melanocyták egyaránt termelnek indukálható nitrogén-monoxid szintetázt (iNOS), amelyek inflammatórikus citokinekkal és lipopoliszacharidokkal (LPS) aktiválhatók (Weller, 1997).

A keratinocytákban szintén megtalálható a NOS (NO-szintetáz) amelyet, egyebek között, UVB besugárzással lehet aktiválni (Deliconstantinos és mtsai, 1996). A NO túltermelése, főleg oxigén-szabadgyökök egyidejű szintézisével, peroxinitrit (PN) kialakulását eredményezheti (Beckman és Koppenol, 1996). A peroxinitrit (ONOO⁻) egy erőteljes oxidáns, amely a NO és szuperoxid reakciójával jön létre. A testnövekedés során is leírták már a bőrszövetben a peroxinitrit produkciót (Virág és mtsai, 2002). Mindezek ellenére a PN keratinocytákra kifejtett celluláris hatását még nem vizsgálták részletesen.

Az epidermális keratinocyták nem képviselnek egynemű sejtpopulációt. Feltételezhető, hogy a bazális, nagy osztódási képességgel rendelkező sejtek, többek között, az oxidatív stressz iránti érzékenységükben is különböznek a bőr legkülső rétegében elhelyezkedő, differenciálódott keratinocytáktól. Ismert az is, hogy az epidermisz rétegeiben kalciumgradiens áll fenn. Munkánk következő részében tehát a kalciumionok szerepét vizsgáltuk a sejtek peroxinitritre és ennek metabolitjának, a SIN-1-re adott válaszában. A kísérletek során használt HaCaT sejtek nagy proliferációs képességüknél fogva jó modelljei az osztódó, bazális bőrsejteknek. Másrészt a konfluens réteget képező HaCaT sejtek számos celluláris mechanizmus tekintetében eltérnek a proliferáló keratinocytáktól, s ekkor az epidermisz külső rétegében elhelyezkedő, differenciálódott sejtek jellegzetességeit mutatják.

IV.3.1. *Peroxinitrit hatása a kalcium influx mechanizmusokra keratinocytákon*

10 μM peroxinitrit alkalmazása az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ drasztikus emelkedését váltotta ki, amely vagy egyáltalán nem, vagy csak minimális reverzibilitást mutatott a szer megvonása után (25A és 25C ábra). Érdekes megfigyelés volt az, hogy a kalcium jelek zajja egy bizonyos fokú $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedés után annyira megemelkedett, hogy abból a

festék esetleges szaturációjára következtethettünk. Az abszolút fluoreszcencia intenzitást megvizsgálva azonban azt tapasztaltuk, hogy a 340 és 380 nm-en mért fluoreszcencia intenzitások nagy mértékben lecsökkentek a szer hatására (25B ábra). Mindez arra utalt, hogy az intracelluláris térben jelentősen lecsökkent a festék mennyisége. Feltételezhető tehát, hogy a peroxinitrit membránkárosító hatásánál fogva a sejtekbe történő kalciumbeáramlást idéz elő és ezzel egyidőben a kalcium-érzékeny, fluoreszcens próba részleges kiáramlását is okozza. Az a megfigyelés azonban, mely szerint a peroxinitrit kimosását az $[Ca^{2+}]_i$ részleges csökkenése követte (25A ábra), valamint az a tény, hogy az ezen fázisban mért fluoreszcencia hányados (3,8 a regisztrátum maximumán) messze elmaradt az R_{max} értékétől (kalibrációs mérések alapján 8,6; Bíró és mtsai, 1998) azt valószínűsíti, hogy a kezelés hatására nem következett be a sejtmembrán teljes pusztulása.

Annak a kizárására, hogy a fent említett hatásokat az oldószerként alkalmazott módosított Tyrode oldat (pH 11) vagy a peroxinitrit lebomlási termékei okozták, kísérleteink folytatásaként ezek hatásait elemeztük (25A és 25C ábra). Sem a módosított Tyrode oldat (V), mint közvetítő közeg, sem a PN lebomlási termékei (D) nem okoztak mérhető intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedést, ám az ezt követő aktív peroxinitrit alkalmazása az előzőekben leírtakhoz hasonló, drasztikus $[Ca^{2+}]_i$ -növekedést váltott ki. Mindezen megfigyelésekből arra következtettünk, hogy a peroxinitrit feltételezhetően nem specifikus útvonalon keresztül képes aktiválni az extracelluláris kalcium HaCaT keratinocytákba történő belépését.

IV.3.2. *A SIN-1 intracelluláris kalciumkoncentrációra kifejtett hatása HaCaT keratinocytákon*

Méréseink során elsőként azt vizsgáltuk, hogy képesek-e az oxidáns anyagok (SIN-1, NO) megváltoztatni az $[Ca^{2+}]_i$ -t, s ha igen a citoplazmában megjelenő kalciumionok az extracelluláris térből, vagy az intracelluláris raktárból származnak-e. Ennek eldöntésére 1, 2,5 valamint 5 mM-os koncentrációban alkalmaztuk a SIN-1-et extracelluláris kalcium jelenlétében és annak hiányában. A belső raktárak kalcium tartalmának ellenőrzésére a foszfatidil-inozitol rendszer ismert aktiválószerét, az ATP-t használtuk. Az ATP-t 180 μ M-os koncentrációban 20 s-ig alkalmaztuk a SIN-1 (300 s) adagolása előtt és után.

Extracelluláris kalcium jelenlétében a SIN-1 már 1 mM-os koncentrációban jelentős $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést okozott (26A ábra). A SIN-1 alkalmazása előtt és után mért, ATP-vel kiváltott kalciumtranziensek amplitúdói között különbséget nem tapasztaltunk. Az adenosin vegyülettel indukált $[Ca^{2+}]_i$ -növekedések nagyságában akkor sem volt szignifikáns változás, amikor magasabb (2,5 és 5 mM) koncentrációban alkalmaztuk az anyagot, bár az általa okozott intracelluláris kalciumszint emelkedés ezekben az esetekben nagyobb volt, mint 1 mM SIN-1 esetében (26B és 26C ábra).

Amikor ugyanezen kísérleteket kalciummentes extracelluláris oldatban végeztük el, azt tapasztaltuk, hogy a SIN-1 ilyen körülmények között is képes volt az $[Ca^{2+}]_i$ megemelésére (27. ábra). Ez a változás azonban jelentősen kisebb volt, mint amit a kalciumot tartalmazó külső oldatok esetében mértünk. A kalciumkoncentrációt növelő SIN-1 tehát részben az intracelluláris kalcium raktárból történő kalciumfelszabadítás révén fejti ki hatását. Ezzel párhuzamosan jelentősen csökkent a SIN-1 adagolást követő, ATP-vel kiváltott kalciumtranziens nagysága is. Ebben a tekintetben szintén

dózisfüggést figyelhettünk meg. A nagyobb koncentrációban alkalmazott SIN-1 nagyobb mértékben csökkentette az intracelluláris raktárak IP_3 receptorainak aktiválásával létrehozott kalciumtranzienseket.

A 28. ábrán bemutatott eredmények szemléltetik a körülbelül 60 egyedi sejten kapott mérések átlagát. Az 28A ábrarész a SIN-1 intracelluláris kalciumkoncentrációt növelő, dózisfüggő hatását szemlélteti. Mint látható, kalciumot tartalmazó külső oldatban magasabb (5 mM) SIN-1 koncentráció esetén az $[Ca^{2+}]_i$ változása elérte a 220 nM-t is. Ehhez képest jóval kisebbnek adódott a kalciummentes oldatban kapott 80 nM-os $[Ca^{2+}]_i$ -növekedés, de még ez a változás is szignifikánsnak bizonyult. Az ATP-vel kiváltott tranziensek amplitúdójára kifejtett hatás ezzel éppen ellentétes volt (28B ábra). Itt ugyanis a SIN-1 extracelluláris kalcium hiányában okozott nagyobb változást, míg normál Tyrode oldatban nem volt észrevehető különbség a SIN-1 adagolását megelőző és az azt követő, ATP által létrehozott kalciumtranziensek nagyságában. Mindezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a SIN-1 nemcsak a belső kalciumraktárakból képes kalciumot felszabadítani, hanem a sejtmembránon át történő kalciumbeáramlást is aktiválhatja.

V. MEGBESZÉLÉS

V.1. *Kapacitív kalcium beáramlás HaCaT keratinocytákon*

Kísérleteink első részében a belső raktárak által vezérelt kalcium csatornák szerepét és szabályozási lehetőségeit vizsgáltuk HaCaT keratinocytákon. Sejtvonalunk, mint a legtöbb olyan sejt, melyben a foszfatidil-inozitol útvonalon keresztül $[Ca^{2+}]_i$ -növekedés váltható ki, expresszálja ezeket a sejtfelszíni csatornákat. A kapacitív kalcium belépés a vizsgálatok széles körében érzékenynek bizonyult a PKC enzimek foszforilációs hatásával szemben. A rendelkezésre álló adatok többsége arra utal, hogy a PKC rendszer forbolésszterrel történő aktiválása után változott a kalcium belépés intenzitása, tehát a csatornák foszforilációs állapota befolyásolta azok működését. Érdeemesnek tűnt tehát megvizsgálni, hogy hosszabb idejű PMA kezelés, azaz a PKC rendszer lefelé szabályozódása megváltoztatja-e a SOC-aktivitást keratinocytákon is. Azon eredményeink, melyekben a PMA-val előkezelt sejteken a kalcium belépés fokozódását tapasztaltuk, valószínűsítik egy hasonló szabályozó mechanizmus jelenlétét HaCaT sejteken is. Izolált HaCaT sejteken a SOC csatornák aktiválódását figyeltük meg a PKC rendszer módosítása során. Ez egybeesik azzal az elképzeléssel, hogy a kalcium beáramlást biztosító csatornák egy része kontroll körülmények között részlegesen defoszforilált állapotban van, illetve a működőképes SOC csatornák számát negatív feedback mechanizmusok állítják be. A csatornákon keresztül bejutó kalcium ugyanis a PKC rendszer aktiválásán keresztül a csatornák foszforilációját hozza létre, mely a csatornák bezáródását, s így az influx megszűnését okozza. Ez a modell (29. ábra) magyarázatul szolgálhat azon korábbi megfigyelésre is, miszerint a foszfatidil-inozitol mechanizmus bradikininnel történő aktiválása során a kalciumbeáramlás PKC enzimek működésével összefüggésbe hozható csökkenését tapasztalták (Aoyama és mtsai, 1995).

