

EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

A külső károsító tényezők hatása a HaCaT keratinociták kalcium homeosztázisára

Dr. Ruzsnavszky Olga

Témavezető:
Prof. Dr. Csernoch László



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS ORVOSTUDOMÁNY DOKTORI ISKOLA

**DEBRECEN
2013.**

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke	4
Kulcsszavak.....	4
Keywords	4
Bevezetés	5
A bőr felépítése és funkciói.....	5
A hám	5
A HaCaT keratinociták.....	7
Az UV sugárzás.....	8
A sebgyógyulás	10
A keratinociták szerepe a primer sebgyógyulásban	10
Nem ingerelhető sejtek Ca^{2+} -homeosztázisa.....	10
Purinerg szignalizáció	11
P2X receptorok.....	12
A P2X receptor altípusok szöveti előfordulása és élettani funkciói.....	14
A P2Y receptorok.....	14
A keratinociták purinerg receptorai.....	15
Protein kinázok és foszfoprotein foszfatázok.....	16
Kinázokat aktiváló mediátorok:	17
A foszfoprotein foszfatázok	17
Szerin/treonin foszfatáz inhibitorok	17
A foszfoprotein foszfatázok élettani hatásai	19
Az UV-B sugárzás élettani hatásai a keratinocitákra	20
A kalciumoszillációk és a foszfoprotein-foszfatáz inhibitorok kapcsolata	21
Célkitűzések	23
Anyagok és módszerek.....	24
HaCaT keratinociták tenyésztése	24
Polimeráz láncreakció (PCR)	24
Fehérjeminták készítése	25
Western-blot analízis.....	26
A keratinociták UV-B-vel történő besugárzása	26
Életképesség vizsgálata	27
Apoptózis vizsgálata	27
Egyedi sejteken történő fluoreszcens, intracelluláris $[\text{Ca}^{2+}]$ -mérés	28
Konfokális mikroszkópos mérések	30
Az adatok elemzésére használt számítógépes program.....	31
Statisztikai módszerek.....	32
Time-lapse felvételek	32
Migrációs assay	32
Eredmények	34
Az UV-B besugárzás hatása a HaCaT keratinociták életképességére.....	34
ATP adagolás hatása a keratinociták $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jára.....	35
Purinerg receptorok kimutatása HaCaT sejteken az UV-B sugárzás függvényében	36
UV-B sugárzás hatására bekövetkező apoptózis vizsgálata.....	41
HaCaT keratinociták spontán kalcium oszcillációinak jellemzése	42
Az oszcillációt mutató sejtek aránya.....	44
A foszfatáz inhibitorok és a karcolás hatása a HaCaT keratinociták nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jára	46
A kalciumtranziensek jellemzése	47

Time-lapse kísérletek a foszfátázgátlók hatásának kimutatására	50
Boyden kamrában végzett kísérletek a keratinociták migrációjának vizsgálatára	52
A Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásáért felelős mechanizmus	52
Megbeszélés	54
Összefoglalás	59
Summary	62
Irodalomjegyzék	63
Közlemények listája	73
Előadások, poszterek listája	75
Idézhető, angol nyelvű absztraktok	75
Angol nyelvű előadások	75
Magyar nyelvű előadások	75
Angol nyelvű poszterek	76
Magyar nyelvű poszterek	76
Köszönetnyilvánítás	78
Függelék	79

Rövidítések jegyzéke

[Ca²⁺]_i: intracelluláris kalciumion koncentráció

AM: acetoximetilészter

ATP: adenosin trifoszfát

BCA: bicinchoninic acid

BzATP: 2'-3'-O-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP

Ca²⁺, kalcium: kalciumion

CLA: kalikulin A

DAG: diacil-glicerol

DMEM: Dulbecco által módosított Eagle medium

ECL: megnövelt kemilumineszcens

EGF: epidermális növekedési faktor (epidermal growth factor)

ER: endoplazmatikus reticulum

FN: fibronektin

FTHM: félértékszélesség, Full Time at Half Maximum

HRP: tormaperoxidáz

IP₃: inozitol 1,4,5-triszfoszfát

IP₃R: inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptor

KGF: keratinocita növekedési faktor (keratinocyte growth factor)

MLC20: 20 kDa-os miozin II könnyű lánc

MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid

OA: okadánsav

PBS: foszfát puffer-oldat

PCR: polimeráz láncreakció

PKA: protein kináz A

PLC: foszfolipáz C

PLC_β: foszfolipáz C_β

PMT: fotoelektronsokszorozó

PP1: szerin/treonin foszfoprotein foszfatáz 1

PP2A: szerin/treonin foszfoprotein foszfatáz 2A

PTI: Photon Technology International

ROI: releváns tartomány, region of interest

RT-PCR: reverz transzkripció PCR

RyR: rianodinreceptor, ryanodine receptor

SERCA: sarco-endoplazmás retikulum Ca²⁺-ATP-áz

SDS-PAGE: nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis

TC: tetrakain

TG: thapsigargin

UV: ultraibolya (ultra violet)

XesC: Xestospongin C

Kulcsszavak

Keratinocita, UV-B, purinerg jelátvitel, foszfatáz inhibitor, kalcium homeosztázis

Keywords

Keratinocyte, UV-B, purinerg signalisation, phosphatase inhibitor, calcium homeostasis

Bevezetés

A bőr felépítése és funkciói

A bőr a szervezetet a külvilág káros hatásaitól védő barrier, érzékszerv, részt vesz a hő és energiaháztartásban, az immunrendszer megfelelő működésében. A bőrben képződik ultraibolya fény hatására a kolekalciferol, más néven D3 vitamin. A D3 vitamin gátolja a humán keratinociták növekedését és a sejtek korai differenciálódását is beindítja. A bőr három, önmagában is összetett rétegből épül fel, ezek a hám (epidermis), irha (dermis vagy cutis) és a bőralja (subcutis). A hámot kizárólag sejtek építik fel, nem tartalmaz ereket és idegeket. Az anyagcseréje az irha felől passzív diffúzióval történik. Az irhában egy rostokból, makromolekulákból és vízből álló alapállományba ágyazva megtalálhatóak az erek és idegi elemek, valamint az alapállományt termelő fibrociták. A bőralja nagyrészt zsírszövetből áll, és vastagsága testtájanként változik. A hám az ectodermából, a kötőszöveti részek a mesodermából fejlődnek. Az embrionális fejlődés 3. hónapjában indul meg a hám elszarusodása. A hám bazális rétege összejt jellegű, pluripotens sejtekből áll. Mitosis után az egyik leánysejt a keratinociták utánpótlásául szolgál, míg a másik a basalis rétegben marad és megőrzi pluripotens jellegét. Az embrionális fejlődés 10-12. hetében neuroectodermális eredetű sejtek vándorolnak az epidermisbe, és ott melanodendrocitákká alakulnak. Ezek a melanociták elődei, amelyek a melanint fogják termelni (Szentágothai & Réthelyi 2002, Dobozy et al. 1998).

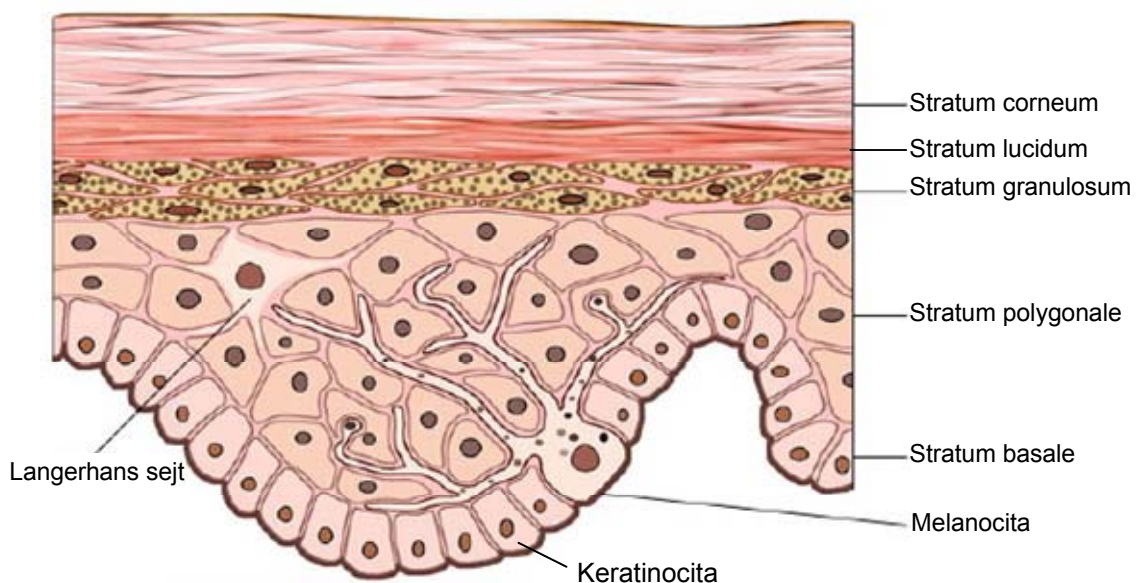
A hám

A hám a bőrnek a testfelszínt a külvilág felé borító rétege. Vastagsága körülbelül 0,2 mm, ami genetikai tényezőktől és az igénybevételtől is függ. Az epidermis 90%-át keratinociták alkotják, mellettük megtalálhatóak még a hámban a melanociták, monociták, a Langerhans- és a Merkel sejtek. Legfontosabb funkciója a keratinképzés, amely védi a szervezetet a külvilág felől érkező hatásokkal szemben (Szentágothai & Réthelyi 2002, Dobozy et al. 1998). A hámnak öt rétegét különböztethetjük meg (1. ábra):

1. Stratum basale vagy stratum germinativum: pluripotens sejtekből álló sejtréteg, amely folyamatos osztódása révén pótolja a keratinocitákat
2. Stratum polygonale vagy stratum spinosum: nevét (tüskés réteg) onnan kapta, hogy szövettani metszetekben a zsugorodott sejtek pontokban még kapcsolódnak egymáshoz, ezáltal a sejtek tüskéseknek tűnnek. A keratinociták ebben a rétegben

laposabbá és poligonálissá válnak. A sejteket desmosomák (macula adherens) kapcsolják egymáshoz, a desmosomákból a citoplazmát behálózó tonofilamentumok indulnak a sejtmag irányába. A keratinociták közötti desmosomalis összeköttetés nem állandó, a sejtek felfelé történő tolódásuk során amöbaszerű mozgást végeznek, egymáshoz viszonyított helyzetük folyamatosan változik. Ebben a rétegben kezdődik meg a sejtek differenciálódása, a keratinosomák a réteg legfelső sejtsoraiban jelennek meg.

3. Stratum granulosum: a szemcsés réteg elnevezést a sejtekben levő keratohyalin granulumok nagy száma miatt kapta, amelyek hisztidinben gazdag fehérjékből, tonofibrillumokból és lipidekből állnak. Általában 2-3 sejtsorból áll.
4. Stratum lucidum: a tenyeret és a talpat kivéve, ahol több sejtsor alkotja, egy sejtsorból áll. Ebben a rétegben az elektrondenz, kénben gazdag közti állományba ágyazott tonofilamentumok párhuzamosan futnak a bőr felszínével. A sejtek laposak és még tartalmaznak sejtorganellumokat. Az elpusztult sejteket egy fehérjeszerű anyag, az eleidin itatja át.
5. Stratum corneum: a hám legfelső, elszarusodott sejteket tartalmazó rétege. Sejtjei sejtorganellumokat nem tartalmaznak, viszont nagy koncentrációban tartalmaznak hidrolitikus és katabolikus enzimeket. Az elszarusodott sejtek hidrofilek, víz hatására megduzzadnak. A stratum corneum alatti hidrofób zóna lipidekben és poliszacharidokban gazdag, és barrier funkciója van.



1. ábra: A hám (epidermis) rétegei. (forrás: <http://www.dermnetnz.org>)

A fényvédelemért felelős melanint a stratum basale keratinocitái között helyet foglaló melanociták termelik. A melanociták nyúlványos sejtek, amelyek nyúlványaik révén adják át a keratinocitáknak a megtermelt melanint, amit a keratinociták aktív fagocitosissal vesznek fel, majd a sejtmagjuk felett sapkaszerűen halmoznak fel.

Epidermopoesis: a szervezet védelmét a külső hatásokkal szemben a keratinocitákból álló epidermis folyamatos megújulása biztosítja. A keratinociták osztódása a basalis rétegben játszódik le, körülbelül minden 400. sejtre jut egy sejtosztódás. Az osztódás során keletkező egyik leánysejt két hét alatt éri el a stratum granulosumot, és további két hétbe telik, amíg onnan a stratum corneum felső részéig eljut. A normálisan 28 napos forgási idő (turnover time) bizonyos esetekben lerövidülhet, ilyenkor a sejtciklus lerövidül és nem tart tovább 5-10 napnál. Ilyen felgyorsult epidermopoesissal jár a psoriasis, a bőrt érintő különböző gyulladások és a napégés. Ezekben az esetekben a keratinizáció normális maradhat (orthokeratosis), vagy kórossá válhat (pl. parakeratosis). A keratinociták osztódásának szabályozásában egyes citokinek, catecholaminok, intracelluláris ciklikus nukleotidok, prosztaglandinok, glukokortikoidok és más szteroidok játszhatnak szerepet (Szentágothai & Réthelyi 2002, Dobozy et al. 1998).

A HaCaT keratinociták

A sejtenyészeteket széles körben alkalmazzák számos előnyös tulajdonságuk miatt élettani tárgyú kísérletek végzéséhez. Sejtenyészetekben a sejtek növekedése, morfológiai változásai mikroszkóp segítségével folyamatosan nyomon követhető. Lehetőség van olyan sejtenyészetek létrehozására, amelyek csak egyféle sejttípust tartalmaznak, sőt immortalizált, folyamatosan osztódó, geno- és fenotípusosan azonos, klónozott sejtek nagy tömegét is elő lehet állítani, ami a kísérletek jó reprodukálhatósága szempontjából igen előnyös. Sejtenyészeteket használva a kísérletekhez nincs szükség élő állatok felhasználására. Az *in vitro* vizsgálatok ezen felül a kísérletező számára is előnyösek, hiszen így elkerülhető az állattal szembeni allergia kialakulása is. Ezek miatt az előnyök miatt a sejtenyészeteket széles körben használják a molekuláris biológiai és sejtelettani kutatások során. Az *in vitro* sejtenyészetek használatának azonban hátránya, hogy a használatukkal kapott eredmények nem mindig modellezik pontosan az élő szervezet sokszorosán szabályozott, *in vivo* válaszait. A hosszú ideig fenntartott tenyészetek tulajdonságai mutációk révén módosulhatnak (pl. a differenciálódási képesség csökkenése), ezért bizonyos passzázsszám elérése után célszerű a tenyészetet kisebb passzázsszámúra cserélni (Szabó 2004).

A HaCaT sejtek a humán keratinociták széles körben alkalmazott modelljei. A sejtvonalat 1988-ban Boukamp és munkatársai készítették (Boukamp et al. 1988). A keratinociták egy 62 éves, melanómában szenvedő férfibetegétől származtak. A tumor műtétje során a daganat kimetszése egy úgynevezett biztonsági zóna ráhagyásával történik, a HaCaT keratinociták őseit innen, ebből a biztonsági zónából izolálták. A sejteket ezután alacsony kalciumtartalmú (0,2 mM) tápoldatban, magas hőmérsékleten (38,5 °C) tenyésztették. A sejtvonal elnevezése is innen ered: Humán adult skin keratinocytes, low Ca²⁺, elevated Temperature (HaCaT). A sejtvonalról bizonyították, hogy – bár a daganat mellől származott – nem szenvedett malignus átalakulást. Megtartotta differenciálódási képességét is, bizonyítottan expresszálja a differenciálódási markereket (keratin 1, keratin 10, involucrin, filaggrin), és kollagén gélen tenyésztve, az egészséges keratinocitákhoz hasonló epidermisz réteget képez. A sejtvonal korlátlanul fenntartható (több mint 140 passzálás után sem változik meg a sejtek génállománya), immortalizálódott sejtekből áll. A HaCaT keratinociták genetikailag eltérnek az egészséges keratinocitáktól: aneuploid (hypodiploid) kromoszómaszám és a p53 gén pontmutációja (transzkripciósan inaktív) jellemzi a sejtvonalat. A p53 gén egyik feladata, hogy a sejtosztódást gátolja, így ennek a génnek az inaktivációja hozzájárul a sejtvonal korlátlan fenntarthatóságához (Boukamp et al. 1988). Mivel a HaCaT tenyészetekben nincsenek melanociták, a HaCaT keratinociták nem tartalmaznak melanint, amely védené őket az UV sugárzás károsító hatásától.

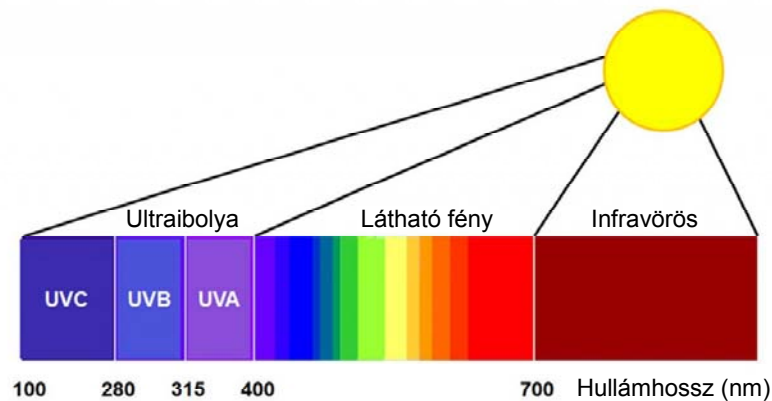
Az UV sugárzás

A fény az elektromágneses sugárzás egy része, és a fotobiológiai reakciókért felelős hullámhosszak közül kiemelkedő fontosságúak az UV sugarak. A fény – elsősorban a napfény – jelentős szerepet játszik több dermatológiai megbetegedés kialakulásában és másoknak a gyógykezelésében. Az UV sugárzást a különböző hullámhosszak alapján három tartományra oszthatjuk (Dobozy et al. 1998) (2. ábra):

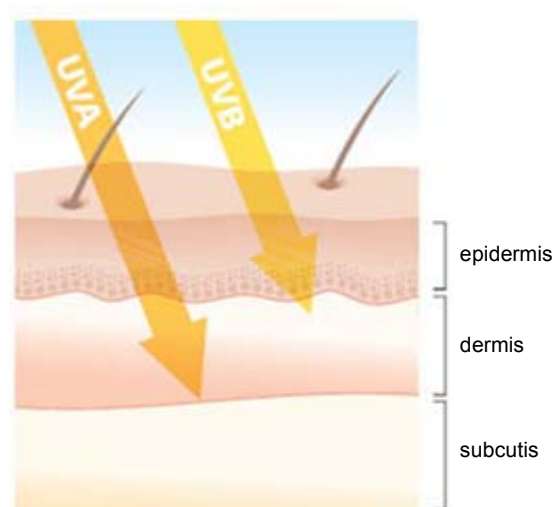
1. Az UV-A sugárzás (315-400 nm) kis adagban sem erythemát, sem pigmentációt nem hoz létre. Ezt a tartományt számos diagnosztikus és terápiás készülék sugározza ki. Nem irritálja a kötőhártyát és az üvegen áthatol.
2. Az UV-B sugárzás (280-315 nm) az előzőhöz hasonlóan ugyancsak része a természetes napfénynek, eléri a földfelszínt. Ezt a sugártartományt sok diagnosztikai és terápiás célból készített fényforrás emittálja. Irritálja a kötőhártyát és a corneát. Az UV-B sugarak nagy részét kiszűri az ablaküveg, de áthatolnak a vízen. Az UV-B

biológiai hatásának tudható be a napégés (erythema), amelyet a prosztaglandin közvetít és 12-24 óra után jelenik meg. Alapvető szerepe van az UV-B sugárzásnak abban, hogy az epidermiszben D3-vitamin képződik. Általánosságban negatív hatása van a szervezetre, amely a bőr akut és krónikus károsításában nyilvánul meg. Az UV-B sugárzás által az epidermális sejtekre, kötőszövetre és kapillárisokra kifejtett károsító hatás magában foglalja a DNS-, RNS-, protein- és sejtmembránpusztítást, amelyek jelentős szerepet játszanak a karcinogenesisben (3. ábra).

3. Az UV-C (100-280 nm) sugarak nem érik el a földfelszínt, mivel a Nap által kibocsátott sugarakat az atmoszféra elnyeli. Ugyanakkor fontos, hogy a xenonlámpa vagy pl. a higanygőzlámpa UV-C sugarakat sugároz ki (Dobozy et al. 1998).



2. ábra: Az UV-B sugárzás hullámhossztartománya a látható fényhez képest (forrás: <http://www.mrsa-uv.com>)



3. ábra: Az UV sugárzás elnyelődése a bőr különböző rétegeiben. Az UV-A sugárzás főleg a dermisben nyelődik el, a bőr öregedését és ráncosodását okozva, míg az UV-B sugárzás főleg az epidermis sejteiben nyelődik el (forrás: <http://www.skincancer.org>).

A sebgyógyulás

A sebgyógyulásnak két különböző mechanizmusát lehet megkülönböztetni. A primer sebgyógyulás (sanatio per primam intentionem) éles szélű, metszett, steril sérülések esetén jön létre, ahol a szervezetnek nincs más dolga, mint a sérülés során létrejött folytonossági hiány helyreállítása. Ilyen sérülések a műtéti metszések. Szekunder sebgyógyulás (sanatio per secundam intentionem) a roncsolt, anyagihiányos, fertőzött sérülések esetén jön létre, ahol a szervezetnek gondoskodnia kell az elvesztett szövetek pótlásáról és a fertőzések elleni védekezésről.

A keratinociták szerepe a primer sebgyógyulásban

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

Nem ingerelhető sejtek Ca^{2+} -homeosztázisa

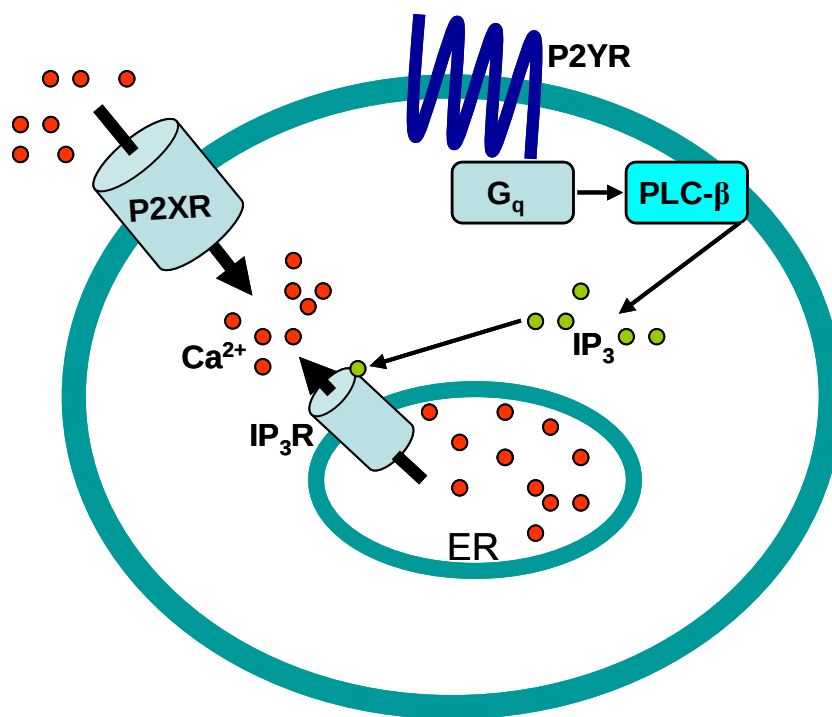
A sejtekben az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ normálisan igen alacsony, nmol/l-es tartományban van, míg az extracelluláris szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ mmol/l-es nagyságrendű. Ez a nagyságrendi különbség teszi lehetővé, hogy a sejtekben a Ca^{2+} az egyik fő másodlagos hírvivő lehessen (Clapham et al., 2007). A sejtekben a Ca^{2+} a különböző fehérjékhez kötődhet és kötődése módosítja a fehérjék aktivitását. A citoplazmában a legfontosabb kalciumkötő fehérje a kalmodulin. A sejtekben az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ szabályozását különböző transzportrendszerek végzik. A plazmamembránon keresztül a Ca^{2+} ioncsatornákon keresztül kerülhet be a sejtbe. A felszíni membránon a külső ligand és a másodlagos hírvivők által szabályozott csatornák a legjelentősebbek. Az előbbi csoportba tartoznak az általunk is vizsgált P2X purinoreceptorok. A sejten belüli szabad $[\text{Ca}^{2+}]$ növekedését sejtmembránon keresztüli ionbeáramláson kívül az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadulás is okozhatja (Csernoch et al., 2000). A nem ingerlékeny sejtekben, így a keratinocitákban is a legjelentősebb kalciumraktár az endoplazmatikus retikulum (ER), ezen kívül a mitochondriumokban és a transz-Golgi hálózatban is raktározódhat Ca^{2+} . Az ER

membránjában található a rianodin receptor (RyR) és az inozitol-triszfoszfát (IP_3) receptor, amelyek aktiválódása szintén emelheti az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t. Az intracelluláris raktárakból történő kalcium-felszabadulás kiváltásában fontos szerep jut a G_q proteineknek, melyek különböző membránreceptorok - az általunk vizsgált purinoreceptorok közül a P2Y_2 receptor működik így- ligandkötését követően aktiválódnak, s aktív alegységük közvetítésével aktiválják a foszfolipáz-C enzimet (PLC), mely a sejtmembrán inozitol-biszfoszfát molekulájának hasításával IP_3 -ot és diacil-glicerolt (DAG) generál. A sejtmembránból felszabaduló IP_3 az endoplazmatikus retikulum IP_3 receptorához kötődve megnyitja az ER membránját a Ca^{2+} -ionok számára, és létrehozza az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedését. A DAG a protein-kináz C (PKC) enzimet aktiválja, amely szerin/treonin oldalláncon foszforilál számos fehérjét, melyeknek szintén szerepük lehet különböző Ca^{2+} -csatornák megnyitásában is. Ezen mechanizmus útján vezet a metabotrop P2Y receptorok aktivációja az intracelluláris kalcium-koncentráció megemelkedéséhez. Ezenkívül a kalcium-indukált kalcium felszabadulás mechanizmusa is hozzájárulhat az ER-ből történő Ca^{2+} felszabaduláshoz. A citoplazmatikus Ca^{2+} eltávolításában szintén több transzportrendszer vesz részt. A sejtmembránban található ezek közül a plazma membrán kalcium ATP-áz. Az általa szabályozott transzport nagy affinitású és kis kapacitású, alkalmas a citoplazma $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jában bekövetkező kis változások finom szabályozására. A plazma membrán kalcium ATP-ázt az intracelluláris kalcium-koncentráció kismértékű emelkedése és/vagy a Ca^{2+} -kaldmodulin komplex aktiválja, mely aktiváció hatására a kalciumionokat kijuttatja a sejtől, ezáltal csökkenti az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t (Clapham et al., 2007; Nayak et al., 2007). A $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ antiport a sejtben belüli Ca^{2+} -ot cseréli extracelluláris Na^+ -ra. A transzport kis affinitású és nagy kapacitású, a működéséhez szükséges energiát közvetve a Na^+/K^+ -ATP-áz szolgáltatja. Az ER membránjában található a sarco-endoplazmás retikulum Ca^{2+} -ATP-áz (SERCA), amely biztosítja a intracelluláris Ca^{2+} -raktárba történő Ca^{2+} -visszavételt.

Purinerg szignalizáció

Az élő szervezetekben a purinerg vegyületek többféle szerepet töltenek be, egyrészt a DNS-ben található alapvető molekulák, illetve nagy energiájú kötéseik révén energiatároló molekulák is. Azt, hogy az extracellulárisan megjelenő adenzinvegyületeknek is van hatásuk, csak a 1929-ben írták le (Drury & Szent-Györgyi 1929). Az ezt követő évtizedekben sorra jelentek meg arra vonatkozó tanulmányok, hogy az ATP fiziológiásan is jelátvivő molekula lehet. 1959-ben Holton nyulak érzőidegeinek stimulációját követően ATP-felszabadulást mutatott ki (Holton et al. 1959, Martinson & Muren 1963, Burnstock et al.

1970). Az ATP az extracelluláris térbe vagy kotranszmitterként szekretálódik, vagy pusztuló sejtekből kiszabadulva jut, valószínűleg az utóbbi miatt a legtöbb kezdetleges életformánál az ATP és a származékai “vésszelző” anyagok. A purinerg receptorok olyannyira elterjedtek az élő szervezetekben, hogy szinte lehetetlen olyan sejtet találni, amelyik nem érzékeny az ATP-re vagy valamelyik analógjára (Burnstock et al. 2010). Az extracellulárisan megjelenő ATP-nek különböző funkciói lehetnek. Kötődhet a sejtfelszíni P2X és P2Y receptorokhoz (Burnstock et al. 1985, North et al. 1997), részt vehet ektokinázok általi foszforilációs reakciókban (Ehrlich et al. 1987), vagy degradálódhat sejtfelszíni enzimek révén (ectoATPázok) ADP-re, AMP-re és adenozinra (Zimmermann et al. 1996), melyek közül az adenozin egy specifikus transzporter révén visszakerül a sejtekbe (Baldwin et al. 1999), ahol újból ATP képződhet belőle. A purinerg jelátviteli rendszer purinokat és pirimidineket használ kémiai jelátvivőként.



4. ábra: A P2X és P2Y receptorok aktiválódása az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedéséhez vezet. (P2XR: P2X receptor, P2YR: P2Y receptor, PLC- β : foszfolipáz C_β , IP_3R : IP_3 receptor, ER: endoplazmatikus retikulum)

P2X receptorok

A P2X receptorok membránban elhelyezkedő ioncsatornák, amelyek aktiválódását az extracellulárisan kötődő ATP váltja ki. Emlősökben 7 különböző gén kódolja a P2X receptorok alegységeit, amelyek aminosavsorrendje 40-50%-ban megegyezik. Minden alegység 2 transzmembrán doménből áll, amelyeket egy extracelluláris domén választ el

egymástól. A P2X receptorok mindegyike áteresztí az egy vegyértékű kis kationokat, néhányuk pedig jelentős kalcium- vagy kloridion áteresztő képességgel is rendelkezik (4. ábra). A homomer P2X₇ receptor aktivációjakor a membrán nagyobb szerves kationok számára is átjárható lesz.

A P2X₄ és P2X₇ receptorok génjei a 12 kromoszóma hosszúkarjának végén foglalnak helyet (12q24.31), és valószínűleg génduplázódással alakultak ki. Minden P2X receptor alegységen találhatóak, úgynevezett „konszenzus szekvenciák” a nitrogénhez kapcsolt glikoziláció számára (Asn-X-Ser/Thr) amelyek közül néhány a receptor membránba történő kihelyeződésében játszik szerepet. A P2X₇ receptor alegység a többi alegységhez képest hosszabb C-terminális résszel rendelkezik, amelyben egy, a membránt potenciálisan áterő hidrofób domén található. Jelenleg nem ismert, hogy a receptor C-terminális vége a sejten belül vagy kívül található-e meg, bár valószínűsíthetően az intracelluláris oldalon található (North 2002).

A homomer P2X₁ receptorok kation szelektív csatornák, amelyek relatíve nagy kalcium permeabilitással rendelkeznek. Agonistái az ATP, az $\alpha\beta$ meATP ($EC_{50} \approx 1 \mu M$), a 2'-3'-O-(benzoyl-4-benzoyl)-ATP (BzATP), és a β meATP, antagonistái a suramin és analógjai (NF023, NF279), a PPADS és analógjai (PPNDS), a P2X₁ receptorra jobban szelektív MRS2220 (cyclic pyridoxine- α 4,5-monophosphate-6-azo-phenil-2',5'-disulfonate, $\approx 10 \mu M$), további antagonistája a TNP-ATP (2',3'-O-(2,4,6 trinitrophenil)-ATP), ami egyébként hatékony gátlószere a homomer P2X₃, és a heteromer P2X_{2/3} receptoroknak is. A di-inosine pentaphosphate (Ip5I) szelektív gátlószere a rekombináns P2X₁ receptornak. A P2X₁ receptorok gyorsan deszenzitizálódnak, és a visszatérésük ebből az állapotból nagyon lassú (>15 perc).

A P2X₃ receptor alegységek alkothatnak homomer formában receptort, vagy heteromerizálódhatnak P2X₂ receptor alegységekkel. A homomer P2X₃ receptor kation szelektív csatorna. A kalcium/nátrium permeabilitási arány $\approx 1,2$. Az ATP-vel kiváltott áramaira jelentős deszenzitizáció jellemző, amelyből való visszatérésük lassú (>15 perc). Ez a folyamat (a deszenzitizált állapotból történő visszatérés) jelentősen felgyorsítható az extracelluláris kalciumkoncentráció emelésével (1mM - 7 perc, 10 mM - 3,5 perc) vagy gadolínium (10 μM) adagolásával. Jellemző agonistái az ATP, $\alpha\beta$ meATP, a 2-Methyltio-ATP ugyanannyira, vagy még hatásosabb, mint az ATP. A diadenosine pentaphosphate (A5pA) teljes agonista. Az ATP hatását a cink és a cibacron blue diadenosine triphosphate (Ap3A) hatékonyabban erősíti, míg a β meATP kevésbé aktiválja a P2X₃ receptort, mint a P2X₁ receptort. Antagonistái a suramin, a PPADS, és a TNP-ATP, amelyek nem tesznek

különbséget a P2X₁ és P2X₃ receptorok között. Az NF023 20-szor jobban gátolja a P2X₁ receptort, mint a P2X₃ receptort (North 2002).

A P2X receptor altípusok szöveti előfordulása és élettani funkciói

A homomer P2X₃ és a heteromer P2X_{2/3} receptorok részt vesznek a fájdalomérzet modulálásában (Chizh et al. 2001). Szívizomsejteken számos purinerg receptort mutattak ki, az ionotróp P2X receptorok 1–7 altípusát, míg a metabotróp P2Y receptorok közül az 1, 2, 4, 6, 11-es altípusokat. Az ATP adagolása ezekre a sejtekre pozitív inotróp hatású, az ATP hirtelen alkalmazásával számos aritmiatípus kiváltható (Vassort et al. 2001). A P2X purinerg receptorokat kimutatták többek között agyi neuronokban (P2X₂, P2X_{2/3}, P2X₄, North 2002), ahol részt vesznek többek között a preszinaptikus ingerlésben, glutamátfelszabadulás során (Inoue et al. 1992). A retina több sejtípusában is számos P2X receptor altípus található meg (P2X₇ Bandle et al. 1998; P2X₃, P2X₄, P2X₅, Jabs et al. 2000). A gerincvelő neuronjaiban szintén megtalálhatóak e receptorok, patkányokban P2X_{2/3} receptor agonistákkal mechanikus allodynia volt kiváltható (Tsuda et al. 2000); illetve P2X₃ receptor deficiens egerekben csökkent a húgyhólyag reflexes működése és az egerek fájdalomérzékelése (Cockayne et al. 2000). A retina Müller-féle gliasejtjeiben a P2X₇ receptort mutatták ki (Pannicke et al. 2000). Az autonóm idegrendszer neuronjaiban, elsődleges érzőidegsejteken, epithel és endotélsejteken, vázizomsejteken és a hemopoetikus, vérképző rendszer sejtjeiben is számos P2X receptor altípus megtalálható, szinte nincs is olyan sejtfeleség, amely ne expresszalna valamilyen purinoreceptort (North, 2002).

A P2Y receptorok

A P2Y receptorok a purinerg jelátvitelben szerepet játszó, purin és pirimidin vegyületekkel aktiválható extracelluláris receptorcsalád (Burnstock et al. 1997) tagja. Az első P2Y receptorokat csirkeagyból (Webb et al. 1993) és egér eredetű neuroblasztómából (Lustig et al. 1993) klónozták. Ez a két receptor a csirke adenin nukleotidokkal aktiválható metabotróp P2Y₁ receptora, és az egér adenin vagy uracil nukleotidokkal aktiválható metabotróp P2Y₂ receptora volt.

Heterológ expressziós rendszerekben a rekombináns P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ receptorok G (főleg Gq) -proteinhez kapcsolnak, melyek intracelluláris jelátviteli rendszereket aktiválnak, leggyakrabban a foszfolipáz C_β-t (PLC_β), ami az intracelluláris kalciumionok felszabadításában vesz részt (Burnstock et al. 1998). A PLC a plazmamembránt alkotó foszfatidilinozitol 4,5-biszfoszfátot (PIP₂) hidrolizálja, aminek következtében inozitol 1,4,5-

triszfoszfát (IP_3) és diacilglicerol (DAG) keletkezik (Yoshida & Imai 1997). Az IP_3 az IP_3 receptor megnyitásán keresztül fontos szerepet játszik az intracelluláris raktárakból történő Ca^{2+} -felszabadításban (4. ábra)(Berridge & Irvine 1984), míg a DAG a membránhoz kötve marad és a proteinkináz C-t (PKC) aktiválja. Néhány rekombináns $P2Y$ receptor ($P2Y_{11}$, $P2Y_{12}$, $P2Y_{13}$, $P2Y_{14}$) az intracelluláris cAMP szint szabályozásában vesz részt (Communi et al. 1997; Burnstock et al. 1998; Boyer et al. 2000). Ezek közül a $P2Y_{11}$ receptornak szerepe van a monociták túlzott, a szervezetet is károsító aktivációjának kivédésében (Kaufmann et al. 2005), illetve e receptor variánsait az akut miokardiális infarktusra hajlamosító egyik tényezőnek tekinthetjük (Amisten et al. 2007). A $P2Y_2$ receptorok 7 transzmembrán szegmenssel rendelkeznek, a receptorok N-terminális vége extracellulárisan, míg a C-terminális vége a membrán intracelluláris oldalán helyezkedik el (Lustig et al. 1993; Webb et al. 1993). A $P2Y$ receptorok ezen felül a rhodopszin szupercsalád tagjai. A $P2Y_5$ receptor mutációja a humán hypotrichosis kialakulásának egyik lehetséges oka lehet (Pasternack et al. 2008). A $P2Y_{12}$ receptor antagonistá clopidogrelt jelenleg is alkalmazzák a trombociták aggregációjának gátlására, ezáltal az akut miokardiális infarktus kockázatának csökkentésére (Yusuf et al. 2001). A $P2Y_{11}$ receptort az immunrendszer több sejttípusában is kimutatták. Többek között szerepet játszik a monocita eredetű dendritikus sejtek immunoszuppresszív hatású trombospondin és indolamin 2,3-dioxigenáz termelésében, ami által csökken a $CD4^+$ T-limfociták proliferációja (Marteau et al. 2005).

