

**EGYETEMI DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**AZ INTRACELLULÁRIS KALCIUMHOMEOSZTÁZIS  
SZABÁLYOZÁSA HUMÁN IMMORTALIZÁLT  
KERATINOCYTÁKON**

*Gönczi Mónika*



*Témavezető: Dr. Csernoch László*

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

***Témavezető:***

**Dr. Csernoch László, az MTA doktora**

***A szigorlati bizottság elnöke:***

**Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora**

***A szigorlati bizottság tagjai:***

**Dr. Ligeti László, az MTA doktora**

**Dr. Szentmiklósi József, az Orvostudományok Kandidátusa**

***A védési bizottság elnöke:***

**Dr. Gergely Lajos, az MTA doktora**

***Opponensek:***

**Dr. Kemény Lajos, az MTA doktora**

**Dr. Panyi György, Ph.D.**

***A védési bizottság tagjai:***

**Dr. Ligeti László, az MTA doktora**

**Dr. Szentmiklósi József, az Orvostudományok Kandidátusa**

# BEVEZETÉS

A külvilágból érkező ingerek felvételében, a környezet károsító anyagaival és hatásaival szembeni védekezésben a bőr szervezetünk egyik legfontosabb szervének számít. A testfelszíntől a szervezet belseje felé haladva három rétegből, a külső epidermiszből, a középső irharétegből (dermis) és az ez alatti, főleg zsírszöveti állományból (subcutis) épül fel. Az epidermisz az elszarusodó, többrétegű laphámok szövettani csoportjába tartozik, melynek mind az 5 sejtrétegét keratinocyták alakítják ki. Ezen sejtek a különböző rétegekben eltérő felépítésűek, eltérő osztódási (proliferációs) képességgel rendelkeznek, más funkciókat látnak el és különböző fejlettségi (differenciáltsági) állapotúak.

A keratinocyták mellett, hogy a hámszövet alkotórészeként természetes barrier funkciót töltenek be, immunológiai szereppel is bírnak, amelyet többek között különböző citokinek szintézise is jelez. Sejtfelszíni antigéneket prezentálnak, képesek migrációra és fagocitózisra. Alapvető fontosságúak a sérüléseket követő sebgyógyulásban, de részt vesznek hiperproliferatív bőrbetegségek (pl. psoriasis) kialakításában is.

A jelátviteli folyamatok széles skáláját írták már le keratinocytákon. Az adenosin-trifoszfát (ATP) és a bradykinin az inozitol trifoszfát ( $IP_3$ ), a hisztamin a ciklikus adenosin-monofoszfát (cAMP), míg a NO és az arachidonsav a ciklikus guanozin-monofoszfát (cGMP) rendszeren keresztül hat. A keratinocyták membránjában felszíni, tirozin-kináz aktivitással rendelkező receptorok is megtalálhatók (EGF-receptor,  $TGF\alpha$ -receptor, citokinek receptorai).

## *Purinoreceptorok*

Bár az ATP kotranszmitterként is felszabadul az idegvégződésekből (például a gyomor-bél traktusban, simaizmoknál, endotél sejteken, endokrin és exokrin mirigysejtekénél, szimpatikus és paraszimpatikus szinapszisoknál), az epidermiszben elsősorban a sérüléseket követően nő meg a koncentrációja. Keratinocytákon az ATP specifikus  $P_{2Y}$  purinoreceptorához kapcsolódva a foszfolipáz-C (PLC) enzimet aktiválja és ezen keresztül megnöveli az  $IP_3$  és diacilglicerol koncentrációját. Az  $IP_3$  hatására bekövetkező intracelluláris kalciumkoncentráció ( $[Ca^{2+}]_i$ ) -változás fontos szabályozó szerepet tölt be a keratinocyták különböző sejtfolyamataiban. A kalciumszint kismértékű, rövid idejű (tranziens) emelkedése a sejtosztódást (proliferációt) serkenti, míg a hosszú ideig fennmaradó, magas intracelluláris kalciumkoncentráció a végső fejlődési stádium felé viszi a sejteket (differenciálódás). Az  $[Ca^{2+}]_i$ -növekedés mellett kalcium-dependens enzimek (pl. proteinkináz C, PKC) aktiválása

révén képes a sejt metabolikus folyamatait is megváltoztatni, befolyásolhatja a transzkripció eseményeket, valamint a sejtmembrán csatornáinak és receptorainak az állapotát.