Kísérleteink egyrészt megerősítették a raktárak által vezérelt csatornák jelenlétét prekonfluens HaCaT sejteken, másrészt rámutattak azok módosulására konfluens sejttenyészetben. Míg különálló sejteknél a kalcium beáramlás csak kisebb mértékű inaktivációt vagy deszenzitizációt mutatott, addig differenciálódó keratinocytákon 90 s alatt a folyamat szinte teljesen inaktiválódott. Ez a gyors inaktiváció is felelős az ATP ismételt adagolásakor jelentkező eltérésekért a két sejtpopuláció esetében. A 7B ábra ugyanis jól szemlélteti, hogy konfluens sejteken az $[Ca^{2+}]_{nyug}$ megemelkedett az első ATP-vel kiváltott kalciumtranzienst követően, de a továbbiakban a $[Ca^{2+}]_{nyug}$ értéke nem változott. Bár a konfluencia fokozódásával együtt a PKC ϵ szintjének a jelentős csökkenése, korai lenne egyértelműen kijelenteni, hogy ezen izoenzim hiánya okozta a kapacitív kalcium belépés gyors inaktiválódását. A prekonfluens sejtekkel ellentétben, az összefüggő réteget képező sejtek esetében, PMA kezelést követően módosultak a kalcium tranziensek, valamint megváltozott a SOC csatornákon keresztül a sejtbe történő kalcium beáramlás is. Forbolészter kezelés hatására nem változott a kalcium beáramlás különálló keratinocytákon, de jelentősen csökkent a PKC α mennyisége.

V.2. PKC izoenzimintázat módosulása a differenciálódás előrehaladtával

Kísérleteink során HaCaT sejteken 6 PKC izoenzimet azonosítottunk (α , β , δ , ϵ , η és ζ), mely jó egyezést mutatott korábbi eredményeinkkel (Bíró és mtsai, 1999; Bíró és mtsai, 2000). Az, hogy a klasszikus csoportba tartozó, kalcium-függő izoformát, a PKC β -t is sikerült azonosítanunk HaCaT sejteken, fontos lehet, hiszen ezzel szemben a psoriasisos sejtekben a PKC β izoforma mennyiségének erőteljes csökkenését mutatták ki (Fisher és mtsai, 1993). Az a tény pedig, hogy a HaCaT keratinocyták hiperproliferatív tulajdonsággal rendelkeznek, arra enged következtetni, hogy a β izoforma mennyiségének megváltozása kapcsolatban állhat az osztódási képesség

módosulásával. Méréseink során ezt egyértelműen nem bizonyítottuk, csak a lehetséges összefüggést tártuk fel.

A PKC rendszer általános aktiválószerének, a PMA-nak (100 nM) a krónikus alkalmazása specifikus változást okozott az izolált sejtek izoenzimintázatában. A PKC α mennyisége csökkent, míg a többi izoenzim szintjében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést a kontroll, előkezeletlen sejtekhez képest. Ez arra utalt, hogy a klasszikus csoportba tartozó, kalcium-dependens PKC α -nál megfigyelt változás kapcsolatban állhat a kísérletek során megfigyelt SOC aktivitás fokozódásával. Ez tovább erősíti azt a fentiekben leírt elképzelést, mely szerint a kapacitatív kalcium belépés és a PKC rendszer közötti kapcsolat egy negatív visszacsatolási mechanizmushoz hasonlít. Psoriasisban humán keratinocyták PKC izoenzim-szintjeinek a változását mutatták ki (Fisher és mtsai, 1993). Az a megfigyelés, hogy psoriasisos sejteken csökken a SOC aktivitás (Karvonen és mtsai, 2000), tovább erősíti az egyes izoenzimtípusok és a raktárak által vezérelt kalciumcsatornák közötti kapcsolatra vonatkozó elképzeléseket.

A proteinkináz C rendszerben differenciálódással együttjáró változások is tapasztalhatóak (Koizumi és mtsai, 1993). A korábban leírtakon túl kísérleteinkben mi az izoenzimintázat újabb módosulását mutattuk ki, ahol is a PKC β és ϵ lefelé szabályozódása következett be konfluens sejtek hosszantartó PMA kezelésének hatására, szemben a prekonfluens sejtekkel. Ezzel együtt a kalciumtranziensek kinetikája is megváltozott. Bár az $[Ca^{2+}]_i$ -változások mechanizmusa és a PKC izoenzimintázat között számos lehetséges kapcsolatot vizsgáltak már, még sok jelenség részletesebb magyarázatra szorul.

V.3. *Az IP₃-útvonalhoz kapcsolódó tényezők jellemzői proliferáló és differenciálódó keratinocytákon*

Bár úgy tűnik, hogy HaCaT sejteken számos PKC izoenzim elengedhetetlen szerepet játszik a kapacitív kalcium beáramlás mechanizmusának szabályozásában, a belső raktárak kalciumtartalmára, illetve az ER kalciumcsatornáira kifejtett közvetlen hatásuk valószínűleg kevésbé jelentős. Számos, egymástól független eredményünk támasztja alá ezt a következtetést. Először is a PMA kezelés sem prekonfluens, sem konfluens sejteknél nem módosította jelentősen az ATP által kiváltott kalciumtranziensek amplitúdóját, tehát valószínűleg nem befolyásolta a foszfo-inozitol útvonalat. Az izolált sejteken, külső kalcium jelenlétében, előkezelést követően megfigyelhető kismértékű, de nem szignifikáns $[Ca^{2+}]_{nyug}$ -emelkedés, valószínűleg a megnövekedett kalcium belépésnek köszönhető. Nem változott a kalciumtranziensek felszálló szárának meredeksége, valamint a kalciumraktárakba történő visszavételezésének időállandója sem, ami arra enged következtetni, hogy a kalciumpumpákat sem befolyásolták közvetlenül a PKC izoenzimek. Az enzimrendszer PMA-val történő aktiválása nem változtatta meg a CPA-val indukált kalciumtranziensek amplitúdóját és annak maximális felszállási meredekségét sem. Míg előbbi a belső raktárak feltöltöttségére utal, utóbbi az ER-ből nyugalomban felszabaduló kalcium mennyiségének jellemzője. Ezen túlmenően a PMA kezelés a kalciumtranziensek kinetikájában sem okozott számottevő változást egyik populációnál sem.

Ezek az eredmények azért is érdekesek, mert más szövetekben már leírták, hogy az IP₃-receptor rendelkezik foszforilációs hellyel (Harnick és mtsai, 1995) és hogy a foszfo-inozitol szignalizációs útvonalat befolyásolja az IP₃-receptorok PKC-dependens foszforilációja (Igwe és mtsai, 1995). Az a megfigyelés, hogy PMA-val kezelt sejteken

a PKC δ , η és ζ átlagos mennyisége nem változott, felveti, hogy a belső raktárak esetleg ezen, kalciumtól független PKC izoformák szabályozó hatása alatt állhatnak HaCaT keratinocytákon.

V.4. Mechanoszenzitív csatornák szerepe tenyésztett keratinocyták elektrofiziológiai tulajdonságaiban és kalcium homeosztázisában

A HaCaT sejtek elektrofiziológiai jellemzőire vonatkozó korábbi vizsgálatok során, a patch-clamp technika teljes sejttes konfigurációját alkalmazva, a sejtek nyugalmi membránpotenciálja -30 , -40 mV közötti értéknek adódott (Wohlrab és mtsai, 2000; Koegel és Alzheimer, 2001). Saját kísérleteinkben konvencionális mikroelektrodával -29 mV-os, patch-clamp technikával pedig -20 mV-os nyugalmi membránpotenciált regisztráltunk. A két módszerrel kapott értékek közötti különbség valószínűleg abból adódik hogy a patch-clamp technika teljes sejttes konfigurációjánál csökkentett klorid tartalmú oldatot használtunk. Irodalmi adatok utalnak ugyanis arra, hogy az extracelluláris tér kloridkoncentrációjának megváltozása a keratinocyták membránpotenciáljának következményes eltolódását idézi elő (Koegel és Alzheimer, 2001). A részleges kloridelvonásra azért volt szükség, hogy az árammérés során valóban az oldatok ozmolaritásának csökkenése, és nem a kloridkoncentráció változása által okozott hatásokat regisztráljuk. Konvencionális mikroelektrodával eddig nem történtek kísérletek keratinocytákon, feltételezhető azonban, hogy az így nyert eredmények megbízhatóbbak, mint a patch-clamp mérésekből származóak, hiszen az előbbi esetben a plazmamembrán kevésbé sérült. Arra vonatkozó irodalmi adatokat sem találtunk, hogy a mérőoldat által kialakított hidrosztatikai nyomás hogyan befolyásolja a sejtek elektrofiziológiai paramétereit. Saját eredményeinkre támaszkodva méréseinket

alacsony hidrosztatikai nyomás (oldatszint) mellett végeztük, s az így kapott -29 mV-os értéket tekintettük elfogadhatónak.

A membránpotenciál csökkenése különböző sejteknél általában együtt jár mechanoszenzitív csatornák aktiválódásával. A hipotalamusz magnocelluláris sejtjei hipozmotikus stresszre hiperpolarizációval válaszolnak, míg hiperozmotikus oldatban a MP depolarizáltabb irányba tolódik (Oliet és Bourque, 1993; Bourque és mtsai, 1994). Simaizomsejteken a mechanikai stressz a membrán depolarizálódását és ezen keresztül kontrakciót idéz elő. Ezt részben az MSC-n, részben feszültségfüggő csatornákon át beáramló kalcium okozza (Kirber és mtsai, 1998). Más sejtípusokon, például könnymirigyek acinus sejtjein (Speake és mtsai, 1998) a hipotóniás stressz által létrehozott extracelluláris kalcium beáramlás a Ca^{2+} -dependens K^+ vagy Cl^- áramokat aktiválja, s ez regulatórikus sejtterefogat növekedést (RVD) vált ki, valamint a sejtek hiperpolarizációját okozza.

Tenyésztett humán keratinocytákon patch-clamp módszerrel eddig mind kation, mind anion szelektív csatornákat sikerült azonosítani (Galiotta és mtsai, 1991). A kation csatornák egy része monovalens kationokra volt permeábilis, alacsony single channel konduktanciával rendelkezett és lineáris áram-feszültség összefüggést mutatott. A másik csoportot ezzel szemben nagy single channel konduktancia jellemezte és tagjai fiziológiás ionösszetétel mellett rektifikációt mutattak. Míg az alacsony konduktanciájú csatornákat az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ megemelkedése aktiválta, a magas áteresztő képességű csatornák működését mind a belső, mind a külső kalciumkoncentráció növekedése gátolta. Az anion (Cl^-) csatornák kismértékű rektifikációval és közepes konduktanciával voltak jellemezhetők.