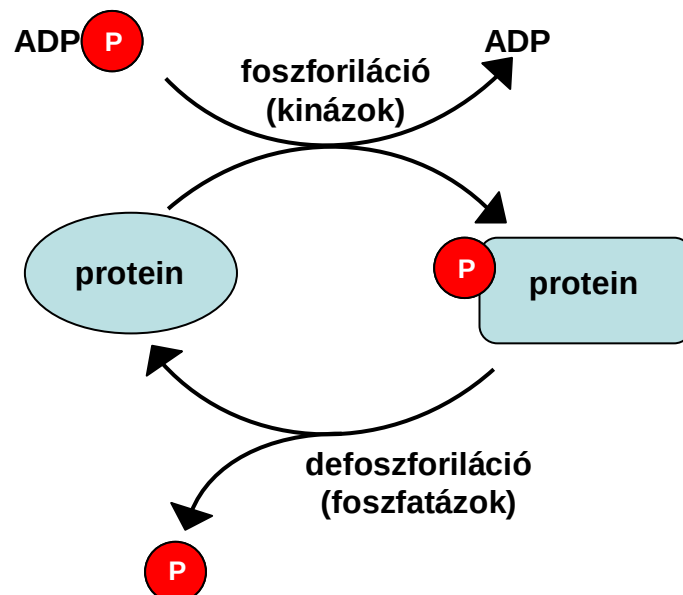
A $P2Y_2$ receptor adenin és uracil nukleotidokkal, és ezek trifoszfát alakjaival is aktiválható, azonban ezen nukleotidok difoszfát formáival nem (Lustig et al. 1993; Nicholas et al. 1996). A $P2Y_2$ receptornak nem ismertek fajspecifikus változatai. Más uracil nukleotidok, mint az INS 365 (Up_4U) és az INS 37217 (Up_4dC), szintén hatékonyan aktiválják a $P2Y_2$ receptort (Yerxa et al. 2002; Shaver et al. 2005). A $P2Y_2$ receptor gátolható suraminnal, PPADS-al viszont nem. A $P2Y_2$ receptor agonista INS37217 a jövőben cisztikus fibrózis elleni gyógyszer lehet (Kellerman et al. 2002).

A keratinociták purinerg receptorai

Egészséges humán epidermális keratinocitákban kimutatták a $P2Y_1$, a $P2Y_2$, a $P2X_5$ és a $P2X_7$ receptorokat. A $P2Y_1$ és $P2Y_2$ receptorok a stratum basale sejteiben voltak kimutathatóak, így jelenlétük összefüggésbe hozható a sejtek proliferációjával. A $P2X_5$ receptort a stratum spinosum sejteiben, míg a $P2X_7$ receptort a stratum corneumban mutatták ki. Jelenlétük összefügghet a keratinociták differenciálódásával, illetve az apoptotikus sejthalállal (Burnstock et al. 2010).

Protein kinázok és foszfoprotein foszfatazok

A protein kinázok által létrehozott reverzibilis fehérjefoszforiláció fontos szerepet játszik az extracelluláris jelre adott sejtválasz kialakulásában. A foszforiláció általában az ATP terminális foszfátcsoportjának terhére megy végbe. A fehérjék foszforilált állapotát a foszfoprotein foszfatazok szüntetik meg, a foszfátcsoport hidrolitikus hasításával (5. ábra). A protein kinázokat aszerint csoportosítják, hogy a fehérjék mely aminosav oldalláncait képesek foszforilálni. E csoportosítás alapján két nagy csoportot különböztethetünk meg, az egyik, amelynek tagjai a fehérjék szerin vagy treonin aminosavainak OH-csoportját foszforilálják, a másik nagy csoport a tirozin OH-csoportját foszforiláló tirozin kinázok csoportja. Az eukarióta sejtek génállományának 2-3%-a protein kinázokat és foszfoprotein foszfatazokat kódol. A sejten belüli fehérjék nagyjából 30%-a képes foszforilálódni protein kinázok segítségével. A szerin/treonin oldalláncok foszforilációja jóval gyakoribb, mint a tirozin oldalláncoké. A protein kinázok az esetek egy jelentős részében olyan fehérjét foszforilálnak, amely maga is kináz aktivitással rendelkezik, így egész foszforilációs kaszkádok is létrejöhetnek, amelyek lehetővé teszik a jelátviteli útvonalak többirányú szabályozhatóságát. A tirozin kinázok általában növekedési faktorok receptorai, és a sejtosztódás szabályozásában vesznek részt (Ádám et al. 2001).



5. ábra: Fehérjék foszforilációja. A fehérjék foszforilációját kinázok végzik, a foszforiláció az ATP terminális foszfátcsoportjának terhére megy végbe. A foszfátcsoport eltávolítását a fehérjékről foszfatazok végzik.

Kinázokat aktiváló mediátorok:

A jelátviteli rendszerben résztvevő intracelluláris mediátorok vagy másodlagos hírvivők igen gyakran aktiválnak protein kinázokat. A teljesség igénye nélkül ilyen mediátor által aktivált protein kináz a protein kináz A (PKA), ahol az aktiváló anyag a cAMP. A képződött cAMP a PKA aktiválásában vesz részt, azonban a cAMP képződést többféle receptor aktivációja módosíthatja. Az adenilát-cikláz működését serkenti a glukagon, az ACTH, a β -adrenerg agonisták, a parathireoideahormon, a tireotrop hormon, a luteinizáló hormon, a vazopresszin (V_2 -receptoron), a dopamin (D_1 receptoron), és a hisztamin (H_2 receptoron keresztül), míg működését gátolják az α_2 -adrenerg agonisták, a dopamin (D_2 receptoron), az acetilkolin (M_2 receptoron), és az opiát receptor agonisták. Az aktivált PKA már többféle fehérjét is képes foszforilálni, úgymint a metabolikus utak fehérjeit és egyes ioncsatornákat is. Az ioncsatornák foszforilációjával befolyásolni képes a kalcium jelátviteli útvonal működését. Ide tartozik szívizomban a SERCA pumpát szabályozó foszfolambán, és a simaizomban a kalcium-kalmodulin-függő miozin könnyűlánc kináz szabályozása is, melyekkel a sejtek kontrakciós állapotát képes befolyásolni. Hasonló módon működik a PKG rendszer, ahol az aktiváló anyag a cGMP (Ádám et al. 2001).

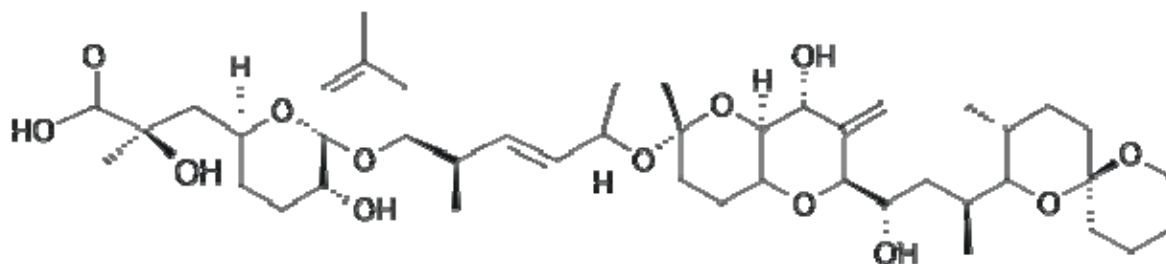
A foszfoprotein foszfatázok

A foszfoprotein foszfatázokat szintén aszerint csoportosítják, hogy a foszfátcsoportot milyen aminosav oldalláncról hasítják le. Ezek szerint megkülönböztethetünk szerin/treonin foszfoprotein foszfatázokat és tirozin foszfoprotein foszfatázokat. A szerin/treonin foszfoprotein foszfatázoknak több csoportját különböztethetjük meg, a PP1, PP2A, PP2B és PP2C csoportokat, illetve a nemrég felfedezett PP4, PP5, PP6 és PP7 csoportokat (Garcia et al. 2003). A PP2B enzim Ca^{2+} -dependens, és kalcineurinnak is nevezik. A kalcineurin az NFAT-t defoszforilálja, ezáltal aktiválja, az aktivált NFAT a génátírás szabályozásán keresztül részt vesz a T-limfociták aktivációjában, a szívizom hipertrófia kialakulásában és a vázizomsejtek differenciálódásában (Mann et al. 2004).

Szerin/treonin foszfatáz inhibitorok

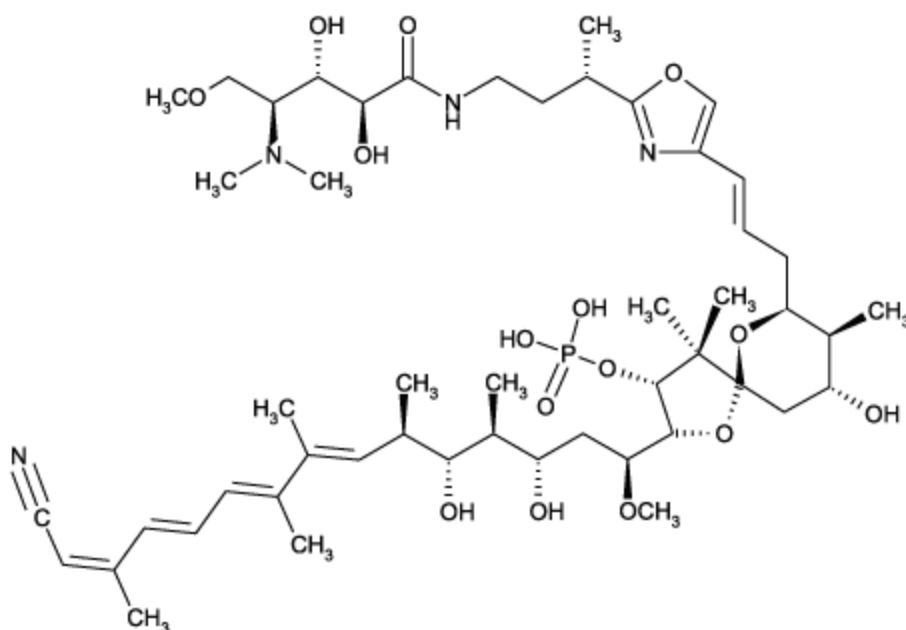
Kísérleteinkben kétféle szerin/treonin foszfoprotein foszfatáz inhibitorot használtunk. Az okadánsavat tengeri szivacsból az *Halichondria okadai*-ből izolálták először (Kazuo et al. 1981), majd egy másik tengeri szivacsból, a *H. malanodocia*-ból is kimutatták. Valójában tengeri alga-félék termelik (Lee et al. 2008), a szivacsokban illetve kagylókban azonban felhalmozódhat, melyek elfogyasztásával hasmenéses mérgezés alakulhat ki. Az okadánsav

gátolja a protein szerin/treonin foszfatáz 1, 2A és 2B alcsoportjait (Garcia et al. 2003), leghatékonyabban a 2A csoportot ($IC_{50} = 0,1-1 \text{ nM}$), majd az 1-et ($IC_{50} = 3-15 \text{ nM}$) és legkevésbé a 2B-t. Rágcsálókban az okadánsav tumor promóter hatású (Haystead et al. 1989). Okadánsav asztrocita tenyészetek sejtjeiben növelte az idegsejtekre ható növekedési faktor szekrécióját, illetve e faktor termelődését (Pshenichkin et al. 1995) (6. ábra).



6. ábra: Az okadánsav szerkezeti képlete.

A másik általunk használt szerin/treonin foszfatáz inhibitor a kalikulin-A volt. A kalikulinokat elsőként a *Discodermia calyx* tengeri szivacsból vonták ki, és egér bőrön erősen rákkeltő anyagnak bizonyult (Suganuma et al. 1990). A kalikulin A erősebb szerin/treonin foszfatáz inhibitor az okadánsavnál. Míg az okadánsav főleg a PP2A csoportot gátolja, és kisebb hatással van a PP1-re, addig a kalikulin A mindkét csoport hatékony gátlószere (PP1: $IC_{50} \sim 2 \text{ nM}$, PP2A $IC_{50} \sim 0,5-1,0 \text{ nM}$). Sem a kalikulin A, sem az okadánsav nincs hatással a savas vagy alkalikus foszfatázokra, illetve a foszfortirozin protein foszfatázokra (Resjö et al. 1999, Ishihara et al. 1989) (7. ábra).



7. ábra: A kalikulin A szerkezeti képlete.

A foszfoprotein foszfatázok élettani hatásai

Tekintettel a foszfoprotein foszfatázok által befolyásolt jelátviteli utak nagy számára, néhány példán keresztül mutatom be a foszfoprotein foszfatázok élettani szerepét. Keratinocitákban a növekedés TGF- β 1-gyel történő leállítása a PP1 aktivációjával jár (Gruppuso et al. 1991). Az okadánsav és a kalikulin A hatékony tumor promotor egér bőrben (Fujiki et al. 1991). A kalikulin A és okadánsav keratinocitákban a HSP27 hőszokk fehérje, és a citokeratinok hiperfoszforilációját indukálja. A hiperfoszforilált citokeratinok a sejtmag körüli térben halmozódnak fel. Ez a változás azon korai változások egyike, amelyek a foszfatázgátló kezelés hatására megfigyelhetők a keratinocitákban (Yatsunami et al. 1993). Az okadánsav azonban nemcsak rákkeltő anyagként viselkedik, számos sejtvonalban képes apoptózist indukálni. Az apoptózis indukciója ezekben az esetekben független a p53 útvonaltól, azonban a Ras mutációi befolyásolják az okadánsav kezelés hatására bekövetkező apoptózis mértékét (Rajesh et al. 1999). Keratinocitákban a β 2 adrenérg receptorok aktiválása növeli a cAMP koncentrációját, viszont a keratinociták migrációját cAMP-től független módon csökkenti (Chen et al. 2002). A migráció csökkenésének oka ebben az esetben a PP2A aktiválása volt, amely az extracellulárisan szabályozott kináz (extracellular regulated kinase, ERK) útvonal csökkent működésével járt (Pullar et al. 2003). A PP2A aktiválása a BCL-2, mitokondriumok integritásáért felelős fehérje defoszforilálása révén apoptózist képes indukálni (Garcia et al. 2003).

Az UV-B sugárzás élettani hatásai a keratinocitákra

Epidemiológiai kutatások kimutatták, hogy komoly összefüggés van a bőr tumoros megbetegedéseinek kialakulása és a bőrt ért napsugárzás mennyisége között (Worswick et al. 2008). A napsugárzás elektromágneses sugárzás, amely tartalmazza az ultraibolya (UV) sugárzás három komponensét (UV-A, UV-B, és UV-C). A három összetevő közül az UV-B sugárzás rendelkezik a legjelentősebb biológiai hatással. Az UV sugárzás rövidtávú hatásai közé tartozik a bőr kipirosodása (erythema) és gyulladása (dermatitis solaris); illetve a szem begyulladása (keratitis, conjunctivitis). Hosszútávú hatás általában az ismételt UV sugárzásnak kitett területeken jelenik meg, különböző bőrdaganatok alakulhatnak ki, felgyorsul a bőr öregedése, és szürkehályog (cataracta) is kialakulhat. Az UV sugárzás az immunrendszert és a DNS-t szintén károsíthatja, hatására mutációk alakulhatnak ki a DNS-ben (Bettega et al. 2001, Ambach et al. 1993). Az UV-C sugárzás, amely jóval hatékonyabban lenne képes biológiai hatások kiváltására, a légkörben elnyelődik, és nem jut le a Föld felszínére. UV sugárzás hatására többféle bőrdaganat is kialakulhat, ilyen daganat a melanoma, amely a bőr melanocitáiból származik és rendkívül agresszív, a basalioma, amely a bőr basalis sejtjeiből alakul ki és áttétet nem ad, valamint a laphámsejtes carcinoma (Perlis et al. 2004), amely keratinocita eredetű, gyakran elszarusodik és áttétet is ad.

A kiterjedt DNS károsodás, vagy a javító mechanizmusok elégtelensége sejthalálhoz, vagy, ami még rosszabb, a sejt malignus transzformációjához vezethet. Fiziológias körülmények között a károsodott DNS-sel rendelkező sejtek felismerésre kerülnek és eltávolítódnak. Például, ha az UV-val kiváltott DNS károsodás nem javítható, a károsodott DNS-sel rendelkező sejtek apoptózis által eliminálódhatnak (Erb et al. 2008). Az apoptózis kiváltásában egy fontos esemény az intracelluláris kalcium koncentráció ($[Ca^{2+}]_i$) megemelkedése. HeLa sejtekben az UV sugárzás által kiváltott apoptózis szabályozásában szerepet játszik a citoplazmatikus kalcium jel (Pu et al. 2001).

A sejtek többek között a felszíni membránban, vagy az endoplazmatikus reticulum (ER) membránjában elhelyezkedő, feszültség- vagy ligand vezérelt kalcium csatornákon keresztül emelhetik meg a $[Ca^{2+}]_i$ -jukat. A keratinocitákban található különböző purinerg receptorok részt vesznek a proliferáció és differenciáció szabályozásában, így a sejt sorsának meghatározásában. A P2Y receptorok inkább a proliferáció, P2X receptorok inkább a differenciáció szabályozásában vesznek részt (Greig et al. 2003). Az utóbbiak közül a három identikus alegységből felépülő (Becker et al. 2008) P2X₇ receptor az apoptózis kiváltásáért felelős (Surprenant et al. 1996). Keratinocitákban a P2Y₂ receptor a migráció negatív szabályozó faktora (Taboubi et al. 2010).

A kalciumoszillációk és a foszfoprotein-foszfataz inhibitorok kapcsolata

Emlős sejtekben az $[Ca^{2+}]_i$ változása a sejtfunkciók széles tárházát szabályozza, ideértve a sejtosztódást, a szekréciót, a sejtek mozgás- és kontraktilis képességeit (Berridge et al. 2000). Gyors kalcium tranziensek szükségesek a gyors sejt folyamatokhoz, mint a szinaptikus jelátvitel és az izomösszehúzódás, míg lassabb $[Ca^{2+}]_i$ változások –ismétlődő kalcium tranziensek és hullámok – szükségesek a gének átírásához és a sejtosztódáshoz. A kalcium oszcillációk alatt megjelenő kalcium ionok felszabadulhatnak az endoplazmás retikulumból inozitol 1,4,5-triszfoszfát receptoron (IP_3R) és rianodinreceptoron keresztül (RyR) és gyakran ismétlődő kalcium hullámot létrehozva terjednek rá az egész citoplazmatikus térre (Berridge et al. 2003). Ez a jelenség jól ismert ingerlékeny sejtek esetén, azonban néhány nem-ingerlékeny sejtél, például endothélsejtekél (Helmlinger et al. 1996), osteoblastoknál (Nesti et al. 2007) és chondrocyták esetében (Matta et al. 2008) is megfigyelték már a kalcium oszcillációk jelenlétét.

A kalcium oszcillációkért felelős ioncsatornák aktivitása, és így a kalciumfelszabadulás mértéke növekedhet, illetve csökkenhet ezen ioncsatornák foszforiláltsági állapotától függően. A szerin/treonin protein foszfataz 1 és 2A (PP1 és PP2A) kapcsolatban áll protein kináz A-val (PKA) és az IP_3R -ral, szívizomsejtekben a $RyR2$ -vel való interakciójuk is ismert. PP1 és PP2A jelenlétében megfigyelhető változások a receptor foszforiláltsági állapotának – ezen keresztül pedig aktivitásának – szoros kontrolljára utalnak (Berridge et al. 2003). A PP1 azon képességét, hogy foszfátcsoportjától megfossza a RyR -t, váz- és szívizomsejtekben is kimutatták (Zhao et al. 1998), ami felveti a lehetőségét, hogy hasonló, a $RyR1$ és/vagy az IP_3R részvételével kialakuló komplexek létezhetnek nemcsak szívizomsejtekben, hanem más sejtípusokban is.

A protein foszfatazok szerepét gátlószerek segítségével vizsgálják. A kalikulin A (CLA) *in vitro* tesztekben hasonló hatékonysággal gátolja a PP1-et és PP2A-t, míg az okadánsav (OA) a PP2A aktivitását hatékonyabban képes csökkenteni, mint a PP1-ét. Sem a kalikulin A, sem az okadánsav nincs hatással az alkalikus foszfatazokra és a foszfortirozin protein foszfatazokra. (Resjö et al. 1999, Ishihara et al. 1989).

Bár a protein kinázok és foszfatazok szerepe régóta ismert az $[Ca^{2+}]_i$ változásával kapcsolatban, és jelentős szerepet játszanak a sejtek mozgásának szabályozásában, mindaddig kevesen vizsgálták szerepüket a sebgyógyulás folyamatában. A sebgyógyulás folyamán a keratinociták a migrációjukat a fibronectinben gazdag állományba lamellipodiumok kibocsátásával kezdik, amely fokozható protein-szerin/treonin kináz inhibitorokkal (Koivisto

et al. 2003). Ezzel ellentétben, az okadánsav, mely növeli a myosin II fehérje foszforilációs szintjét, kísérletekben csökkentette a hepatociták migrációját (Lontay et al. 2005). Humán eredetű primer keratinocitákon az epidermális növekedési faktor receptorok aktiválódása és az ERK foszforilálódása fokozta a sejtek migrációját, illetve a sebgyógyulás sebességét. Hasonlóképpen ahhoz, amikor a $\beta 2$ adrenerg receptor stimulációja során a PP2A aktiválódik, és az ERK elveszti a foszfátcsoportját, a sejtvándorlás sebessége lecsökken. Másrészt viszont a PP2A 10 nM okadánsavval való gátlása fokozta a migrációt (Pullar et al. 2003).

Hal eredetű keratinocitákban a sejtek mozgását az $[Ca^{2+}]_i$ hirtelen megnövekedése leállította (Liu et al. 2009). Ezen kívül az endogén kalcium tranziensek által létrehozott kalciumoszillációk részt vehetnek a sejtek reszenzitizáción-deszenzitizáción alapuló, szubsztrát által irányított mozgásának szabályozásában. Hasonló jelenséget figyeltek meg humán primer keratinociták esetén, ahol a nikotinos acetilkolin receptoron keresztül kalciumfelvétel csökkentette a sejtek által a migráció során megtett távolságot (Grando et al. 1996). Foszfátázgátlók, úgymint az OA és a CLA, elősegítették a thapsigarginnal kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ emelkedést humán neutrofil granulocitákban (Wong & Li 1998), bár az nem volt egyértelmű, hogyan függ össze e hatás a foszfátázok gátlásával. Az arachidonsavval kiváltott kalciumfelszabadulás és -belépés CLA-val és tautomycinnel egyaránt növelhető volt parotis acinussejteken, míg az OA nem volt hatással a felszabadulásra, gátolta viszont a kalcium belépését a sejtekbe (Saino & Watson 2008). Hasonlóképpen a CLA szívizomsejtekben fokozta a rángások alatti kalciumtranzienseket és a sejtek megrövidülését mind kontroll, mind izoproterenollal kezelt sejtek esetén (Kawashima et al. 2009). A fentebb említettek arra utalnak, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ változása, illetve bizonyos fehérjék foszforilációja (kinázok aktiválása, vagy foszfátázok gátlása által) egymással kapcsolatban állhat és együttesen hatnak a sejtek vándorlására.

Célkitűzések

Kísérleteinkben az UV-B kezelés és a keratinociták purinerg receptor mintázata közötti összefüggéseket kívántuk megvizsgálni. Vizsgáltuk a P2X1, P2X3, P2X7 és P2Y2 purinoreceptorok expressziójának UV-B sugárzás hatására bekövetkező változásait az idő függvényében, a sejtek nyugalmi kalcium szintjét UVB kezelés előtt és után, illetve a purinoreceptorokhoz köthető ATP-vel kiváltott $[Ca^{2+}]_i$ változásainak alakulását. Meghatároztuk UVB sugárzást követően az ATP adagolással kiváltott, P2X₇ receptoron keresztüli apoptózis mértékének változását.

További kísérleteinkben foszfatázgátlók (CLA és OA) hatását vizsgáltuk HaCaT keratinociták migrációjára és proliferációjára, mely kísérletek során az összefüggő sejtréteg megkarcolása után alkalmazzuk a szereket. A spontán Ca^{2+} -oszcillációkat a karcmentes tenyészetek sejtjeiben illetve a közvetlenül a karcolás mellett helyet foglaló sejteken figyeltük meg és a kísérletek során ezeket elemeztük. Megvizsgáltuk továbbá a foszfatázgátlók hatását a keratinociták nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jára.

Anyagok és módszerek

HaCaT keratinociták tenyésztése

A sejttenyészeteket széles körben alkalmazzák számos előnyös tulajdonságuk miatt élettani tárgyú kísérletek végzéséhez. Sejttenyészetekben a sejtek növekedése, morfológiai változásai mikroszkóp segítségével folyamatosan nyomon követhető. Lehetőség van olyan sejttenyészetek létrehozására, amelyek csak egyféle sejtípust tartalmaznak, sőt immortalizált, folyamatosan osztódó, geno- és fenotípusosan azonos, klónozott sejtek nagy tömegét is elő lehet állítani, ami a kísérletek jó reprodukálhatósága szempontjából igen előnyös. Sejttenyészeteket használva a kísérletekhez nincs szükség élő állatok felhasználására. Az *in vitro* vizsgálatok ezen felül a kísérletező számára is előnyösek, hiszen így elkerülhető az állattal szembeni allergia kialakulása is. Ezek miatt az előnyök miatt a sejttenyészeteket széles körben használják a molekuláris biológiai és sejtelettani kutatások során. Az *in vitro* sejttenyészetek használatának azonban hátránya, hogy a használatukkal kapott eredmények nem mindig modellezik pontosan az élő szervezet sokszorosán szabályozott, *in vivo* válaszait. A hosszú ideig fenntartott tenyészetek tulajdonságai mutációk révén módosulhatnak (pl. a differenciálódási képesség csökkenése), ezért bizonyos passzázsszám (HaCaT keratinociták esetén ez a szám több mint 140; (Boukamp et al. 1988)) elérése után célszerű a tenyészetet kisebb passzázsszámúra cserélni (Szabó 2004).

A HaCaT keratinocitákat (Boukamp et al. 1988) Dulbecco által módosított Eagle mediumban (DMEM, Sigma, Budapest, Magyarország) tenyésztettük, amit 10% borjúsérummal (fetal calf serum, Sigma), 2 mmol/L L-glutaminnal, illetve antibiotikumokkal (50 NE/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin) és antimikotikummal (1,25 µg/ml Fungizon) egészítettünk ki. A sejteket 37°C-ra beállított, 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban tenyésztettük (Gönczi et al. 2007, Gönczi et al. 2008).

Polimeráz láncreakció (PCR)

A purinoreceptorok mRNS szintű kimutatását reverz transzkripció PCR-ral (RT-PCR) végeztük. A HaCaT keratinocita sejttenyészeteket 3-szor átmostuk jéghideg foszfát puffer-oldattal (PBS; 0,02 M NaH₂PO₄, 0,1 M NaCl), folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd felhasználásig -70 °C-on tároltuk. A keratinociták teljes RNS-ét Qiagen RNeasy® Mini Kit-tel izoláltuk a gyártó utasításai szerint (Qiagen, Budapest,

Magyarország). Az izolált RNS mennyiségét és tisztaságát NanoDrop (NanoDrop Technologies, Bio-Science, Magyarország) készülék segítségével ellenőriztük.

A reverz transzkripció reakcióhoz Omniscript kit-et használtunk (Qiagen). A reakcióelegy (20 µl végtérfogatban) 500 ng RNS-t, 0,25 µl RNáz inhibitor, 0,25 µl oligo (dT) primert, 2 µl dNTP-t (200 µM), 1 µl M-MLV RT enzimet tartalmazott 1×RT pufferben hígítva. A purinoreceptorokra specifikus cDNS szekvenciák amplifikációja specifikus primerekkel történt (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA), melyeket az Interneten közölt humán purinoreceptor nukleotid szekvenciák alapján terveztünk a Primer Premier 5.0 program (Premier Biosoft International, Palo Alto, CA, USA) segítségével. Az így kapott P2X₇ receptor primer forward szekvenciája 5' TATGAAGGGAACCAGAAGACC 3' a reverz pedig 5' TATTTGGGACGGCAGTGAT 3' volt. A P2Y₂ receptor forward primer szekvenciája 5' GACTTCTTGTACGTGCTGACTC 3', a reverz primeré 5' CAGGTACTCGTCTGAGGTGG 3' volt. A kontrollként használt GAPDH forward primer szekvenciája 5'-AAGGTCGGAGTCAACGGATTTGG-3', a reverz primeré 5'-AATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3' volt. Az 50 µl végtérfogatú PCR-reakcióelegy a következő komponensekből állt: 2 µl forward és reverz primer, 1 µl dNTP (200 µM), és 0,5 µl Promega GoTaq® DNS polimeráz 1× töménységűre hígított pufferben. A PCR reakciót programozható termosztátban (Eppendorf Mastercycle, Netheler, Hinz GmbH, Hamburg, Németország, ill. Bio-Rad C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad, Budapest, Magyarország) a következő beállításokkal hajtottuk végre: 2 perc 95 °C a kezdeti denaturációra, amit ismétlődő denaturációs ciklusok követtek 94 °C-on 1 percig, ezután a primerek anellációja 1 percig a primer számára optimális hőmérsékleten, majd végül az elongáció 72 °C-on 1 perc, 30 s-ig. Az utolsó ciklus után egy további elongációs lépés következett 10 percig, 72 °C-on. A PCR-termékeket 1,5%-os agarózgélben futtattuk meg, etídium-bromiddal jelöltük, Gel Logic 1500 előhívó rendszerrel előhívtuk, majd analizáltuk. Az eredmények kvantitatív elemzését ImageJ programmal végeztük.

Fehérjeminták készítése

A keratinocita tenyészeteket jégen tartva, jéghideg PBS-sel háromszor lemostuk, hogy az elpusztult sejteket és sejttörmelékét eltávolítsuk, majd a sejteket homogenizációs pufferben (összetevői: 20 mM Tris-Cl, 5 mM EGTA, 1 mM 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride, 20 µM leupeptin, pH 7,4; minden a Sigma-tól) szedték fel. A mintákat folyékony nitrogénes gyorsfagyasztás után a felhasználásig -70 °C-on tároltuk. Az antigének feltárásához

a mintákat jégen, 3-szor 10-10 másodpercig jégen szonikáltuk (Branson Sonifier, Danbury, USA).

A minták fehérjekoncentrációját módosított BCA (bicinchoninic acid) protein assay segítségével (Pierce, Rockford, IL, USA) határoztuk meg, melynek során standardként ismert koncentrációjú BSA-t használtunk.

Western-blot analízis

A teljes sejt lizátumokat Western-blot analízissel vizsgáltuk. 1/5 térfogatú, 5-szörös töménységű elektroforézis mintapuffert (310 mM Tris-HCl, pH 6,8; 10% SDS, 50% glicerol, 100 mM DTT, 0,01 % brómfenol-kék) adtunk a sejt-lizátumokhoz, majd 10 percig 100 °C-on főztük őket. A kísérletekben 8%-os nátrium-dodecilszulfát-poliakrilamid gélelektroforézis (SDS-PAGE) gélt használtunk, amelyen kísérletenként azonos mennyiségű, 40-50 µg mintát választottunk szét a vizsgált fehérjék immunológiai detektálásához. Ezután a fehérjéket elektroforézis segítségével nitrocellulóz membránra (BioRad, Bécs, Ausztria) transzferáltuk. Az aspecifikus kötőhelyeket PBS-ben oldott 5%-os sovány tejporral blokkoltuk, majd 4 °C-on, egész éjszakán keresztül inkubáltuk az elsődleges antitestekkel, melyeket a következő arányokban hígítottunk a tejporos blokkoló oldatban: nyúlban termeltetett P2X₁ antitest 1:5000, P2X₃ antitest 1:200, P2X₇ antitest 1:500, P2Y₂ antitest 1:500. Ezután 3-szor 10 perc PBST-vel (PBS kiegészítve 0,1% Tween 20 reagenssel) történő mosás következett, majd a membránokat 1 órán keresztül inkubáltuk a másodlagos antitestekkel. Másodlagos antitestként az elsődleges antitestet termelő faj (nyúl) ellen kecskében termeltetett, tormaperoxidázzal (HRP) konjugált IgG-t (BioRad) használtunk 5% sovány tejport tartalmazó PBS-ben 1:1000 arányban hígítva. A jeleket megnövelt kemilumineszcens (ECL) reakcióval (Thermo Scientific, Budapest, Magyarország) hívtuk elő, az intézetünkben rendelkezésünkre álló Gel Logic 1500 előhívó rendszerrel.

A keratinociták UV-B-vel történő besugárzása

Ezekhez a kísérletekhez a keratinocitákat 10 cm átmérőjű műanyag Petri csészékben tenyésztettük. A tápoldat eltávolítása után PBS-pufferrel mostuk a tenyészetet, majd a besugárzás idejére 0,5 ml PBS-t tettünk rájuk, elkerülendő a sejtek kiszáradását. A besugárzáshoz a Philips TL-12 (az UV kibocsátás 57,5%-a UV-B, 280–315 nm) készüléket használtuk. A besugárzáshoz szélessávú UV-B sugárzást használtunk 1 perc időtartamban, 40 mJ/cm² dózisban, a laborunk által már korábban leírt módon (Balogh et al. 2008). Az UV-B dózis meghatározása az UVX Digital Radiometerrel (UVP Inc., San Gabriel, CA, USA)

történt. A besugárzás kontrolljául szolgáló tenyészeteket a besugárzottakhoz hasonló módon kezeltük, a besugárzástól eltekintve. A kezelés végeztével a sejtekre újra tápoldat került, és a 8, 12, 16, 24, 30, 36 és 48 órával későbbi felhasználásukig 37 °C-os termosztátban tartottuk őket.

Életképesség vizsgálata

A sejtek életképességének meghatározását MTT assay-vel mértük, melynek alapja, hogy az élő sejtek mitokondriális dehidrogenáz enzime a 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid (MTT; Sigma-Aldrich) tetrazólium gyűrűjét oldhatatlan, színes formazánná alakítja, így annak mennyisége kolorimetriásan meghatározható. A sejteket 96 lyukú tenyésztőedény 10-10 lyukában tenyésztettük 5000 sejt/lyuk sűrűségben, majd a megfelelő tenyészeteket UV-B-vel kezeltük. A kezelés után 8, 12, 16, 24, 30, 36 és 48 órával a tenyészeteket 2 órán keresztül 0,5 mg/ml MTT-vel inkubáltuk, majd a formazán kristályok koncentrációját kolorimetriásan, 570 nm-es hullámhosszon határoztuk meg, a gyártó utasításai szerint. A formazán mennyisége az élő sejtek számával arányos.

A kapott adatokat $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ábráztuk.

Apoptózis vizsgálata

Az apoptosis mértékének vizsgálatára a Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI kitet (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) használtuk. A kit a foszfatidilszerin kimutatásán alapul. A foszfatidilszerin ép sejtben a sejtmembrán belső oldalán található, így az annexin V nem fér hozzá, míg apoptotikus sejtekben a foszfatidilszerin átkerül a sejtmembrán külső oldalára, ahol a FITC fluoreszcens festékkel konjugált annexin V már képes hozzákötődni. A sejteket az UV-B besugárzás után fekete oldalú, átlátszó aljú 96 lyukú tenyésztőedénybe (Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, Németország) tettük 5000 sejt/lyuk sűrűségben. A teljes sejtmennyiség mérésére a CyQUANT® Cell Proliferation Assays kitet (Invitrogen) használtuk, a gyártó utasításainak megfelelően. Apoptosis kiváltására 48 órán keresztül 180 μM ATP-oldatban tartottuk a sejteket, amelyet 12 óránként cseréltünk a sejteken. A fluoreszcencia intenzitását FLIPR készülékkel mértük 485 nm-es gerjesztő és 530 nm-es emissziós hullámhosszokon. Az apoptotikus sejtek számát az összes sejt mennyiségére normalizáltuk.

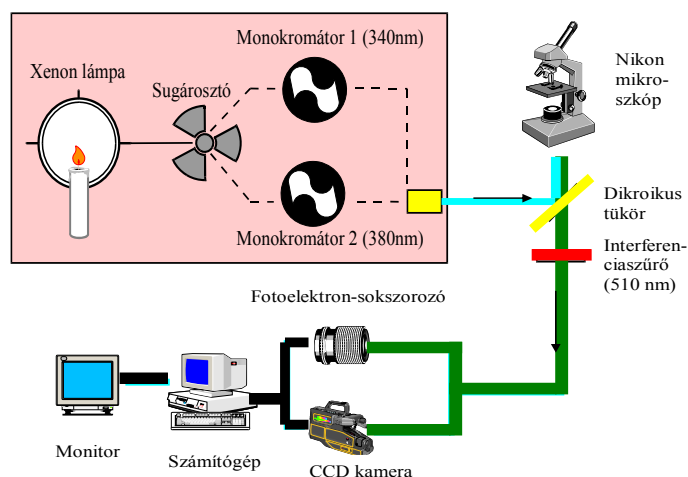
Egyedi sejteken történő fluoreszcens, intracelluláris $[Ca^{2+}]$ -mérés

Az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ változásának mérését a Photon Technology International (PTI) Delta ScanTM rendszer segítségével végeztük (8. ábra). A mérés alapelve, hogy a Ca^{2+} -ot kötött fluoreszcens festék abszorpciós maximuma (340 nm) eltér a Ca^{2+} -ot nem kötött festékétől (380 nm), így a két különböző abszorpciós maximumnak megfelelő hullámhosszon gerjesztve a sejtet, a két hullámhosszon való gerjesztést követően emittált fluoreszcens fény intenzitásának hányadosából az intracelluláris $[Ca^{2+}]$ kiszámolható (Grynkiewicz et al. 1985.). A fedőlemezen lévő, 100%-ban konfluens sejttenyészetet a Fura-2 kalciumérzékeny fluoreszcens festék acetoximetilészter (AM) formájával inkubáltuk. A festék sejtekbe jutásáért az AM csoport felelős, amely lipidoldékonyvá teszi a molekulát, így az szabadon átdiffundál a sejtmembránon. A sejtbe bekerülve az endogén észterázok lehasítják az AM csoportot, így a festék elveszíti a képességét, hogy átmenjen a membránokon és csapdába esik a sejtekben. A festékkel feltöltött tenyészeteket egy steril, 10 µl-es pipettahegy segítségével megkarcoltuk, majd fluoreszcens mikroszkóp tárgyasztalára helyeztük.