#### *A proteinkináz C rendszer jellemzői és szerepe keratinocytákban*

A PKC rendszer tagjai a szerin/threonin kinázok csoportjába tartoznak. Jelenleg 11 különböző izoenzimet ismerünk, amelyek aktiválhatóságuk és szerkezeti felépítésük alapján a kalcium- és forbolészter dependens “klasszikus” (PKC $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II, és  $\gamma$ , mint cPKC-k), a kalciumtól független “új típusú” (PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , és  $\theta$ , mint nPKC-k) és a kalcium- és forbolészter independens “atípusos” (PKC $\zeta$  és  $\lambda$ /1, mint aPKC-k) csoportokba oszthatók. Külön “csoport”-ot képez a PKC $\mu$  izoenzim. Az izoenzimformák jellegzetes eloszlási mintázatot mutatnak a különböző sejtekben, és a proliferációban illetve differenciálódásban betöltött szerepük is eltérő. A PKC rendszernek kulcsszerepe van a keratinocyták osztódási- és fejlődési folyamataiban is. Az izoenzim expressziós szintje és a jelenlévő formák sejten belüli (subcelluláris) lokalizációja is módosul a kalcium- és a magas sejtszám által indukált differenciálódás során.

#### *Belső raktárak által vezérelt csatornák (Store Operated Channels, SOC)*

Az intracelluláris tér kalciumkoncentrációja egyrészt a belső raktárakból történő kalciumfelszabadulás, másrészt az extracelluláris térből történő kalciumbelépés révén emelkedhet meg. Az előbbi a sejt felszínén található specifikus receptorok, keratinocyták esetében ilyen a P<sub>2Y</sub> receptor, és a foszfatidil-inozitol (PI) útvonal aktiválódásához, míg utóbbi kalciumra permeabilis csatornák megnyílásához köthető. Ezek a csatornák lehetnek ligand-vezéreltek, mint a P<sub>2X</sub> receptor, de szabályozhatja őket az intracelluláris raktárak állapota is (ún. Store Operated Channels, SOC). Ebben az esetben az endoplazmatikus retikulum (ER) kalciumtartalmának a csökkenése a csatornák megnyílását, és így kalciumionoknak az intracelluláris térbe történő beáramlását eredményezi.

Az Élettani Intézetben végzett korábbi vizsgálatok alapján feltételezhető, hogy keratinocytákon is megtalálhatóak a kalciumfelszabadulással indukálható kalciumbelépési mechanizmusok. A SOC-csatornák működéséről, illetve azok PKC rendszeren keresztül megvalósuló szabályozásáról azonban kevés információ áll rendelkezésünkre.

#### *Mechanoszenzitív csatornák (MSC)*

A mechanoszenzitivitás a sejtek és az élő szervezetek általános jellemzője. A mechanikai ingerek felfogása és azoknak a sejt belseje felé történő közvetítése a mechanoszenzitív ioncsatornához kötött, amelyek jelenlétét számos sejttípuson leírták. Bár

pontos funkciójukat még nem határozták meg, változatos előfordulásuk arra enged következtetni, hogy sokféle szabályozó folyamat részesei.

A humán keratinocyták szinte állandó mechanikai stressznek vannak kitéve. Fontosnak tűnt tehát megvizsgálni az ilyen típusú hatásokra kialakuló sejtválaszokat, hiszen korábbi mérések mind kation-, mind anion szelektív, ozmotikus stresszel aktiválható csatornákat azonosítottak ezen a sejt típuson.

#### *Szabadgyökök, oxidáns anyagok, NO és peroxinitrit*

A reaktív oxigén vegyületeknek szerteágazó szerepe van a normál és patológias folyamatokban. Fontosak a szervezet növekedése során, de másodlagos hírvívőként különböző enzimek, transzkripció- és növekedési faktorok termelését befolyásolják, valamint apoptózist is képesek kiváltani. Reaktív oxigén molekulák szintetizálódhatnak a sejtmembránban, a mitokondriumokban, az endoplazmatikus retikulumban és a peroxiszómákban.

A peroxinitrit anion ( $\text{ONOO}^-$ , PN) a szuperoxid anion ( $\text{O}_2^-$ ) és nitrogén-monoxid (NO) között lezajló reakció eredményeként kialakuló oxidáns anyag, amely közvetlenül képes oxidálni különböző biomolekulákat, például fehérjék szulfát-csoportjait. A biológiai féléletideje igen alacsony ( $<0,1$  s). A PN citotoxikus hatásának kialakulásához vezető útvonal még nem teljesen ismert, de egyes enzimek (pl. poli(ADP-ribóz)-szintetáz; PARS) aktivációja, valamint az intracelluláris tér  $\text{NAD}^+$ - és ATP koncentrációjának drasztikus csökkenése is fontos lehet ezekben a folyamatokban.

## CÉLKITŰZÉSEK

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

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

Végezetül a sejtciklus egyes lépéseit ugyancsak érintő oxidatív hatású anyagok (PN és ennek prekursora, a SIN-1) intracelluláris kalciumszintre kifejtett hatását kívántuk vizsgálni. Tanulmányoztuk, hogy a citoplazma kalciumtartalmának különböző nagyságú és ideig tartó megemelkedése milyen szereppel bír a sejtek számát csökkentő, oxidatív hatásra beinduló apoptotikus és nekrotikus folyamatok során.