A mérőoldatok ozmolaritásának csökkentése az általunk vizsgált sejteken jelentős hiperpolarizációt hozott létre anélkül, hogy a sejtterefogatot számottevően megváltoztatta

volna. Kísérleti körülményeink között a MP-változások lehetséges okának a klorid belépés és/vagy a kálium kilépés tűnt. Korábbi közleményekben már beszámoltak arról, hogy keratinocytákon a hipotóniás stressz egy térfogat-szenzitív klorid áramot aktivál (Rugolo és mtsai, 1992), hisz a regisztrált áram jelentősen csökkent kloridmentes külső oldatban. A Rugolo és mtsai (1992) által leírt áram, mely magasabb MP-értékeknél erős rektifikációt mutatott, egyértelműen különbözött az általunk regisztráltaktól. Valószínű tehát, hogy a fontos szabályozó szereppel bíró kloridkonduktancia mellett stretch-aktivált kation csatornák is részt vesznek a HaCaT sejtek MP-jának kialakításában, illetve annak megváltoztatásában. A mérések során megfigyelt $[Ca^{2+}]_i$ -változások felvetik a kalcium-függő csatornák szerepét is a vizsgált sejtfolymatokban. A kalcium-függő ionáramok felelősek lehetnek azért is, hogy a konvencionális mikroelektrodákkal regisztrált membránpotenciál-változások nagyobbak voltak, mint a patch elektrodák segítségével rögzítettek. Utóbbi esetben ugyanis nemcsak dializálva volt az intracelluláris tér, de ezen túlmenően a pipettaoldatban jelenlévő EGTA is megakadályozta az $[Ca^{2+}]_i$ jelentősebb megemelkedését.

A PKC izoenzimek számos sejttypusnál töltenek be fontos szerepet a proliferáció, és a differenciálódás (Denning és mtsai, 1995; Lee és mtsai, 1998) valamint a különböző ioncsatornák működésének (Wickman és Chapman, 1995; Sheppard és Welsh, 1999) szabályozásában. Eredményeink szerint a PKC rendszer aktivitásának tartós PMA kezeléssel történő megváltoztatása fokozza a hipotóniás stresszre adott sejt választ. Kísérleteink során a forbolészterrel történő előkezelés növelte a csökkent ozmolaritású oldatban mérhető klorid áramot, és nagyobb volt a regisztrált membránhiperpolarizáció is. Irodalmi adatok arra utalnak, hogy egyes klorid csatornák kalcium jelenlétében PMA-val aktiválhatók, és az aktiválódás során PKC által mediált

fehérjefoszforiláció zajlik (Robson és Hunter, 1994). Az említett csatornák hipotóniás közegben fokozott aktivitást mutatnak.

Eredményeink arra utalnak, hogy a HaCaT sejtek plazmamembránjában valószínűleg mind anion- (klorid), mind kation-szelektív mechanoszenzitív csatornák vannak. A klorid áram hipozmotikus körülmények között jelentős MP-változást, hiperpolarizácót képes kiváltani. E csatornák működése PKC által mediált foszforilációs mechanizmusokkal befolyásolható (29. ábra). A kation csatornák száma feltehetően kevesebb, így feszültség-clamp körülmények között a rajtuk átfolyó áram nehezen detektálható. A kation csatornák biztosíthatják a megfelelő mennyiségű kalcium bejutását a sejtbe, és így hozzájárulhatnak a hiperproliferációs válasz kialakulásához. Fontos megjegyezni azt is, hogy a klorid áram által kiváltott jelentős hiperpolarizáció, megfelelő elektrokémiai gradiens kialakításával segíti a kalcium beáramlást, s így hozzájárul a hipotóniás stressz által okozott celluláris válaszok kialakításához.

V.5. Hipotóniás stressz hatása a keratinocyták proliferációjára és differenciálódására

Az irodalomban régóta feltételezik, hogy a mechanikai stressz befolyásolja a keratinocyták proliferációját (Görmár és mtsai, 1990; Takei és mtsai, 1997). Az osztódási ráta fokozódása mellett többféle szignalizációs folyamat megváltozását is megfigyelték már mechanikai stimuláció esetén. Ezek közül kiemelkedő a PKC rendszer izoforma-specifikus aktivációja (Takei és mtsai, 1997), valamint az interleukin-1 α és β gének expressziójának fokozódása (Takei és mtsai, 1998). További közlemények szólnak a hiperozmotikus környezet és a HaCaT sejtek osztódási rátájának csökkenése közötti kapcsolatról (Dascalu és mtsai, 2000). Ezekkel a megfigyelésekkel hozták kapcsolatba a külső mechanikai ingerek hatására bekövetkező sejtproliferációs változásokat.

Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a HaCaT sejtek nem osztódtak, ha környezetükben folyamatosan hipotóniás médium volt jelen. Ha azonban hirtelen ozmotikus stressznek tettük ki őket, proliferációs képességük megnőtt. Ezek alapján feltételezzük, hogy a mechanikai feszülés megváltozása jelenti az osztódás megindulásához szükséges szignált. Ezt az elképzelést alátámasztják azok az kísérletek is, melyekben periódikus, nem pedig állandó mechanikai hatások a sejtek hiperproliferációjához vezettek (Takei és mtsai, 1997).

Csökkentet ozmolaritású tenyésztőoldatban az osztódás elmaradását, valamint egy késői differenciálódási marker, az involucrin szintjének módosulását tapasztaltuk. Hasonló megfigyelést tettek Dascalu és mtsai. (2000) hiperozmotikus oldatok hatásának vizsgálatakor. Figyelembe véve, hogy kísérleteinkben az aktuális térfogatváltozások kismértékűek voltak, feltételezhető, hogy mindkét irányú ozmolaritás változás hasonló jelátviteli folyamatokat indít el a keratinocytákban. Ezt támasztja alá az is, hogy mind az ozmolaritás csökkentése (saját eredményeink), mind annak növelése (Dascalu és mtsai, 2000) az $[Ca^{2+}]_i$ megváltozását eredményezte. Az $[Ca^{2+}]_i$ emelkedése pedig kulcsszerepet játszik a keratinocyták proliferációs és differenciálódási folyamataiban (Pillai és mtsai, 1990). Befolyásolja (növeli) többek között az involucrin expresszióját (Ng és mtsai, 1996), és fontos szabályozó szerepe van a transzmembrán áramok aktiválásában is (Koegel és Alzheimer, 2001). Mindezeket figyelembe véve úgy tűnik, hogy a sejtosztódási és érési folyamatokban az $[Ca^{2+}]_i$ -nak mind PKC-tól független, mind PKC-függő hatásai vannak. Ezen túlmenően feltételezhető, hogy a megemelkedett $[Ca^{2+}]_i$ hatására hiperproliferáció alakul ki, míg a differenciálódási markerek szintje a megváltozott osztódási rátának a következményeként módosul.

V.6. Peroxinitrit és SIN-1 hatása keratinocytá sejtvonalon

Kísérleteinkben arra is választ kerestünk, hogy milyen szerepet játszik a kalciumjel az indukált sejthalál kialakításában peroxinitrittel előkezelt HaCaT sejteken. Mind a PN, mind ennek prekursoraként számontartott SIN-1, intracelluláris kalciumszint-emelkedést váltott ki a vizsgált sejteken. A leírt változások nagy hasonlóságot mutattak a korábban thymocytákon (Virág és mtsai, 1999), valamint neuronokon és izolált mitokondriumokon (Ohkuma és mtsai, 2001; Packer és Murphy, 1994) megfigyelt, PN-által indukált kalciummobilizálással. Az intracellulárisan megjelenő kalciumionok elsősorban az extracelluláris térből származtak, bár jelentős volt a citoplazmatikus kalciumraktárakból történő kalciumfelszabadulás is. A sejt környezetéből történő kalciumbeáramlás egyrészt létrejöhetett azáltal, hogy a peroxinitrit közvetlen membránkárosító hatással rendelkezik. Másrészt viszont az intracelluláris raktárak által vezérelt, SOC csatornák aktivációja is elősegíthette a kalcium sejtbe történő bejutását. Ez utóbbi csatornák jelenlétét és kapcsolatukat a PKC rendszerrel munkacsoportunk már korábban kimutatta HaCaT sejteken (Csernoch és mtsai, 2000), s szerepüket a IV.1 és V.1. fejezet részletesen tárgyalta.

Az a megfigyelés, hogy sejtpermeabilis kalciumkelátor (BAPTA-AM) alkalmazásával kivédhető volt a peroxinitrit által okozott sejttoxicitás, szintén a kalciumjelnek a sejthalál folyamatában betöltött fontos szerepére utalt. A kalcium megkötése esetén elmaradt a hidrogén-peroxiddal kiváltott citotoxicitás is, míg a BAPTA jelenléte nem befolyásolta a szuperoxiddal létrehozott sejtelhalást. Mindebből arra következtethetünk, hogy a különböző reaktív anyagok eltérő citotoxikus útvonalakat aktiválnak.

Fontos volt megvizsgálni azt is, hogy a kalciumjel és/vagy a sejtdenzitás változása okozza-e az osztódó és differenciálódó sejtek oxidatív hatásokkal szemben mutatott eltérő ellenállóképességét *in vitro* körülmények között. Adataink arra utalnak, hogy nem a sejtek nyugalmi intracelluláris kalciumkoncentrációja, hanem az abban kialakuló változások jelentik a citotoxikus szignált. Mindezek mellett méréseink alapján valószínűnek tűnik az is, hogy a sejt különböző metabolikus (pl. mitokondriális) aktivitása is befolyásolja a prekonfluens (proliferáló) és a konfluens (differenciálódó) keratinocyták oxidatív stresszel szemben mutatott érzékenységét. Mivel a peroxinitrit fokozta a DNS szálakban bekövetkező törések gyakoriságát, jelenléte a poly(ADP-ribóz) polimeráz (PARP) aktivációjához is vezetett. Utóbbi enzim a DNS-en található bemélyedéseket érzékeli, s így megvédi a sejtet az oxidatív károsító hatásoktól (Szabó és mtsai, 2001).

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során HaCaT keratinocyták kalcium homeosztázisát és transzmembrán áramait tanulmányoztuk. Vizsgáltuk a proteinkináz C izoenzimek szerepét a purinerg jelátviteli útvonal szabályozásában, a kapacitív kalcium beáramlási folyamatban és a hipotóniás stresszel indukált mechanoszenzitív válaszban. Meghatároztuk a HaCaT sejtek jellemző elektrofiziológiai paramétereit normál és csökkentett ozmolaritású oldatban. Leírtuk a sejtproliferációban és a differenciálódásban az ozmotikus stressz hatására bekövetkező változásokat, valamint azt, hogy a fejlődési stádiumok hogyan befolyásolják az intracelluláris raktárakból történő kalciumfelszabadulást és a membránon átfolyó ionáramokat. Megvizsgáltuk oxidatív hatású anyagok intracelluláris kalciumkoncentrációra kifejtett hatását is. Eredményeinket összefoglalva a következőket mondhatjuk el.