A sejtekbe juttatott festék 340 és 380 nm hullámhosszúságok között váltakozó gerjesztése a PTI Delta Scan kettős monokromátoros berendezése segítségével történt. Fényforrásként a rendszer xenonlámpája szolgált, melynek fényét egy forgótükros sugárosztó két nyalábra osztja. A keletkező sugarak külön-külön monokromátoron haladnak át, melynek eredménye a méréseinkhez szükséges 340, illetve 380 nm hullámhosszúságú fénynyaláb. A monokromátorokból optikai szálak vezetik a fényt egy csatoló egységen, valamint egy dikroikus tükrön keresztül a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett sejtekre. A Fura-2 által kibocsátott fluoreszcens fényt 510 nm-en, interferenciaszűrő közbeiktatásával, egy fotoelektronsokszorozó (PMT) segítségével detektáltuk. A jelek regisztrációja 10 Hz-es mintavételi gyakorisággal történt. A háttérfluoreszcenciát a tárgylemezek sejtmentes helyein mértük, ezt a program automatikusan levonta a mért fluoreszcenciaértékekből. A két hullámhosszon történő gerjesztés során mért fluoreszcenciaértékek hányadosából ($R = F_{340}/F_{380}$) az irodalomból ismert egyenlet (Grynkiewicz et al. 1985) alapján számítottuk ki az intracelluláris Ca^{2+} -koncentrációkat:

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

ahol K_d a disszociációs állandó, $R_{\max}$ az a fluoreszcenciahányados, ahol a festék Ca^{2+} -mal telített, $R_{\min}$ az a fluoreszcenciahányados, ahol a festék egyáltalán nem köt Ca^{2+} -ot, R a mért fluoreszcenciaértékek hányadosa, β a rendszerre jellemző állandó.



8. ábra: A PTI Delta Scan mérőrendszer felépítése. A sejtekben lévő Ca^{2+} -érzékeny festéket 340 és 380 nm hullámhosszon gerjesztjük, majd az emissziót 510 nm-en detektálva, a hányadosukból az intracelluláris Ca^{2+} -koncentráció kiszámítható.

Az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változásait Fura-2 kalciumkötő fluoreszcens festékkel mértük a laborunk által már korábban leírt módon (Szappanos et al. 2004).

A HaCaT keratinocitákat műanyag Petri-csészékbe helyezett 30 mm átmérőjű fedőlemezekre (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig, Germany) tenyésztettünk, majd 1 órán keresztül $10 \mu\text{M}$ Fura-2 AM-mel inkubáltunk saját tápoldatukban (DMEM, 10% FBS-sel kiegészítve), termosztátban (37°C , 5% CO_2). A foszfatazgátlókkal történő inkubáció (kalikulin esetén 1 h, isokadénsav esetén 2 h) a Fura-2 AM-mel történő inkubációval egyidőben történt. A festékkel töltött sejteket egy speciális mérőkádban egy invertáló fluoreszcens mikroszkóp (Diaphot; Nikon, Tokyo, Japan) tárgyasztalára helyeztük, majd 40 $\times$ -es nagyítású olajimmerziós objektívvel vizsgáltuk. A sejteket folyamatosan perfundáltuk NTY vagy kalciummentes Tyrode-oldattal egy külső perfúziós rendszer segítségével. A $180 \mu\text{M}$ koncentrációjú ATP mérőoldatot közvetlenül a kiválasztott sejtekre juttattuk egy $250 \mu\text{m}$ -es belső átmérőjű lokálperfúziós kapilláris tűn keresztül (Perfusion Pencil™; AutoMate Scientific, San Francisco, CA, USA) $0,35 \text{ ml/perc}$ sebességgel, melynek az adagolását egy lokálperfúziós rendszerrel (Valve Bank™ 8 version 2.0, AutoMate Scientific) vezéreltük. A foszfataz inhibitorokkal történő vizsgálatokat normál (NTY; 137 mM NaCl, $5,4 \text{ mM}$ KCl, $0,5 \text{ mM}$ MgCl_2 , $1,8 \text{ mM}$ CaCl_2 , $11,8 \text{ mM}$ HEPES, 1 g/l glükóz, pH 7,4; minden a Sigma-tól) Tyrode-oldatban végeztük, amelyet a mérésnek megfelelően kiegészítettünk kalikulinnal (10 nM) vagy isokadénsavval (50 nM).

A méréseket szobahőmérsékleten végeztük. A gerjesztő hullámhosszt 340 és 380 nm között váltogattuk egy kettős hullámhosszú monokromátor (Delta Scan, Photon Technology

International, New Brunswick, NJ, USA) segítségével, míg az emissziót 510 nm-en detektáltuk egy fotoelektronsokszorozót használva. A mérési eredményeket egy, az intézetünkben fejlesztett program segítségével elemeztük ki. Az elemzés során megkaptuk a sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jét, a kalciumtranziensek amplitúdóit a felszálló szár meredekségét (rate of rise), és a tranziensek után a nyugalmi kalcium szint eléréséhez tartozó időállandó (τ) értékeit. Az eredményeket átlag $\pm$ az átlagérték standard hibája formában ábrázoltuk.

Konfokális mikroszkópos mérések

Kísérleteink során az $[Ca^{2+}]_i$ megváltozásának méréséhez az LSM 5 LIVE konfokális mikroszkópot (Zeiss, Oberkochen, Németország) használtuk. Kétdimenziós leképezés esetén a rendszer a hagyományos konfokális mikroszkóptól eltérően, amely pontonként vizsgálja az adott mintát, a LIVE mikroszkóp vonalanként pásztázza végig a vizsgált sejtet reprezentáló pixeleket, és az egyes fluoreszcencia-intenzitásokat x-y koordinátarendszerben ábrázolja. Ilyen formában a sejtről a hagyományos fluoreszcens mikroszkóppal készített képekhez hasonló – de annál élesebb és kontrasztosabb – kétdimenziós képet kapunk. 2 Hz-es mintavételezési frekvenciával 250 s-es felvételeket készítettünk. A kapott képsorozat a mérés alatt végbement fluoreszcenciaintenzitás-változást mutatja be az idő függvényében. Ezeket a felvételeket az $[Ca^{2+}]_i$ megváltozásának nyomon követésére használtuk.

A sebgyógyulással kapcsolatban a kalciumoszillációk változásait fizikai károsítás (karcolás) közvetlen szomszédságában elhelyezkedő sejteken vizsgáltuk.

A HaCaT keratinocitákat 10 μ M Fluo-4-AM kalciumkötő festékkel inkubáltunk 30 percen keresztül, 37 °C-on. A Fluo-4-et argonion lézerrel gerjesztettük 488 nm hullámhosszon, és a fluoreszcencia intenzitást 500-570 nm-es áteresztő szűrő segítségével detektáltuk. A méréseket normál Tyrode-oldatban, szobahőmérsékleten végeztük, amelyet a mérésnek megfelelően kiegészítettünk a következő anyagok egyikével: 10 nM kalikulin A, 50 nM okadánsav, 10 μ M Xestospongine C, 200 μ M vagy 1 mM tetrakain, 4 vagy 10 μ M thapsigargin. A fluoreszcenciaintenzitás változásainak követésére 2 Hz mintavételi gyakorisággal 250 s-es felvételeket készítettünk, 512x512 pixel felbontással, 40 $\times$ olajimmerziós objektívet használva. Konfluens kontroll, illetve foszfátázgátlóval kezelt, Fluo-4-gyel feltöltött tenyészetekről x-y felvételeket készítettünk, majd a tenyészeteket pipettahegy segítségével megkarcoltuk, és a karcolás mellett elhelyezkedő sejtekről szintén elkészítettük az x-y felvételeket. Minden egyes tenyészet esetén karcolás előtt és után is 500 képet vettünk fel 500 ms időközönként, 3-6 különböző látótérrel. A felvételeken ezután minden egyes sejt ROI-t jelöltünk ki, majd az oszcillációt mutató sejteket és az oszcillációk jellemzőit egy az

intézetben megírt program segítségével határoztuk meg. A felvételek fluoreszcenciáját (F) az alap fluoreszcenciára (F_0 ; a sejtek nyugalmi fluoreszcencia-intenzitása a tranziensek előtt) normalizáltuk, majd a tranziensek amplitúdóját $\Delta F/F_0$ -ként határoztuk meg.

Az adatok elemzésére használt számítógépes program

Az x-y sorozatfelvételeket az ImageJ és egy intézetben megírt analízis program segítségével elemeztük. A felvételeken minden sejten kijelöltünk egy vizsgálandó területet (Region of interest, ROI) az ImageJ program segítségével, majd, szintén ezzel a programmal kaptuk meg a ROI-k átlagos fluoreszcencia intenzitás értékeit az idő függvényében. Ezen adatokat a továbbiakban a fentebb említett analízis program segítségével elemeztük.

Az elemzés első lépéseként normalizált fluoreszcencia intenzitás értékeket ($F_n = F/F_0$) számoltunk. Az F_0 értékek meghatározásakor minden egyes ROI esetében az alapvonal, tehát eseményt nem tartalmazó szakasz(ok) fluoreszcencia intenzitás átlagát vettük figyelembe. Azon ROI-n belüli átlagos fluoreszcencia intenzitás értékeket tekintettük az alapvonal részének, melyek az adott ROI-ra vonatkozó fluoreszcencia intenzitás értéket legfeljebb ezen értékek standard deviációjának 40%-ával haladták meg. A normalizált adatokat minden egyes ROI esetében egymástól függetlenül elemeztük.

A Szabó és munkatársai által 2010-ben közölt egydimenziós stationary wavelet transzformációt alkalmaztunk az adatok elemzésére. Röviden, ez a transzformáció optimális módon elkülöníti az eredeti jel alacsonyabb és magasabb frekvenciájú összetevőit. Ezeket az összetevőket nevezzük wavelet szinteknek: W_i jelzi az i -edik szintet, alacsonyabb i értékhez magasabb frekvenciájú összetevő tartozik. Az első wavelet szint, amely szinte csak a különösen nagy frekvenciájú zajt tartalmazta, eltávolításra került a jelből. A háttér meghatározására 8. wavelet transzformáció értékeit használtuk, és minden egyes normalizált értéket ezzel a háttér jellel osztottunk a további elemzés megkezdése előtt. Ezzel eltávolítottuk az egyes ROI-kon belüli fluoreszcencia intenzitás lassú változásait, amelyeket nem a vizsgált tranziensek okoztak és egy közös skálára normalizáltuk a jeleket.

A 4. és 5. wavelet szintet használtuk az események detektálására. Eseménynek tekintettük, ha egy ROI-n belül egy szakaszon a normalizált W_4 és W_5 értékek közül legalább az egyik magasabb volt egy előre megadott küszöbértéknél (0,01). Az ilyen értékű mintákat tartalmazó összefüggő szakaszokat kiterjesztettük a legközelebbi lokális minimumig az F_n -en és az így kapott szakaszokat tekintettük eseményeknek a további analízis szempontjából.

Statisztikai módszerek

Az eredményeket átlagérték $\pm$ az átlagérték standard hibája formátumban ábrázoltuk. Az adatok statisztikai elemzésére a SigmaStat (Aspire Software International, Ashburn, VA, USA) programot használtuk. A legtöbb, általunk gyűjtött adat nem mutatott normál eloszlást ($p < 0,05$), ezért nemparametrikus tesztek végeztünk a szignifikáns különbségek kimutatására. A karcolás nélküli és a karcolt csoportok közötti szignifikáns különbségek kimutatására a Mann-Whitney U tesztet használtuk. Kruskal-Wallis féle sorokon kivitelezett egyutas variancia-analízist végeztünk annak a meghatározására, hogy volt-e szignifikáns eltérés több mint két csoport között, amely helyesnek bizonyult a páronkénti összehasonlíthatóság szempontjából. Az azonos fedőlemezekon történt ismételt mérésekből számolt arányok normál eloszlást mutattak, ezért ezeknek az elemzéséhez a parametrikus egyutas variancia-analízist használtuk. Szignifikánsnak tekintettük az eltéréseket, ha $p < 0,05$.

Time-lapse felvételek

A time-lapse felvételek nagy érzékenységgű videokamerával összekapcsolt inverz mikroszkóp alatt készültek egy direkt ehhez a rendszerhez épített képfelvevő számítógépes rendszer segítségével (Farkas et al. 2010). A hő- és fototoxicitást szintén külön ehhez a rendszerhez tervezett világítással küszöböltük ki. A meleg fehér fényt kibocsátó diódák a felvételek elkészítésével összhangban kapcsolódtak fel. A sejt kultúrák üveg fedőlemezekon, Petri csészékben kerültek a mikroszkóp alá, és percenként készült róluk felvétel. Az expozíció valós ideje minden egyes felvételen feltüntetésre került. Az egyes felvételekből videofilm is készült, amelyben minden másodperc 30 képkockát mutat be. A disszertációban meghatározott időpontokban készült egyedi képkockák kerülnek bemutatásra. A mérések 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó termosztátban készültek.

Migrációs assay

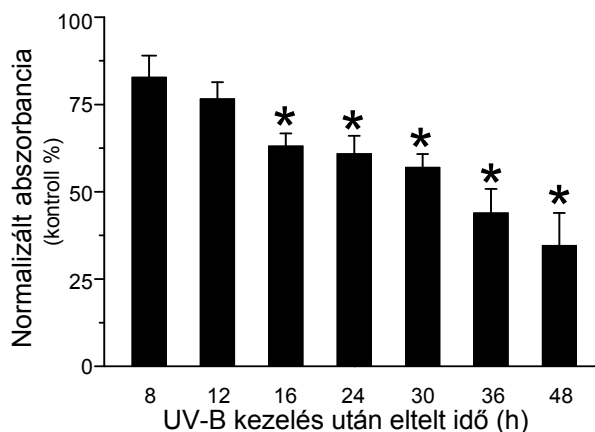
A sejtek migrációját fibronektinnel bevont (FN) “Quantitative Cell Migration Assay” segítségével vizsgáltuk a gyártó utasításai alapján (Merck Millipore, Budapest, Hungary). Passzálás előtt a HaCaT keratinocitákat szérumentes DMEM tenyésztőfolyadékban éhezettettük 18 órán keresztül. $2,5 \times 10^5$ sejtet tettünk ki Boyden kamrában lévő, BSA-val (kontroll) és FN-nel bevont membránokra. A DMEM tenyésztőfolyadékot az alsó kamrában 20% FBS-sel egészítettük ki. A sejtek 18 órán keresztül inkubálódtak 50 nM OA vagy 10 nM CLA jelenlétében, illetve hiányában. A sejtek migrációját a membrán másik oldalára plate

reader segítségével, 540 nm-es hullámhosszon a festékkel feltöltött sejtek optikai denzitását felhasználva határoztuk meg.

Eredmények

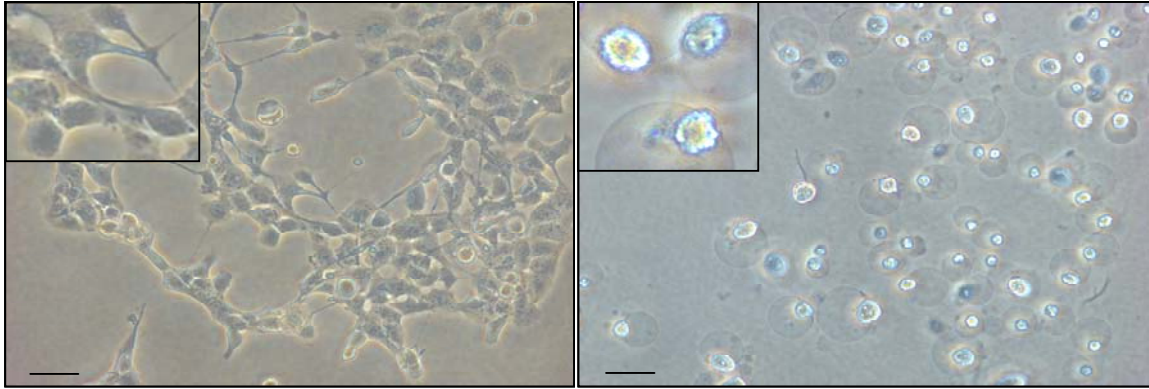
Az UV-B besugárzás hatása a HaCaT keratinociták életképességére

Kísérleteinkben a 40 mJ/cm^2 dózisú UV-B besugárzás hatásait vizsgáltuk. MTT-assay segítségével vizsgáltuk a sejtek életképességét, és kimutattuk, hogy az 1 perces tartó UV-B besugárzás csökkenti az élő sejtek számát. Látható, hogy a besugárzás után eltelt különböző időpontokban (8, 12, 16, 24, 30, 36, 48 órával a besugárzás után) vizsgálva az élő sejtek számát, és azt a kontroll értékekre normalizálva, a kontrollhoz képest folyamatosan csökken a besugárzott sejtek száma. Habár ez a csökkenés folyamatos, szignifikánssá csak 16 óra eltelte után válik. 24 óra eltelte után a sejtszám csökkenésének mértéke meghaladja az 50 %-ot (10. ábra).



10. ábra: A keratinociták életképességének vizsgálata. A HaCaT keratinociták életképességét a feltüntetett időpontokban MTT-assay segítségével vizsgáltuk. Az abszorbancia mértéke egyenesen arányos az élő sejtek számával. Az értékeket a kontrollra normalizáltuk, és csillaggal jelöltük a szignifikáns eltéréseket (* $p < 0,05$). Az ábrán jól látható az UV-B kezelés hatására bekövetkező sejtszámcsökkenés.

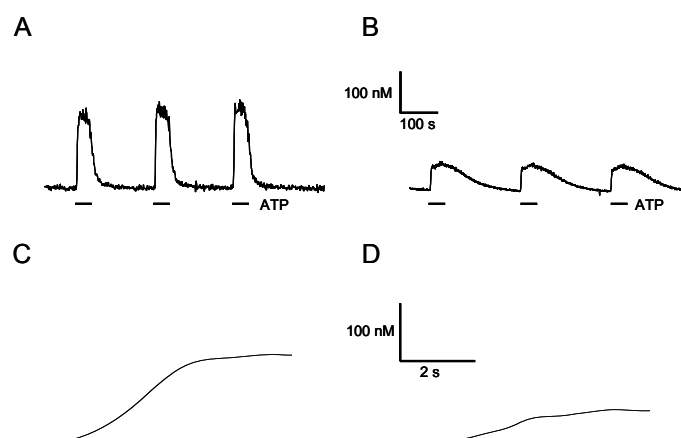
A besugárzástól eltelt idő előrehaladtával azonban nem csak a sejtszám csökken, hanem morfológiai változások is megfigyelhetővé válnak a sejteken. Fázis kontraszt mikroszkóppal vizsgálva a sejteket jól látszik, hogy a sejtek zsugorodnak és elveszítik a nyúlványaikat (11. ábra).



11. ábra: Morfológiai változások UV-B sugárzás hatására. Fázis-kontraszt mikroszkópos képek 24 órával az UV-B kezelés után kontroll (baloldali kép) és UV-B-vel kezelt HaCaT keratinocitákról (jobboldali kép). A képeken jól látszanak a sejtek morfológiájában történt változások: az UV-B-vel kezelt sejtek zsugorodtak és elvesztették a nyúlványaikat. Az inzertben nagyítva látható néhány sejt a jobb összehasonlíthatóság kedvéért. A kalibrációs vonal 50 μm -nek felel meg.

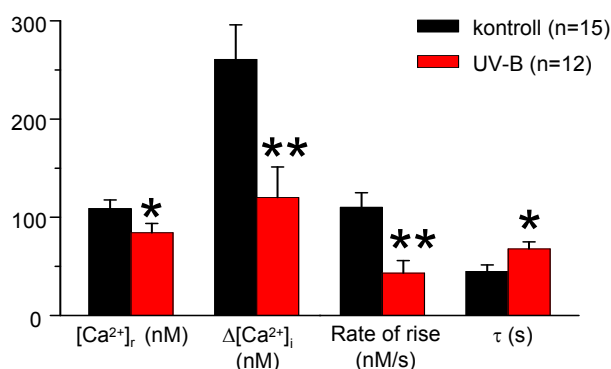
ATP adagolás hatása a keratinociták $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -jára

A HaCaT keratinociták extracelluláris ATP adagolására intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedéssel válaszolnak (12. ábra). Egy nappal az UV-B besugárzás után az ATP-t lokális perfúzió keresztül a sejtek közvetlen közelébe adagolva mind a kontroll, mind a besugárzott sejtek intracelluláris kalciumkoncentráció növekedést mutattak. Kontroll sejtekben a kalcium tranziensek amplitúdója nagyobb volt, mint a besugárzott sejtekben, illetve a besugárzott sejtekben a kalcium tranziens kialakulása után az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ lassabban tért vissza a nyugalmi értékre.



12. ábra: ATP-vel kiváltott Ca^{2+} tranziensek. Kalciumot tartalmazó oldatban az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ban ATP-adagolással kiváltott változások kontroll (A, C) és UV-B sugárzással kezelt (B, D) sejtek esetén. A C és D ábrán az első tranziensek kinagyított felszálló szára látható.

Oszlopdiaagramon ábrázolva a kapott eredményeket látható, hogy a kontroll sejtekben magasabb a nyugalmi kalcium szint, illetve a tranziensek felszálló szárának meredeksége (rate of rise) is nagyobb. A nyugalmi kalciumkoncentráció eléréséhez tartozó időállandó (τ) a besugárzott sejtekben nagyobbak adódott, mint kontroll sejtekben. Ezek az eltérések minden esetben szignifikánsnak bizonyultak (13. ábra).



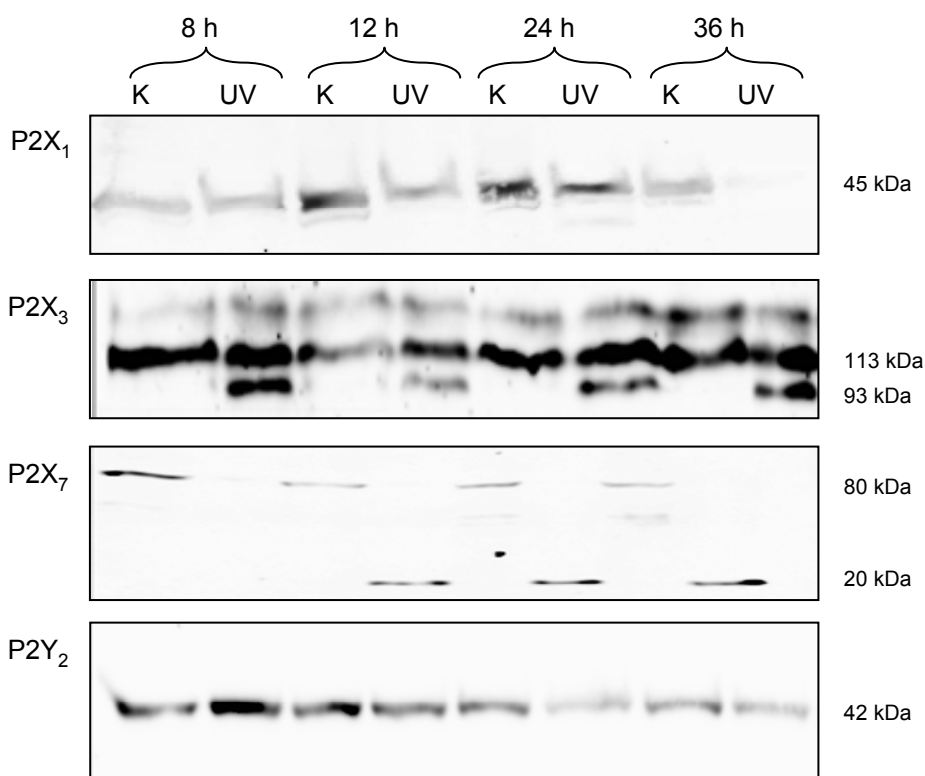
13. ábra: ATP-vel kiváltott Ca^{2+} -tranziensek. Oszlopdiaagramon ábrázoltuk az ATP-adagolással kiváltott kalcium tranziensek vizsgált paramétereit mind kontroll, mind UV-B-vel kezelt sejtek esetén. (* $p<0,05$; ** $p<0,01$).

Megfigyeléseink alapján megállapítható, hogy a purinerg szignalizáció UV-B besugárzás hatására megváltozik a sejteken. A változások magyarázatául szolgálhat a purinoreceptorok kifejeződésének megváltozása. Ennek kiderítésére RT-PCR-al vizsgáltuk a purinerg receptorok mRNS-ének kifejeződését, illetve a fehérje expresszióját Western-blot analízissel ellenőriztük.

Purinerg receptorok kimutatása HaCaT sejteken az UV-B sugárzás függvényében

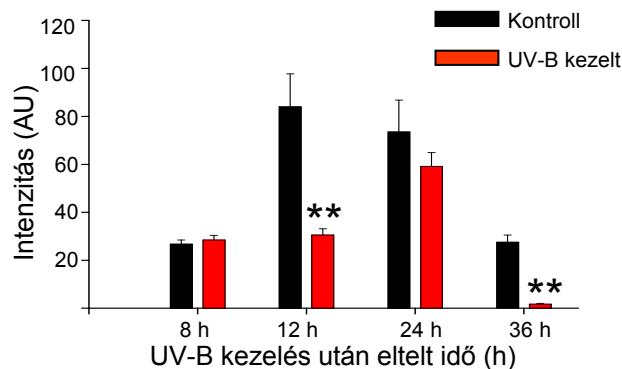
Munkacsoportunk előző közleményeiben bemutattuk, hogy a HaCaT keratinocitákon a $P2X_1$, $P2X_3$, $P2X_7$ és $P2Y_2$ purinoreceptorok megtalálhatóak és fontos szerepet töltenek be a kalciumhomeosztázisban (Gönczi 2008). Jelen kísérleteinkben e receptorok expressziós mintázatának változásait vizsgáltuk, külön kiemelve az apoptózis indukálásáért felelős $P2X_7$ receptort. Western-blot analízissel megvizsgáltuk mind az ionotróp ($P2X$), mind a metabotróp ($P2Y$) purinoreceptorok kifejeződését a besugárzástól eltelt idő (8, 12, 24, 36 óra) függvényében. Az ionotróp $P2X_1$ receptor esetében azt találtuk, hogy – a kontroll sejtekhez viszonyítva – a 8 órás időponttól eltekintve, ahol a fehérje szintje nagyjából megegyezett a kontroll és a besugárzott sejtekben, a besugárzott sejtekben minden vizsgált időpontban

csökkent a receptor fehérje szintű kifejeződése. A P2X₃ receptor esetében a besugárzás után egy extra sáv jelent meg a Western-bloton. Ez az extra sáv utalhat arra, hogy a receptorok egy része degradálódott az UV-B sugárzás hatására. A P2X₇ receptort vizsgálva az intakt receptorra jellemző, 80 kDa-os sávot csak a kontroll sejtekben tudtuk kimutatni. Besugárzott sejtek esetén csak egy 20 kDa-os sáv jelent meg, amely megfelelhet a P2X₇ receptor monomer formájának (14. ábra) (Becker 2008). A P2Y₂ receptor fehérje szintje 8 órával az UV-B kezelés után nagyobb volt a sugárzást kapott sejtekben, viszont 12, 24 és 36 óra elteltével már kevesebb receptort lehetett a sugárzást kapott sejtekben kimutatni.



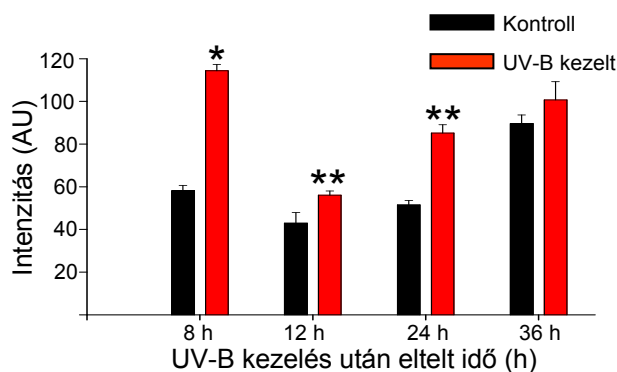
14. ábra: Western-blot kísérletek: A HaCaT keratinocitákra jellemző négy purinoreceptor P2X₁, P2X₃, P2X₇ és P2Y₂ fehérje szintű kimutatása Western-blot segítségével, 8, 12, 24 és 36 órával az UV-B kezelés után.

A fentebb említett Western-blotok denzitometriás analízisét is elvégeztük. A P2X₁ receptor szintje 12 és 36 órával a sugárzás után a besugárzott sejtekben szignifikánsan csökkent (15. ábra).



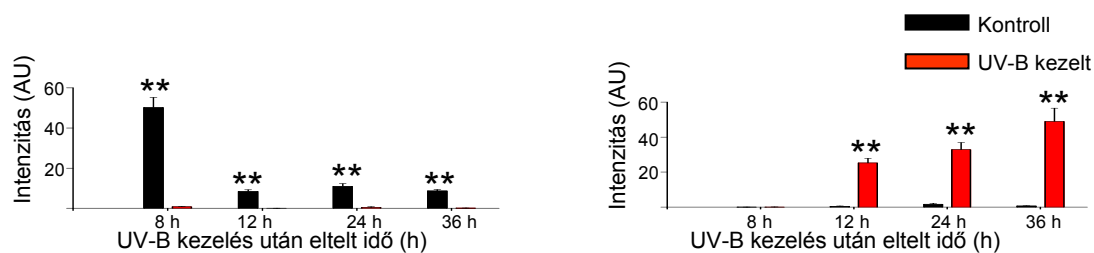
15. ábra: A P2X₁ receptor Western-blot denzitometriás analízise. A P2X₁ receptor expressziójának alakulása UV-B besugárzás hatására az idő függvényében. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

A P2X₃ receptor szintje UV-B vel besugárzott sejtekben szignifikánsan magasabbnak bizonyult 8, 12 és 24 órával a besugárzás után (16. ábra).



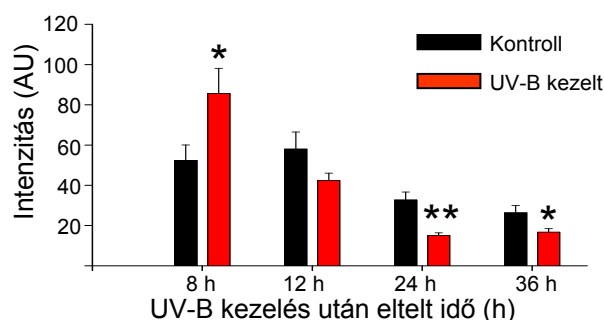
16. ábra: A P2X₃ receptor Western-blot denzitometriás analízise. A P2X₃ receptor expressziójának alakulása UV-B besugárzás hatására az idő függvényében. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

A P2X₇ receptor esetében a denzitometriás analízist külön elvégeztük a 80 és a 20 kDa-os sávokon. A besugárzott sejtekből a 80 kDa-os sáv gyakorlatilag hiányzott (17. ábra baloldali panel), azonban 12, 24 és 36 órával a besugárzás után a 20 kDa-osból szignifikánsan több volt bennük, a kontroll sejtekhez viszonyítva (17. ábra jobboldali panel).



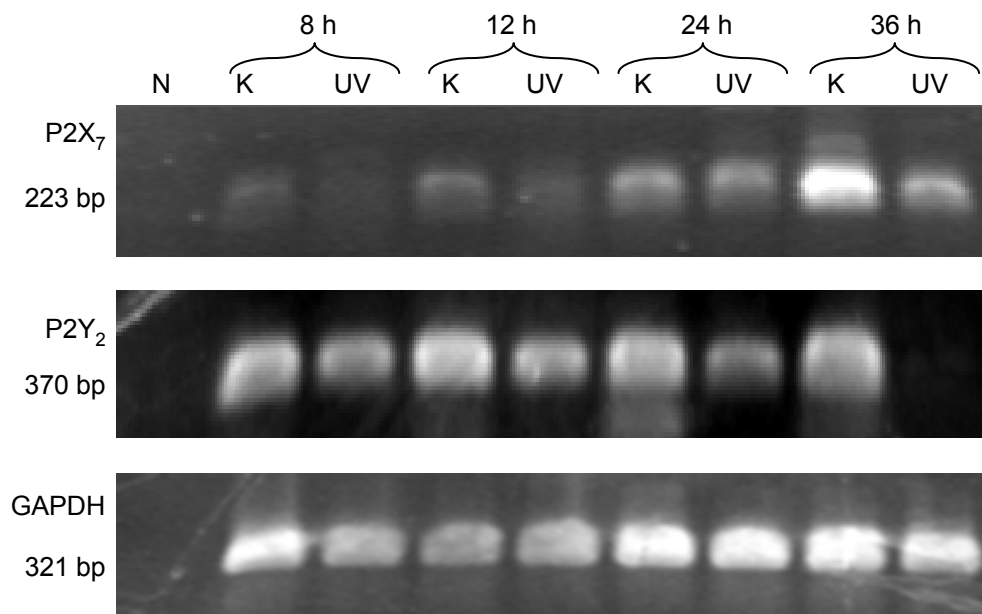
17. ábra: A P2X₇ receptor Western-blot denzitometriás analízise. A P2X₇ receptor expressziójának alakulása UV-B besugárzás hatására az idő függvényében. A P2X₇ receptor esetén a 80 kDa-os és a 20 kDa-os sávokat külön grafikonon ábrázoltuk (baloldali panel 80 kDa, jobboldali 20 kDa) (* p<0,05; ** p<0,01).

A P2Y₂ receptort vizsgálva azt találtuk, hogy 8 órával a besugárzás után az UV-B sugárzásnak kitett sejtekben szignifikánsan magasabb volt a szintje. Ez a változás azonban 12 óra elteltével már nem volt megfigyelhető, és 24, illetve 36 óra múlva már szignifikánsan kevesebb fehérjét tudtunk a besugarazott sejtekben kimutatni (18. ábra).



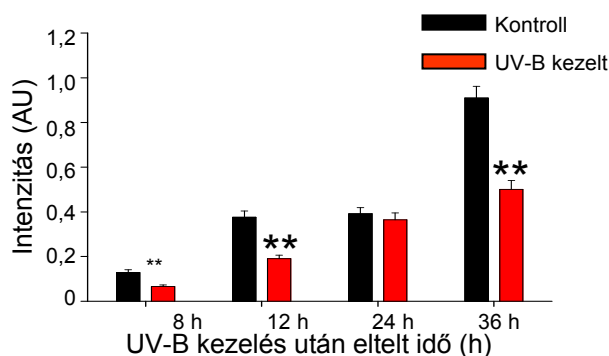
18. ábra: A P2Y₂ receptor Western-blot denzitometriás analízise A P2Y₂ receptor expressziójának alakulása UV-B besugárzás hatására az idő függvényében (* p<0,05; ** p<0,01).

A receptorok mRNS szintjeit RT-PCR segítségével ellenőriztük (19. ábra). P2X₇ receptor mRNS-éből - a 24 órás időponttól eltekintve, ahol nagyjából megegyezett a szintje a kontroll és a besugarazott sejtekben - a besugárzott sejtekben kevesebb volt. UV-B kezelés után a P2Y₂ receptor mRNS szintje 8 órával a besugárzás után nem változott, 12 és 24 óra elteltével csökkent, majd 36 óra után gyakorlatilag eltűnt a sejtekből.



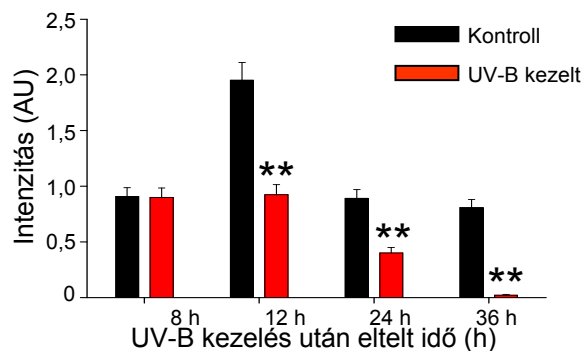
19. ábra: Purinoreceptorok mRNS-ének kimutatása RT-PCR segítségével. A P2X₇ és a P2Y₂ receptorok mRNS szintjeinek vizsgálata kontroll és UV-B sugárzásnak kitett sejtekben. A GAPDH mRNS-ét belső kontrollként használtuk, és a denzitometriás analízisnél az értékeket a GAPDH-ra normalizáltuk.

A denzitometriás analízis elvégzéséhez a belső kontrollként használt GAPDH-ra normalizáltuk a kapott értékeket. A P2X₇ receptor mRNS szintje a kontrollhoz viszonyítva 8, 12 és 36 óra elteltével szignifikánsan csökkent a sugárzásnak kitett sejtekben (20. ábra).



20. ábra: A P2X₇ receptor PCR denzitometriás analízise A P2X₇ receptor mRNS szintjének alakulása UV-B besugárzás hatására az idő függvényében (* p<0,05; ** p<0,01).

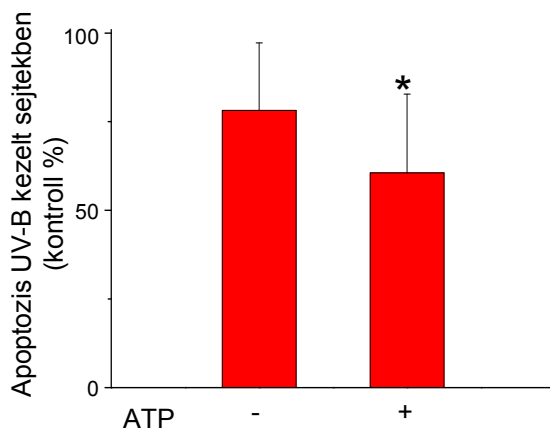
A P2Y₂ receptor mRNS szintje szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyult a besugarazott sejtekben 12, 24 és 36 órával a besugarazás után (21. ábra).



21. ábra: A P2Y₂ receptor PCR denzitometriás analízise. A P2Y₂ receptor mRNA szintjének alakulása UV-B besugárzás hatására az idő függvényében (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

UV-B sugárzás hatására bekövetkező apoptózis vizsgálata

Következő lépésként fluoreszcens technika segítségével vizsgáltuk az apoptosis mértékét mind kontroll, mind UV-B sugárzásnak kitett sejtekben. Bár a kísérletek kezdetén ugyanannyi sejtől indultunk ki, az idő előrehaladtával a sejtszám változott, ahogyan az az 1. ábrán bemutatásra került. Kiküszöbölendő az ebből adódó eltéréseket, az apoptosis vizsgálatokor kapott értékeket mindig az aktuális sejtszámmra normalizáltuk. Az így kapott eredményeket a besugárzást nem kapott sejtek értékeire normalizáltuk (22. ábra).



22. ábra: Apoptosis assay. ATP nélkül kialakuló illetve ATP-vel indukált apoptosis mértékének összehasonlítása UV-B-vel kezelt sejtekben, a kezeletlen kontrollra normálva (* $p < 0,05$).

Az ATP nélkül kialakuló apoptosis mértéke a kontroll sejtekhez viszonyítva alacsonyabb volt ugyan a besugárzott sejtek esetében ($78 \pm 19\%$, $n=8$), azonban ez a különbség nem volt szignifikáns ($p > 0,2$). Az ATP-vel indukált apoptosis mértéke azonban már szignifikánsan kisebbnek bizonyult az UV-B-vel kezelt sejtek esetén, összehasonlítva a besugárzást nem kapott sejtekével ($61 \pm 22\%$, $n=8$; $p < 0,02$). Ez a megfigyelés összhangban

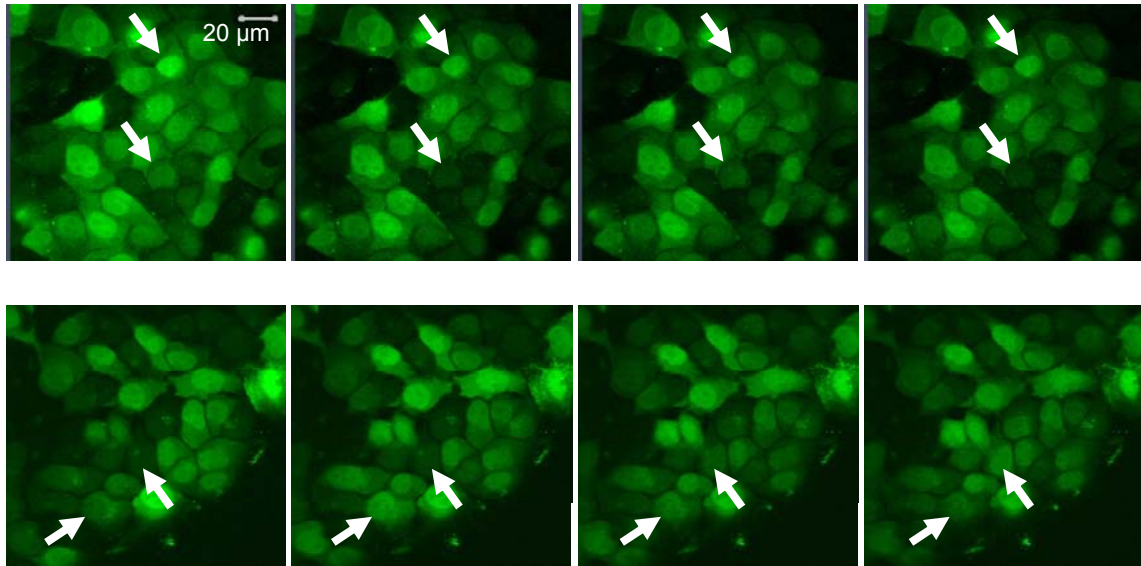
lehet azzal a megfigyelésünkkel, hogy UV-B sugárzás hatására a működőképes P2X₇ receptorok eltűnnek a sejtekből.

HaCaT keratinociták spontán kalcium oszcillációinak jellemzése

További kísérleteink során HaCaT keratinocitákon spontán kalciumtranzienseket figyeltünk meg. A sebgyógyulással kapcsolatban a kalciumoszcillációk változásait fizikai károsítás (karcolás) közvetlen szomszédságában elhelyezkedő sejteken vizsgáltuk. Kísérleteinkben vizsgáltuk továbbá két különböző foszfátáz inhibitor (CLA és OA) hatását a sebgyógyulásra és a sejt kultúrák kalcium homeosztázisára.

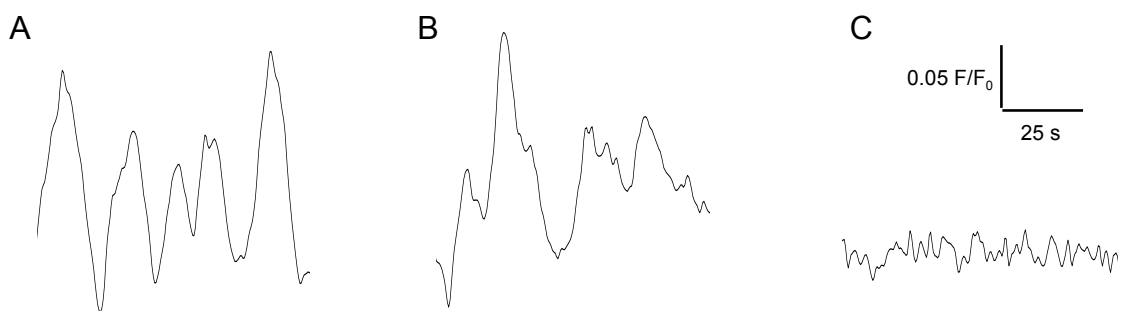
Konfluens kontroll, illetve foszfátázgátlóval kezelt, Fluo-4-gyel feltöltött tenyészetekről x-y felvételeket készítettünk, majd a tenyészeteket pipettahegy segítségével megkarcoltuk, és a karcolás mellett elhelyezkedő sejtekről szintén elkészítettük az x-y felvételeket. Minden egyes tenyészet esetén karcolás előtt és után is 500 képet vettünk fel 500 ms időközönként, 3-6 különböző látótérrel. A felvételeken ezután minden egyes sejten ROI-t jelöltünk ki, majd az oszcillációt mutató sejteket és az oszcillációk jellemzőit egy az intézetben megírt program segítségével határoztuk meg.

Konfluens HaCaT keratinocita tenyészetekben a sejteken lassú ismétlődő spontán $[Ca^{2+}]_i$ tranzienseket figyeltünk meg konfokális lézerpásztázó mikroszkóp segítségével (23. ábra). Az ábrán az egy rétegben növe HaCaT keratinocitákon karcolás előtti, illetve utáni felvételeket mutatunk be. Nyilakkal jeleztük a különböző időpillanatokban $[Ca^{2+}]_i$ változást (kalciumoszcillációt) mutató sejteket. Azonban nem csak a nyíllal megjelölt sejteken, hanem más sejteken is jól megfigyelhetők a fluoreszcencia intenzitásában bekövetkezett változások.



23. ábra: Spontán kialakuló kalcium oszcillációk keratinocita tenyészetek sejtjeiben. Konfokális mikroszkóppal készült reprezentatív x-y felvételek karcolás nélküli és karcolt HaCaT keratinocita tenyészetekről. A nyilak egy-egy oszcilláló sejtet jeleznek. Az eredeti nagyítás: 40x.

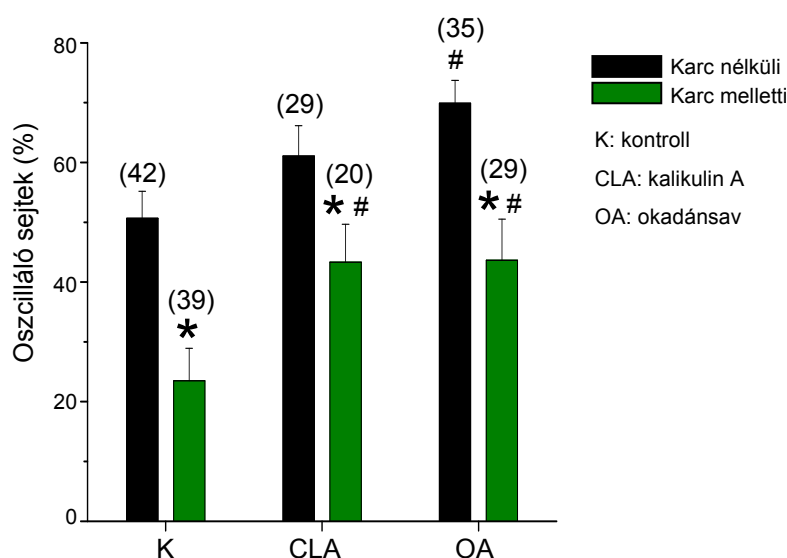
Az ábrán az idő függvényében mutatjuk be egy-egy reprezentatív sejt fluoreszcencia intenzitás változásait karcolás nélküli (24. ábra A panel) és karc melletti (24. ábra B panel) sejtek esetében. Az oszcillatorikus változások az $[Ca^{2+}]_i$ -ban lassú hullámok formájában figyelhetők meg. CLA és OA alkalmazása során hasonló görbéket kaptunk. Összehasonlításképpen az ábra egy oszcillációt nem mutató sejt fluoreszcencia intenzitás változását mutatja szintén az idő függvényében (24. ábra C panel). Az ábrákon bemutatott fluoreszcencia értékek minden esetben a nyugalmi fluoreszcenciára (F_0) normalizált értékek.



24. ábra: HaCaT keratinociták spontán kalcium oszcillációi. Egyedi sejtekről készült fluoreszcencia intenzitás változást bemutató görbék spontán oszcillációt mutató, karcolás nélküli (A panel) és karcolt tenyészetek sejtjeiből (B panel). A C panelen egy spontán oszcillációt nem mutató sejt fluoreszcencia intenzitás változását bemutató görbe látható.

Az oszcillációt mutató sejtek aránya

Kontroll, karc melletti sejtek esetén ($23,5 \pm 5,4\%$, $n=39$, n = a vizsgált látóterek számával) az oszcillációt mutató sejtek százalékos aránya szignifikánsan csökkent ($p < 0,05$) karcolatlan tenyészetek sejtjeihez képest ($50,7 \pm 4,5\%$, $n=42$). CLA-val (karcmentes: $61,1 \pm 5,1\%$, $n=29$, karc melletti: $43,3 \pm 6,4\%$, $n=20$) és OA-val (karcmentes: $69,9 \pm 3,8\%$, $n=35$, karc melletti: $43,7 \pm 6,9\%$, $n=29$) kezelt tenyészetek sejtjei esetén ez a szignifikáns eltérés szintén megfigyelhető volt. Tehát a karcolás mellett elhelyezkedő sejtek kevésbé mutatták a kalcium oszcillációkat, függetlenül attól, hogy voltak-e foszfatázgátlóval kezelve vagy sem (25. ábra).

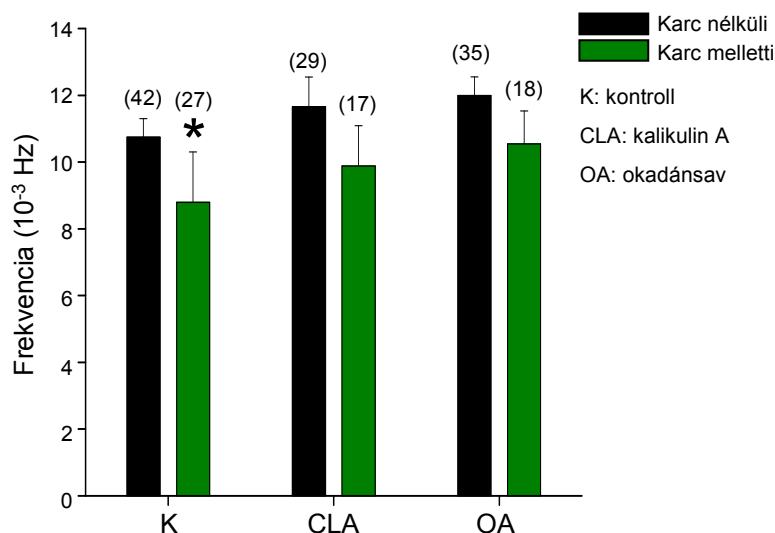


25. ábra: Foszfatázgátlók hatása a HaCaT keratinociták spontán kalcium oszcillációira. Az oszcillációt mutató sejtek százalékos aránya kontroll illetve CLA-val és OA-val kezelt tenyészetek sejtjeiben. A zárójelben lévő számok a vizsgált látóterek számát mutatják. * $p < 0,05$, karc nélküli vs karcolt, # $p < 0,05$, kontroll vs foszfatáz inhibitorral kezelt.

Az oszcilláló sejtek aránya foszfatázgátlóval kezelt tenyészetek sejtjei esetén szignifikánsan magasabb, mind karcolás előtt, mind karcolás után vizsgálva a sejteket. A karcolás nélküli CLA-val kezelt sejtjei esetén a tendencia hasonló, azonban ebben az esetben nem volt szignifikáns a különbség. E megfigyelésekből arra következtethetünk, hogy bár sem a CLA sem az OA nem befolyásolja a karcolás hatását, mindkettő beavatkozik a spontán kialakuló $[Ca^{2+}]_i$ változásokért felelős alapmechanizmusokba.

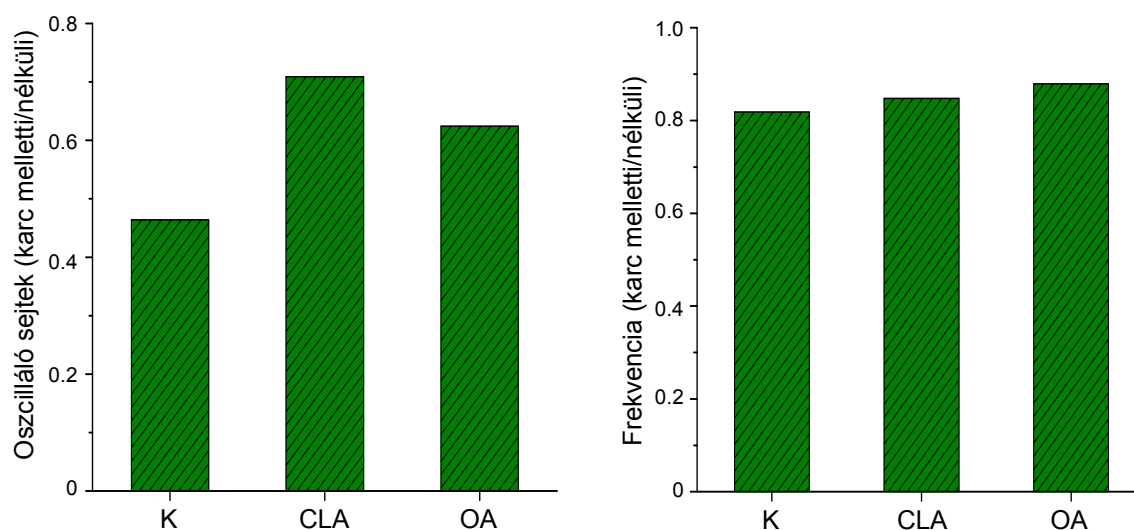
Kontroll, karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben a kalcium oszcillációk frekvenciája is szignifikánsan alacsonyabb ($8,8 \pm 1,5 \times 10^{-3}$ Hz, $n=27$) mint a karcolás nélküli kontroll

sejtekben ($10,7 \pm 0,6 \times 10^{-3}$ Hz, $n=42$) ($p < 0,05$). A foszfatáz inhibitorok jelenléte nem befolyásolja szignifikánsan a kialakuló oszcillációk frekvenciáját, ahogy azt a karcolás előtti és utáni mérések mutatják ($11,7 \pm 0,9 \times 10^{-3}$ Hz, $n=29$ karcolás nélkül, és $9,9 \pm 1,2 \times 10^{-3}$ Hz, $n=17$ karc mellett, CLA kezelés esetén; illetve $12,0 \pm 0,6 \times 10^{-3}$ Hz, $n=35$ karcolás nélkül, és $10,5 \pm 1,0 \times 10^{-3}$ Hz, $n=18$ karc mellett, OA kezelés mellett). Mindazonáltal hasonló tendencia volt megfigyelhető kezeletlen kontroll, és CLA-val valamint OA-val kezelt sejtek esetén, vagyis a kalcium tranziensek frekvenciája alacsonyabb volt a karcolás mellett elhelyezkedő sejtek esetén, a karc nélküli sejteken mért adatokkal összehasonlítva. Továbbá a foszfatázgátlók jelenlétében tendenciózusan magasabb volt az oszcillációk frekvenciája, bár ezek az eltérések nem bizonyultak szignifikánsnak (26. ábra)



26. ábra: Foszfatázgátlók hatása a HaCaT keratinociták spontán kalcium oszcillációira. A spontán kalcium oszcillációk frekvenciája kontroll illetve CLA-val és OA-val kezelt tenyészetek sejtjeiben. A zárójelben lévő számok a vizsgált látóterek számát mutatják. * $p < 0,05$, karc nélküli vs karcolt.

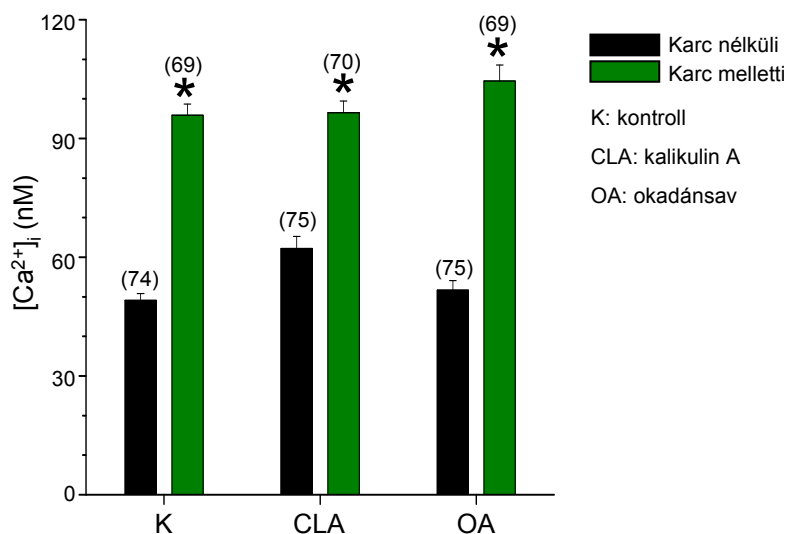
A jobb összehasonlíthatóság kedvéért ábrázoltuk az oszcillációt mutató sejtek százalékos arányát és az oszcillációk frekvenciáját úgy is, hogy a karcmentes területekről származó sejtek értékeire normalizáltuk (27. ábra). A kalcium oszcillációkat mutató, karc mellett elhelyezkedő sejtek aránya foszfatázgátlók jelenlétében magasabb volt, mint foszfatázgátlóval nem kezelt sejtekben.



27. ábra: Foszfatazsgátlók hatása a HaCaT keratinociták spontán kalcium oszcillációira. Az oszcillációt mutató sejtek százalékos aránya kontroll illetve CLA-val és OA-val kezelt tenyészetek sejtjeiben. A baloldali panelen az oszcillációt mutató sejtek aránya, a jobboldali panelen az oszcillációk frekvenciája látható.

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

A keratinociták nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jét Fura-2-vel feltöltött kontroll és foszfatazsgátlóval kezelt sejteken határoztuk meg (49 ± 2 nM, $n=74$ a karc nélküli kontroll sejtekben, 62 ± 3 nM, $n=75$ a karc nélküli CLA-val kezelt, és 52 ± 2 nM, $n=75$ a szintén karc nélküli OA-val kezelt sejtek esetén). Karcolás után a karc mellett helyet foglaló sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -ja szignifikánsan magasabb volt mindhárom vizsgált esetben, összehasonlítva a karc nélküli kultúrák sejtjeivel (96 ± 3 nM, $n=69$ a karcolt kontroll, 97 ± 3 nM, $n=70$ a karcolt CLA-val kezelt, és 104 ± 4 nM, $n=69$ a szintén karcolt, OA-val kezelt sejtekben) (28. ábra). Tehát a karcolás - függetlenül attól, hogy a sejtek foszfatazsgátlókkal voltak-e kezelve vagy sem - megemelte a karc melletti sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jét.

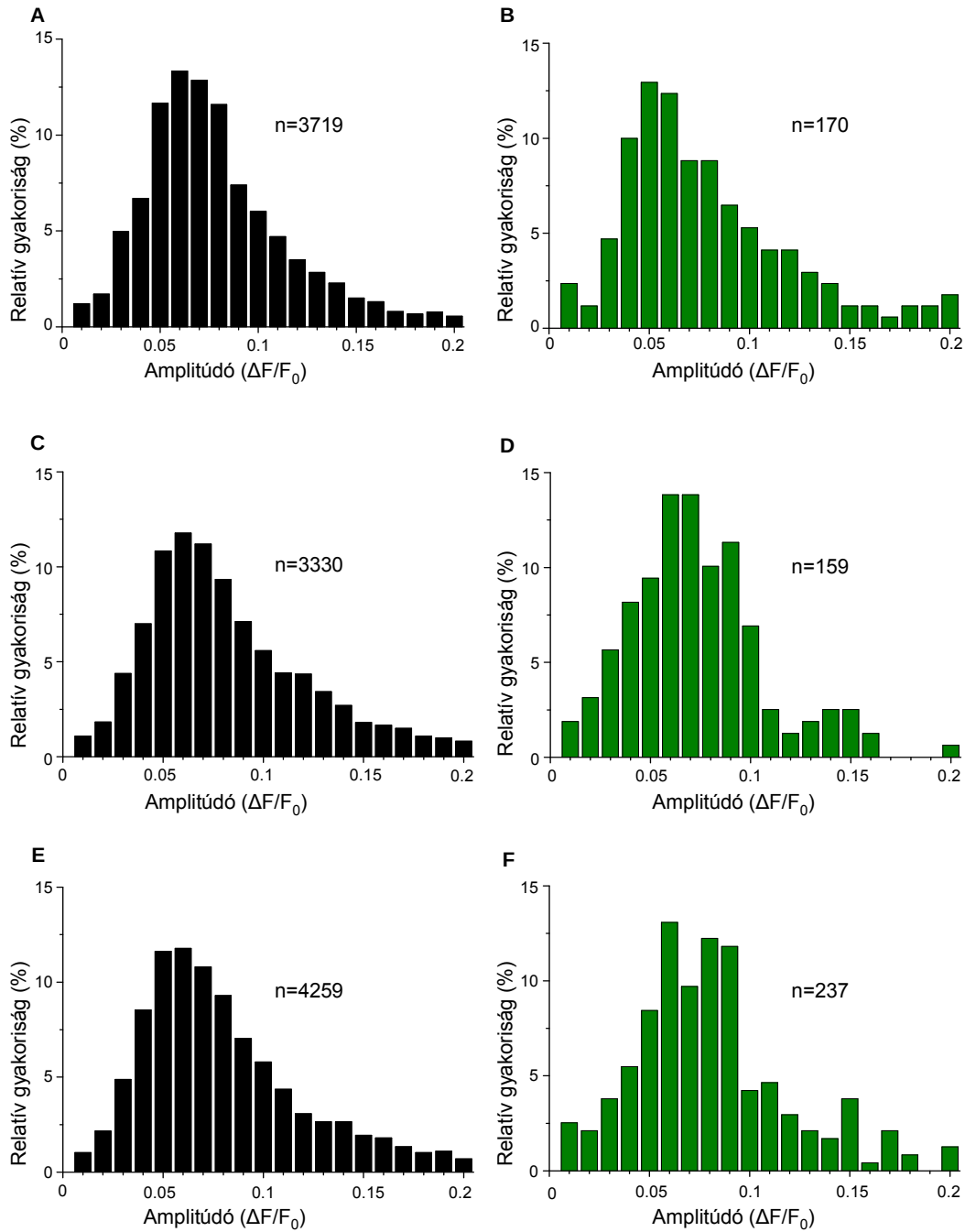


28. ábra: Foszfatazsgátlók és karcolás hatása a HaCaT keratinociták nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jára. A karcolás szignifikánsan növelte a sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jét. A zárójelben lévő számok a vizsgált sejtek számát mutatják. * $p < 0,05$, karc nélküli vs karcolt.

A kalciumtranziensek jellemzése

A spontán kialakuló, egyedi kalciumtranziensek jellemzésére a tranziensek két jellemző tulajdonságát, az amplitúdót és a félpértékszélességet (*Full Time at Half Maximum*, *FTHM*) vizsgáltuk. Az amplitúdót a fluoreszcencia intenzitás változásából ($\Delta F/F_0$) – amely az $[Ca^{2+}]_i$ változásával mutat összefüggést – számoltuk ki, míg az FTHM meghatározásakor az egyedi kalciumtranziensek amplitúdóinak felénél mértük meg a tranziens időtartamát.

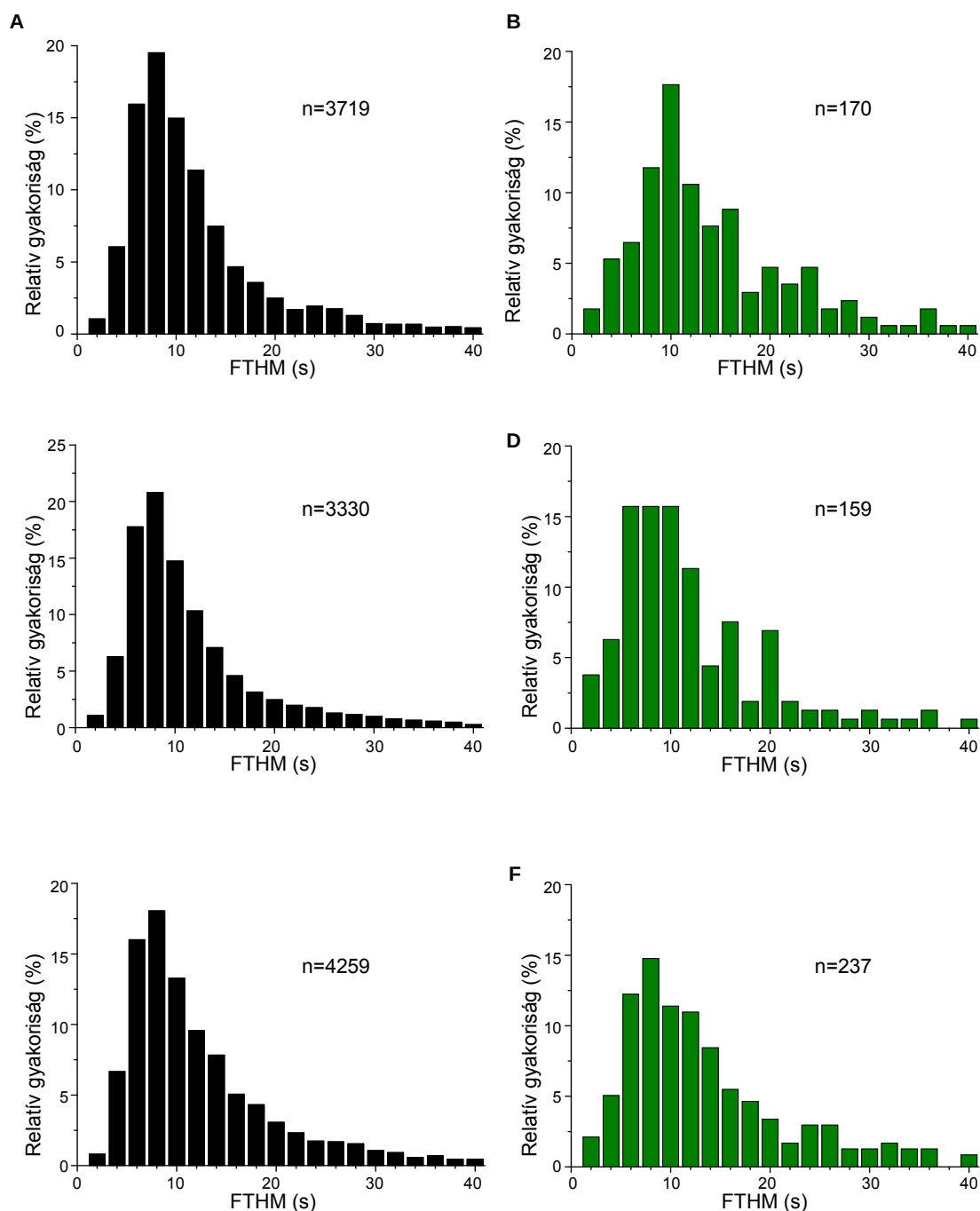
Karcolás nélküli kultúrákban a kalciumtranziensek amplitúdója foszfatazsgátlók jelenlétében szignifikánsan magasabb, mint a kontroll tenyészetek sejtjeiben (kontroll: $0,082 \pm 0,001$, CLA: $0,096 \pm 0,002$, OA: $0,089 \pm 0,001$). A karc melletti sejtek adatainak elemzése esetén hasonló eltérést nem figyeltünk meg (kontroll: $0,093 \pm 0,008$, CLA: $0,079 \pm 0,006$, OA: $0,090 \pm 0,004$). A karcolás a CLA-val kezelt sejtekben csökkentette a tranziensek amplitúdóit. Kontroll és OA-val kezelt sejtek esetén a karcolás nem volt hatással a kalciumtranziensek amplitúdójára (29. ábra).



29. ábra: A spontán kalcium oszcillációk amplitúdói. Az amplitúdók eloszlását mutató hisztogramok kontroll (A, B), CLA-val (C, D), és OA-val (E, F) kezelt tenyészetek sejtjei esetén. A fekete oszlopok a karcolás nélküli sejtek, míg a zöldek a karcolt tenyészetekről származó sejtek oszcillációinak amplitúdóit mutatják. Az “n” értékek a vizsgált Ca^{2+} -tranziensek számát jelzik.

Kontroll és OA-val kezelt karcmentes sejtek tranzienseinek FTHM értékei szignifikánsan nagyobbak voltak, mint a karcmentes területekről származók (karcmentes kontroll: $12,6 \pm 0,2$ s, OA: $13,4 \pm 0,2$ s; karcmentes kontroll: $15,4 \pm 0,9$ s, OA: $16,2 \pm 1,1$ s). Ez a különbség CLA-val kezelt sejtek esetén nem volt statisztikailag szignifikáns (nem karcmentes).

11,8±0,2 s, karcolt: 11,5±0,6 s). Karcolás nélküli tenyészetek sejtjeiben a CLA kezelés csökkentette, míg az OA-val történő kezelés növelte az FTHM értékeket. A karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben a CLA-val történő kezelés szignifikánsan csökkentette, míg az OA-val történő kezelés a kontrollhoz viszonyítva nem változtatta meg az FTHM értékeket (30. ábra).



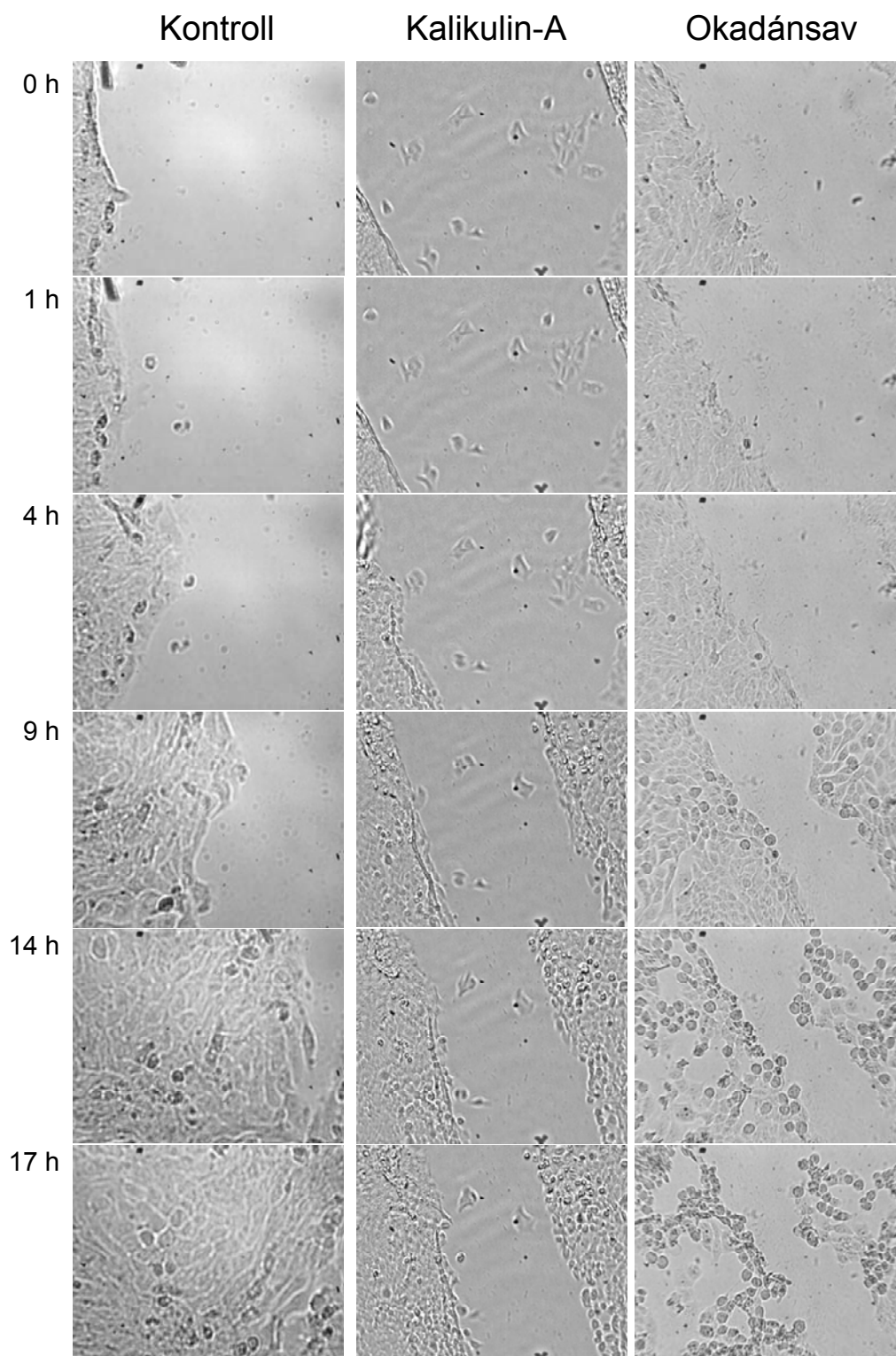
30. ábra: A spontán kalcium oszcillációk FTHM értékei. Az FTHM értékek eloszlását mutató hisztogramok kontroll (A, B), CLA-val (C, D), és OA-val (E, F) kezelt tenyészetek sejtjei esetén. A fekete oszlopok a karcolás

nélküli sejtek, míg a zöldek a karcolt tenyészetekről származó sejtek oszcillációinak FTHM értékeit mutatják. Az “n” értékek a vizsgált Ca^{2+} -tranziensek számát jelzik.

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

Time-lapse kísérletek a foszfátázgátlók hatásának kimutatására

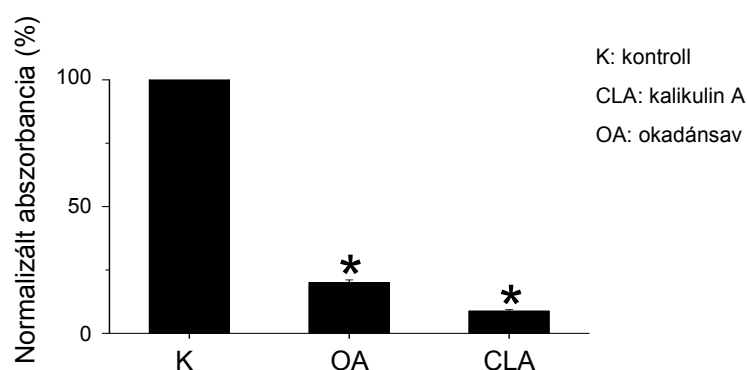
A keratinociták migrációjának bemutatására time-lapse kísérleteket végeztünk, megvizsgálva a migrációt kontroll körülmények között, valamint foszfátázgátlók hatására (31. ábra). A kontroll sejtek azonnal elkezdtek benőni a karcolt területet, és a kísérlet 17. órájára teljesen ki is töltötték azt. Ezzel szemben a CLA-val és OA-val kezelt sejtek hasonló időtartam alatt nem voltak képesek kitölteni a karcolt területet, sőt, mi több, az OA-val kezelt sejtek a kísérlet végére elvesztették a nyúlványaikat, illetve a szomszédos sejtekkel való kapcsolatukat. Hasonló elváltozásokat CLA kezelés hatására nem figyeltünk meg.



31. ábra: Time-lapse felvételek a foszfatazsgátlók keratinocita migrációra kifejtett hatásának bemutatására. A kontroll tenyészetek sejtjeivel ellentétben a foszfatazsgátlóval kezelt tenyészetek sejtjeiben a keratinociták a kísérlet időtartama alatt nem tudták befedni a karcolt területet.

Boyden kamrában végzett kísérletek a keratinociták migrációjának vizsgálatára

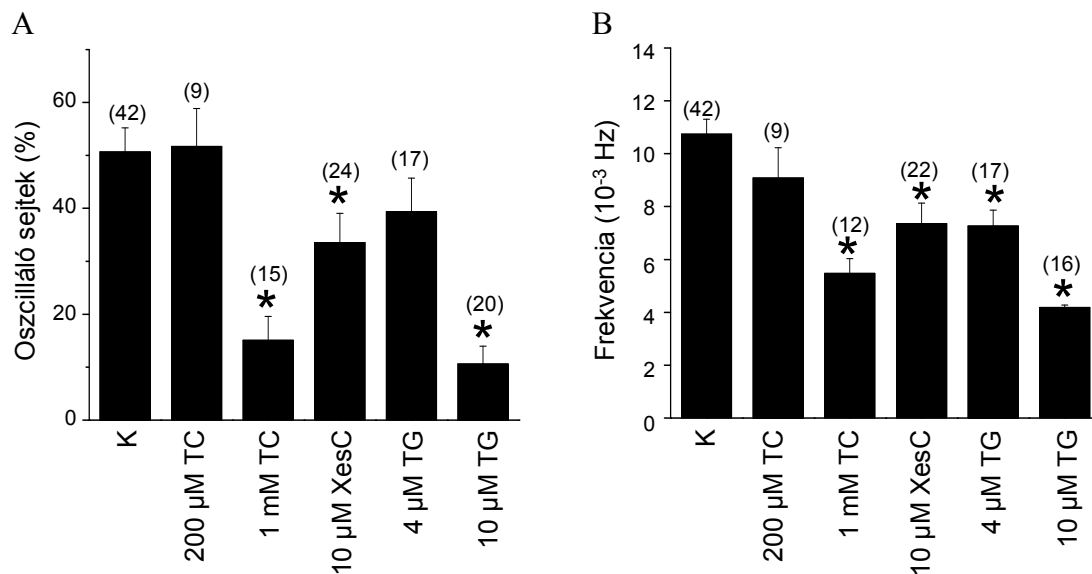
A sejtek migrációjának kvantitatív elemzésére a sejteket alacsony szérumkoncentrációjú tápoldatban tartottuk 18 órán keresztül, CLA vagy OA jelenlétében, illetve hiányában, Boyden kamrában. A porózus membránon keresztüli, a membrán másik oldalára történő migráció mértékét a lizált, festett sejtek optikai denzitásának alapján határoztuk meg. 50 nM koncentrációban történő OA kezelés nagyjából 80%-kal csökkentette a kemoattraktánsok által kiváltott migráció mértékét. Ehhez hasonlóan a 10 nM CLA kezelésnek szintén erőteljes gátló hatása volt a sejtek vándorlására, körülbelül 90%-kal csökkentve a sejtek vándorlását (32. ábra).