A kapacitív kalcium beáramlás a belső raktárakból történő kalciumfelszabaduláshoz szorosan kapcsolódó folyamat és HaCaT sejtekben is fontos szerepet játszik a kalcium homeosztázisban. HaCaT sejtek esetében ez a transzmembrán áram közvetetten a foszfoinozitol útvonalon keresztül aktiválható. HaCaT sejtek hosszú ideig tartó előkezelése forbol 12-mirisztát 13-acetáttal, a klasszikus csoportba tartozó, kalcium-dependens proteinkináz C izoforma, a PKC α szintjének szelektív csökkenését okozta proliferáló sejteken. Ezzel egyidőben bár a PI-útvonalban nem tapasztaltunk változást az előkezelt sejteken, a kapacitív kalcium beáramlás azonban fokozódott. Ez arra utal, hogy a PKC rendszer közvetlenül a transzmembrán áramot befolyásolja. Megfigyeléseinket megerősítették a ciklopiazonsavval végzett kísérletek is. Ha CPA-val kiürítettük a citoplazmatikus kalciumraktárakat, s így aktiváltuk a store-operated kalciumcsatornákon keresztül létrejövő kalcium beáramlást, a kalcium belépés mértéke

47%-al nagyobb volt a PMA-val előkezelt sejteken, mint kontroll esetben. Konfluens, differenciálódó keratinocytákban a PKC ϵ szintje jelentősen lecsökkent a prekonfluens sejtekhez viszonyítva, míg a többi jelenlévő izoenzim expressziójában nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést. A differenciálódás előrehaladtával párhuzamosan módosult a kapacitív kalcium beáramlás kinetikája is, a megfigyelt lassulás valószínűleg a csatornák inaktivációjára utal. Konfluens sejtek PMA-val történő előkezélése a PKC β és PKC ϵ izoenzimek szintjének csökkenését okozta, nem változtatta meg azonban a SOC aktivitását. Ezen megfigyelésekből arra következtettünk, hogy számos PKC izoenzimnek van szabályozó szerepe a kapacitív kalcium beáramlás mechanizmusában, de ezek a hatások eltérőek, esetenként akár ellentétesek is lehetnek.

A keratinocyták proliferációját és differenciálódását jelentősen megváltoztathatják különböző mechanikai hatások. Munkánk során sikerült a stretch-aktivált csatornák jelenlétét kimutatni HaCaT sejtvonalon. Ezen csatornák hipotóniás stresszel történő aktiválása a sejtek membránpotenciáljának hiperpolarizációs irányba történő elmozdulását okozta, amely változás részlegesen reverzibilis volt. A membránpotenciál hasonló változását tapasztaltuk a hidrosztatikai nyomás emelésekor is. A csatornák Cl⁻-ra permeábilisak, mivel Cl⁻-mentes mérőoldatban a korábban tapasztalt változások elmaradtak. Hipotóniás oldatok az intracelluláris kalciumkoncentrációt is növelték, a válaszok nagysága erőteljesen függött az extracelluláris kalcium mennyiségétől. Ebből arra következtethettünk, hogy a sejtmembrán feszülése kation-szelektív csatornákat is aktivál. A sejtek PMA-val történő előkezélése növelte a hipotóniás stressz által kialakított válaszokat, feltehetően fokozva a stretch-aktivált csatornák megnyílásának valószínűségét.

A csökkentett ozmolaritású tenyésztőoldat folyamatos jelenléte megakadályozta a keratinocyták növekedését. Ezzel szemben, ha az izotóniás tenyésztőoldatban növekvő sejteken az oldatot hirtelen hipotóniásra cseréltük le, a proliferáció növekedését, illetve a terminális differenciálódási marker, az involucrin szintjének csökkenését tapasztaltuk. Megfigyeléseink a mechanikai feszülés megváltoztatásának, mint a proliferáció szabályozásában szerepet játszó külső ingernek a fontosságára mutattak rá.

A különböző gyulladásoz folyamatok során megnövekvő citotoxikus anyagok apoptózist és nekrozist kialakító hatása a sejtek többségénél összefüggésbe hozható a kalciumhomeosztázis befolyásolásával. Ezt tapasztaltuk a HaCaT sejtek esetében is, ahol mind a peroxinitrit, mind ennek prekürzora, a SIN-1 növelte a sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációját. A SIN-1 hatásának kialakításában mind a belső raktárakból felszabaduló, mind az extracelluláris térből bejutó kalcium részt vett és a kalciumkoncentráció emelkedések reverzibilisek voltak. Ezzel ellentétben a PN az intracelluláris tér kalcium koncentrációjának folyamatos emelkedését és ezzel egyidőben a sejtmembrán integritásának csökkenését okozta, amely visszafordíthatatlan folyamat volt.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném köszönetemet kifejezni témavezetőmnek, Dr. Csernoch Lászlónak, az MTA doktorának, akinek szakmai iránymutatása, értékes segítsége, baráti támogatása és hasznos tanácsai nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönöm Dr. Kovács László akadémikusnak, a DE OEC Élettani Intézete igazgatójának, hogy munkám elkészítéséhez minden feltételt megadott intézetében és munkám során támogatására mindig számíthattam.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet minden dolgozójának, különösen Tálásné Őri Róza és Dr. Varga Attiláné asszisztensnőknek munkám során nyújtott önzetlen segítségükért.

Végezetül, de nem utolsósorban köszönöm családom és barátaim megértő támogatását, amely erőt és biztonságos hátteret adott munkám végzéséhez.

IRODALOMJEGYZÉK

- Ackerman MJ, Wickman KD, Clapham DE. Hypotonicity activates a native chloride current in *Xenopus* oocytes. *J Gen Physiol* 1994; 103:153-179.
- Aoyama Y, Seishima M, Mori S, Kitajima Y, Okano Y, Nozawa Y. Involvement of protein kinase C in bradykinin-induced intracellular calcium increase in primary cultured human keratinocytes. *J Dermatol Sci* 1995; 9:111-116.
- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxid, superoxide, and peroxinitrit: The good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-C1437.
- Bikle DD, Ratman A, Mauro T, Harris J, Pillai S. Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocytes differentiation. Potential role of the calcium receptor. *J Clin Invest* 1996; 97:1085-1093.
- Bíró T, Boros S, Boczán J, Kovács L. The role of protein kinase C in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1999; 113:455.
- Bíró T, Papp H, Lázár J, Czifra G, Kovács L. Distinct roles of protein kinase C isoenzymes in regulating proliferation and differentiation of HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000; 115: 548.
- Bíró T, Szabó I, Kovács L, Hunyadi L. And Csernoch L. Distinct subpopulation in HaCat cells as revealed by the characteristic of intracellular calcium release induced by phosphoinositide-coupled agonists. *Arch Dermatol Res* 1998; 290:270-276.
- Bode HP, Goke B. Protein kinase C activates capacitative calcium entry in the insulin secreting cell line RINm5F. *FEBS Letter* 1994; 339:307-311.
- Bollag WB, Ducote J, Harmon CS. Effects of the selective protein kinase C inhibitor, Ro 31-7549, on the proliferation of cultured mouse epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 1993 ; 100(3) :240-246.

- Boukamp P, Petrussevka RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 1988; 106:761-771.
- Bourque CW, Oliet SH, Richard D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 1994 ; 15(3) :231-274.
- Brodie C, Kuperstein I, Acs P, Blumberg PM. Differential role of specific PKC isoforms in the proliferation of glial cells and the expression of the astrocytic markers GFAP and glutamine synthetase. *Brain Res Mol Brain Res* 1998 ; 56:108-117.
- Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev.* 1972; 24(3):509-581.
- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen. Pharmacol.* 1985; 16:433-440.
- Christensen O. Mediation of cell volume regulation by Ca^{2+} influx through stretch-activated channels. *Nature* 1987 ; 330:66-68.
- Clapham DE. Sorting out MIC, TRP, and CRAC ion channels. *J Gen Physiol* 2002; 120(2):217-220.
- Cotton SA, Herrick AL, Jayson MI, Freemont AJ. Endothelial expression of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in systemic sclerosis skin. *J Pathol* 1999; 189:273-278.
- Csernoch L, Hunyadi J. And Kovács L. Calcium release activated calcium entry in a human skin derived cell line (HaCaT). *Exp Dermatol* 2000; 9:200-205.
- Dascalu A, Matithyou A, Oron Y, Korenstein R. A hyperosmotic stimulus elevates intracellular calcium and inhibits proliferation of a human keratinocyte cell line. *J Invest Dermatol* 2000 ; 115(4) :714-718.

- Deliconstantinos G, Villiotou V, Stavrides JC. Increase of particulate nitric oxide synthase activity and peroxynitrite synthesis in UVB-irradiated keratinocyte membranes. *Biochem J* 1996; 320:997-1003.
- Denning MF, Dlugosz AA, Williams EK, Szallasi Z, Blumberg PM, Yuspa SH. Specific protein kinase C isozymes mediate the induction of keratinocyte differentiation markers by calcium. *Cell Growth Differ* 1995 ; 6:149-157.
- Dixon CJ, Bowler WB, Littlewood-Evans A, Dillon JP, Bilbe G, Sharpe GR, Gallagher JA. Regulation of epidermal homeostasis through P2Y₂ receptors. *Br J Pharmacol* 1999; 127:1680-1686.
- Dlugosz AA, Mischak H, Mushinski JF, Yuspa SH. Transcripts encoding protein kinase C-alpha, -delta, -epsilon, -zeta, and -eta are expressed in basal and differentiating mouse keratinocytes in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cells. *Mol Carcinog* 1992 ; 5:286-292.
- Dlugosz AA, Yuspa SH. Protein kinase C regulates keratinocyte transglutaminase (TG_K) gene expression in cultured primary mouse epidermal keratinocytes induced to terminally differentiate by calcium. *J Invest Dermatol* 1994; 102:409-414.
- Fischer SM, Lee ML, Maldve RE, Morris RJ, Trono D, Burow DL, Butler AP, Pavone A. And Warren B. Association of protein kinase C activation with ornithine decarboxylase in murine but not in human keratinocyte cultures. *Mol Carcinog* 1993; 7:228-237.
- Fisher GJ, Tavakkol A, Leach K, Burns D, Basta P, Loomis C, Griffiths CE, Cooper KD, Reynolds NJ, Elder JT. Differential expression of protein kinase C isoenzymes in normal and psoriatic adult human skin: reduced expression of protein kinase C-beta II in psoriasis. *J Invest Dermatol* 1993; 101:553-559.