32. ábra: A foszfátázgátlók keratinocita migrációra kifejtett hatásának vizsgálata Boyden kamrában. A foszfátáz inhibitorokkal történő kezelés szignifikánsan csökkentette a HaCaT keratinociták migrációját. A kapott adatokat a foszfátázgátlóval nem kezelt kontroll sejtek adataira normalizáltuk. * $p < 0,05$

A Ca^{2+} -oszcillációk kialakulásáért felelős mechanizmus

A Ca^{2+} -oszcillációkért felelős mechanizmus pontosítása érdekében nagy koncentrációjú tetrakainnal (1 mM), illetve kis koncentrációjú Xestospongin C-vel (10 μM) gátoltuk az IP_3R működését, kis koncentrációjú tetrakainnal (200 μM) a RyR-t és thapsigarginnal (4 és 10 μM) a SERCA-t. Az oszcillációt mutató sejtek százalékos arányát és az oszcillációk frekvenciájának alakulását a különböző anyagok hatására oszlopdiagramon ábráztuk (33. ábra).



33. ábra: Az oszcillációt mutató sejtek százalékos aránya (A) és az oszcillációk frekvenciája (B) kontroll és 200 μM vagy 1 mM tetrakain (TC), 10 μM Xestospongin C (XesC), és 4 vagy 10 μM thapsigargin (TG) jelenlétében. Az 1 mM TC-nal, 10 μM XesC-vel és 10 μM TG-nal történő kezelés szignifikánsan csökkentette a spontán oszcillációt mutató sejtek arányát, míg az 1 mM TC-nal, 10 μM XesC-vel, a 4 és 10 μM TG-nal történő kezelés szignifikánsan csökkentette az oszcillációk frekvenciáját. * $p < 0,05$ a kontrollhoz képest. A zárójelben lévő számok a vizsgált látóterek számát mutatják.

200 μM tetrakain – amely csak a RyR-ra van gátló hatással – nem változtatta meg sem az oszcillációt mutató sejtek százalékos arányát, sem az oszcillációk frekvenciáját. Másrésről viszont az IP₃R gátlószer Xestospongin C, és az IP₃R-t és a RyR-t egyaránt gátló 1 mM koncentrációjú tetrakain szignifikánsan csökkentette mind az oszcillációt mutató sejtek arányát, mind az oszcillációk frekvenciáját. 10 μM thapsigargin - ami a SERCA gátlásán keresztül az ER Ca²⁺-raktárának kiürülését váltja ki- szintén szignifikánsan csökkentette az oszcillációt mutató sejtek arányát, és az oszcillációk frekvenciáját is.

Megbeszélés

Kísérleteinkben megvizsgáltuk, hogyan reagálnak a keratinociták az UV-B sugárzásra, ezen belül is, hogy miként változik UV-B sugárzás hatására a purinerg receptorok expressziós mintázata, illetve, hogy ez hogyan befolyásolja a keratinociták kalcium homeosztázisát. A III. bőrtípusba tartozó emberek (ritkán égnek le, inkább lebarnulnak) bőre 30-50 mJ/cm² UV-B sugárzás hatására pirosodik ki (Duarte et al, 2006). Kísérleteinkhez 1 perces, 40 mJ/cm² UVB besugárzást alkalmaztunk, és Western-blot segítségével ellenőriztük a receptorok fehérje szintű, RT-PCR-ral pedig a receptorok mRNS szintű kifejeződését a besugárzástól eltelt idő függvényében, illetve vizsgáltuk a keratinociták ATP adagolás hatására történő intracelluláris kalciumkoncentráció emelkedésének változásait is. Azért alkalmaztuk egy percre az UV-B sugárzást, mert az egy percnél hosszabb időtartamú besugárzások praktikusán a sejtek pusztulását okozták, illetve korábbi kísérleteinkben is hasonló időtartamú és intenzitású besugárzást használtunk, így ezek az eredmények közvetlenül összehasonlíthatóak a munkacsoportunk által előzőleg publikált eredményekkel (Balogh 2008). Fontos kiemelni, hogy még ez a kis energiájú sugárzás is jelentősen csökkentette a sejtek életképességét.

A programozott sejthalál eseményei közül az első lépések egyike az intracelluláris kalcium koncentráció megemelkedése a sejtekben. Előző tanulmányok kapcsolatot mutattak ki a purinoreceptorok, ezeken belül is a P2X₇ receptor (Becker, 2008; Tran 2010) aktivációja és az apoptotikus sejthalál beindulása között. *In vivo* ezeknek a purinoreceptoroknak az aktivációjához szükséges ATP származhat más, halott sejtekből, vagy fiziológiásan felszabadulhat idegsejtekből (Sperlágh 1995), uroepitél sejtekből (Ferguson 1999) illetve endotélsejtekből (Bodin 1998). Az A431 humán laphám eredetű carcinoma sejtvonalon a mikromólos koncentrációban alkalmazott ATP mitogén (Huang 1989) és emeli a sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációját (Gonzalez 1988). Az ATP az MCF-7 emlőrák eredetű sejtvonalban (Dixon 1997) és a humán petefészek eredetű tumorsejtekben szintén fokozza a sejtek proliferációját (Popper 1993). Magas koncentrációban alkalmazott ATP (1-5 mM), illetve BzATP (a P2X₇ receptor specifikus agonistája, 30μM) szignifikánsan csökkentette az A431 sejtek számát (Greig 2003). Kísérleteinkben kimutattuk, hogy UV-B besugárzás után a P2X₇ receptor nem mutatható ki a keratinocitákban, illetve az mRNS-ének szintje is csökken. Ez magyarázhatja, hogy a besugárzás miatt károsodott, de azt túlélő sejt képessége az apoptózis beindítására csökken. Ez a változás elősegítheti a malignus átalakulás kialakulását azáltal, hogy a károsodott DNS-sel rendelkező sejtek kevésbé eliminálódnak.

Más P2X és P2Y receptorok szintén fontos szabályozói a sejtek proliferációjának és differenciálódásának. A metabotróp P2Y₁ és P2Y₂ receptorok a keratinociták proliferációját szabályozzák (Greig 2003). A keratinociták malignus átalakulása esetén a purinoreceptor mintázat megváltozhat. Kísérleteink során azt találtuk, hogy az 1 perc időtartamú 40 mJ/cm²-es UV-B besugárzás csökkentette a P2X₁ és P2Y₂ receptorok szintjét, és alapvetően károsította a P2X₇ receptorokat. A P2Y₂ receptorok a normál humán keratinocitákban és a HaCaT sejtekben összefüggésbe hozhatók a proliferáció elindításával (Burrell 2003). Kísérletinkben bemutattuk, hogy UV-B besugárzás hatására az élő sejtek száma csökkent, ami összefügghet a P2Y₂ receptor szintjének csökkenésével. Kimutattuk, hogy a P2Y₂ receptor mRNS-e az UV-B-vel kezelt sejtekben kevesebb volt, és 36 ill. 48 órával a besugárzás után vizsgálva a sejteket, a receptor mRNS-e már nem volt kimutatható. Bár 8 órával a besugárzás után a P2Y₂ receptor fehérje szintje a besugárzott sejtekben magasabb volt, minden más vizsgált időpontban a mennyisége a kontrollhoz viszonyítva kevesebb volt. Ezen receptorok elvesztése együtt járhat a sejtek proliferáció vagy differenciálódás feletti kontrolljának elvesztésével, ami a sejtek malignus transzformációjához vezethet.

A purinerg receptor mintázat megváltozásával együtt megváltozott a keratinocitákban az ATP adagolással kiváltott kalciumtranziensek morfológiája is. UV-B sugárzásnak kitett sejtekben a kalcium tranziensek amplitúdója és felszálló szárak meredeksége is kisebb volt, mint a kontroll sejtekben, ami összefüggésben állhat a kezelt sejtek megváltozott purinoreceptor expressziójával. A felszálló szár meredekségének csökkenése összefügghet azzal, hogy a nagyrészt ionotróp (P2X) válasz az UV-B sugárzást kapott sejtekben részben metabotróppá (P2Y) válik. Besugárzott sejtekben a kalciumtranziensek után a nyugalmi kalcium szintre való visszatérés is több időt vesz igénybe, mint kontroll sejtekben. Ez összefügghet azzal, hogy az UV sugárzás hatására egyéb fehérjék, mint pl. a kalcium pumpa, is degradálódhatnak. A nyugalmi [Ca²⁺]_i az UV-B sugárzással kezelt sejtekben alacsonyabb volt, mint az UV-B sugárzással nem kezelt kontroll sejtekben.

A keratinocita tenyészetek összefüggő sejtrétegének megkarcolása és az így keletkezett sebágyat a későbbiekben kitöltő, újonnan képződött sejtek vizsgálata a sebgyógyulás mechanizmusának, vagyis a seb záródásának és ezen keresztül a barrier funkció helyreállításának egy gyakran alkalmazott modellje a kutatásban. A protein kináz és foszfatáz enzimek az [Ca²⁺]_i változásaival együtt jelentős hatással vannak a sejtek vándorlásának szabályozására és a sebgyógyulásra. Az utóbbi különösen fontos a bőr esetében, amely a szervezet első védelmi vonalát adja. Számos kutatási eredmény ellenére még nincs egyetértés abban, hogy az [Ca²⁺]_i változásai és a foszfatázok aktivitása ugyanabban az irányban, vagy

éppen egymással ellentétesen hat (Chen et al, 2002; Jackson et al, 2011; Kaufmann et al, 2005; Lontay et al, 2005; Pullar et al, 2003; Ridley et al, 2003; Taboubi et al, 2010).

Jelen kísérleteinkben kimutattuk, hogy – összehasonlítva az érintetlen területekről származó sejtekkel – a karcolt területekről származó sejtekben a Ca^{2+} -oszcillációk frekvenciája szignifikánsan csökkent, illetve az oszcillációt mutató sejtek aránya is kisebb volt ezeken a területeken. Ezen oszcillációk jellegzetes paraméterei (amplitúdó, FTHM) azonban szignifikánsan nagyobbak voltak a karcolt területeken. E megfigyeléseink azt sejtetik, hogy – összehasonlítva a nem karcolt tenyészetek sejtjeivel – a karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben a Ca^{2+} felszabadulási folyamatok kevésbé gyakoriak, azonban ha kialakulnak, akkor hosszabb ideig tartanak, egy nagyobb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ változást eredményezve. Más sejtípusok, mint a Cajal (Bayguinov et al. 2010), és az extraoculáris izomsejtek (Feng et al. 2012) szintén mutatnak spontán kalciumszint emelkedéseket, amelyek hasonlóak az általunk HaCaT sejteken megfigyelt tranziensekhez, ideértve az amplitúdójukat és az időbeli kiterjedésüket is.

Másrésről, a fehérjék foszforilációs szintjének emelése a Ser/Thr specifikus protein foszfatázokkal (sejtpermeabilis CLA vagy OA) növelte a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t, valamint a kalciumoszcillációk frekvenciáját, mind a karcolt, mind az érintetlen tenyészetek sejtjeiben. A karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben azonban még így is kisebb volt az oszcillációk száma, mint a nem karcolt tenyészetek sejtjeiben. A foszfatázgátlók hatására történő $[\text{Ca}^{2+}]_i$ növekedés összhangban áll előző kutatások eredményeivel, amelyek szerint a foszfatázok gátlása emelheti az $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t és a kalcium belépését a sejtekbe, növelve a kalciumtranszportban résztvevő fehérjék (foszfolambán, rianodinreceptor, plazma membrán kalcium csatorna) foszforilációs szintjét (Berridge et al. 2003; Kawashima et al. 2009). Karcolás nélküli tenyészetek sejtjeiben a Ca^{2+} -tranziensek jellemző paraméterei (amplitúdó, FTHM) a CLA-val és OA-val történő kezelés után nagyobbak adódtak (kivéve a CLA hatását az FTHM-ra). E paraméterek jelentősen megváltoztak, ha megkarcoltuk a foszfatázgátlóval kezelt sejttenyészetet. Összehasonlítva a nem karcolt tenyészetek sejtjeiből származó eredményeket a karc mellett elhelyezkedő sejtek értékeivel, kizárhatjuk a foszfatázok és a karcollással kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változás közötti szinergista összefüggést. A karcollással kiváltott $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedés mértékét nem serkentette jelentősen sem a CLA sem az OA-val való kezelés. A vizsgált paraméterek kontroll tenyészetek sejtjeiben karcolás hatására megfigyelt változásai a foszfatáz inhibitorok alkalmazása után nem növekedtek, inkább vagy kisebbek lettek, vagy teljesen el is tűntek, annak ellenére, hogy a

foszfatázgátlóknak a nem karcolt tenyészetek sejtjeiben hasonló hatása volt a vizsgált paraméterekre, mint a karcolásnak.

A még mindig fennálló fő kérdés, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ változásai és bizonyos fehérjék foszforilációs állapota hogy működhet közre a sebgyógyulás folyamatában a sejtek proliferációjára és migrációjára hatva. A jelenleg meglévő irodalmi adatok ellentmondásosak. Egyik oldalról leírták, hogy az $[Ca^{2+}]_i$ hirtelen megnövekedése leállította a keratinociták irányított mozgását (Liu et al. 2009) valamint a miozin II megnövekedett foszforilációs szintje a megnövekedett stressz rost szintézissel együtt a hepatociták migrációjának csökkenését eredményezte (Lontay et al. 2005). Más kutatócsoportok kísérleteiben a protein-szerin/threonin kináz inhibitorok fokozták a lamellipodiumok kialakulását és kiterjedését, azt a folyamatot, amelyet a keratinociták migrációjához és a seb gyógyulásához vezető események kezdeti jelének tartanak (Koivisto et al. 2003). Továbbá, a PP2A 10 nM okadánsavval történő gátlása a migráció mértékének növekedését eredményezte (Pullar et al. 2003).

A sejtek mozgásához szükséges az aktin-citoszkeleton átrendeződése, amely magában foglalja az aktin-miozin stressz rostok kialakulását a 20 kDa-os miozin II könnyű lánc (MLC20) Ca^{2+} -függő foszforilációján és RhoA/Rho kináz által indukált miozin foszfatáz foszforiláción és inaktiváción keresztül (Somlyo, 2003). Kimutatták, hogy sebzést követően az MLC20 gyors foszforilációja megelőzi a sejtek polarizációjának megjelenését és a migrációt, amelyhez citoszolikus Ca^{2+} -beáramlás és a p38/MAPK aktivációja szükséges (Betapudi et al. 2010). Az MLC20 korai és gyors foszforilációja eredményezi a myosin IIA transzlokációját elsősorban a sejt felszínére, ahol ez az aktin-miozin kölcsönhatás a sebzett sejt membránjának helyreállításában is részt vesz. A RhoA/Rho kináz működése nélkülözhetetlennek bizonyult a keratinociták kontrakciójában és irányított vándorlásában (Jackson et al. 2011). Következésképpen azt várhatnánk, hogy a protein foszfatázok CLA-val vagy OA-val való gátlása kedvező hatással van a sejtek migrációjára az $[Ca^{2+}]_i$ növelésén keresztül, elindítva az MLC20 foszforilációját és a miozin foszfatáz szabályozó alegységének gátló foszforilációját (Lontay et al. 2005; Kiss et al. 2008). Jelen kísérleteinkben a CLA és az OA szemmel láthatóan megállította a keratinociták migrációját, mind a time-lapse, mind a Boyden kamrás kísérletekben. A miozin foszforilációja fontos szerepet játszik a sejtek összehúzóási és elernyedési folyamataiban, különös tekintettel a nyúlványok retractiójára, amelyhez az aktin-miozin komplex által kifejtett erő feltétlenül szükséges (Ridley et al. 2003). A sejtek migrációjához szükséges az ismételt összehúzóási-elernyedési folyamat, illetve ehhez kapcsolódva az MLC20 ciklikus foszforilációja és defoszforilációja. Eredményeink

megegerősítik azt a feltételezést, hogy a foszfatázgátlók fenntartják az MLC20 foszforilált állapotát, állandósítva így az aktin-miozin komplexet, amely végül a migráció csökkenéséhez vezet.

Figyelembe véve ezeket az eredményeket, a sebzés szélén elhelyezkedő sejtekben megfigyelt csökkent kalcium oszcillációs aktivitás segítheti a keratinocitákat abban, hogy a sebzés során a sejtek között kialakult résbe vándoroljanak. Másrészt a $[Ca^{2+}]_i$ csökkenése előnyös lehet a keratinociták proliferációja szempontjából, mivel ezt a folyamatot a sejtekbe történő megnövekedett Ca^{2+} -beáramlás gátolja (Tóth et al. 2011).

A RyR gátlószerekkel történő kezelése nem változtatta meg sem az oszcillációt mutató sejtek százalékos arányát, sem az oszcillációk frekvenciáját. Másrészt viszont az IP_3R gátlása szignifikánsan csökkentette mindkét vizsgált paramétert. Hasonló eredményeket kaptunk a SERCA gátlása során is. Ezen eredményeink azt sugallják, hogy az IP_3R által közvetített Ca^{2+} -felszabadulás fontos szerepet játszik a HaCaT keratinociták spontán kialakuló kalcium oszcillációjában.

Összefoglalás

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

A purinerg receptor mintázat megváltozásával együtt megváltozott a keratinocitákban az ATP adagolással kiváltott kalcium tranziensek morfológiája is. UV-B sugárzásnak kitett sejtekben a kalcium tranziensek amplitúdója és felszálló szárának meredeksége is kisebb volt, mint a kontroll sejtekben, ami összefüggésben állhat a kezelt sejtek alacsonyabb purinoreceptor expressziójával. A felszálló szár meredekségének csökkenése összefügghet azzal, hogy a nagyrészt ionotróp ($P2X$) válasz az UV-B sugárzást kapott sejtekben részben metabotróppá ($P2Y$) válik. Besugárzott sejtekben a kalcium tranziensek után a nyugalmi kalcium szintre való visszatérés is több időt vett igénybe, mint kontroll sejtekben. Ez összefügghet azzal, hogy az UV sugárzás hatására egyéb fehérjék, mint pl. a kalcium pumpa, is degradálódhatnak. A nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ az UV-B sugárzással kezelt sejtekben alacsonyabb volt, mint az UV-B-vel nem kezelt kontroll sejtekben. Az apoptózis kiváltásáért felelős $P2X_7$ receptor UV-B sugárzás hatására degradálódott és az ATP-vel indukált apoptózis mértéke szignifikánsan kisebbnek bizonyult az UV-B-vel kezelt sejtek esetén, összehasonlítva a kontroll, besugárzást nem kapott sejtekkel.

HaCaT keratinocitákon spontán kalcium oszcillációkat figyeltünk meg. E kalcium tranziensek jellemzőit vizsgáltuk kontroll körülmények között, valamint mechanikai sértés (karcolás) hatására. Megvizsgáltuk továbbá két foszfatáz inhibitor, a CLA (10 nM) és az OA (50 nM) hatását a sejtek nyugalmi $[Ca^{2+}]_i$ -jára és a spontán kalcium oszcillációkra. Kimutattuk, hogy összehasonlítva az érintetlen területekről származó sejtekkel, a karcolt területekről származó sejtekben a Ca^{2+} -oszcillációk frekvenciája szignifikánsan csökkent, illetve az oszcillációt mutató sejtek aránya is kisebb volt ezeken a területeken. Ezen oszcillációk jellegzetes paraméterei (amplitúdó, FTHM) azonban szignifikánsan nagyobbak adódtak a karcolt területeken. E megfigyeléseink azt sejtetik, hogy összehasonlítva a nem

karcolt tenyészetek sejtjeivel, a karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben a Ca^{2+} -felszabadulási folyamatok kevésbé gyakoriak, azonban ha kialakulnak, akkor hosszabb ideig tartanak, egy nagyobb $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -változást eredményezve. Karcolás után a karc mellett helyet foglaló sejtek nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ja szignifikánsan magasabb volt mind kontroll, mind foszfatázgátlóval történő kezelés után, összehasonlítva a karc nélküli kultúrák sejtjeivel. Egyik foszfatáz inhibitorral való kezelés sem változtatta meg szignifikánsan a keratinociták nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ját.

Megvizsgáltuk továbbá a foszfatáz inhibitorok hatását a HaCaT keratinociták migrációjára. A sebzés szélén elhelyezkedő sejtekben megfigyelt csökkent kalcium oszcillációs aktivitás segítheti a keratinocitákat abban, hogy a sebzés során a sejtek között kialakult résbe vándoroljanak. Kísérleteinkben, bár a nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -t egyik foszfatáz inhibitor sem változtatta meg szignifikánsan, mindkét foszfatázgátló szer csökkentette a keratinociták migrációját. Ez a megfigyelés összefüggésben állhat azzal, hogy a gátlószerek hatására nőtt az oszcillációt mutató sejtek aránya.

A dolgozatban bemutatott új tudományos megállapítások:

40 mJ/cm^2 dózisban alkalmazott UV-B irradáció hatására HaCaT keratinocitákban megváltozik a purinerg receptorok expressziós mintázata. A P2X_7 és a P2Y_2 purinerg receptorok expressziójának csökkenése mRNS és fehérjeszinten is kimutatható. Szintén csökken a P2X_1 receptorok fehérje szintje, míg a P2X_3 receptoroké növekszik az UV-B kezelést kapott sejtekben. A P2X_7 receptorok UV-B sugárzás hatására degradálódnak, ennek megfelelően csökken a P2X_7 receptorhoz köthető, ATP-vel kiváltható apoptózis mértéke az UV-B sugárzásnak kitett sejtekben. Kísérleteinkben kimutattuk, hogy UV-B irradáció után a purinerg szignalizációs rendszer megváltozása hatással van a HaCaT keratinociták Ca^{2+} -homeosztázisára.

HaCaT keratinocitákon spontán intracelluláris Ca^{2+} -tranzienseket figyeltünk meg. Karcolás hatására szignifikánsan csökkent a Ca^{2+} -oszcillációt mutató sejtek aránya és az oszcilláció frekvenciája is. Az IP_3 -receptor és a SERCA farmakológiai gátlása szintén csökkentette ezen paramétereket, míg a RyR gátlásának nem volt ilyen hatása. A nyugalmi $[\text{Ca}^{2+}]_i$ a karcolás mellett elhelyezkedő sejtekben nagyobbak adódtak, mint a sértetlen területekről származóké. A foszfatázgátló okadánsav és kalikulin A alkalmazásával a Ca^{2+} -oszcillációt mutató sejtek aránya szignifikánsan nőtt, illetve megváltoztak a spontán Ca^{2+} -tranziensek amplitúdó és félértékszélesség értékei. A karcolás a foszfatázgátlóval történő

kezelés esetén is csökkentette az oszcilláló sejtek arányát és az oszcilláció frekvenciáját. Foszfatazgátlók hatására csökkent a HaCaT keratinociták migrációja. Kísérleteinkkel igazoltuk, hogy a Ca^{2+} -homeosztázis szabályozásának fontos szerepe van a sebgyógyulás folyamatában.

Summary

In this thesis the effect of UV-B radiation on purinergic receptor expression of HaCaT keratinocytes was examined. We revealed that HaCaT keratinocytes show spontaneous repetitive calcium transients. The effects of two phosphatase inhibitors (CLA and OA) on these spontaneous calcium oscillations, and the keratinocyte migration were also examined.

Although there are a number of recognized risk factors resulting in cutaneous malignancies, very little is known about the exact mechanism. In keratinocytes different purinergic receptors have been implicated to play essential roles in deciding the fate of the cells through regulating proliferation and differentiation. While P2Y receptors seem to control the former, P2X receptors, among which the P2X₇ receptor is associated with the induction of apoptosis, are likely to be responsible for the latter. 40 mJ/cm² UV-B irradiation decreased the number of viable cells as assessed using MTT assay. This irradiation decreased the amount of both P2X₁ and P2Y₂ receptors and essentially destroyed the P2X₇ receptors in surviving cells. Morphology of ATP-induced Ca²⁺ transients were altered in irradiated cells compared to control. The amplitude and the rate of rise of the transients were decreased and the return to resting [Ca²⁺]_i prolonged. This observation is consistent with the finding that in control cells mostly ionotropic, while in irradiated cells mostly metabotropic receptors were underlying the response to ATP. These alterations in the expression pattern of purinergic receptors and in the Ca²⁺ transients could explain the observed decreased tendency for ATP-induced apoptosis and thus enable the malignant transformation of keratinocytes.

Changes in intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i) as well as in the phosphorylation state of proteins have been implicated in keratinocyte wound healing revealed in scratch assays. Scratching confluent HaCaT monolayers decreased the number of cells displaying repetitive Ca²⁺ oscillations as well as the frequency of their Ca²⁺-transients in cells close to the wounded area and initiated migration of the cells into the wound bed. In contrast, calyculin-A (CLA) and okadaic acid (OA), known cell permeable inhibitors of protein phosphatase-1 and 2A, increased the level of resting [Ca²⁺]_i and suppressed cell migration and wound healing of HaCaT cells. Furthermore, neither CLA nor OA influenced how scratching affected Ca²⁺ oscillations. It is assumed that changes in and alterations of the phosphorylation level of Ca²⁺-transport and contractile proteins upon phosphatase inhibition mediates cell migration and wound healing.

Irodalomjegyzék

- Ádám V: Orvosi Biokémia. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2001
- Ambach W, Blumthaler M: Biological effectiveness of solar UV radiation in humans. *Experientia*. 1993 Sep 15;49(9):747-53.
- Amisten S, Melander O, Wihlborg AK, Berglund G, Erlinge D: Increased risk of acute myocardial infarction and elevated levels of C-reactive protein in carriers of the Thr-87 variant of the ATP receptor P2Y₁₁, *European Heart Journal* (2007) 28, 13–18
- Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, Young JD: Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development. *Mol Med Today*. 1999 May;5(5):216-24.
- Balogh A, Paragh G Jr, Juhász A, Köbling T, Törocsik D, Mikó E, Varga V, Emri G, Horkay I, Scholtz B, Remenyik E: Reference genes for quantitative real time PCR in UVB irradiated keratinocytes. *J Photochem Photobiol B*. 2008 Dec 11;93(3):133-9.
- Bandle U, Kohler K, Wheeler-Schilling TH: Expression of the P2X₇-receptor subunit in neurons of the rat retina. *Mol Brain Res*, 62: 106–109, 1998.
- Bayguinov PO, Hennig GW, Smith TK: Ca²⁺ imaging of activity in ICC-MY during local mucosal reflexes and the colonic migrating motor complex in the murine large intestine. *J Physiol*. 2010 Nov 15;588(Pt 22):4453-74.
- Becker D, Woltersdorf R, Boldt W, Schmitz S, Braam U, Schmalzing G, Markwardt F: The P2X₇ carboxyl tail is a regulatory module of P2X₇ receptor channel activity. *J Biol Chem*. 2008 Sep 12;283(37):25725-34.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003): Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jul;4(7):517-29.
- Berridge MJ, Irvine RF (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000): The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):11-21.
- Betapudi V, Rai V, Beach JR, Egelhoff T: Novel regulation and dynamics of myosin II activation during epidermal wound responses. *Exp Cell Res*. 2010 Apr 1;316(6):980-91.
- Bettega D, Calzolari P, Belloni F, Di Lena F, Genchi S, Lupi M, Massariello P, Orsini S, Tallone L, Tomasoni D, Ubezio P, Redpath JL: Solar UV radiation: differential

- effectiveness of UVB subcomponents in causing cell death, micronucleus induction and delayed expression of heritable damage in human hybrid cells. *Int J Radiat Biol.* 2001 Sep;77(9):963-70.
- Bodin P, Burnstock G: Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation. *Inflamm Res.* 1998 Aug;47(8):351-4.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE: Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 1988 Mar;106(3):761-71.
- Boyer JL, Delaney SM, Villanueva D, Harden TK: A molecularly identified P2Y receptor simultaneously activates phospholipase C and inhibits adenylyl cyclase and is nonselectively activated by all nucleoside triphosphates. *Mol Pharmacol.* 2000 Apr;57(4):805-10.
- Burnstock G, Kennedy C: Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol.* 1985;16(5):433-40.
- Burnstock G, Verkhratsky A: Long-term (trophic) purinergic signalling: purinoceptors control cell proliferation, differentiation and death *Cell Death and Disease* (2010) 1, e9;
- Burnstock G: The past, present and future of purine nucleotides as signalling molecules. *Neuropharmacology.* 1997 Sep;36(9):1127-39.
- Burnstock G, Dobson JG. (1998) The G protein-coupled P2Y receptors. in *Cardiovascular Biology of Purines* Edited by Burnstock, G. Kluwer Academic Publishers. 187-205
- Burrell HE, Bowler WB, Gallagher JA, Sharpe GR: Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: evidence for functional P2Y1, P2Y2, and P2Y4 receptors. *J Invest Dermatol.* 2003 Mar;120(3):440-7.
- Clapham D.E. (2007): Calcium signaling. *Cell* 131:1047-58
- Chen J, Hoffman BB, Isseroff RR.: Beta-adrenergic receptor activation inhibits keratinocyte migration via a cyclic adenosine monophosphate-independent mechanism. *J Invest Dermatol.* 2002 Dec;119(6):1261-8.
- Chizh BA, Illes P (2001). P2X receptors and nociception. *Pharmacol. Rev.* 53 (4): 553–68.
- Cockayne DA, Hamilton SG, Zhu QM, Dunn PM, Zhong Y, Novakovic S, Malmberg AB, Cain G, Berson A, Kassotakis L, Hedley L, Lachnit WG, Burnstock G, McMahon SB, Ford AP. Urinary bladder hyporeflexia and reduced pain-related behaviour in P2X3-deficient mice. *Nature* 407: 1011–1015, 2000.

- Communi D, Govaerts C, Parmentier M, Boeynaems JM: Cloning of a human purinergic P2Y receptor coupled to phospholipase C and adenylyl cyclase. *J Biol Chem.* 1997 Dec 19;272(51):31969-73
- Csernoch L, Hunyadi J, Kovács L (2000): Calcium release activated calcium entry in a human skin derived cell line (HaCaT), *Exp. Dermatol.* 9:200-205
- Dixon CJ, Bowler WB, Fleetwood P, Ginty AF, Gallagher JA, Carron JA: Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P2-purinoreceptors. *Br J Cancer.* 1997;75(1):34-9.
- Dobozy A, Farkas B, Horváth A, Hunyadi J, Schneider I: *Bőrgyógyászat. Eklektikon Kiadó és Nyomdai Szolgáltató Kft, Budapest, 1998.*
- Drury AN, Szent-Györgyi A: The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol.* 1929 Nov 25;68(3):213-37.
- Duarte I, Buense R, Kobata C: Phototherapy. *An. Bras. Dermatol.* vol.81 no.1 Rio de Janeiro Jan./Feb. 2006
- Ehrlich YH, Davis TB, Bock E, Kornecki E, Lenox RH: Ecto-protein kinase activity on the external surface of neural cells. *Nature.* 1986 Mar 6-12;320(6057):67-70.
- Erb P, Ji J, Kump E, Mielgo A, Wernli M: Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2008;624:283-95.
- Farkas E, Ujvarosi K, Nagy G, Posta J, Banfalvi G (2010): Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells. *Toxicol In Vitro.* 2010 Feb;24(1):267-75.
- Feng CY, Hennig GW, Corrigan RD, Smith TK, von Bartheld CS: Analysis of spontaneous and nerve-evoked calcium transients in intact extraocular muscles in vitro. *Exp Eye Res.* 2012 Jul;100:73-85.
- Ferguson DR: Urothelial function. *BJU Int.* 1999 Aug;84(3):235-42.
- Fujiki H, Suganuma M, Yoshizawa S, Nishiwaki S, Winyar B, Sugimura T. Mechanisms of action of okadaic acid class tumor promoters on mouse skin. *Environ Health Perspect.* 1991 Jun;93:211-4.
- Garcia A, Cayla X, Guernon J, Dessauge F, Hospital V, Rebollo MP, Fleischer A, Rebollo A (2003). Serine/threonine protein phosphatases PP1 and PP2A are key players in apoptosis. *Biochimie* 85 (8): 721–726

- Gonzalez FA, Gross DJ, Heppel LA, Webb WW: Studies on the increase in cytosolic free calcium induced by epidermal growth factor, serum, and nucleotides in individual A431 cells. *J Cell Physiol.* 1988 May;135(2):269-76.
- Gönczi M, Szentandrassy N, Fülöp L, Telek A, Szigeti GP, Magyar J, Bíró T, Nánási PP, Csernoch L: Hypotonic stress influence the membrane potential and alter the proliferation of keratinocytes in vitro. *Exp Dermatol.* 2007 Apr;16(4):302-10.
- Gönczi M, Telek A, Czifra G, Balogh A, Blumberg PM, Bíró T, Csernoch L: Altered calcium handling following the recombinant overexpression of protein kinase C isoforms in HaCaT cells. *Exp Dermatol.* 2008 Jul;17(7):584-91.
- Grando SA, Horton RM, Mauro TM, Kist DA, Lee TX, Dahl MV (1996): Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol.* 1996 Sep;107(3):412-8.
- Greig AV, Linge C, Healy V, Lim P, Clayton E, Rustin MH, McGrouther DA, Burnstock G: Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells. *J Invest Dermatol.* 2003 Aug;121(2):315-27.
- Greig AV, Linge C, Terenghi G, McGrouther DA, Burnstock G: Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 2003 Jun;120(6):1007-15.
- Gruppuso PA, Mikumo R, Brautigan DL, Braun L.: Growth arrest induced by transforming growth factor beta 1 is accompanied by protein phosphatase activation in human keratinocytes. *J Biol Chem.* 1991 Feb 25;266(6):3444-8.
- Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985 Mar 25;260(6):3440-50.
- Haystead TA, Sim AT, Carling D, Honnor RC, Tsukitani Y, Cohen P, Hardie DG.: Effects of the tumour promoter okadaic acid on intracellular protein phosphorylation and metabolism. *Nature.* 1989 Jan 5;337(6202):78-81.
- Helmlinger G, Berk BC, Nerem RM (1996): Pulsatile and steady flow-induced calcium oscillations in single cultured endothelial cells. *J Vasc Res.* 1996 Sep-Oct;33(5):360-9.
- Huang N, Wang DJ, Heppel LA: Extracellular ATP is a mitogen for 3T3, 3T6, and A431 cells and acts synergistically with other growth factors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989 Oct;86(20):7904-8.
- Inoue K, Nakazawa K, Fujimori K, Watano T, Takanaka A: Extracellular adenosine 5'-triphosphate-evoked glutamate release in cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 134: 215–218, 1992.

- Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, Kato Y, Fusetani N, Watabe S, Hashimoto K, Uemura D, et al.: Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989 Mar 31;159(3):871-7.
- Jabs R, Guenther E, Marquord TK, Wheeler-Schilling TH: Evidence for P2X3, P2X4, P2X5 but not for P2X7 containing purinergic receptors in Muller cells of the rat retina. *Mol Brain Res* 76: 205–210, 2000.
- Jackson B, Peyrollier K, Pedersen E, Basse A, Karlsson R, Wang Z, Lefever T, Ochsenbein AM, Schmidt G, Aktories K, Stanley A, Quondamatteo F, Ladwein M, Rottner K, van Hengel J, Brakebusch C: RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes. *Mol Biol Cell*. 2011 Mar 1;22(5):593-605.
- Kaufmann A, Musset B, Limberg SH, Renigunta V, Sus R, Dalpke AH, Heeg KM, Robaye B, Hanley PJ: 'Host tissue damage' signal ATP promotes nondirectional migration and negatively regulates toll-like receptor signaling in human monocytes. *J Biol Chem* 2005; 280:32459–32467.
- Kawashima H, Satoh H, Saotome M, Urushida T, Katoh H, Hayashi H: Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the Ca^{2+} loading of the sarcoplasmic reticulum without changing its Ca^{2+} release. *Circ J*. 2009 Jun;73(6):1133-40.
- Kazuo Tachibana, Paul J. Scheuer, Yasumasa Tsukitani, Hiroyuki Kikuchi, Donna Van Engen, Jon Clardy, Yalamanchili Gopichand, and Francis J. Schmitz (1981). "Okadaic acid, a cytotoxic polyether from two marine sponges of the genus *Halichondria*". *Journal of the American Chemical Society* 103 (9): 2469–2471. doi:10.1021/ja00399a082
- Kellerman D, Evans R, Mathews D, Shaffer C.: Inhaled P2Y2 receptor agonists as a treatment for patients with Cystic Fibrosis lung disease. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Dec 5;54(11):1463-74.
- Kiss A, Lontay B, Bécsi B, Márkász L, Oláh E, Gergely P, Erdodi F: Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell Signal*. 2008 Nov;20(11):2059-70.
- Koivisto L, Alavian K, Hakkinen L, Pelech S, McCulloch CA, Larjava H (2003): Glycogen synthase kinase-3 regulates formation of long lamellipodia in human keratinocytes. *J Cell Sci*. 2003 Sep 15;116(Pt 18):3749-60.

- Lee RE: Phycology, Cambridge University Press, 4th ed. 2008
- Liu HW, Luo YC, Ho CL, Yang JY, Lin CH (2009): Locomotion guidance by extracellular matrix is adaptive and can be restored by a transient change in Ca^{2+} level. PLoS One. 2009 Oct 5;4(10):e7330.
- Lontay B, Kiss A, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdodi F (2005): Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. Cell Signal. 2005 Oct;17(10):1265-75.
- Lustig KD, Shiau AK, Brake AJ, Julius D: Expression cloning of an ATP receptor from mouse neuroblastoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Jun 1;90(11):5113-7.
- Lyng FM, Seymour CB, Mothersill C: Early events in the apoptotic cascade initiated in cells treated with medium from the progeny of irradiated cells. Radiat Prot Dosimetry. 2002;99(1-4):169-72.
- Mann KM, Ray JL, Moon ES, Sass KM, Benson MR.: Calcineurin initiates smooth muscle differentiation in neural crest stem cells. J Cell Biol. 2004 May 24;165(4):483-91. Epub 2004 May 17.
- Marteau F, Gonzalez NS, Communi D, Goldman M, Boeynaems JM: Thrombospondin-1 and indoleamine 2,3-dioxygenase are major targets of extracellular ATP in human dendritic cells. Blood 2005;106:3860–3866.
- Matta C, Fodor J, Szigyártó Z, Juhász T, Gergely P, Csernoch L, Zákány R (2008): Cytosolic free Ca^{2+} concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. Cell Calcium. 2008 Sep;44(3):310-23.
- Nayak L, De RK (2007): Modularized study of human calcium signalling pathway. J Biosci. 32:1009-17
- Nesti LJ, Caterson EJ, Li WJ, Chang R, McCann TD, Hoek JB, Tuan RS (2007): TGF-beta1 calcium signaling in osteoblasts. J Cell Biochem. 2007 May 15;101(2):348-59.
- Nicholas RA, Watt WC, Lazarowski ER, Li Q, Harden K: Uridine nucleotide selectivity of three phospholipase C-activating P2 receptors: identification of a UDP-selective, a UTP-selective, and an ATP- and UTP-specific receptor. Mol Pharmacol. 1996 Aug;50(2):224-9.
- North RA, Barnard EA: Nucleotide receptors. Curr Opin Neurobiol. 1997 Jun;7(3):346-57.

- Pannicke T, Fischer W, Biedermann B, Schädlich H, Grosche J, Faude F, Wiedemann P, Allgaier C, Illes P, Burnstock G, Reichenbach A: P2X7 receptors in Müller glial cells from the human retina. *J Neurosci*. 2000 Aug 15;20(16):5965-72.
- Papp H, Czifra G, Lázár J, Gönczi M, Csernoch L, Kovács L, Bíró T: Protein kinase C isozymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol*. 2003 Dec;12(6):811-24.
- Pasternack SM, von Kügelgen I, Al Aboud K, Lee YA, Rüschenhoff F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nürnberg P, Nöthen MM, Betz RC.: G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet*. 2008 Mar;40(3):329-34. doi: 10.1038/ng.84. Epub 2008 Feb 24.
- Perlis C, Herlyn M: Recent advances in melanoma biology. *Oncologist*. 2004;9(2):182-7.
- Popper LD, Batra S. Calcium mobilization and cell proliferation activated by extracellular ATP in human ovarian tumour cells. *Cell Calcium*. 1993 Mar;14(3):209-18.
- Pshenichkin, S. P., B. C. Wise. (17 March 1995) Okadaic Acid Increases Nerve Growth Factor Secretion, mRNA Stability, and Gene Transcription in Primary Cultures of Cortical Astrocytes. *Journal of Biological Chemistry*. Vol. 270, Num. 11. pp. 5994-5999.
- Pu Y, Luo KQ, Chang DC: A Ca²⁺ signal is found upstream of cytochrome c release during apoptosis in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002 Dec 20;299(5):762-9.
- Pullar CE, Chen J, Isseroff RR.: PP2A activation by beta2-adrenergic receptor agonists: novel regulatory mechanism of keratinocyte migration. *J Biol Chem*. 2003 Jun 20;278(25):22555-62.
- Rajesh D, Schell K, Verma AK.: Ras mutation, irrespective of cell type and p53 status, determines a cell's destiny to undergo apoptosis by okadaic acid, an inhibitor of protein phosphatase 1 and 2A. *Mol Pharmacol*. 1999 Sep;56(3):515-25.
- Resjö S, Oknianska A, Zolnierowicz S, Manganiello V, Degerman E (1999): Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A. *Biochem J*. 1999 Aug 1;341 (Pt 3):839-45.
- Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR: Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. 2003 Dec 5;302(5651):1704-9.

- Saino T, Watson EL: Inhibition of serine/threonine phosphatase enhances arachidonic acid-induced $[Ca^{2+}]_i$ via protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 Jan;296(1):C88-96.
- Shaver SR, Rideout J, Pendergast W, Douglass JG, Brown EG, Boyer, J.L., Patel, R.I., Redick, C.C., Jones, A.C., Picher, M. and Yerxa, B.R. (2005) Structure-activity relationships of dinucleotides: Potent and selective agonists of P2Y receptors. *Purinerg Sig*, 1: 183-191.
- Somlyo AP, Somlyo AV: Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. 2003 Oct;83(4):1325-58.
- Sperlágh B, Kittel A, Lajtha A, Vizi ES: ATP acts as fast neurotransmitter in rat habenula: neurochemical and enzyme cytochemical evidence. *Neuroscience*. 1995 Jun;66(4):915-20.
- Suganuma M, Fujiki H, Furuya-Suguri H, Yoshizawa S, Yasumoto S, Kato Y, Fusetani N, Sugimura T. (1990). "Calyculin A, an inhibitor of protein phosphatases, a potent tumor promoter on CD-1 mouse skin". *Cancer Res*. 50 (12): 3521–3525.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G: The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science*. 1996 May 3;272(5262):735-8.
- Szabó G (szerk.) (2004): *Sejtbiológia. Medicina Könyvkiadó RT., Budapest.*
- Szabó LZ, Vincze J, Csernoch L, Szentesi P: Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms. *J Theor Biol*. 2010 Jun 21;264(4):1279-92.
- Szappanos H, Cseri J, Deli T, Kovács L, Csernoch L: Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *J Biochem Biophys Methods*. 2004 Apr 30;59(1):89-101.
- Szentágothai J, Réthelyi M: *Funkcionális Anatómia. Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest, 2002*
- Szücs A, Szappanos H, Tóth A, Farkas Z, Panyi G, Csernoch L, Sziklai I: Differential expression of purinergic receptor subtypes in the outer hair cells of the guinea pig. *Hear Res*. 2004 Oct;196(1-2):2-7.
- Taboubi S, Garrouste F, Parat F, Pommier G, Faure E, Monferran S, Kovacic H, Lehmann M: Gq-coupled purinergic receptors inhibit insulin-like growth factor-I/phosphoinositide 3-kinase pathway-dependent keratinocyte migration. *Mol Biol Cell*. 2010 Mar 15;21(6):946-55.

- Tóth BI, Dobrosi N, Dajnoki A, Czifra G, Oláh A, Szöllosi AG, Juhász I, Sugawara K, Paus R, Bíró T: Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J Invest Dermatol.* 2011 May;131(5):1095-104.
- Tran JN, Pupovac A, Taylor RM, Wiley JS, Byrne SN, Sluyter R: Murine epidermal Langerhans cells and keratinocytes express functional P2X7 receptors. *Exp Dermatol.* 2010 Aug;19(8):e151-7.
- Tsuda M, Koizumi S, Kita A, Shigemoto Y, Ueno S, Inoue K: Mechanical allodynia caused by intraplantar injection of P2X receptor agonist in rats: involvement of heteromeric P2X2/3 receptor signaling in capsaicin-insensitive primary afferent neurons. *J Neurosci* 20: RC90, 2000.
- Vassort G: Adenosine 5'-triphosphate: a P2-purinergetic agonist in the myocardium. *Physiol Rev.* 2001 Apr; 81(2):767-806.
- Webb TE, Simon J, Krishek BJ, Bateson AN, Smart TG, King BF, Burnstock G, Barnard EA. Cloning and functional expression of a brain G-protein-coupled ATP receptor. *FEBS Lett.* 1993 Jun 14;324(2):219-25.
- Wong K, Li XB (1998): Protein phosphatase inhibitors exert specific and nonspecific effects on calcium influx in thapsigargin-treated human neutrophils. *Inflammation.* 1998 Dec;22(6):631-42.
- Worswick SD, Cockburn M, Peng D. Measurement of ultraviolet exposure in epidemiological studies of skin and skin cancers. *Photochem Photobiol.* 2008 Nov-Dec;84(6):1462-72.
- Yatsunami J, Komori A, Ohta T, Suganuma M, Yuspa SH, Fujiki H.: Hyperphosphorylation of cytokeratins by okadaic acid class tumor promoters in primary human keratinocytes. *Cancer Res.* 1993 Mar 1;53(5):992-6.
- Yerxa BR, Sabater JR, Davis CW, Stutts MJ, Lang-Furr M, Picher M, Jones AC, Cowlen M, Dougherty R, Boyer J, Abraham WM, Boucher RC: Pharmacology of INS37217 [P(1)-(uridine 5')-P(4)- (2'-deoxycytidine 5')tetraphosphate, tetrasodium salt], a next-generation P2Y(2) receptor agonist for the treatment of cystic fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002 Sep;302(3):871-80.
- Yu LG, Packman LC, Weldon M, Hamlett J, Rhodes JM (2004): Protein phosphatase 2A, a negative regulator of the ERK signaling pathway, is activated by tyrosine phosphorylation of putative HLA class II-associated protein I (PHAPI)/pp32 in response to the antiproliferative lectin, jacalin. *J Biol Chem.* 2004 Oct 1;279(40):41377-83.

- Yusuf S, Zhao F, Mehta SR, Chrolavicius S, Tognoni G, Fox KK; Clopidogrel in Unstable Angina to Prevent Recurrent Events Trial Investigators. Effects of clopidogrel in addition to aspirin in patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation. *N Engl J Med*. 2001 Aug 16;345(7):494-502.
- Zhao S, Brandt NR, Caswell AH, Lee EY (1998): Binding of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the ryanodine-sensitive calcium release channel protein. *Biochemistry*. 1998 Dec 22;37(51):18102-9
- Zimmermann H: Biochemistry, localization and functional roles of ecto-nucleotidases in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1996 Aug;49(6):589-618.

Közlemények listája



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

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

Jelölt: Ruzsnavszky Olga

Neptun kód: CM1WC1

Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

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

További Közlemények

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



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

Összesített impakt faktor: 21.933

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

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

Debrecen, 2013.05.28



Előadások, poszterek listája

Idézhető, angol nyelvű absztraktok

- Laszlo Csernoch, Dora Bodnar, **Olga Ruzsnavszky**, Nikolett Geyer, Bence Hegyi, Beatrix Dienes, Monika Sztretye, Peter Szentesi: Myostatin Deficient Mice Display Altered Calcium Signaling. *Biophysical Journal*, 2013/1, Volume: 104, Page 289
- Tamás Oláh, János Fodor, **Olga Ruzsnavszky**, Celine Berbey, Bruno Allard, László Csernoch (2010): The Alterations of Store-Operated Calcium Entry in TRPC1-Overexpressing C2C12 Myotubes. *Biophysical Journal* Volume 98, Issue 3, Supplement 1, January 2010, Pages 152a-153a. doi:10.1016/j.bpj.2009.12.820
- G Drabik, A Telek, B Dienes, **O Ruzsnavszky**, I Kovács, T Flaskó, G Balla, C Kiss, T Józsa: C129 The androgen status of the appendix testis determines the effect of hormonal treatment in cryptorchidism. *European Urology Supplements*, 2009/9, Volume 8, Issue 8, Page 700

Angol nyelvű előadások

- Olga Ruzsnavszky**: HaCaT keratinocytes exhibit spontaneous intracellular calcium transients, Annual Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen 2011. June 6-7
- J. Fodor, T. Oláh, **O. Ruzsnavszky**, S. Oddoux, P. Szentesi, I. Marty, L. Csernoch: Role of Trisk 32, the 32 kDa triadin isoform, in the calcium homeostasis of skeletal muscle. XXXIX European Muscle Conference (EMC). Padua, Italy, 2010. September 11-15.
- Olga Ruzsnavszky**: Effect of UV-B irradiation on the expression of purine receptors of HaCaT keratinocytes, Gene-Environment Multidisciplinary Meeting, Szeged, 2010. July 5
- Olga Ruzsnavszky**: Examination of hormone receptors on appendix testis and other human tissues, PhD Symposium of the Doctoral School of Molecular Medicine. Debrecen, 2010. May 31 - June 1.

Magyar nyelvű előadások

- Ruzsnavszky Olga**: „Az ösztrogén hatása melanoma sejtek kalcium-homeosztázisára” (Conference of the Students’ Scientific Society, Debrecen, 2008)
- Ruzsnavszky Olga**: „A rianodin receptorok és a purinerg jelátvitel lehetséges szerepe a melanomák malignus potenciáljának kialakulásában” (National Conference of the Students’ Scientific Society, Budapest, 2007)
- Balogh Ágnes, **Ruzsnavszky Olga**: „UV-B besugárzás hatása HaCaT keratinocyták purinoreceptor expressziójára” (Conference of the Students’ Scientific Society, Debrecen, 2007). The presentation won the special reward of the Hungarian Physiological Society.

Ruzsnavszky Olga: „A rianodin receptorok és a purinerg jelátvitel lehetséges szerepe a melanomák malignus potenciáljának kialakulásában” (Conference of the Students’ Scientific Society, Debrecen, 2006). The presentation won the special reward of the Hungarian Physiological Society.

Deli Tamás, **Ruzsnavszky Olga**, Szentesi Péter, Szigeti Gyula Péter, Csernoch László: „Az intracelluláris kalciumhomeosztázis vizsgálata melanocitákon és melanoma sejteken” (Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Budapest, 2005)

Ruzsnavszky Olga: „Melanoma sejtek Ca^{2+} -homeostasisának vizsgálata” (Conference of the Students’ Scientific Society, Debrecen, 2005)

Angol nyelvű posztterek

Tamás Oláh, János Fodor, **Olga Ruzsnavszky**, Celine Berbey, Bruno Allard, László Csernoch (2010): The alterations of store-operated calcium entry in TRPC1-overexpressing C2C12 myotubes (Biophysical Society 54th Annual Meeting, San Francisco, USA, 2010)

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

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

Magyar nyelvű posztterek

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

Bodnár Dóra, **Ruzsnavszky Olga**, Geyer Nikolett, Dienes Beatrix, Balogh Ágnes, Szabó László, Papp Zoltán, Szentesi Péter, Csernoch László: Az elektromechanikai kapcsolat módosulása myostatin hiányos (MSTN^{-/-}) egerek vázizmaiban (LXXVI. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Debrecen, 2012)

Bodnár Dóra, **Ruzsnavszky Olga**, Oláh Tamás, Mosca Barbara, Fodor János, Dienes Beatrix, Zorzato Francesco, Szentesi Péter, Csernoch László: Egy újonnan izolált izomeredetű fehérje in vitro és in vivo overexpresszióját követő lokalizációs vizsgálatok (LXXV. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Pécs, 2011)

Bodnár Dóra, **Ruzsnavszky Olga**, Ungvári Éva, Benkő Ilona, Prokisch József, Csernoch László, Szentesi Péter: Szelénvegyületek hatása egerek vázizmainak kontraktilis tulajdonságaira (LXXV. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Pécs, 2011)

Nagy Dénes, **Ruzsnavszky Olga**, Fodor János, Nagy Zsuzsanna, Rusznák Zoltán, Csernoch László, Szűcs Géza: A mitokondriális elhelyezkedésű TASK-3 fehérje szerepe melanoma sejtekben (LXXV. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Pécs, 2011)

- Kistamás Kornél, **Ruzsnavszky Olga**, Telek Andrea, Kosztka Livia, Józsa Tamás, Csernoch László: Anti-Müller hormon (AMH) receptor expressziója Appendix testisen (LXXV. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Pécs, 2011)
- Ruzsnavszky O.**, Józsa T., Telek A., Dienes B., Kistamás K. Csernoch L.: Az appendix testisen jelen lévő androgén receptorok lehetséges szerepe a testis congenitalis vándorlásában (LXXIII. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Budapest, 2009)
- Oláh Tamás, Fodor János, **Ruzsnavszky Olga**, Tóth Adrienn, Tóth Judit, Isabelle Marty, Csernoch László (2009): A Trisk 32 fehérje szabályozó hatása az IP₃ receptorokon keresztül történő Ca²⁺-felszabadulásra patkány eredetű L6 myoblastokban (LXXIII. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Budapest, 2009)
- Oláh Tamás, Fodor János, **Ruzsnavszky Olga**, Tóth Adrienn, Isabelle Marty, Csernoch László (2009): A Trisk 32 fehérje szabályozó hatása az IP₃ receptorokon keresztül történő Ca²⁺-felszabadulásra patkány eredetű L6 myoblastokban (39th Membrane Transport Conference, Sümeg, 2009)
- Ruzsnavszky O.**, Balogh Á., Telek A., Gönczi M., Remenyik É., Csernoch L.: „UV-B besugárzás hatása HaCaT keratinocyták purinoreceptor expressziójára” (LXXI. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Pécs, 2007)
- Deli Tamás, **Ruzsnavszky Olga**, Szigeti Gyula Péter, Tóvári József, Kenessey István, Tímár József, Csernoch László: „Rianodin receptor (RyR) – P2X7 purinoreceptor kölcsönhatás szerepe a malignus transzformációban” (LXX. Annual Meeting of the Hungarian Physiological Society, Szeged, 2006)

Köszönetnyilvánítás

Itt szeretném köszönetemet kifejezni mindazoknak, akik segítségemre voltak az egyetemi doktori értekezést megalapozó kísérletek elvégzésében, és a mögötte rejlő elméleti tudásom megszerzésében.

Köszönet illeti témavezetőmet, Prof. Dr. Csernoch Lászlót, a DE OEC Élettani Intézet igazgatóját, aki az irányítása alatt álló intézetben lehetővé tette és útmutatásával segítette munkámat.

Köszönöm a sok segítséget Dr. Deli Tamásnak, akitől kezdő TDK hallgatóként a munkámhoz szükséges elméleti és gyakorlati tudás nagy részét elsajátítottam, és akihez kérdéseimmel mindig bátran fordulhattam. Köszönet illeti Dr. Telek Andreát, Dr. Szentandrásyné Dr. Gönczi Mónikát és Dr. Dienes Beatrixot is, akiktől szintén nagyon sokat tanulhattam, illetve Dr. Balogh Ágnes, aki TDK hallgatóként a kísérleti munkában tevékenyen részt vett.

Köszönet Dr. Vargáné Kiss Ibolya, valamint Őri Róza asszisztensnőknek, akik a kísérletek elvégzéséhez szükséges kiváló technikai háttérrel biztosították.

Köszönettel tartozom az Élettani Intézet valamennyi dolgozójának a kísérletek során nyújtott segítségükért, és a baráti légkörért, amiben dolgozhattam, valamint kollaborációs partnereinknek is az eredményes közös munkáért.

Ezen felül köszönettel tartozom családomnak, valamint férjemnek, Dr. Oláh Tamásnak, aki a nyugodt családi háttér biztosításán kívül a disszertációm alapjául szolgáló kísérletekben is tevékenyen részt vett.

A munka a következő anyagi támogatásokkal valósulhatott meg: OTKA NK78398, K68401, K75604 és CNK80709, ETT (186/09), TÁMOP 4.2.2.-08/1-2008-0019, TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024, TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025, Baross Gábor project (REG_EA_INFRA_09, LSM_LIVE)



SZÉCHENYI TERV

Függelék

A dolgozat alapját képező cikkek különlenyomatai



UV-B induced alteration in purinergic receptors and signaling on HaCaT keratinocytes

Olga Ruzsnavszky^a, Andrea Telek^{a,1}, Mónika Gönczi^a, Attila Balogh^b, Éva Remenyik^b, László Csernoch^{a,*}

^a Department of Physiology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen H-4012, Hungary

^b Department of Dermatology, Medical and Health Science Center, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 March 2011

Received in revised form 12 July 2011

Accepted 25 July 2011

Available online 4 August 2011

Keywords:

Purinoreceptor

UV-B

Keratinocytes

ABSTRACT

Although there are a number of recognized risk factors resulting in cutaneous malignancies, very little is known about the exact mechanism. In keratinocytes different purinergic receptors have been implicated to play essential roles in deciding the fate of the cells through regulating proliferation and differentiation. While P2Y receptors seem to control the former, P2X receptors, among which the P2X₇ receptor is associated with the induction of apoptosis, are likely to be responsible for the latter. Forty mJ/cm² UV-B irradiation decreased the number of viable cells as assessed using MTT assay. This irradiation decreased the amount of both P2X₁ and P2Y₂ receptors and essentially destroyed the P2X₇ receptors in surviving cells. Morphology of ATP-induced Ca²⁺ transients were altered in irradiated cells compared to control. The amplitude and the rate of rise of the transients were decreased and the return to resting [Ca²⁺]_i prolonged. This observation is consistent with the finding that in control cells mostly ionotropic, while in irradiated cells mostly metabotropic receptors were underlying the response to ATP. These alterations in the expression pattern of purinergic receptors and in the Ca²⁺ transients could explain the observed decreased tendency for ATP-induced apoptosis and possibly contribute to the malignant transformation of keratinocytes.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The increasing incidence of skin cancer indicates the importance of understanding the pathogenesis of these diseases. Epidemiological studies have revealed a strong association between skin cancer formation and exposure to sunlight [1]. While the sunlight has a wide spectrum of electromagnetic radiation, from the three components of UV light (UV-A, UV-B, and UV-C) UV-A is biologically less effective, UV-C – although highly effective – is absorbed by the atmosphere, therefore, UV-B has the most severe biological effects [2]. UV light has been implicated in the genesis of several forms of cutaneous malignancies including melanoma, basal cell carcinoma, and squamous cell carcinoma [3]. UV irradiation is assumed to lead to mutations in the DNA [4]. Excessive DNA damage or defective DNA repair mechanisms can lead to cell death or, even worse, to malignant transformation of the cells. Under normal conditions, however, cells with damaged DNA should be recognized and eliminated.

Indeed, various repair and safety mechanisms exist to maintain the integrity of the skin epidermis. For example, if UV-light-induced DNA damage is unreparable, cells containing modified

DNA can be eliminated by apoptosis [5]. An important event in the process of UV-B-induced apoptosis is the increase of the intracellular calcium concentration ([Ca²⁺]_i; see e.g. [6]) as the cytosolic Ca²⁺ signal seems to be involved in regulating UV-induced apoptosis in HeLa cells [7].

There are a number of possible ways for a cell to increase [Ca²⁺]_i, including voltage- and ligand-gated calcium channels in the surface and endoplasmic reticulum (ER) membranes. In keratinocytes different purinergic receptors have been implicated to play essential roles in deciding the fate of the cells through regulating proliferation and differentiation. While P2Y receptors seem to control the proliferation of these cells, P2X receptors are likely to be responsible for their differentiation [8]. Among the latter P2X₇ receptor is an apoptosis-inducing receptor [9], composed of three identical subunits [10]. In keratinocytes, the P2Y₂ receptor takes part in the regulation of migration as a negative regulator [11].

In these experiments the connection between UV-B irradiation and the pattern of the expression of purinergic receptors is described. We demonstrate a clear reduction in P2X₇ receptor expression following UV-B irradiation. In line with the altered expression pattern, differences in resting [Ca²⁺]_i and in the way how cells respond to extracellular ATP was also recognized. These modifications in purinergic signaling could contribute to an altered apoptotic tendency and thus in part explain the increased probability of survival of malignantly transformed cells.

* Corresponding author. Tel.: +36 52 255 575; fax: +36 52 255 116.

E-mail address: csi@phys.dote.hu (L. Csernoch).

¹ Present address: National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA.

2. Materials and methods

2.1. Culturing HaCaT keratinocytes

HaCaT keratinocytes [12] were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, Budapest, Hungary) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma), 2 mmol/L L-glutamine, and antibiotics (50 NE/mL penicillin, 50 µg/mL streptomycin and 1.25 µg/mL fungizone) at 37 °C temperature in a 5% CO₂ atmosphere as described in our previous reports [13,14].

2.2. Irradiating the cells

Keratinocytes were cultured in 10 cm diameter Petri dishes. After media removal and wash with phosphate based saline (PBS; Sigma) 0.5 mL of PBS was put on the cells to prevent the exsiccation of the monolayer culture. For irradiation, a broadband UV-B irradiation was applied using a Philips TL-12 (57.5% of UV output in UV-B, 280–315 nm) in 40 mJ/cm² dose as described in our previous reports [15]. Proper UV-B dosage was determined by a UVX Digital Radiometer (UVP Inc., San Gabriel, CA, USA); regularly. Mock treated samples were handled the same way as irradiated ones. Untreated controls cells were taken up at the time of the experiment, while UV-B irradiated and mock treated cells were supplied with 37 °C culture media and were used for experiments at 8, 12, 16, 24, 30, 36 and 48 h as indicated.

2.3. Determination of viable cell numbers

The number of viable cells was determined by measuring the conversion of the tetrazolium salt MTT to formazan (Sigma). Cells were plated in 96-well multititer plates (5000 cells/well density) and were treated with UV-B and, at appropriate times, the cells were incubated with 0.5 mg/mL MTT for 2 h, and the concentration of formazan crystals (as the indicator of number of viable cells) was determined using a colorimetric assay according to the manufacturer's protocol. Data were expressed as mean ± SEM.

2.4. Determination of apoptosis

To detect the rate of apoptosis, the Dead Cell Apoptosis Kit with Annexin V FITC and PI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) was used. Cells were plated in 96 multititer plates with black walls and clear bottoms (5000 cells/well density) after the UV-B irradiation. To detect the total cell number CyQUANT[®] Cell Proliferation Assays (Invitrogen) was used, according to the manufacturer's protocol. To evoke apoptosis 180 µM ATP was administered to the cells. Solution was changed three times after every 12 h. The apoptotic cell number was normalized to the total cell number.

2.5. RT-PCR analysis

For RT-PCR analysis, cells were washed three times with CMF-PBS (calcium magnesium free PBS), scraped, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at –70 °C. Total RNA was isolated from cells using Quiagen RNeasy[®] Micro Kit according to the instructions of the manufacturer (Quiagen, Budapest, Hungary). The assay mixture (20 µL) for reverse transcriptase reaction (Omniscript, Quiagen) contained 500 ng RNA, 0.25 µL RNase inhibitor, 0.25 µL oligo(dT), 1 µL dNTP (200 µM), 1 µL M-MLV RT in 1× RT buffer. Amplifications of specific cDNA sequences were performed with specific primers (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) that were designed based on published purinoreceptor nucleotide sequences (for sequences of primer pairs, see [Supplementary data](#)). PCR reactions were allowed to proceed in a final volume of 50 µL (containing

1 µL forward and reverse primers, 1 µL dNTP [200 µM], and 5 units Promega GoTaq[®] DNA polymerase in 1× reaction buffer) in a programmable thermocycler (Eppendorf Mastercycler, Netheler, Hinz GmbH, Hamburg, Germany) with the following settings: 2 min at 95 °C for initial denaturation followed by repeated cycles of denaturation at 94 °C for 1 min, primer annealing for 60 s at an optimized temperature, and extension at 72 °C for 1 min 30 s. After the final cycle, further extension was allowed to proceed for another 10 min at 72 °C. PCR products were analyzed using a 1.5% agarose gel. The gel was stained with 0.01% ethidium bromide solution for 30 min, and observed in UV light. Image J program (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA) was used for densitometry analysis. Together with the purinoreceptors GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) mRNA expression was also determined and used as internal control.

2.6. Western blot analysis

To determine the expression of different purinoreceptors in cultured cells, the Western blot technique was applied [16]. Cells in cultures were washed with ice-cold PBS, harvested in homogenization buffer (in mmol/L, 20 TRIS-Cl, 5 EGTA, 1 4-(2-aminoethyl) benzenesulphonyl fluoride, 0.02 leupeptin, pH 7.4; all from Sigma) and disrupted by sonication on ice. Protein content of samples was measured by a modified bicinchoninic acid (BCA) protein assay (Pierce, Rockford, IL, USA). Total cell lysates were mixed with sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS–PAGE) sample buffer and boiled for 10 min at 100 °C. The samples were subjected to SDS–PAGE (8% gels were loaded with 40–50 µg protein per lane) and transferred to nitrocellulose membranes (BioRad, Wien, Austria). Membranes were then blocked with 5% dry milk in PBS and probed with the appropriate, primary antibodies overnight (see [Supplementary data](#)). Peroxidase-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (IgG; BioRad) were used as secondary antibodies, and the immunoreactive bands were visualized by an enhanced chemiluminescence (ECL) western blotting detection kit (Amersham, Little Chalfont, England). Image J program was used for densitometry analysis.

2.7. Measuring the changes in intracellular calcium concentration

Changes in [Ca²⁺]_i were monitored using Fura-2, as described in our earlier reports [17,18]. In brief, isolated cells were placed on a coverslip and loaded with 5 µM Fura-2 AM (acetoxy methyl ester) for 60 min. Cells were then equilibrated in Tyrode's solution (in mmol/L, 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 11.8 Hepes–NaOH, 1 g/L glucose, pH 7.4, all from Sigma) for a half an hour at room temperature. Coverslips with Fura-2-loaded cells were placed on the stage of an inverted fluorescence microscope (Diaphot; Nikon, Tokyo, Japan). The excitation wavelength was altered between 340 and 380 nm by a microcomputer-controlled dual-wavelength monochromator (Deltascan; Photon Technology International, New Brunswick, NJ), whereas the emission was monitored at 510 nm using a photomultiplier at 10 Hz acquisition rate of the ratios. [Ca²⁺]_i was calculated from the ratio of measured fluorescence intensities (F_{340}/F_{380}) as described [19]. Cells were continuously washed by Tyrode's solution using a background perfusion system, whereas the investigated agents were applied through a local perfusion system, which is positioned in close proximity to the measured cell.

3. Results

In our case a 1 min long, 40 mJ/cm² UV-B irradiation decreased the number of viable cells as assessed using the MTT assay. [Fig. 1A](#)

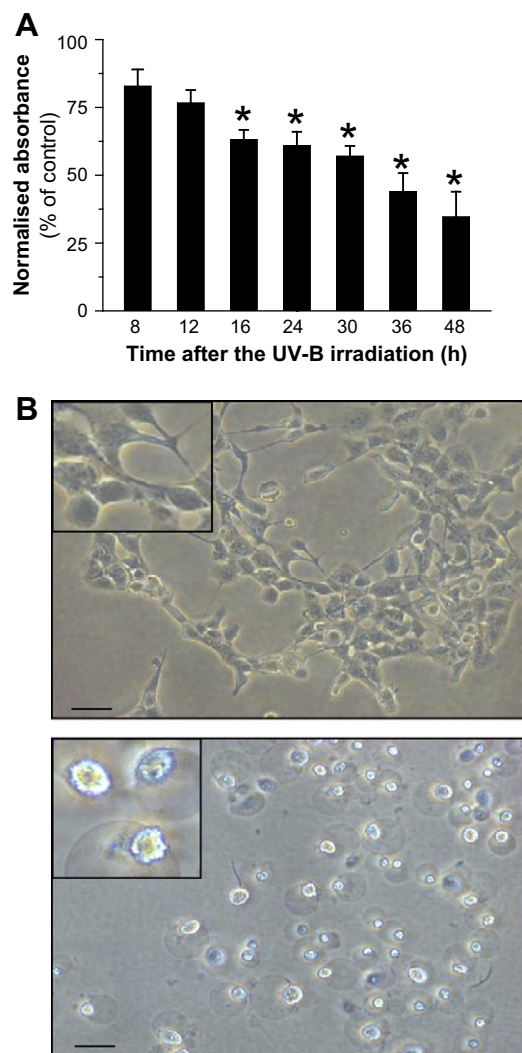


Fig. 1. Examination of cell viability. Effect of UV-B irradiation (1 min, 40 mJ/cm²) on viable cell number and cell morphology. (A) HaCaT cell viability was measured at the times indicated using the MTT assay and expressed as normalized to the non-irradiated (mock) control. Here and in all subsequent figures asterisks indicate significant (**p* < 0.05; ***p* < 0.01) differences as compared to control. (B) Phase contrast images of non-irradiated (upper panel) and irradiated cells 24 h after irradiation. Note the changes in the cell number and especially in morphology. Inserts show enlarged images of selected cells to further the comparison. Scale bars represent 50 μm .

shows that, as measured at several points from 8 h up to 2 days after irradiation, the number of viable cell – expressed as the percent of control – decreased substantially. Albeit not yet significant the decrease was already present 8 h after the irradiation. It became significant after 16 h and reached more than 50% after 24 h. Not only did the number of cells decrease but their morphology was also altered as shown on the phase contrast images of the cells (Fig. 1B). Comparing with the non-irradiated cells, the irradiated cells shrank and lost their extensions.

Cells, nevertheless, responded to challenges of extracellular ATP by elevating their intracellular Ca²⁺ level (Fig. 2). We measured the effect of 180 μM ATP on [Ca²⁺]_i 1 day after the irradiation by administering it to the close proximity of cells. Fig. 2A and B demonstrates that the administration of ATP induced a transient increase in [Ca²⁺]_i in both control and in irradiated cells bathed in Ca²⁺-containing solution. Fig. 2A and B also demonstrates that in the non-irradiated cells the amplitude of the response to the ATP challenge (the change in [Ca²⁺]_i) was higher than in irradiated cells.

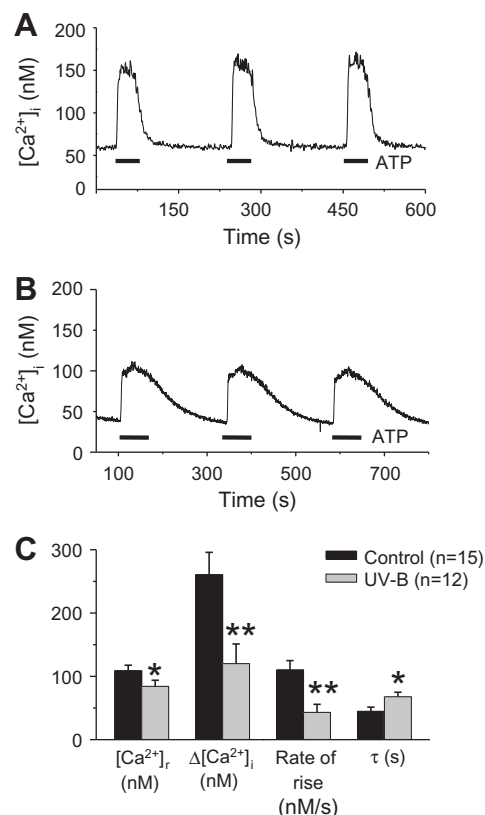


Fig. 2. ATP-induced Ca²⁺ transients. ATP-induced changes in [Ca²⁺]_i in control (untreated) (A) and in irradiated cells (B) bathed in Ca²⁺-containing extracellular solution. Note, that in the non-irradiated cells the amplitude of the ATP-induced Ca²⁺ transient (the change in [Ca²⁺]_i) was higher than in irradiated cells. In addition, in case of the irradiated cells [Ca²⁺]_i returned to its resting level slower than in control cells. (C) Pooled data of the characteristic parameters of ATP-induced Ca²⁺ transients for control and irradiated cells.

In addition, in case of the irradiated cells, after the response to ATP, [Ca²⁺]_i returned to its resting level slower than in control cells. Fig. 2C presents pooled data for control and irradiated cells. Apart from the above mentioned changes, Fig. 2C also demonstrates that the resting calcium level and the maximal rate of rise of the calcium transients were higher in control cells. All these differences were found to be significant. These observations clearly indicate that the purinergic signaling must have been altered in irradiated cells. To explain these alterations the changes in receptor expression was assessed in both RT-PCR and Western blot experiments.

Previous results from our lab identified the P2X₁, P2X₃, P2X₇ and P2Y₂ purinergic receptors as the most important on normal HaCaT cells [14], thus in the followings the changes in the expression patterns of these receptors, especially in that of the proapoptotic P2X₇ receptor, were put in focus. Figs. 3 and 4 demonstrate that after seeding the expression of these receptors followed a characteristic pattern. With Western blot, again, the control and irradiated cells were compared. Both ionotropic and metabotropic purinoreceptors were examined after 8, 12, 24, 36 h of UV-B irradiation (Fig. 3). First the changes in the expression level of the ionotropic purinoreceptors were checked. Fig. 3 demonstrates that except for 8 h after irradiation, where the protein levels seemed to be the same, in every other case the P2X₁ protein level was less in the irradiated cells as compared to control (mock-treated) cells at the same time. In the case of P2X₃ receptor, after the irradiation, an extra band appeared below the P2X₃ protein band. This might indicate that UV-B irradiation damaged some of these receptors. Examining the P2X₇ protein levels we could detect the characteristic (80 kDa) band

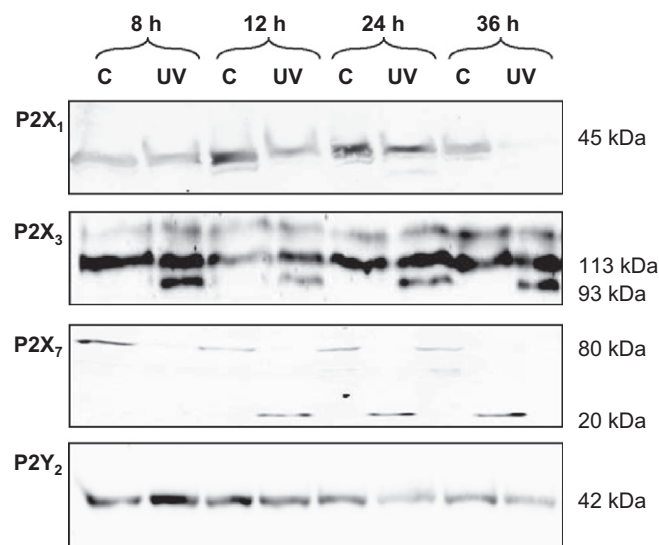


Fig. 3. Western blot experiments. Protein levels of four purinoreceptors – P2X₁, P2X₃, P2X₇ and P2Y₂ – characteristic for HaCaT cells as detected by Western blot 8, 12, 24 and 36 h after UV-B (1 min, 40 mJ/cm²) irradiation. UV-B irradiation usually decreased the protein level as compared to the control (mock-treated). Note the marked degradation in the P2X₇ protein level of HaCaT cells. Except for 8 h after irradiation, we could only detect an approximately 20 kDa band in the UV-B irradiated samples, whereas in control cells we could see the 80 kDa band which is characteristic for the P2X₇ receptor.

for the intact receptor only in the non-irradiated cells. In the irradiated cells we could only detect an approximately 20 kDa band, which could represent the monomeric form of this receptor [10].