- Fomina AF, Fanger CM, Kozak JA, Cahalan MD. Single channel properties and regulated expression of Ca(2+) release-activated (CRAC) channels in human T cells. *J Cell Biol* 2000; 150:1435-1444.
- Galiotta LJV, Barone V, De Luca M, Romeo G. Characterization of chloride and cation channels in cultured human keratinocytes. *Pflügers Arch* 1991; 418:18-25.
- Geiges D, Marks F, Gschwendt M. Loss of protein kinase C δ from human HaCaT keratinocytes upon ras transfection is mediated by TGF α . *Exp Cell Res* 1995; 219:299-303.
- Gönczi M, Papp H, Bíró T, Kovács L, Csernoch L. Effect of protein kinase C on transmembrane calcium fluxes in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 2002; 11:25-33.
- Goodnight JA, Mischak H, Kolch W. And Mushinski JF. Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isoenzymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J Biol Chem* 1995; 270:9991-10001.
- Goodnight JA, Mischak H. And Mushinski JF. Selective involvement of protein kinase C isoenzymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv Cancer Res* 1994; 64:159-209.
- Gormar FE, Bernd A, Bereiter-Hahn J, Holzmann H. A new model of epidermal differentiation: induction by mechanical stimulation. *Arch Dermatol Res* 1990; 282(1):22-32.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985; 260:3440-3450.

- Hahn J, Jung W, Kim N, Uhm DY, Chung S. Characterization and regulation of rat microglial Ca(2+) release activated (CRAC) channel by protein kinases. *Glia* 2000: 31:118-124.
- Harnick DJ, Jayaraman T, Ma Y, Mulieri P, Go LO, Marks AR. The human type 1 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor from T lymphocytes. Structure, localization, and tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 1995; 270: 2833-2840.
- Hattori Y, Nishigori C, Tanaka T, Uchida K, Nikaido O, Osawa T, Hiai H, Imamura S, Toyokuni S. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine is increased in epidermal cells of hairless mice after chronic ultraviolet B exposure. *J Invest Dermatol* 1996: 107:733-7.
- Hegemann L, Wevers A, Bonnekoh B, Mahrle G. Changes of epidermal cell morphology and keratin expression induced by inhibitors of protein kinase C. *J Dermatol Sci* 1992: 3:103-110.
- Igwe OJ, Filla MB. Regulation of phosphatidylinositide transduction system in rat spinal cord during aging. *Neurosci* 1995: 69:1239-1251.
- Karvonen SL, Korkiamaki T, Yla-Outinen H. Psoriasis and altered calcium metabolism: downregulated capacitative calcium influx and defective calcium-mediated cell signaling in cultured psoriatic keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2000: 114:693-700.
- Kippenberger S, Bernd A, Loitsch S, Guschel M, Müller J, Bereiter-Hahn J, Kaufmann R. Signaling of mechanical stretch in human keratinocytes via MAP kinases. *J Invest Dermatol* 2000:114:408-412.
- Koegel H, Alzheimer C. Expression and biological significance of Ca²⁺-activated ion channels in human keratinocytes. *Faseb J* 2001: 15:145-154.
- Koizumi H, Kohno Y, Osada S, Ohno S, Ohkawara A, Kuroki T. Differentiation-associated localization of nPKC η , a Ca⁺⁺-independent protein kinase C, in normal human skin and skin diseases. *J Invest Dermatol* 1993: 101:858-863.

- Le Panse R, Coulomb B, Mitev V, Bouchard B, Lebreton C, Dubertret L. Differential modulation of human fibroblast and keratinocyte growth by protein kinase C inhibitor GF 109203X. *Mol Pharmacol* 1994; 46:445-451.
- Lee YS, Dlugosz AA, McKay R, Dean NM, Yuspa SH. Definition by specific antisense oligonucleotides of a role for protein kinase C α in expression of differentiation markers in normal and neoplastic mouse epidermal keratinocytes. *Mol Carcinog* 1997; 18:44-53.
- Lee YS, Yuspa SH, Dlugosz AA. Differentiation of cultured human epidermal keratinocytes at high cell densities is mediated by endogenous activation of protein kinase C pathway. *J Invest Dermatol* 1998; 111:762-766.
- Lewis RS. Calcium signaling mechanisms in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 2001; 19:497-521.
- Marletta MA, Hurshman AR, Rusche KM. Catalysis by nitric oxide synthase. *Curr Opin Chem Biol* 1998; 2:656-663.
- Mauro MT, Isseroff RR, Lasarow R, Pappone PA. Ion channels are linked to differentiation in keratinocytes. *J Membrane Biol* 1993; 132:201-209.
- Mene P, Pugliese G, Pricci F, Di Mario U, Cinotti GA, Pugliese F. High glucose level inhibits capacitative Ca²⁺ influx in cultured rat mesangial cells by a protein kinase C-dependent mechanism. *Diabetologia* 1997; 40:521-527.
- Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron GM, Schaehtle C, Kazaneitz MG, Blumberg PM, Pierce JH, Mushinski JF. Overexpression of protein kinase C- δ and - ϵ in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J Biol Chem* 1993; 268:6090-6096.
- Murray NR, Baumgardner GP, Burns DJ, Fields AP. Protein kinase C isotypes in human erythroleukemia (K562) cell proliferation and differentiation. Evidence that

- beta II protein kinase C is required for proliferation. *J Biol Chem* 1993;268:15847-15853.
- Ng DC, Su MJ, Kim R, Bikle DD. Regulation of involucrin gene expression by calcium in normal human keratinocytes. *Front Biosci* 1996; 1:16-24
- Nicotera P, Orrenius S. The role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium* 1998; 23:173-80.
- Nilius B, Droogmans G. Ion channels and their functional role in vascular endothelium. *Physiol Rev* 2001; 81(4):1415-1459.
- Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implication for cellular regulation. *Nature* 1988; 334:661-665.
- North RA. Molecular physiology of P2X receptors. *Physiol Rev* 2002; 82(4):1013-1067.
- Ohkuma S, Katsura M, Higo A, Shirotani K, Hara A, Tarumi C, Ohgi T. Peroxynitrite affects Ca^{2+} influx through voltage-dependent calcium channels. *J Neurochem* 2001; 76:341-50.
- Ohno S, Akita Y, Hata a, Osada S, Kubo K, Kohno Y, Akimoto K, Mizuno K, Saido T, Kuroki T. And Suzuki K. Structural and functional diversities of a family of signal transduction protein kinases. Protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv Enzyme Regul* 1991; 31:287-303.
- Oliet SH, Bourque CW. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* 1993 ; 364(6435) :341-3.
- Oliet SH, Bourque CW. Steady-state osmotic modulation of cationic conductance in neurons of rat supraoptic nucleus. *Am J Physiol* 1993 ; 265 :R1475-9.
- Packer MA, Murphy MP. Peroxynitrite formed by simultaneous nitric oxide and superoxide generation causes cyclosporin-A-sensitive mitochondrial calcium efflux and depolarization. *Eur J Biochem* 1995; 234:231-239.

- Packer MA, Murphy MP. Peroxynitrite causes calcium efflux from mitochondria which is prevented by Cyclosporin A. *FEBS Lett* 1994: 345:237-40.
- Papp H, Czifra G, Lázár J, Boczán J, Gönczi M, Csernoch L, Kovács L. And Bíró T. Protein kinase C isoenzymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* 2002:közlésre elfogadva
- Petersen CC, Berridge MJ. The regulation of capacitative calcium entry by calcium and protein kinase C in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* 1994: 269:32246-53.
- Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol* 1990: 143:294-302.
- Pillai S, Bikle DD. Adenosine triphosphate stimulates phosphoinositide metabolism, mobilises intracellular calcium, and inhibits terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Clin Invest* 1992: 90:42-51.
- Rawlingson A, Greenacre SA, Brain SD. Generation of peroxynitrite in localised, moderate temperature burns. *Burns* 2000: 26: 223-227.
- Rennecke J, Johannes FJ, Richter KH, Kittstein W, Marks F, Gschwendt M. Immunological demonstration of protein kinase C μ in murine tissues and various cell lines. Differential recognition of phosphorylated forms and lack of down-regulation upon 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate treatment of cells. *Eur J Biochem* 1996: 242:428-432.
- Robson L, Hunter M. Volume-activated, gadolinium-sensitive whole-cell currents in single proximal cells of frog kidney. *Pflügers Arch* 1994: 429(1):98-106.
- Romero-Graillet C, Aberdam E, Biagoli N, Massabni W, Ortonne JP, Ballotti R. Ultraviolet B radiation acts through the nitric oxide and cGMP signaltransduction

- pathway to stimulate melanogenesis in human melanocytes. *J Biol Chem* 1996 : 271 :28052-6.
- Rugolo M, Mastrocola T, De Luca M, Romeo G, Galletta LJV. A volume-sensitive chloride conductance revealed in cultured human keratinocytes by Cl⁻ efflux and whole-cell patch clamp recording. *Biochim Biophys Acta* 1992: 1112:39-44.
- Ryle CM, Breitzkreutz D, Startk HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D, Fuseind NE. Density-dependent modulation with synthesis of keratin 1 and 10 in human keratinocyte line HaCaT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation* 1989: 40:42-54.
- Sachs F, Morris CE. Mechanosensitive ion channels in nonspecialized cells. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1998: 132:1-77.
- Sackin H. Mechanosensitive Channels. *Annu Rev Physiol* 1995: 57:333-353.
- Sarkadi B, Parker JC. Activation of ion transport pathways by changes in cell volume. *Biocim Biophys Acta* 1991: 1071:407-427.
- Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channels. *Physiol Rev* 1999 : 79 :S23-45.
- Speake T, Douglas IJ, Brown PD. The role of calcium in the volume regulation of rat lacrimal acinar cells. *J Membr Biol* 1998 : 164(3) :283-291.
- Sun X, Martinez JR, Zhang GH. Inhibition of Ca²⁺ influx by pentoxifylline in NR8383 alveolar macrophages. *Immunopharmacology* 1999: 43:47-58.
- Szabó É, Virág L, Bakondi E, Gyüre L, Haskó G, Bai P, Hunyadi J, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite production, DNA breakage and poly(ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazolone-induced contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol* 2001 : 117 :74-80.

- Tasker RC, Sahota SK, Cotter FE, Williams SR. Early postischemic dantrolene-induced amelioration of poly(ADP-ribose) polymerase-related bioenergetic failure in neonatal rat brain slices. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18:1346-56.
- Virág L, Scott GS, Antal-Szalmás P, O'Connor M, Ohshima H, Szabó Cs. Requirement of intracellular calcium mobilization for peroxynitrite-induced poly(ADP-ribose) synthetase activation and cytotoxicity. *Mol Pharmacol* 1999; 56:824-833.
- Virág L, Szabó É, Bakondi E, Bai P, Gergely P, Hunyadi J, Szabó C. The nitric oxide – peroxynitrite – poly(ADP-ribose) polymerase pathway in the skin. *Exp Dermatol* 2002; 11:189-202.
- Warren JB. Nitric oxide and human skin blood flow responses to acetylcholine and ultraviolet light. *FASEB J* 1994; 8: 247-251.
- Weller R, Pattullo S, Smith L, Golden M, Ormerod A, Benjamin N. Nitric oxide is generated on the skin surface by reduction of sweat nitrate. *J Invest Dermatol* 1996; 107: 327-331.
- Weller R. Nitric oxide—a newly discovered chemical transmitter in human skin. *Br J Dermatol* 1997; 137: 665-672.
- Wickman K, Clamham DE. Ion channel regulation by G proteins. *Physiol Rev* 1995 : 75(4) :865-885.
- Wohlrab D, Wohlrab J, Markwardt F. Electrophysiological characterization of human keratinocytes using the patch-clamp technique. *Exp Dermatol* 2000; 9:219-223.
- Yamasaki K, Edington HD, McClosky C. Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer. *J Clin Invest* 1998; 101: 967-971.

KÖZLEMÉNYEK

Az értekezésben felhasznált *in extenso* közlemények:

Gönczi M, Papp H, Bíró T, Kovács L, Csernoch L. Effect of protein kinase C on transmembrane calcium fluxes in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2002: 11:25-33.

IF: 2,234

*Edina Bakondi, ***Mónika Gönczi**, Éva Szabó, Péter Bai, Pál Pacher, Pál Gergely, László Kovács, János Hunyadi, Csaba Szabó, László Csernoch, László Virág: Role of intracellular calcium mobilization and cell density-dependent signaling in oxidative stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J Invest Dermatol* (közlésre elfogadva) **IF: 4,645**

* Bakondi Edina és Gönczi Mónika megosztott első szerzők.

Mónika Gönczi, Norbert Szentandrassy, Enikő Bodó, János Magyar, Tamás Bíró, Péter P. Nánási, László Kovács, László Csernoch: Stretch-activated channels influence the membrane potential and alter the proliferation of HaCaT keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol* (közlésre beküldve)

Egyéb *in extenso* közlemények és idézhető absztraktok:

Helga Papp, Gabriella Czifra, József Lázár, Judit Boczán, **Mónika Gönczi**, László Csernoch, László Kovács, Tamás Bíró: Protein kinase C isoenzymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol* In press **IF: 2,234**

M. Gönczi, Gy. Szigeti, L. Fülöp, J. Magyar, L. Kovács, L. Csernoch: Role of stretch-activated channels in human keratinocytes. *Acta Physiologica Hungarica* 2002: 89(1-3):48.

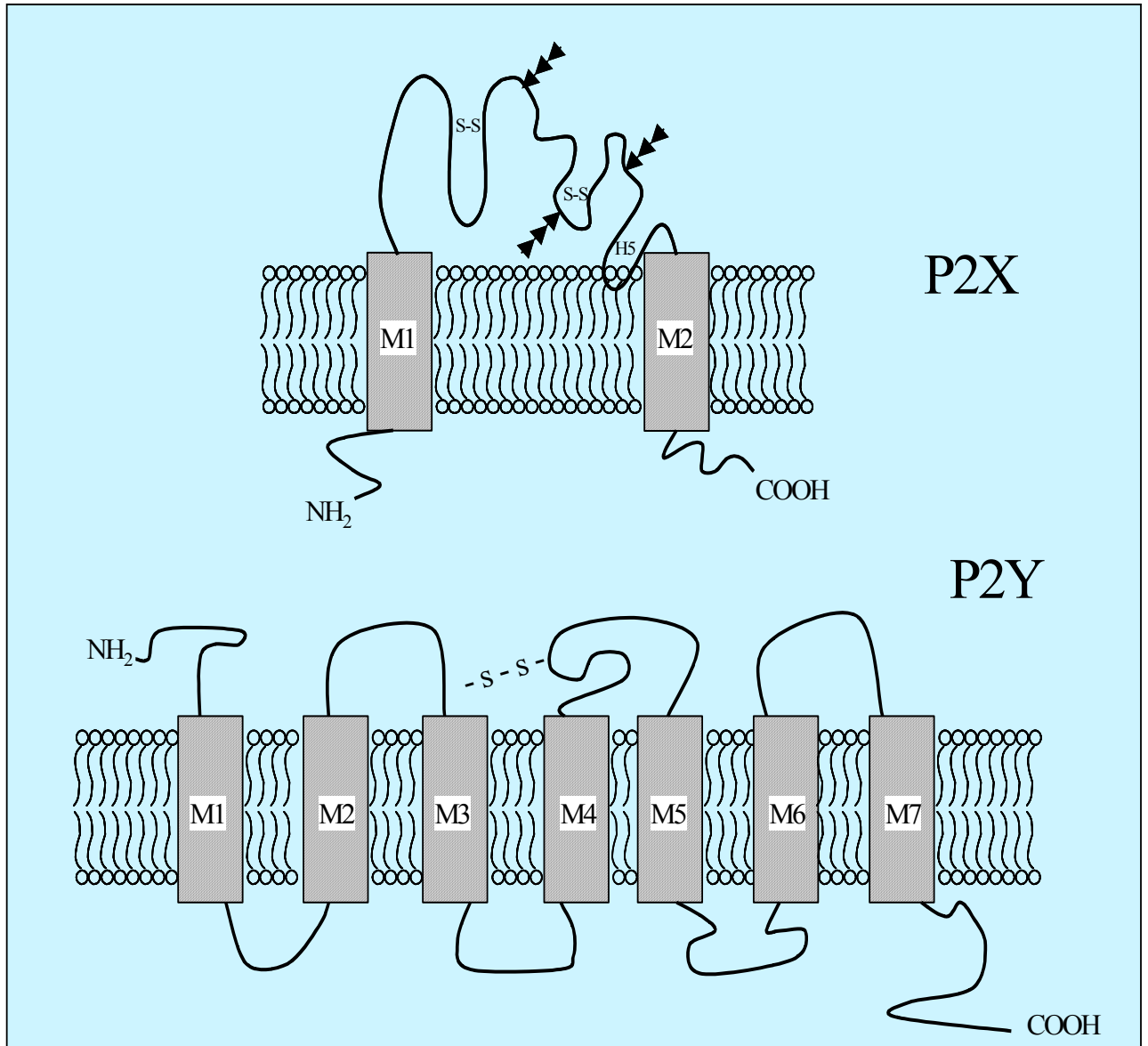
M. Gönczi, H. Papp, E. Bodó, L. Kovács, T. Bíró, L. Csernoch: Effects of recombinant overexpression of PKC α and δ on receptor-coupled calcium handling in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2002: 119(3):746.

N. Szentandrásy, **M. Gönczi**, H. Papp, J. Lázár, L. Kovács, T. Bíró, L. Csernoch: Stretch-activated channels and their regulation by protein kinase C in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 2002: 119(3):746.

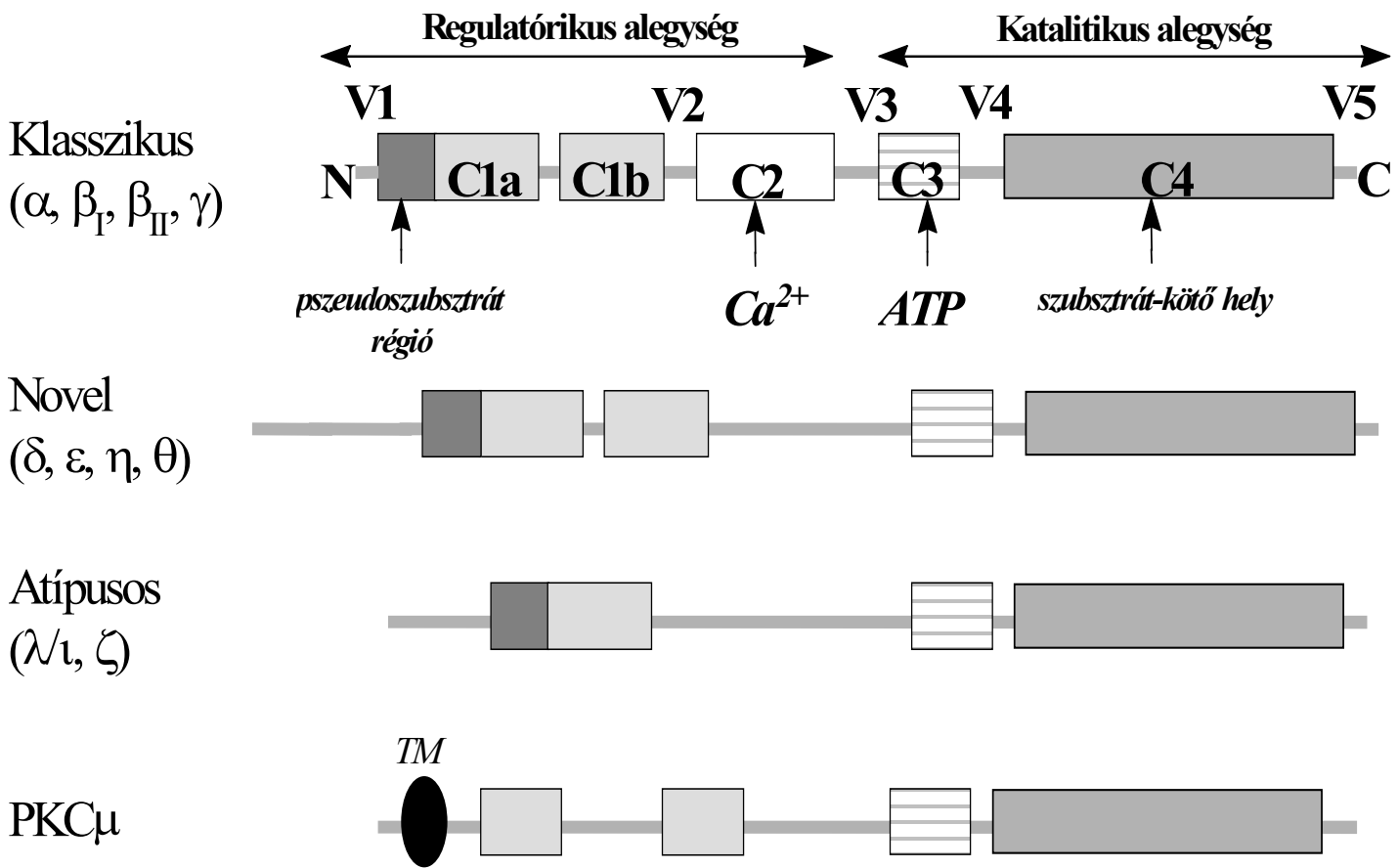
**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ,
NYOMTATÁSBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK
KÜLÖNLENYOMATAI**