Densitometric analysis was carried out on the above mentioned Western blots (Fig. 4). The protein levels of P2X₁ receptor were

significantly decreased in the irradiated cells 12 and 36 h after the irradiation (Fig. 4A). The level of the P2X₃ receptor was significantly higher than in the control cells 8, 12 and 24 h after irradiation (Fig. 4B). In case of P2X₇ receptor, the densitometric analysis was separately made from both 80 kDa and 20 kDa bands. In case of the irradiated cells the 80 kDa band of P2X₇ receptor could not be found at all (Fig. 4Ca). 12, 24 and 36 h after the irradiation the 20 kDa bands of P2X₇ receptor were significantly higher in irradiated cells compared to control cells (Fig. 4Cb). In case of the P2Y₂ receptor 8 h after the irradiation the UV-B exposed cells had significantly more P2Y₂ protein than did the control cells. 24 and 36 h after the irradiation, the P2Y₂ protein level was significantly less in the irradiated as compared to control cells (Fig. 4D).

The mRNA levels of the receptors were checked with RT-PCR (Fig. 5). Except from 24 h after irradiation, where the mRNA levels seemed to be the same in both control and irradiated cells, we detected less P2X₇ receptor mRNA after irradiation. RT-PCR also indicated that after irradiation the P2Y₂ mRNA levels decreased, and after 36 h from the irradiation, the mRNA of this receptor disappeared from the UV-B treated cells (Fig. 5A). Densitometric analysis for these receptors were made by normalizing the bands to that of GAPDH. Fig. 5B demonstrates that the mRNA level of the P2X₇ receptor was significantly higher in the control as compared to the irradiated cells 8, 12 and 36 h after the irradiation. The P2Y₂ mRNA level was significantly lower in the irradiated cells as compared to control after 12, 24 and 36 h of the irradiation (Fig. 5C).

As a next step the rate of apoptosis was measured in control and UV-B irradiated cells using established fluorescence methods. Although equal number of cells were plated, the number of cells at the time of the measurement were different as expected from the results presented in Fig. 1. To correct for this difference the rate of apoptosis was first normalized to cell count. The rate of apoptosis in irradiated cells – in the absence and presence of ATP – was

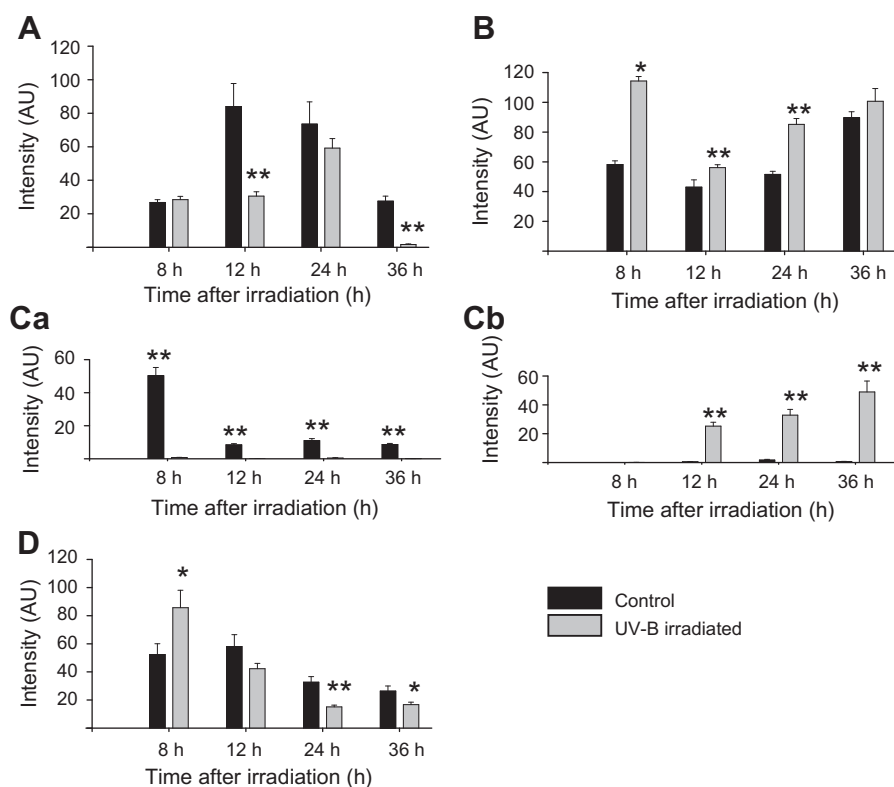


Fig. 4. Densitometric analysis of Western blots. Densitometric analysis of Western blots presented in Fig. 3 (panel A – P2X₁; panel B – P2X₃; panel C – P2X₇; panel D – P2Y₂). Black columns represent the non-irradiated cells (mock-treated), while gray columns show the UV-B irradiated samples. Note that the 80 and 20 kDa bands for the P2X₇ receptor are presented as separate graphs (panel Ca for 80 kDa protein and panel Cb for 20 kDa fragment, respectively).

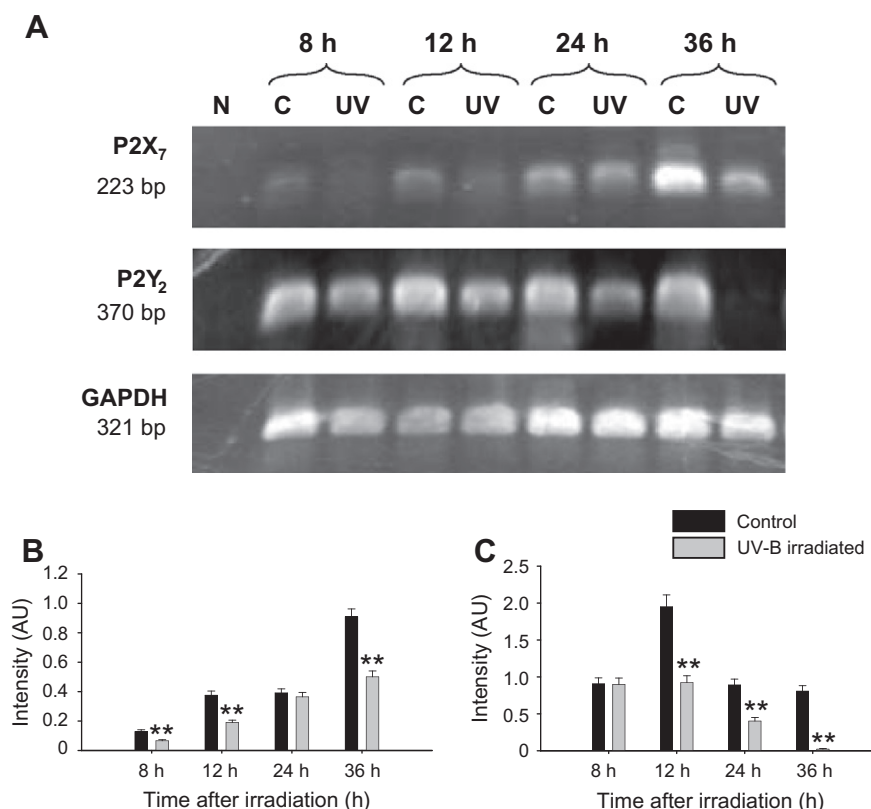


Fig. 5. mRNA measurements. mRNA levels of P2X₇ and P2Y₂ receptors were measured in control (mock-treated) and irradiated cells (A). GAPDH was used as control, and values were normalized to the GAPDH data. Panels B and C present pooled data for the mRNA of P2X₇ and P2Y₂ receptors, respectively, obtained from the densitometric analysis of experiments similar to that in Fig. 4.

then expressed as percentage of the values obtained for non-irradiated cells (Fig. 6). Although already the basal rate of apoptosis (in the absence of ATP) was slightly smaller in UV-B irradiated than in control cells ($78 \pm 19\%$, $n = 8$), this difference did not prove to be statistically significant ($p > 0.2$). On the other hand, if apoptosis was induced by the addition of ATP into the bathing medium (for both non-irradiated and irradiated cells) the rate of apoptosis was significantly smaller in UV-B irradiated cells as compared to non-irradiated (mock-treated) cells ($61 \pm 22\%$, $n = 8$; $p < 0.02$), in line with the absence of functional P2X₇ receptors on these cells.

4. Discussion

In our experiments, we examined how keratinocytes respond to UV-B irradiation in respect to their purinergic calcium signaling.

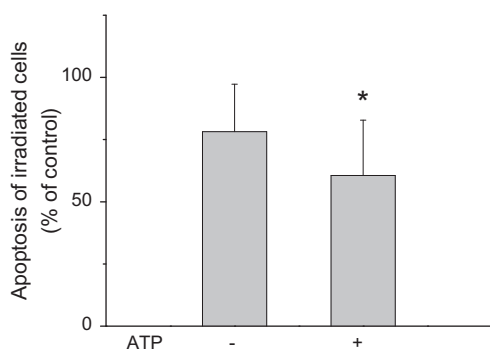


Fig. 6. Apoptosis assay. Rate of apoptosis was measured in control (mock-treated) and UV-B irradiated cells and normalized to total cell count. Values from irradiated samples were expressed as percentage of those obtained under control conditions.

One minute long, 40 mJ/cm^2 UVB irradiation – corresponding to approximately 2–4 minimal erythemal dose in an intact skin [20,21] – was used to check the accompanying changes in the expression levels of purinoreceptors, and the changes in the response of the cells to the extracellular application of ATP. A 1 min long 40 mJ/cm^2 UVB exposure was selected because longer irradiation times resulted in the death of essentially every cell. Similar irradiation time and light intensity was used in our previous measurements concerning gene expression [15], therefore these data are directly comparable to those results. Importantly though, even this low energy exposure to UV-B light decreased the viable cell number significantly as compared to control cells.

In the events of programmed cell death one of the first steps is the increase in the intracellular calcium concentration of the cell. Several studies have linked the activation of purinoreceptors especially that of the P2X₇ receptor [9,22] to the initiation of apoptotic cell death. *In vivo* these purinoreceptors may be activated by ATP coming from other dead cells, or physiologically released from nerves [23], uroepithelial [24] and endothelial [25] cells. In the human squamous cell carcinoma line A431 micromolar concentrations of ATP were mitogenic [26] and increased intracellular calcium levels [27]. ATP has also been shown to activate cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells [28] and in human ovarian tumor cells [29]. Importantly though high concentrations of ATP and BzATP (specific agonist of the P2X₇ receptor) caused a significant decrease in A431 cell number [30]. In our experiments, after irradiation, the P2X₇ receptors were diminished in the cells, and we detected less P2X₇ receptor mRNA. This might indicate that cells which were damaged to some extent but survived the irradiation were not as capable of initiating apoptotic cell death. This in turn could give rise to a population of cells with damaged DNA but low apoptotic capabilities thus enabling malignantly transformed

cells to persist. It should be noted, however, that while DNA damage in the skin is commonly described in association with UV-B irradiation [31] the direct degradation of proteins following exposure to UV-B light is far less frequently observed [32].

Other P2X and P2Y receptors also have important functions in regulating the proliferation and differentiation of cells. The metabotropic P2Y₁ and P2Y₂ receptors were shown to control the proliferation of keratinocytes [8]. When a skin cancer evolves from healthy keratinocytes, the pattern of these purinoreceptors may change. We found that a 1 min long 40 mJ/cm² UV-B irradiation decreased the amount of both P2X₁ and P2Y₂ receptors, while essentially destroyed the P2X₇ receptors. In particular, P2Y₂ receptors have been associated with promoting proliferation in both normal human keratinocytes and in HaCaT cells [33]. In our experiments, we demonstrated that the viable cell number was decreased after the 1 min long 40 mJ/cm² UV-B irradiation, in which the decreased amount of P2Y₂ receptors might also have played a role. Indeed, the experiments revealed that the mRNA of the P2Y₂ receptor was less in the UV-B treated than in control cells, and 36 and 48 h after the irradiation the mRNA of this receptor disappeared from the irradiated cells. Although 8 h after the irradiation the protein level of the P2Y₂ receptor was higher in the UV-B treated than in the control cells, the amount of this receptor was decreased in the UV-B treated cells at every other point in time. By losing much of these receptors, cells could lose the control over the proliferation, differentiation or both, and thus be shifted towards a malignant transformation.

In line with the altered expression of purinoreceptors, differences in the calcium transients obtained in response to challenges with ATP were also observed. The amplitude and the rate of rise of these calcium transients were lower in the irradiated cells, which may reflect the lower amount of purinergic receptors on these cells. The latter might also be caused by the shift from mostly ionotropic (P2X) to partly metabotropic (P2Y) response in the irradiated cells. For [Ca²⁺]_i to return to its resting level took longer times in the irradiated cells. This could indicate that other proteins, for example the calcium pump was also damaged by UV-B irradiation. This notion should, however, be taken with caution since resting [Ca²⁺]_i was lower in irradiated than in control cells.

Acknowledgements

The authors wish to thank Vargáné Kiss Ibolya for the excellent technical assistance. This work was supported by Grants from the Hungarian Science Fund (OTKA NK78398 and K68401), ETT (186/09), and TÁMOP 4.2.2.-08/1-2008-0019.

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jphotobiol.2011.07.009](https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.07.009).

References

- [1] S.D. Worswick, M. Cockburn, D. Peng, Measurement of ultraviolet exposure in epidemiological studies of skin and skin cancers, *Photochem. Photobiol.* 84 (2008) 1462–1472.
- [2] W. Ambach, M. Blumthaler, Biological effectiveness of solar UV radiation in humans, *Experientia* 49 (1993) 747–753.
- [3] C. Perlis, M. Herlyn, Recent advances in melanoma biology, *Oncologist* 9 (2004) 182–187.
- [4] D. Bettega, P. Calzolari, F. Belloni, F. Di Lena, S. Genchi, M. Lupi, P. Massariello, S. Orsini, L. Tallone, D. Tomasoni, P. Ubezio, J.L. Redpath, Solar UV radiation: differential effectiveness of UVB subcomponents in causing cell death, micronucleus induction and delayed expression of heritable damage in human hybrid cells, *Int. J. Radiat. Biol.* 77 (2001) 963–970.
- [5] P. Erb, J. Ji, E. Kump, A. Mielgo, M. Wernli, Apoptosis and pathogenesis of melanoma and nonmelanoma skin cancer, *Adv. Exp. Med. Biol.* 624 (2008) 283–295.
- [6] F.M. Lyng, C.B. Seymour, C. Mothersill, Early events in the apoptotic cascade initiated in cells treated with medium from the progeny of irradiated cells, *Radiat. Prot. Dosimetry* 99 (2002) 169–172.
- [7] Y. Pu, D.C. Chang, Cytosolic Ca²⁺ signal is involved in regulating UV-induced apoptosis in HeLa cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 282 (2001) 84–89.
- [8] A.V. Greig, C. Linge, G. Terenghi, D.A. McGrouther, G. Burnstock, Purinergic receptors are part of a functional signaling system for proliferation and differentiation of human epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 120 (2003) 1007–1015.
- [9] A. Surprenant, F. Rassendren, E. Kawashima, R.A. North, G. Buell, The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X₇), *Science* 272 (1996) 735–738.
- [10] D. Becker, R. Woltersdorf, W. Boldt, S. Schmitz, U. Braam, G. Schmalzing, F. Markwardt, The P2X₇ carboxyl tail is a regulatory module of P2X₇ receptor channel activity, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 25725–25734.
- [11] S. Taboubi, F. Garrouste, F. Parat, G. Pommier, E. Faure, S. Monferran, H. Kovacic, M. Lehmann, Gq-coupled purinergic receptors inhibit insulin-like growth factor-I/phosphoinositide 3-kinase pathway-dependent keratinocyte migration, *Mol. Biol. Cell* 21 (2010) 946–955.
- [12] P. Boukamp, R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, N.E. Fusenig, Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line, *J. Cell Biol.* 106 (1988) 761–771.
- [13] M. Gönczi, N. Szentandrassy, L. Fülöp, A. Telek, G.P. Szegedi, J. Magyar, T. Bíró, P.P. Nánási, L. Csernoch, Hypotonic stress influence the membrane potential and alter the proliferation of keratinocytes in vitro, *Exp. Dermatol.* 16 (2007) 302–310.
- [14] M. Gönczi, A. Telek, G. Czifra, A. Balogh, P.M. Blumberg, T. Bíró, L. Csernoch, Altered calcium handling following the recombinant overexpression of protein kinase C isoforms in HaCaT cells, *Exp. Dermatol.* 17 (2008) 584–591.
- [15] A. Balogh, G. Paragh Jr., A. Juhász, T. Köbling, D. Töröcsik, E. Mikó, V. Varga, G. Emri, I. Horkay, B. Scholtz, E. Remenyik, Reference genes for quantitative real time PCR in UVB irradiated keratinocytes, *J. Photochem. Photobiol. B* 93 (2008) 133–139.
- [16] H. Papp, G. Czifra, J. Lázár, M. Gönczi, L. Csernoch, L. Kovács, T. Bíró, Protein kinase C isoenzymes regulate proliferation and high cell density-mediated differentiation in HaCaT keratinocytes, *Exp. Dermatol.* 12 (2003) 811–824.
- [17] H. Szappanos, J. Cseri, T. Deli, L. Kovács, L. Csernoch, Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture, *J. Biochem. Biophys. Methods* 59 (2004) 89–101.
- [18] A. Szűcs, H. Szappanos, A. Tóth, Z. Farkas, G. Panyi, L. Csernoch, I. Sziklai, Differential expression of purinergic receptor subtypes in the outer hair cells of the guinea pig, *Hear Res.* 196 (2004) 2–7.
- [19] G. Grynkiewicz, M. Poenie, R.Y. Tsien, A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties, *J. Biol. Chem.* 260 (1985) 3440–3450.
- [20] J. Shorrocks, N.D. Paul, T.J. McMillan, The dose rate of UVA treatment influences the cellular response of HaCaT keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 685–693.
- [21] Y. Furusawa, L.E. Quintern, H. Holtschmidt, P. Koepke, M. Saito, Determination of erythema-effective solar radiation in Japan and Germany with a spore monolayer film optimized for the detection of UVB and UVA – results of a field campaign, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 (1998) 597–603.
- [22] J.N. Tran, A. Pupovac, R.M. Taylor, J.S. Wiley, S.N. Byrne, R. Sluyter, Murine epidermal Langerhans cells and keratinocytes express functional P2X₇ receptors, *Exp. Dermatol.* 19 (2010) e151–157.
- [23] B. Sperlágh, A. Kittel, A. Lajtha, E.S. Vizi, ATP acts as fast neurotransmitter in rat habenula: neurochemical and enzyme cytochemical evidence, *Neuroscience* 66 (1995) 915–920.
- [24] D.R. Ferguson, Urothelial function, *BJU Int.* 84 (1999) 235–242.
- [25] P. Bodin, G. Burnstock, Increased release of ATP from endothelial cells during acute inflammation, *Inflam. Res.* 47 (1998) 351–354.
- [26] N. Huang, D.J. Wang, L.A. Heppel, Extracellular ATP is a mitogen for 3T3, 3T6, and A431 cells and acts synergistically with other growth factors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 7904–7908.
- [27] F.A. Gonzalez, D.J. Gross, L.A. Heppel, W.W. Webb, Studies on the increase in cytosolic free calcium induced by epidermal growth factor, serum, and nucleotides in individual A431 cells, *J. Cell. Physiol.* 135 (1988) 269–276.
- [28] C.J. Dixon, W.B. Bowler, P. Fleetwood, A.F. Ginty, J.A. Gallagher, J.A. Carron, Extracellular nucleotides stimulate proliferation in MCF-7 breast cancer cells via P2-purinoreceptors, *Br. J. Cancer* 75 (1997) 34–39.
- [29] L.D. Popper, S. Batra, Calcium mobilization and cell proliferation activated by extracellular ATP in human ovarian tumour cells, *Cell Calcium* 14 (1993) 209–218.
- [30] A.V. Greig, C. Linge, V. Healy, P. Lim, E. Clayton, M.H. Rustin, D.A. McGrouther, G. Burnstock, Expression of purinergic receptors in non-melanoma skin cancers and their functional roles in A431 cells, *J. Invest. Dermatol.* 121 (2003) 315–327.
- [31] F.R. de Gruij, L. Rebel, Early events in UV carcinogenesis – DNA damage, target cells and mutant p53 foci, *Photochem. Photobiol.* 84 (2008) 382–387.
- [32] M.A.K. Jansen, V. Gaba, B.M. Greenberg, A.K. Mattoo, M. Edelman, Low threshold levels of ultraviolet-B in a background of photosynthetically active radiation trigger rapid degradation of the D2 protein of photosystem-II, *Plant J.* 9 (1996) 693–699.
- [33] H.E. Burrell, W.B. Bowler, J.A. Gallagher, G.R. Sharpe, Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: evidence for functional P2Y₁, P2Y₂, and P2Y₄ receptors, *J. Invest. Dermatol.* 120 (2003) 440–447.

Differential Effects of Phosphatase Inhibitors on the Calcium Homeostasis and Migration of HaCaT Keratinocytes

Olga Ruzsnavszky^{1*}, Beatrix Dienes^{1*}, Tamás Oláh¹, János Vincze¹, Tamás Gáll¹, Enikő Balogh⁴, Gábor Nagy³, Róbert Batori², Beáta Lontay², Ferenc Erdődi², Laszlo Csernoch^{1*}

1 Department of Physiology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, **2** Department of Medical Chemistry, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, **3** Department of Microbial Biotechnology and Cell Biology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, **4** 1st Department of Internal Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary

Abstract

Changes in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) as well as in the phosphorylation state of proteins have been implicated in keratinocyte wound healing revealed in scratch assays. Scratching confluent HaCaT monolayers decreased the number of cells displaying repetitive Ca^{2+} oscillations as well as the frequency of their Ca^{2+} -transients in cells close to the wounded area and initiated migration of the cells into the wound bed. In contrast, calyculin-A (CLA) and okadaic acid (OA), known cell permeable inhibitors of protein phosphatase-1 and 2A, increased the level of resting $[Ca^{2+}]_i$ and suppressed cell migration and wound healing of HaCaT cells. Furthermore, neither CLA nor OA influenced how scratching affected Ca^{2+} oscillations. It is assumed that changes in and alterations of the phosphorylation level of Ca^{2+} -transport and contractile proteins upon phosphatase inhibition mediates cell migration and wound healing.

Citation: Ruzsnavszky O, Dienes B, Oláh T, Vincze J, Gáll T, et al. (2013) Differential Effects of Phosphatase Inhibitors on the Calcium Homeostasis and Migration of HaCaT Keratinocytes. PLoS ONE 8(4): e61507. doi:10.1371/journal.pone.0061507

Editor: Marcello Rota, Brigham & Women's Hospital - Harvard Medical School, United States of America

Received: November 27, 2012; **Accepted:** March 10, 2013; **Published:** April 30, 2013

Copyright: © 2013 Ruzsnavszky et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by TÁMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0024 project (co-financed by the European Union and the European Social Fund) and TÁMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0025 project (co-financed by the Hungarian Republic and the European Social Fund). Research grants from the Hungarian National Science Fund (OTKA NK78398, K75604 and CNK80709) and the Baross Gabor project (REG_EA_INFRA_09, LSM_LIVE) also supported the work. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Laszlo Csernoch is one of the Academic Editors of PLOS ONE. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

* E-mail: csl@edu.unideb.hu

These authors contributed equally to this work.

Introduction

In mammalian cells changes in intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) control a wide variety of functions, including proliferation, secretion, motility and contractility [1]. Rapid Ca^{2+} transients are required for fast cellular processes, like synaptic transmission and muscle contraction, while slower Ca^{2+} responses – as repetitive Ca^{2+} transients and waves – are responsible for gene transcription and cell proliferation. Calcium ions underlying Ca^{2+} oscillations are released from the endoplasmic reticulum (ER) via inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3R) and ryanodine receptors (RyR), and often spread through the cytoplasm as a regenerative Ca^{2+} wave [2]. This phenomenon is well-known in excitable cells, but some non-excitable cells, such as endothelial cells [3], osteoblasts [4], and chondrocytes [5] were also shown to display calcium oscillations.

Activity of the Ca^{2+} release channels responsible for Ca^{2+} oscillations can be increased or decreased depending on their phosphorylation state. The serine/threonine protein phosphatases 1 and 2A (PP1 and PP2A) have been found to co-purify with protein kinase A (PKA) and IP_3R , which is reminiscent of their interaction with RyR2 in heart muscle. The presence of PP1 and PP2A ensures a tight regulation of the phosphorylation status of

the receptor and, therefore, its activity [2]. The ability of PP1 to dephosphorylate RyR was demonstrated in both skeletal and cardiac muscle [6], which could indicate that a similar complex exists not only in heart muscle, but in other cell types as well, with the involvement of RyR1 and/or IP_3R .

Several inhibitors were used to study the role of protein phosphatases. Calyculin A (CLA) inhibits the activity of both PP1 and PP2A with similar effectiveness in *in vitro* assays, while okadaic acid (OA) reduces PP2A activity with higher efficiency than that of PP1. Neither calyculin A nor okadaic acid inhibit acid or alkaline phosphatases or phosphotyrosine protein phosphatases [7,8].

Albeit protein kinase and phosphatase enzymes together with the changes in $[Ca^{2+}]_i$ have been implicated to possess a significant role in the regulation of cell migration their interaction has not been studied in wound healing. During wound healing, keratinocytes initiate migration from the wound edge by extending lamellipodia into a fibronectin-rich provisional matrix, which was enhanced by protein-serine/threonine kinase inhibitors [9]. In contrast, okadaic acid which can increase the phosphorylation level of myosin II, together with an increased stress fiber formation was shown to decrease hepatic cell migration [10]. On human primary keratinocytes, when epidermal growth factor receptors were activated and the phosphorylation of extracellular signal-

related kinase (ERK) was increased cell migration and wound healing was enhanced. Similarly, during β_2 adrenergic receptor stimulation, when PP2A was activated and ERK was dephosphorylated, the extent of cell migration was decreased. On the other hand, inhibition of PP2A by 10 nM okadaic acid resulted in an increased extent of migration [11].

In fish keratinocytes migration can be stopped with a burst increase of $[Ca^{2+}]_i$ [12] and it was suggested that the endogenous Ca^{2+} -transients occurring during Ca-oscillations may exert a resensitization-desensitization control during substrate guided movements of keratinocytes. Similar results were obtained with human primary keratinocytes where the Ca^{2+} uptake via nicotinic acetylcholine (ACh) receptors caused the decrease of the migratory distance of the cells [13]. Phosphatase inhibitors as OA and CLA were shown to potentiate the thapsigargin-induced elevation in $[Ca^{2+}]_i$ in human neutrophils [14], although it was not evident whether these effects were due to their phosphatase inhibitory action. Arachidonic acid (AA)-induced Ca^{2+} release and entry was enhanced by both CLA and tautomycin (TM) in parotid acini, while OA had no influence on the release but inhibited entry [15]. Similarly, CLA augmented twitch Ca^{2+} -transients and cell shortenings in both control and isoproterenol-treated cardiac myocytes [16]. The above findings imply that the changes in $[Ca^{2+}]_i$ and phosphorylation of key proteins (by activating kinases or inhibiting phosphatases) may be interrelated and their combined effect might mediate cell migration.

In our experiments migration and proliferation of HaCaT keratinocytes in the presence and absence of phosphatase inhibitors (CLA and OA) were tested following a scratch of confluent cells. Spontaneous Ca^{2+} oscillations were observed and analyzed in unscratched cells and cells next to the scratch. In the latter increased resting $[Ca^{2+}]_i$ and decreased oscillations could be observed. Phosphatase inhibitors increased both the extent of spontaneous Ca^{2+} oscillations and the resting $[Ca^{2+}]_i$, while they decreased migration of the cells. These results suggest that protein phosphatases and oscillatory changes in $[Ca^{2+}]_i$ have distinct roles in keratinocyte migration.

Materials and Methods

1. Culturing HaCaT keratinocytes

HaCaT keratinocytes [17] were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, Budapest, Hungary) supplemented with 2 mmol/L L-glutamine, 10% fetal calf serum (Sigma) and antibiotics (50 NE/ml penicillin, 50 μ g/ml streptomycin and 1.25 μ g/ml fungizone) at 37°C temperature in a 5% CO₂ atmosphere as described in our previous reports [18].

2. Measuring the intracellular calcium concentration

Resting $[Ca^{2+}]_i$ was monitored using Fura-2, as described in our earlier reports [19]. In brief, cells were placed on a glass coverslip and loaded with 10 μ M Fura-2 AM (acetoxymethyl ester) for 60 minutes. Cells were then equilibrated in Tyrode's solution (in mmol/L, 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.5 MgCl₂, 1.8 CaCl₂, 11.8 Hepes-NaOH, 1 g/L glucose, pH 7.4, all from Sigma) for 30 min at room temperature. Cells were incubated with CLA (10 nM) for 1 hour, or with OA (50 nM) for 2 hours before the measurements, and during the experiments cells were bathed continuously in these phosphatase inhibitors. The scratch was made with a sterile 10 μ l pipette tip in the confluent culture. Coverslips with Fura-2-loaded cells were placed on the stage of an inverted fluorescent microscope (Diaphot; Nikon, Tokyo, Japan). The excitation wavelength was changed between 340 and 380 nm by a microcomputer-controlled dual-wavelength monochromator (Del-

tascan; Photon Technology International, New Brunswick, NJ), whereas the emission was monitored at 510 nm using a photomultiplier at 10 Hz acquisition rate of the ratios. $[Ca^{2+}]_i$ was calculated from the ratio of fluorescence intensities ($R = F_{340}/F_{380}$) using an in vivo calibration ($R_{min} = 0.2045$, $R_{max} = 8.315$, $K_d \beta = 1183$) as described [20]. All measurements were performed at room temperature.

3. Confocal measurements

Calcium transients were monitored with LSM 5 Live confocal laser scanning microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany). The protocol described earlier [21] was followed. In brief, cells were incubated with 10 μ M Fluo-4-AM for 30 min at 37°C. Calcium imaging was performed in normal Tyrode's solution, and Tyrode's solution supplemented with the phosphatase inhibitors CLA (10 nM) or OA (50 nM).

Two dimensional (x-y) images were used to monitor the fluorescence intensity of the cultures. Series of x-y images were recorded using a 40 $\times$ oil immersion objective with 2 frames/second scan speed. The resolution was 512 $\times$ 512 pixels. Fluo-4 was excited with an argon ion laser. All measurements were performed at room temperature.

4. Data analysis and statistics

Series of x-y images were analyzed using ImageJ and a custom-developed computer program. All cells were manually marked as region of interest (ROI) in case of each image series in ImageJ. Time-series data containing the mean fluorescence values for each ROI on each frame were exported for further analysis by the custom-developed program.

As the first step of the analysis normalized fluorescence values ($F_n = F/F_0$) were calculated. For each ROI F_0 values were determined as the mean of fluorescence values not corresponding to an event (not exceeding the mean fluorescence for the given ROI across the frames by more than 40% of the standard deviation of the same values). The normalized time-series data were analyzed independently for each ROI.

One-dimensional stationary wavelet transform was applied as described by Szabó et al. [22]. In brief, this transformation separates the original signal into higher and lower frequency components in an optimal way. These components are called wavelet levels: W_i denotes the i -th level; lower indexed levels correspond to higher frequency components. The first wavelet level, containing almost exclusively high-frequency noise, was removed from the signal. The low-pass filtered signal after the 8th of the wavelet transform was used as a background signal and all normalized values were divided by this background signal before further analysis in order to remove slow changes of fluorescence level in the ROI not caused by the studied spontaneous transients.

The 4th and 5th wavelet levels were used to detect events. An event was identified in a ROI on the given frame if at least one of the corresponding W_4 and W_5 values was higher than a preset threshold (0.01). Contiguous regions of such points were extended to the nearest local minima on F_n and these regions were considered events for further analysis.

5. Time-lapse photography

An inverse microscope was equipped with a high sensitivity video camera, and was connected to a custom-built image acquisition computer system as described earlier [23]. Custom-designed illumination was developed to minimize heat- and photo-toxicity. Operation of the spectrally warm-white light emitting diodes was synchronized with image acquisition periods. Cell cultures on glass coverslips, in Petri dishes were placed on the

microscope. Photographs were taken in every minute. The time of the exposure was indicated in each frame. Snapshots were converted into video films by speeding up the projection to 30 exposures/s. Individual photographs were selected as they are shown in the figures. The measurements were performed at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere.

6. Cell migration assay

Cell migration was measured by using fibronectin-coated (FN) Quantitative Cell Migration Assay following the procedure provided by the manufacturer (Merck Millipore, Budapest, Hungary). Briefly, HaCaT cells were starved 18 hours prior passage in serum free DMEM medium. 2.5×10^5 cells were plated on BSA (as control) and FN-coated membrane in Boyden Chamber. DMEM culture medium completed with 20% FBS was applied in the lower chamber. Cells were incubated in the absence or in the presence of 50 nM OA and 10 nM CLA for 18 hours. Migration of the cells to the other side of the membrane was assessed by measuring the optical density of dye infiltrated cells at 540 nm in a plate reader.

7. Statistical methods

Averages are presented as mean $\pm$ standard error of the mean. Statistical analysis was performed using SigmaStat (Aspire Software International, Ashburn, VA, USA). Most of the observed data failed to show normal distribution ($p < 0.05$), therefore nonparametric tests were used to assess the significance of differences. Significance of differences between non-scratched and scratched groups was assessed by the Mann-Whitney U test. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks was carried out to determine whether there were significant differences between more than two groups and subsequently an appropriate post-hoc test was used for pairwise comparisons. Ratios resulting from repeated measurements on the same coverslips showed normal distribution and were therefore analyzed using the parametric One Way Analysis of Variance. Differences were regarded significant at $p < 0.05$.

Results

In our experiments spontaneous calcium transients of HaCaT keratinocytes were observed. The changes in calcium oscillations upon physical damage to neighbouring cells (i. e. scratch) followed by wound healing were investigated. The effects of two different phosphatase inhibitors (CLA and OA) were also studied on the wound healing and calcium homeostasis of the cultures.

1. Characterization of spontaneous calcium oscillations of HaCaT keratinocytes

Series of x-y images were recorded both on Fluo-4 loaded control and drug treated cultures, then these cultures were scratched with a pipette tip and cells next to the wound were examined in the same way. 500 images with 500 ms intervals were taken from 3–6 different visual fields of each culture before and after scratching. ROIs were selected on every individual cell, and the number of oscillating cells and characteristics of the oscillations were determined with a custom-developed computer program.

Confluent HaCaT keratinocyte cultures displayed slow and repetitive spontaneous $[Ca^{2+}]_i$ transients as observed by confocal laser scanning microscopy. Figure 1 displays images of an unscratched (Fig. 1A) and scratched (Fig. 1B) area from the HaCaT keratinocyte monolayer with arrows pointing to cells presenting elevations in $[Ca^{2+}]_i$ (calcium oscillations) at

different timepoints. Note that not only cells marked by arrows but others as well presented clear changes in fluorescence intensity.

Figure 1C, D present the time course of fluorescence change in representative cells from non-scratched (Fig. 1C) and scratched (Fig. 1D) cultures. Note the slow waves representing oscillatory changes in $[Ca^{2+}]_i$. Similar observations were made in case of the application of CLA and OA. For comparison, Figure 1E shows the time course of fluorescence intensity of a non-oscillating cell. In all cases fluorescence was expressed as normalised to resting fluorescence (F_0).

To assess the underlying mechanisms responsible for the Ca^{2+} oscillations we tested a number of chemical agents known to either block the IP₃R (large concentration of tetracaine, low concentration of Xestospongine C) or RyR (low concentration of tetracaine) and the Ca^{2+} ATPase of the endoplasmic reticulum (thapsigargin). Figure 1F and G show, respectively, the percentage of oscillating cells and the frequency of oscillations under control conditions and in the presence of 200 μ M or 1 mM tetracaine, 10 μ M Xestospongine C, and 4 or 10 μ M thapsigargin.

Tetracaine in the concentration assumed to affect only RyR neither influenced the percentage of oscillating cells nor the frequency of oscillations. On the other hand, both Xestospongine C, and tetracaine in 1 mM, where it is known to inhibit the IP₃R as well, significantly reduced both parameters. Similar observation was made with 10 μ M thapsigargin. These results indicate that IP₃R mediated Ca^{2+} release plays an important role in the generation of spontaneous oscillations of HaCaT keratinocytes.

1.1. The rate of oscillation of scratched cultures. In control cultures the percentage of oscillating cells (Fig. 2A) decreased significantly ($p < 0.05$) in scratched cultures near the scratch as compared to before scratching ($50.7 \pm 4.5\%$, $n = 42$, in unscratched cultures and $23.5 \pm 5.4\%$, $n = 39$, near the scratch; n = the number of fields of view). In case of CLA or OA treated cultures this significant difference was also observable between the corresponding scratched and unscratched cultures ($61.1 \pm 5.1\%$, $n = 29$, in unscratched cultures and $43.3 \pm 6.4\%$, $n = 20$, near the scratch; $69.9 \pm 3.8\%$, $n = 35$, in unscratched cultures and $43.7 \pm 6.9\%$, $n = 29$, near the scratch, respectively). In other words, cells near the scratch were less likely to display calcium oscillations independent of the presence or absence of phosphatase inhibitors.

Note, on the other hand, that the ratio of oscillating cells was significantly higher in cells treated with phosphatase inhibitors both before and after the scratch. This was true for all cases except for the unscratched control *vs* unscratched CLA treated cultures, where, albeit the tendency was present, the significance was not reached. These observations clearly suggest that while neither CLA nor OA influenced the effect of scratching, they both interfered with the basic mechanism responsible for the generation of the spontaneous increases in $[Ca^{2+}]_i$.