FÜGGELÉK

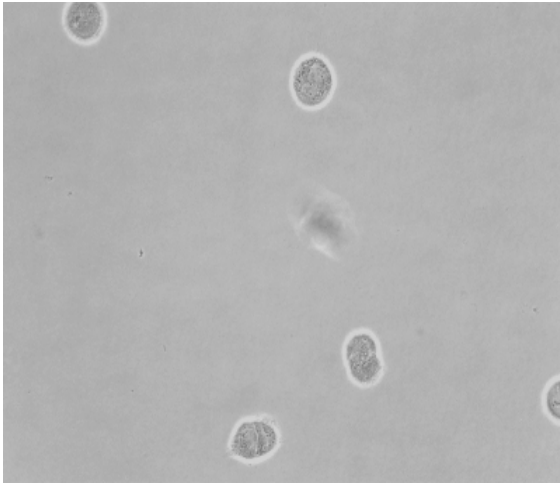
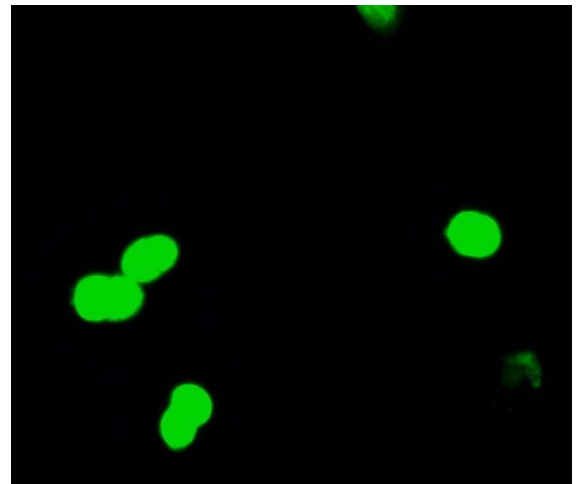
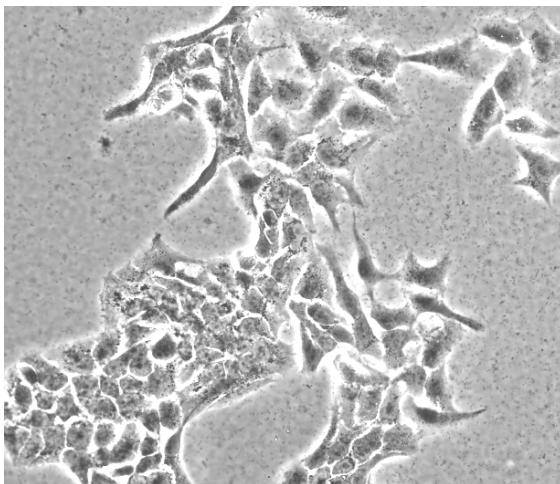
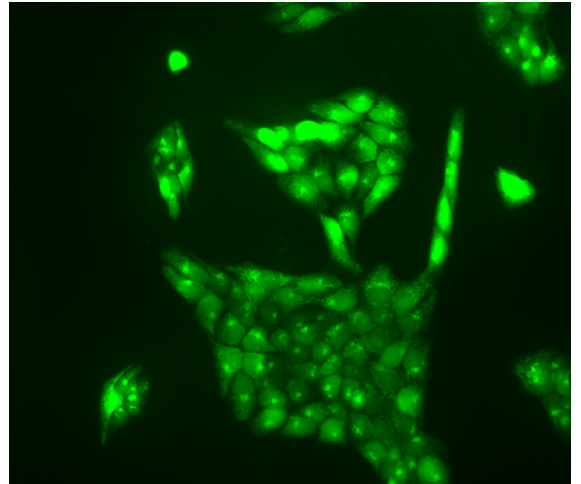
(A CIKKEKBEN MEG NEM JELENT ÁBRÁK)



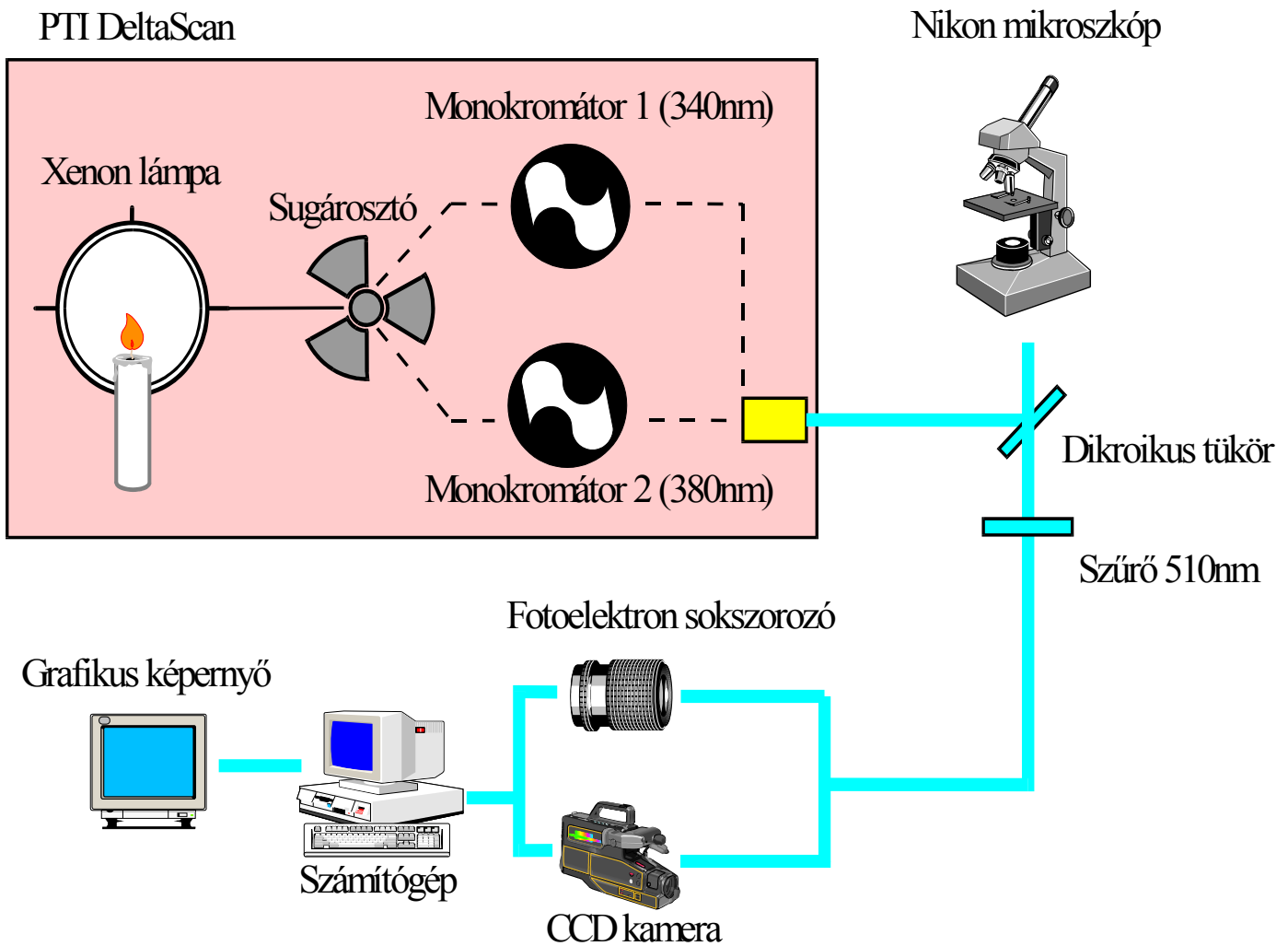
1. ábra: Az ionotróp (P2X) és metabotróp (P2Y) purinoreceptorok sematikus szerkezeti felépítése és membránban való elhelyezkedése. A P2X és P2Y receptorok nemcsak a membránon átívelő szakaszok számában, hanem az N- és C- terminális elhelyezkedésében is különböznek. Emellett számos eltérés figyelhető meg a rajzon, amely a funkcionális különbségek és tulajdonságok alapja.



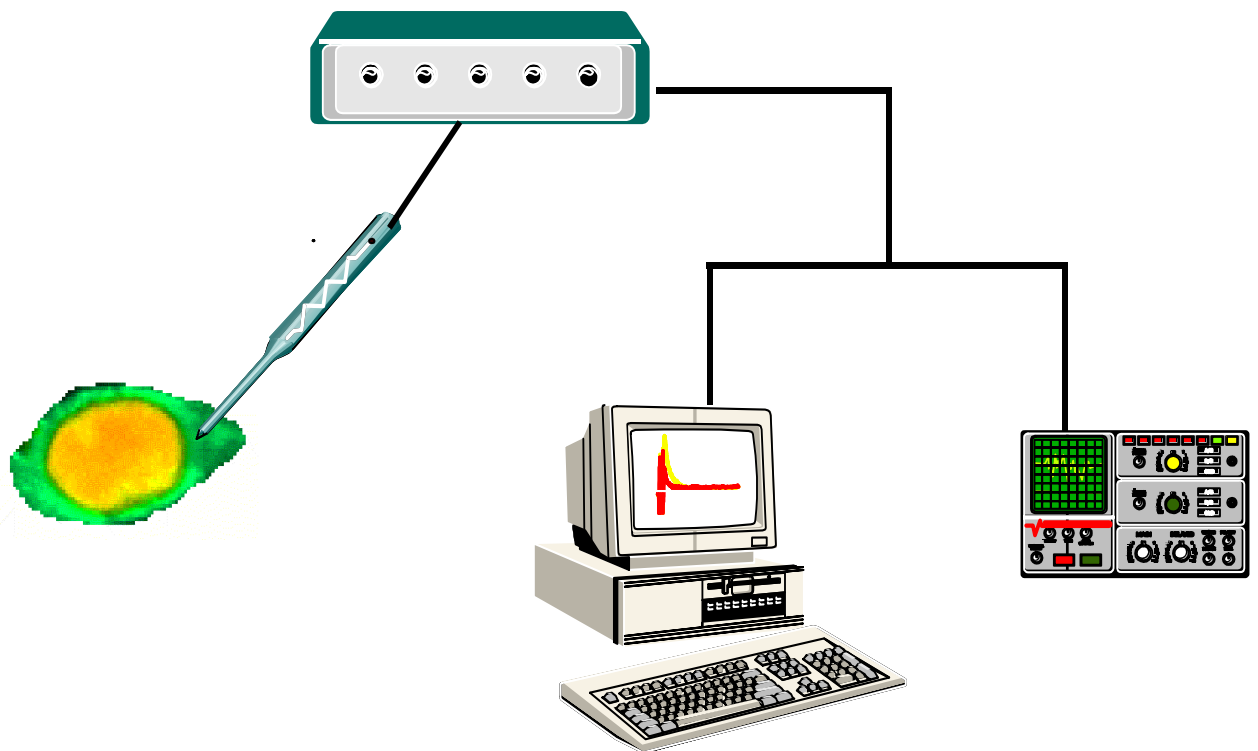
2. ábra: A proteinkináz C (PKC) izoenzimek szerkezete és osztályozása. A klasszikus csoportba tartozó α , β és γ izoenzimek aktiválásukhoz Ca^{2+} -ot és forbolésztart egyaránt igényelnek, míg az új típusú (novel) δ , ε , η és θ izoenzimek kalcium hiányában is képesek kifejteni hatásukat. Az atípusos λ és ζ izoenzimek működése már nem kötődik a forbolésztterhez sem, a külön csoportba tartozó PKC μ izoenzimnek pedig az a jellegzetessége, hogy egy membránon átívelő (transzmembrán; TM) doménnel rendelkezik.