Not only the percentage of the oscillating cells but also the frequency of calcium oscillations (Fig. 2B) was significantly lower in the scratched control cells ($8.8 \pm 1.5 \times 10^{-3}$ Hz, $n = 27$) than in the unscratched control ($10.7 \pm 0.6 \times 10^{-3}$ Hz, $n = 42$) ($p < 0.05$). The presence of the phosphatase inhibitors did not alter significantly the frequency of oscillations as measured before and after the scratch was made ($11.7 \pm 0.9 \times 10^{-3}$ Hz, $n = 29$ in unscratched, and $9.9 \pm 1.2 \times 10^{-3}$ Hz, $n = 17$ in scratched, CLA treated; and $12.0 \pm 0.6 \times 10^{-3}$ Hz, $n = 35$ in unscratched, and $10.5 \pm 1.0 \times 10^{-3}$ Hz, $n = 18$ in scratched, OA treated cells). Nevertheless the same tendency was present in untreated and in CLA and OA treated cells, namely, the frequency of calcium transients was less in cells next to the scratch as compared to cells

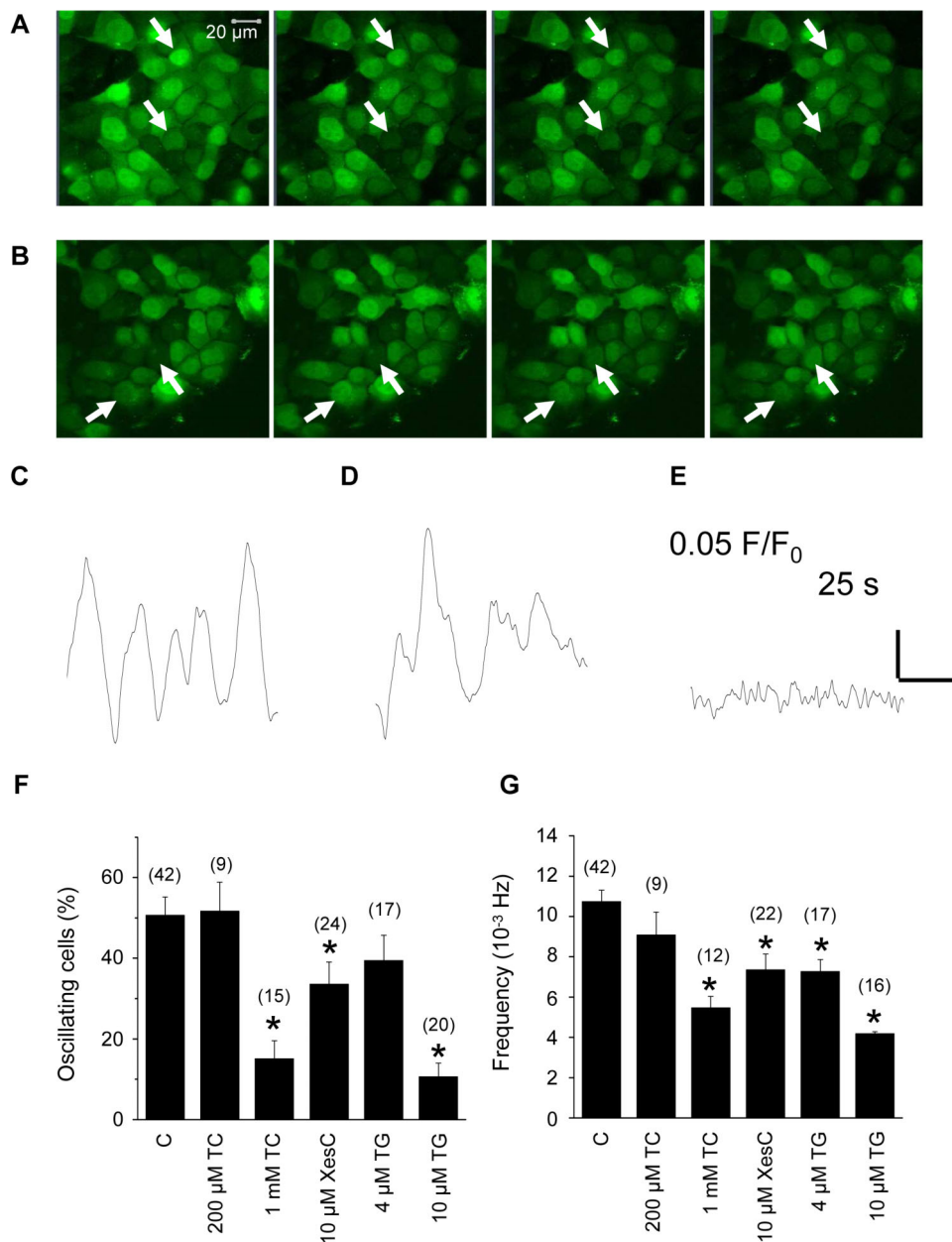


Figure 1. Spontaneous Ca^{2+} oscillations of keratinocyte cultures. Series of confocal x-y images showing the spontaneous Ca^{2+} oscillations of a representative keratinocyte culture without scratch (A) and a culture after scratch (B). Arrows show examples of oscillating cells. Calibration was the same in all images. Original magnification was 40 $\times$. Representative curves showing the fluorescence intensity of a single cell from a non-scratched culture (C) and from a cell next to the scratch (D). Cultures were imaged by confocal microscopy, sampling rate was 2 Hz. For reference, panel E represents the time course of fluorescence ratio of a cell with no spontaneous oscillations. Percentage of oscillating cells (F) and average frequency of oscillations (G) under control conditions and in the presence of 200 μ M or 1 mM tetracaine, 10 μ M Xestospongin C, and 4 or 10 μ M thapsigargin. doi:10.1371/journal.pone.0061507.g001

from unscratched cultures. Furthermore, the presence of phosphatase inhibitors also raised the frequency of oscillations in cells from both unscratched and scratched cultures as compared to control cells, although these differences were not significant (Fig. 2B). For better comparison the percentage of the oscillating cells and the frequency of oscillations for the cells next to the scratch are also shown after normalized to the values obtained for cells from non-scratched areas (Fig. 2C and 2D, respectively). The ratio of cells showing Ca^{2+} -oscillations next to the scratch was higher in the presence of phosphatase inhibitors than under control conditions.

1.2. Effect of phosphatase inhibitors and scratching on the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was measured in Fura-2 loaded control and phosphatase inhibitor treated cells (Fig. 2E; 49 ± 2 nM, $n = 74$ in unscratched control, 62 ± 3 nM, $n = 75$ in CLA treated, and 52 ± 2 nM, $n = 75$ in OA treated cells). After scratching the resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ of the cells near the scratch was significantly higher in all three cases as compared to unscratched cultures (96 ± 3 nM, $n = 69$ in scratched control, 97 ± 3 nM, $n = 70$ in CLA treated, and 104 ± 4 nM, $n = 69$ in OA treated cells).

1.3. Characterisation of the Ca^{2+} transients. Two basic characteristics, the *amplitude* and the *Full Time at Half Maximum*

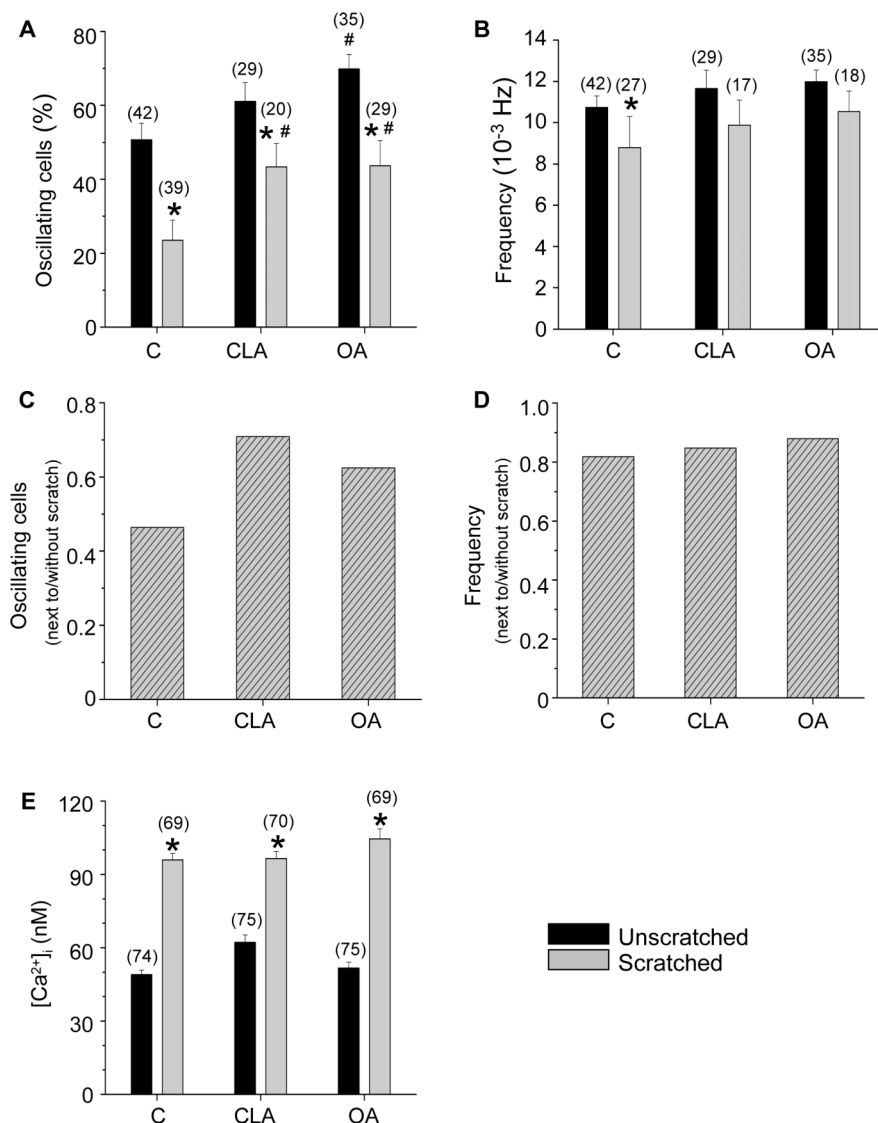


Figure 2. Effect of phosphatase inhibitors on the spontaneous calcium oscillations and $[Ca^{2+}]_i$ of the keratinocytes. Percentage of oscillating cells in control, CLA treated, and OA treated cultures (A). Average frequency of calcium oscillations in those cells where such oscillations could be observed (B). Percentage of oscillating cells (C) and the frequency of oscillations (D) calculated as a ratio from corresponding values obtained from cells next to the scratch and in cells from non-scratched areas. Resting $[Ca^{2+}]_i$ of control, CLA treated, and OA treated cells (E). Numbers in parentheses give either the number of cells (E) or the number of fields of view (A, B), measured. (C: control, CLA: calyculin A, OA: okadaic acid). * $p < 0.05$, unscratched vs scratched, # $p < 0.05$, control vs phosphatase inhibitor. doi:10.1371/journal.pone.0061507.g002

(FTHM) of the individual spontaneous Ca^{2+} transients were examined. The former was calculated as the change in fluorescence intensity ($\Delta F/F_0$) and is a measure of the change in $[Ca^{2+}]_i$, while the latter was determined as the duration time of the transients at the half of the amplitude, and correlates with the duration of the Ca^{2+} transients.

In unscratched cultures the amplitudes of the spontaneous Ca^{2+} transients were significantly higher in the presence of phosphatase inhibitors than in control cultures (control: 0.082 ± 0.001 , CLA: 0.096 ± 0.002 , OA: 0.089 ± 0.001), while no such increase was observable analyzing the data of cells next to the scratch (control: 0.093 ± 0.008 , CLA: 0.079 ± 0.006 , OA: 0.090 ± 0.004). Furthermore, except for the CLA treated cells, the difference between the amplitude values measured in non-scratched cultures and in cells near the scratch was not significant (Fig. 3).

In control and in OA treated cultures the FTHM values were significantly higher in the vicinity of the scratch as compared to untouched areas (non-scratched control: 12.6 ± 0.2 s, OA: 13.4 ± 0.2 s; scratched control: 15.4 ± 0.9 s, OA: 16.2 ± 1.1 s). This difference was not statistically significant in case of CLA treated cells (non-scratched: 11.8 ± 0.2 s, scratched: 11.5 ± 0.6 s). In unscratched cultures CLA treatment decreased, while OA treatment increased the FTHM values. In cells near the scratch, the CLA treatment decreased significantly, while OA treatment did not change the FTHM values as compared to the control (Fig. 4).

The influence of the scratching on both parameters was parallel in control cultures, i.e. the amplitude as well as the FTHM increased. After the treatment by phosphatase inhibitors the measured values of these parameters (except for CLA treatment on FTHM) were also augmented.

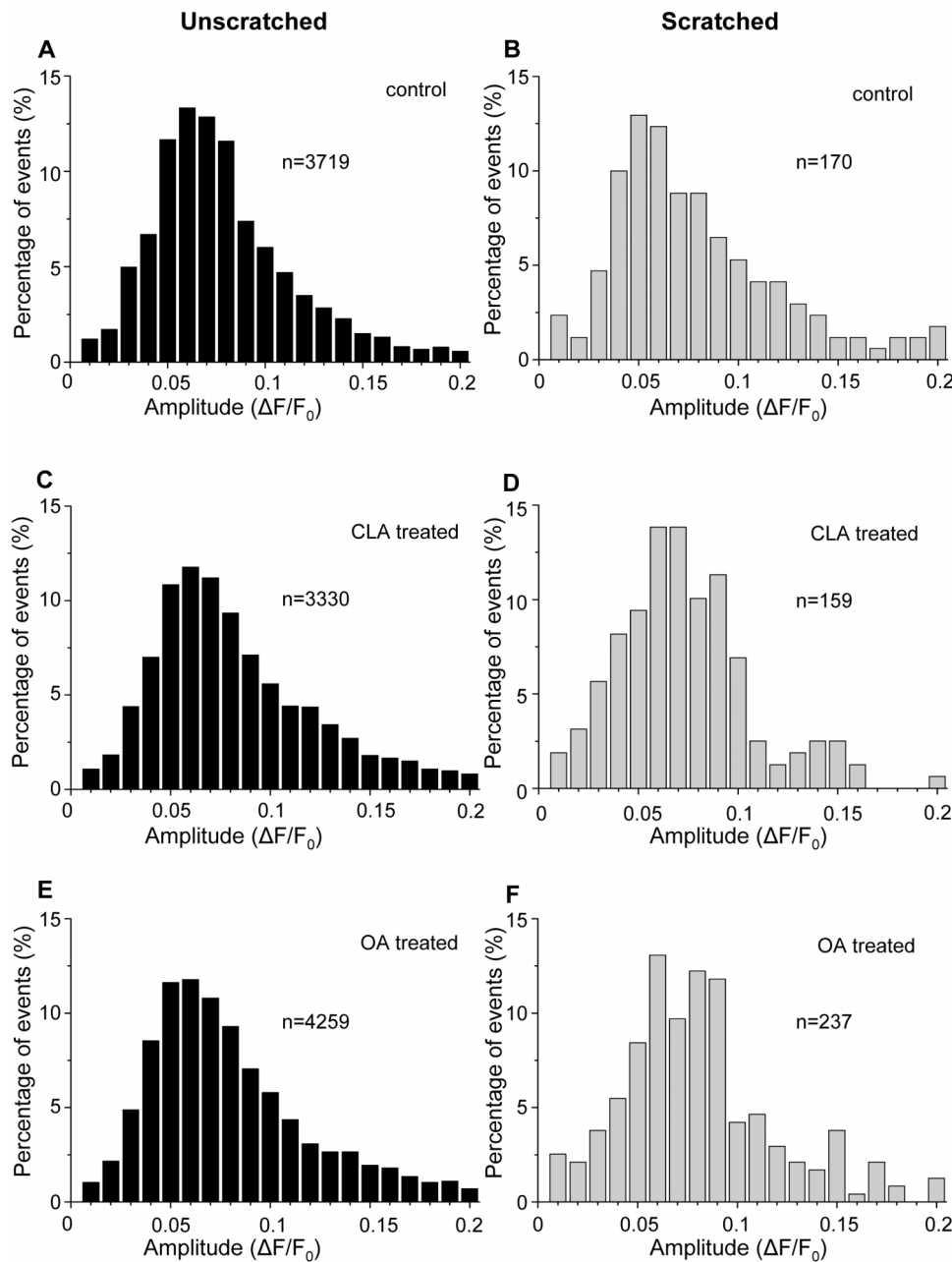


Figure 3. The amplitude of oscillations. Distribution histograms of the amplitude of oscillations in control (A, B), CLA treated (C, D) and OA treated (E, F) cultures measured by confocal microscopy. The cells were chosen either from unscratched coverslips (A, C, E) or from the cell groups next to the scratch in scratched coverslips (B, D, F). The “n” values give the number of Ca^{2+} transients (C: control, CLA: calyculin A, OA: okadaic acid). doi:10.1371/journal.pone.0061507.g003

2. Effects of the phosphatase inhibitors on keratinocyte cultures

Time-lapse experiments were carried out to demonstrate the migration of keratinocytes by examining control and phosphatase inhibitor treated cultures (Fig. 5). Control cells started to cover the scratched area (time-lapse video can be seen in Video S1), and they totally filled it in by the 17th hour of the experiment. In contrast, CLA and OA treated cells were not able to cover the scratched area during the same time interval, and, furthermore, in case of OA treatment cells lost their extensions and their connections with their neighbors by the end of the experiment

(Video S2). Similar morphological changes were not recognized on CLA treated cultures (Video S3).

3. Effect of OA and CLA on the migration of HaCaT cells

To quantitatively assess the migration properties of the cells, they were incubated under low-serum conditions for 18 hours in the absence or presence of OA and CLA in the Boyden Chamber. Migration through the porous membrane to the other side was assessed by measuring optical density of the lysed cells stained with the dye provided in the migration assay kit. OA in 50 nM concentration decreased the chemoattractant-induced cell migra-

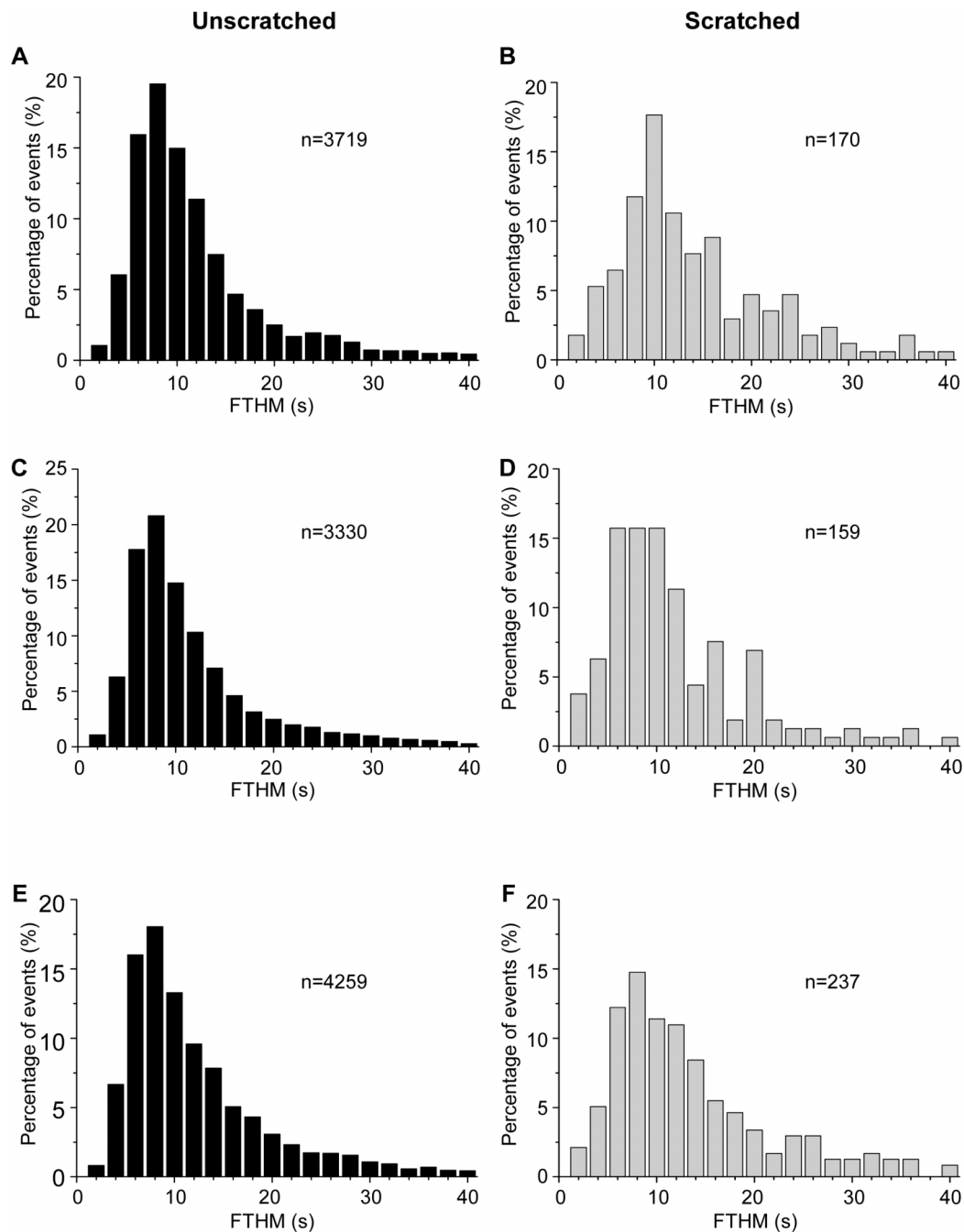


Figure 4. The Full time at half maximum (FTHM) values of oscillations. Distribution histograms of the Full time at half maximum (FTHM) values of oscillations in control (A, B), CLA treated (C, D) and OA treated (E, F) cultures measured by confocal microscopy. The cells were chosen either from unscratched coverslips (A, C, E) or from the cell groups next to the scratch in scratched coverslips (B, D, F). The “n” values give the number of Ca^{2+} transients. (C: control, CLA: calyculin A, OA, okadaic acid). doi:10.1371/journal.pone.0061507.g004

tion by about 80%. Similarly, 10 nM CLA also had a massive inhibitory effect on cell migration decreasing the normalized cell migration by 90% (Fig. 6).

Discussion

Scratching a confluent layer of keratinocytes and subsequent filling of the wound bed with new cells represent a wound healing model often applied to study the mechanism of wound closure and

restoration of barrier function of this cell type. Protein kinase and phosphatase enzymes together with the changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ have been shown to possess a significant role in the regulation of cell migration and wound healing. The latter is especially important in case of the skin which is the first defense line of the body. Despite of the numerous studies there still is no clear consensus whether changes in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and phosphatase activities have parallel or antagonistic roles.

Our present results show that in cells from scratched regions the frequency of Ca^{2+} -oscillations is significantly decreased compared

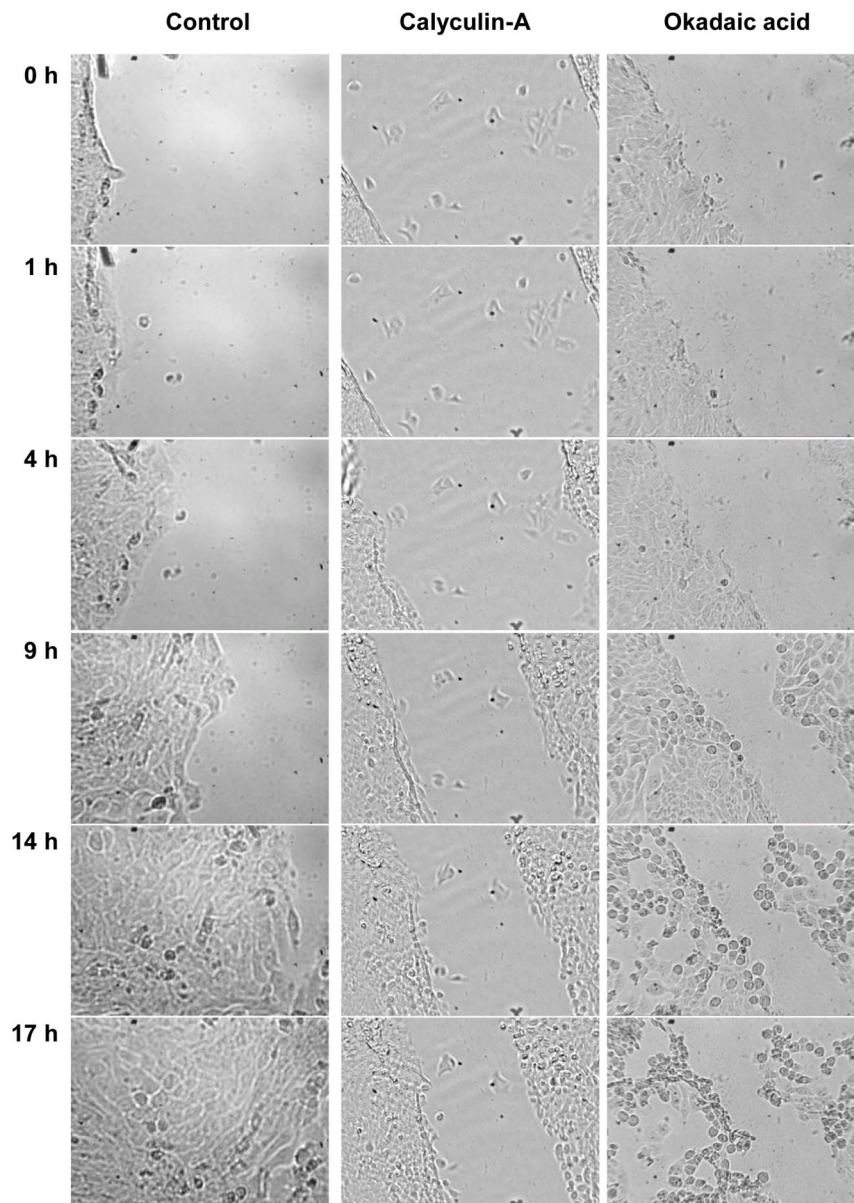


Figure 5. Time-lapse experiments. Representative images from time-lapse experiments of control (left panel), CLA treated (middle panel), and OA treated (right panel) cultures showing the altered migrating ability and wound healing as a consequence of phosphatase inhibitor treatment. Cultures were scratched with a 10 μ l pipette tip and were placed on inverse microscopes in a 37°C incubator. Photographs were taken in every minute. Original magnification was 40 $\times$, 10 $\times$, and 25 $\times$, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0061507.g005

to the cells from the untouched areas and the ratio of oscillating cells is also reduced. The characteristic parameters of these oscillations (amplitude, FTHM), however, were significantly higher in the scratched area. These observations suggest that the Ca^{2+} release processes in cells next to the scratch are less frequent but last longer and result in a greater change in $[\text{Ca}^{2+}]_i$ as compared with untouched cells. Other cell types like Cajal [24] and extraocular muscle cells [25] also show spontaneous calcium elevations, which are similar to those observed here on HaCaT cells considering both their amplitude and their time course.

On the other hand, enhancing the phosphorylation level of proteins by inhibition of Ser/Thr specific protein phosphatases with cell-permeable CLA and OA increased resting $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and the frequency of Ca^{2+} -oscillations in cells of both unscratched and

scratched areas, however, cells close to the scratch still exhibited fewer number of oscillations than the unscratched ones. This $[\text{Ca}^{2+}]_i$ increasing effect of phosphatase inhibitors is in accordance with previous results suggesting that phosphatase inhibition may raise $[\text{Ca}^{2+}]_i$ and Ca^{2+} entry via enhancing the phosphorylation level of proteins involved in Ca^{2+} -transport such as phospholamban, ryanodine receptor and plasma membrane Ca^{2+} channel [2,16]. In non-scratched cultures the characteristic parameters of the Ca^{2+} -transients (amplitude, FTHM) were calculated to be higher after the treatment by CLA and OA (except for FTHM in case of CLA treatment). These parameters showed remarkable alteration after scratching on phosphatase inhibitors treated cell cultures. Comparing the values measured on non-scratched cultures to the parameters obtained in cells next to

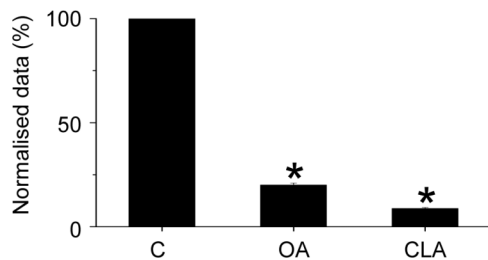


Figure 6. Effect of OA and CLA on the migration of HaCaT cells. Migration of HaCaT cells was assayed in a Quantitative Cell Migration Assay as described in the Materials and Methods at the indicated concentrations of OA and CLA. The optical density of stained cells migrated in the absence of OA and CLA was taken as 100%. Values represent mean $\pm$ SEM ($n=3$). doi:10.1371/journal.pone.0061507.g006

the scratch, a synergistic relationship between phosphatases and the scratch-induced changes in $[Ca^{2+}]_i$ could be excluded. The magnitude of the scratch-induced $[Ca^{2+}]_i$ elevation was not significantly potentiated either by CLA or by OA treatment. The changes in the examined parameters observed in control cultures after scratching were not amplified by the application of phosphatase inhibitors rather they were diminished or vanished, however the application of phosphatase inhibitors on non-scratched cells had similar effect on the measured parameters as the scratch did.

Still standing key question is how changes in $[Ca^{2+}]_i$ and the phosphorylation state of certain proteins may contribute to the proliferation and migration of the cells during the wound healing process. According to the current literature this issue is controversial. On the one hand a burst increase in $[Ca^{2+}]_i$ was reported to stop directional movement of keratinocytes [12] and an increased phosphorylation level of myosin II together with an increased stress fiber formation resulted in a decreased hepatic cell migration [10]. On the other hand, protein-serine/threonine kinase inhibitors enhance the formation and extension of lamellipodia, a process believed to mark the start of events that lead to the migration of keratinocytes and wound healing [9]. In addition, inhibition of PP2A by 10 nM okadaic acid resulted in an increased extent of migration [11].

Movement of cells requires remodeling of the actin-cytoskeleton that includes formation of actin-myosin stress fibers via the Ca^{2+} -dependent phosphorylation of the 20 kDa light chain of myosin II (MLC20) and RhoA/Rho-kinase induced phosphorylation and inactivation of myosin phosphatase [26]. It was shown that following wounding a rapid phosphorylation of MLC20 occurred as a prelude of cell polarization and migration which required a cytosolic Ca^{2+} flux and upstream activation of the p38/MAPK [27]. This early and rapid phosphorylation of MLC20 resulted in translocation of myosin IIA to the cell cortex primarily and this actin-myosin interaction was implicated in the membrane repair of wounded cells. In addition, RhoA/Rho-kinase was found to be

essential for contraction and directed migration of keratinocytes [28]. Accordingly, inhibition of the protein phosphatases by CLA or OA would be expected to favor cell migration via increasing $[Ca^{2+}]_i$ as well as promoting the phosphorylation of both MLC20 and the inhibitory phosphorylation of the myosin phosphatase regulatory subunit as shown earlier [10,29]. Nevertheless, CLA and OA were shown here to apparently halt migration of keratinocytes in both the wound healing assay and in the transwell migration assay. Myosin phosphorylation plays important roles in the cell attachment-detachment process especially during retraction of the tail which requires the force exerted by the actin-myosin stress fibers [30]. As cell migration involves repeated attachment-detachment processes it should be coupled with cyclic phosphorylation-dephosphorylation of MLC20. Our findings support the idea that phosphatase inhibitors cause a maintained phosphorylation of MLC20 with long-lasting stress fibers which eventually suppresses migration.

With respect to these findings the decrease of Ca^{2+} -oscillations in cells close to the scratch may help keratinocytes to move into the gap between the cells caused by scratching. On the other hand lowering $[Ca^{2+}]_i$ may also be advantageous for the proliferation of keratinocytes since this process could be inhibited by increasing influx of Ca^{2+} into the cells [31].

Supporting Information

Video S1 Migration of keratinocytes in control culture. Time-lapse video. Control cells started to cover the scratched area, and they totally filled it in by the 17th hour of the experiment. (MP4)

Video S2 Migration of keratinocytes in okadaic acid treated culture. Time-lapse video. OA treated cells were not able to cover the scratched area and, furthermore, these cells lost their extensions and their connections with their neighbors by the end of the experiment. (MP4)

Video S3 Migration of keratinocytes in calyculin A treated culture. Time-lapse video. CLA treated cells were not able to cover the scratched area, however, morphological changes similar to the OA treated cells were not recognized on CLA treated cultures. (MP4)

Acknowledgments

The authors are grateful to Ms Róza Óri and Ms Ibolya Kiss for their excellent technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LC FE BD OR. Performed the experiments: OR EB GN TG TO BL RB BD. Analyzed the data: JV BD LC FE OR. Contributed reagents/materials/analysis tools: JV TO. Wrote the paper: OR BD LC FE.

References

- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000) The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11–21.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL (2003) Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517–29.
- Helmlinger G, Berk BC, Nerem RM (1996) Pulsatile and steady flow-induced calcium oscillations in single cultured endothelial cells. *J Vasc Res* 33(5):360–9.
- Nesti LJ, Caterson EJ, Li WJ, Chang R, McCann TD, et al. (2007) TGF-beta1 calcium signaling in osteoblasts. *J Cell Biochem* 101(2):348–59.
- Matta C, Fodor J, Sziógyártó Z, Juhász T, Gergely P, et al. (2008) Cytosolic free Ca^{2+} concentration exhibits a characteristic temporal pattern during in vitro cartilage differentiation: a possible regulatory role of calcineurin in Ca-signalling of chondrogenic cells. *Cell Calcium* 44(3):310–23.
- Zhao S, Brandt NR, Caswell AH, Lee EY (1998) Binding of the catalytic subunit of protein phosphatase-1 to the ryanodine-sensitive calcium release channel protein. *Biochemistry* 37(51):18102–9.
- Resjö S, Oknianska A, Zolnierowicz S, Manganiello V, Degerman E (1999) Phosphorylation and activation of phosphodiesterase type 3B (PDE3B) in adipocytes in response to serine/threonine phosphatase inhibitors: deactivation of PDE3B in vitro by protein phosphatase type 2A. *Biochem J* 341 (Pt 3): 839–45.

8. Ishihara H, Martin BL, Brautigan DL, Karaki H, Ozaki H, et al. (1989) Calyculin A and okadaic acid: inhibitors of protein phosphatase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 159(3):871–7.
9. Koivisto L, Alavian K, Hakkinen L, Pelech S, McCulloch CA, et al. (2003) Glycogen synthase kinase-3 regulates formation of long lamellipodia in human keratinocytes. *J Cell Sci* 116(Pt 18):3749–60.
10. Lontay B, Kiss A, Gergely P, Hartshorne DJ, Erdodi F (2005) Okadaic acid induces phosphorylation and translocation of myosin phosphatase target subunit 1 influencing myosin phosphorylation, stress fiber assembly and cell migration in HepG2 cells. *Cell Signal* 17(10):1265–75.
11. Pullar CE, Chen J, Isseroff RR (2003) PP2A activation by beta2-adrenergic receptor agonists: novel regulatory mechanism of keratinocyte migration. *J Biol Chem* 278(25):22555–62.
12. Liu HW, Luo YC, Ho CL, Yang JY, Lin CH (2009) Locomotion guidance by extracellular matrix is adaptive and can be restored by a transient change in Ca^{2+} level. *PLoS One* 4(10):e7330.
13. Grando SA, Horton RM, Mauro TM, Kist DA, Lee TX, et al. (1996) Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *J Invest Dermatol* 107(3):412–8.
14. Wong K, Li XB (1998) Protein phosphatase inhibitors exert specific and nonspecific effects on calcium influx in thapsigargin-treated human neutrophils. *Inflammation* 22(6):631–42.
15. Saino T, Watson EL (2009) Inhibition of serine/threonine phosphatase enhances arachidonic acid-induced $[Ca^{2+}]_i$ via protein kinase A. *Am J Physiol Cell Physiol* 296(1):C88–96.
16. Kawashima H, Satoh H, Saotome M, Urushida T, Katoh H, et al. (2009) Protein phosphatase inhibitor-1 augments a protein kinase A-dependent increase in the Ca^{2+} loading of the sarcoplasmic reticulum without changing its Ca^{2+} release. *Circ J* 73(6):1133–40.
17. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, et al. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106(3):761–71.
18. Ruzsnavszky O, Telek A, Gönczi M, Balogh A, Remenyik E, et al. (2011) UV-B induced alteration in purinergic receptors and signaling on HaCaT keratinocytes. *J Photochem Photobiol B* 105(1):113–8.
19. Szappanos H, Cseri J, Deli T, Kovács L, Csernoch L (2004) Determination of depolarisation- and agonist-evoked calcium fluxes on skeletal muscle cells in primary culture. *J Biochem Biophys Methods* 59(1):89–101.
20. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260(6):3440–50.
21. Szentesi P, Szappanos H, Szegedi C, Gönczi M, Jona I, et al. (2004) Altered elementary calcium release events and enhanced calcium release by thymol in rat skeletal muscle. *Biophys J* 86(3):1436–53.
22. Szabó LZ, Vincze J, Csernoch L, Szentesi P (2010) Improved spark and ember detection using stationary wavelet transforms. *J Theor Biol* 264(4):1279–92.
23. Farkas E, Ujvarosi K, Nagy G, Posta J, Banfalvi G (2010) Apoptogenic and necrogenic effects of mercuric acetate on the chromatin structure of K562 human erythroleukemia cells. *Toxicol In Vitro* 24(1):267–75.
24. Bayguinov PO, Hennig GW, Smith TK (2010) Ca^{2+} imaging of activity in ICC-MY during local mucosal reflexes and the colonic migrating motor complex in the murine large intestine. *J Physiol* 588(Pt 22):4453–74.
25. Feng CY, Hennig GW, Corrigan RD, Smith TK, von Bartheld CS (2012) Analysis of spontaneous and nerve-evoked calcium transients in intact extraocular muscles in vitro. *Exp Eye Res* 100:73–85.
26. Somlyo AP, Somlyo AV (2003) Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 83(4):1325–58.
27. Betapudi V, Rai V, Beach JR, Egelhoff T (2010) Novel regulation and dynamics of myosin II activation during epidermal wound responses. *Exp Cell Res* 316(6):980–91.
28. Jackson B, Peyrollier K, Pedersen E, Basse A, Karlsson R, et al. (2011) RhoA is dispensable for skin development, but crucial for contraction and directed migration of keratinocytes. *Mol Biol Cell* 22(5):593–605.
29. Kiss A, Lontay B, Bécsi B, Márkász L, Oláh E, et al. (2008) Myosin phosphatase interacts with and dephosphorylates the retinoblastoma protein in THP-1 leukemic cells: its inhibition is involved in the attenuation of daunorubicin-induced cell death by calyculin-A. *Cell Signal* 20(11):2059–70.
30. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, et al. (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302(5651):1704–9.
31. Tóth BI, Dobrosi N, Dajnoki A, Czifra G, Oláh A, et al. (2011) Endocannabinoids modulate human epidermal keratinocyte proliferation and survival via the sequential engagement of cannabinoid receptor-1 and transient receptor potential vanilloid-1. *J Invest Dermatol* 131(5):1095–104.