A**B****C****D****40x nagyítás**

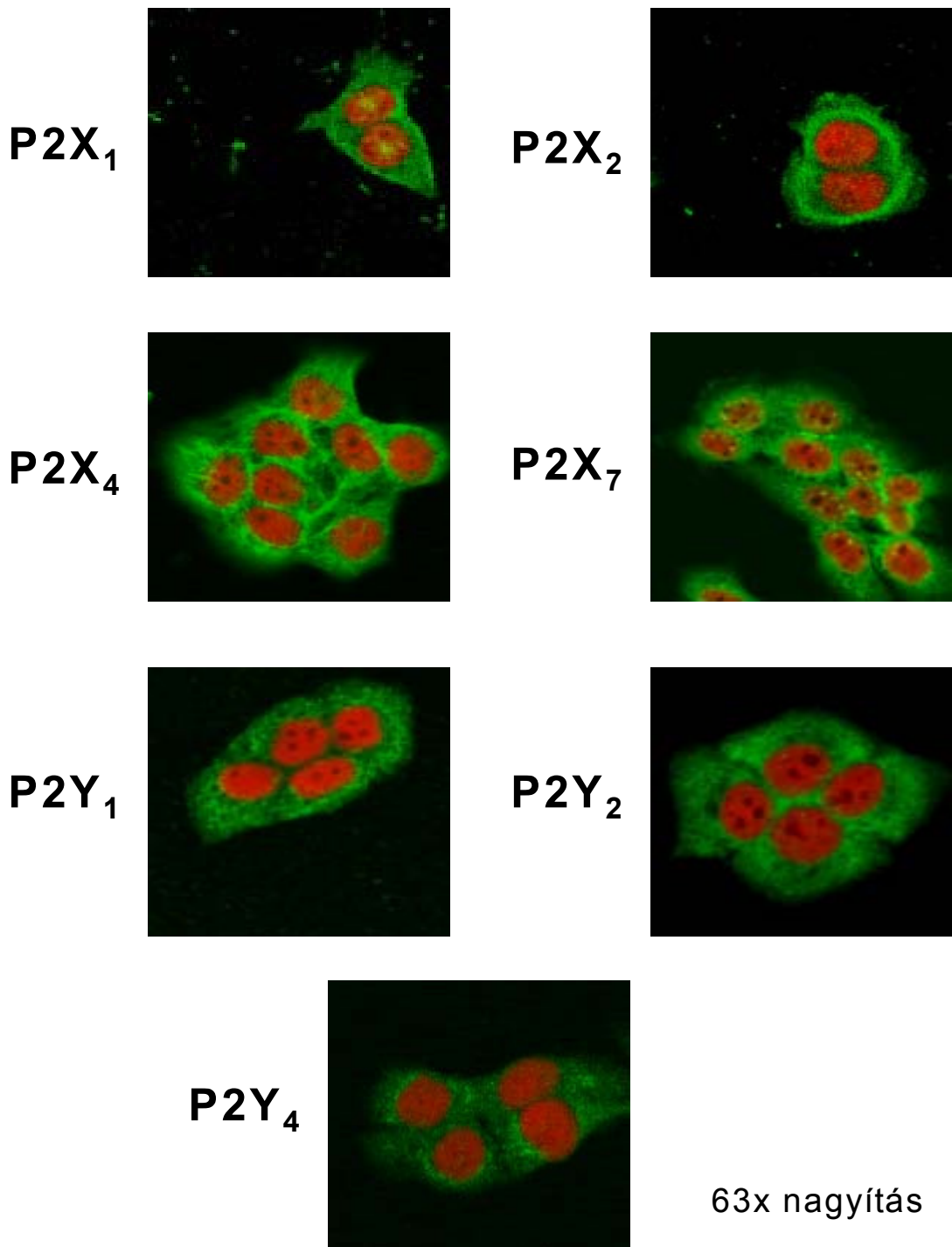
3. ábra: Tenyésztett HaCaT keratinocyták. A különálló, egymással nem összefüggő sejtek (A és B) erőteljes proliferációval rendelkeznek és méréseink során prekonfluens sejt-ként szerepeltek. A kisebb-nagyobb szigeteket képező, kb. 100-200 sejt-ből álló sejt-csoportosulások (C és D) esetében a keratinocytákban inkább a differenciálódás kerül előtérbe, a továbbiakban ezeket konfluens sejtekként kezeltük. Feltüntettük a sejteket áteső fényben (A és C), illetve Fura-2-AM-el feltöltött és UV fényel megvilágított formában is (B és D).



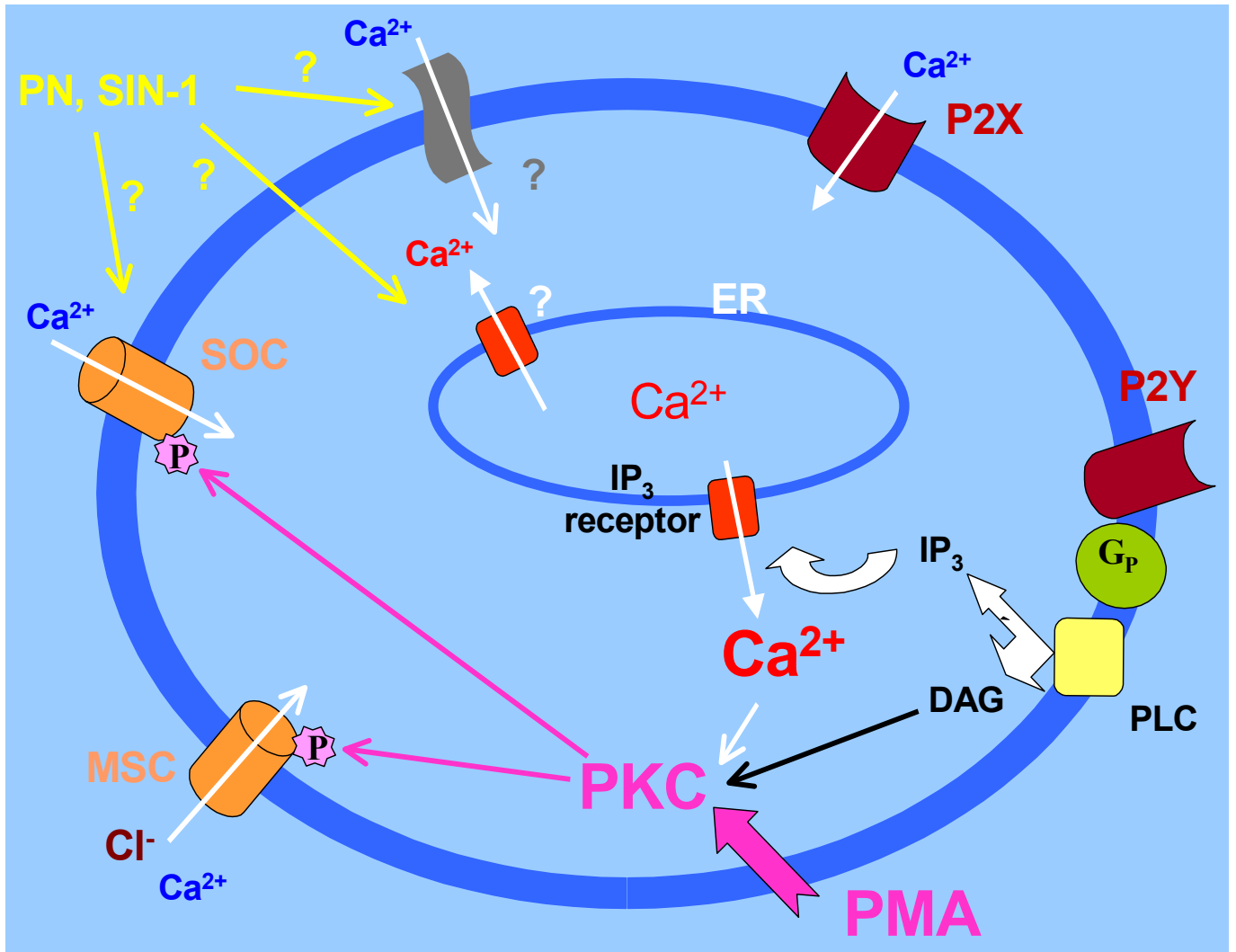
4. ábra: A fluoreszcenciás kalciummérésre alkalmas PTI DeltaScan rendszer sematikus rajza. A Xenon lámpa fényéből egy sugárosztó két fénynyalábot készített, melyeket egy-egy monokromátoron átvezetve 340 és 380nm hullámhosszúságú fényt kaptunk. Ezzel gerjesztettük a Fura-2-AM-el feltöltött sejteket, majd az emittált fényt egy dikroikus tükör közbeiktatásával, 510nm-en, fotoelektronsokszorozó segítségével detektáltuk. A számítógéppel rögzített eredményeket analizáltuk és grafikus képernyőn jelenítettük meg.



5. ábra: Az áramok és a membránpotenciál mérésére szolgáló mérőrendszer sematikus rajza. A konvencionális mikroelektrodával történő mérés esetében nagy ellenállású ($20\text{-}30\text{M}\Omega$), 3M -os KCl oldattal feltöltött üvegelektrodákat használtunk. A patch-clamp technika whole-cell konfigurációjának kivitelezésénél kis ellenállású ($2\text{-}3\text{M}\Omega$), K -aszpatát alapú belső oldattal töltött pipettákat alkalmaztunk.



6. ábra: Purinoreceptorok vizsgálata immuncitokémiai módszerrel HaCaT sejteken. Az acetonos fixálást és membránpermeabilizálást követően a sejteken kettős immunfestést alkalmaztunk. A különböző purinoreceptor ellenes specifikus antitesteket fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) jelöltük és a képen ez zöld színben látható, míg a piros szín a propidium-jodidos magfestést szemlélteti.



29. ábra: Egy HaCaT sejt modellje, amin feltüntettük az általunk vizsgált jelátviteli útvonalakat, szabályozó fehérjéket, membránban elhelyezkedő receptorokat és csatornákat, valamint a kísérleti eredményeinkből valószínűsíthető kapcsolatokat a fent említett folyamatok és molekulák között.