# ESZKÖZÖK ÉS MÓDSZEREK

## *Sejttenyésztés*

Kísérleteinket immortalizált humán keratinocita sejtvonalon, ún. HaCaT sejteken végeztük. A sejtek tenyésztése 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett 37<sup>0</sup>C-ra termosztált körülmények között, DMEM tápoldatban történt, amelyet 10% főtális borjúsavóval (FCS), 2 mM L-glutaminnal, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin és 1,25 µg/ml fungizone oldattal egészítettük ki.

A kísérletekhez a sejteket steril fedőlemezre szélesztettük ki és DMEM tápoldatban, termosztált körülmények között tartottuk. A proteinkináz C izoenzimek szerepének vizsgálatához a fedőlemezen kitapadt sejteket forbol 12-mirisztát 13-acetát (PMA) 100 nM-os koncentrációjú oldatával kezeltünk elő 16 órán át.

Kísérleteink egyik részében különálló (proliferáló), míg másik részében differenciálódó sejteket vizsgáltunk. Utóbbi körülmények között a sejtek összefüggő, legalább 100 sejtből álló "szigeteket" hoztak létre és elérték a 70%-os konfluenciát.

## *Intracelluláris kalciumkoncentráció mérés*

Az intracelluláris kalciumkoncentrációban bekövetkező változásokat kalciumérzékeny, fluoreszcens festék segítségével követtük nyomon. Ennek érdekében a fedőlemezre kitapadt sejteket 5 µM Fura-2 AM-el töltöttük fel, 1 órára, 37<sup>0</sup>C-on történő inkubálással. A fedőlemezen kitapadt, festékkel feltöltött sejteket váltakozó, 340 és 380 nm-es hullámhosszúságú fényvel világítottuk meg, melyet egy Xenon lámpa fényéből egy sugárosztó és két monokromátor segítségével állított elő a mérőrendszer. A kibocsátott fényt 510 nm-en detektáltuk egy fotoelektron sokszorozóval 10 Hz-es mintavételezési frekvenciával. Az [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-változásokat a 340 (F<sub>340</sub>) és 380 (F<sub>380</sub>) nm-en mért fluoreszcenciaintenzitások hányadosából (R=F<sub>340</sub>/F<sub>380</sub>) határoztuk meg *in vivo* kalibrációs adatok segítségével.

A kísérletek normál- illetve kalciummentes Tyrode oldatok folyamatos perfúziója mellett történtek, mely utóbbit CaCl<sub>2</sub>-mentes Tyrode oldatból 1 mM EGTA hozzáadásával készítettünk. A kalciummérés során használt hipozmotikus oldatokat a normál oldat NaCl mennyiségének csökkentésével állítottuk elő. Az erős oxidatív hatású peroxinitritet glükóz- és Hepes-mentes (pH 11), míg a SIN-1-et hasonló, pH 7,5-es Tyrode oldatban oldottuk fel közvetlenül a mérés előtt.

### *Membránpotenciál regisztrálása konvencionális mikroelektódával*

Boroszilikát üvegkapillárisokból nagy ellenállású (20-30 M $\Omega$ ) konvencionális mikroelektrodákat készítettünk, amelyeket 3 M-os KCl oldattal töltöttük fel. A kísérlet során a Cl<sup>-</sup>-koncentráció változásának kivédése érdekében Na-glutamáttal módosított Tyrode oldatot (TY) használtunk a nyugalmi membránpotenciál meghatározásához. Ezt követően lecseréltük az extracelluláris oldatot 75- illetve 50%-os hipotóniás oldatra (TY75 és TY50). Előbbi a TY oldat Na-glutamát mennyiségének felét tartalmazta, míg utóbbiból teljesen hiányzott a Na-glutamát. Az 1 kHz-en mintavételezett elektromos jeleket Axoclamp 2B erősítő segítségével regisztráltuk, majd analóg-digitális átalakítás után a kapott adatokat a pClamp 6.0.4. szoftverrel értékeltük ki.

### *Feszültség- és áram clamp mérések*

Az elektrofiziológiai mérések ezen részében alacsony (2-3 M $\Omega$ ) ellenállású, K<sup>+</sup>-aszpartát alapú oldattal feltöltött pipettákat használtunk. Az ingerületi folyamatokat a patch-clamp technika teljes-sejtes (whole-cell) konfigurációjának segítségével tanulmányoztuk. A sejtek ionáramait a mérőrendszer feszültség-rögzítéses (voltage-clamp), míg a membránpotenciál-változásokat az áram-rögzítéses (current-clamp) üzemmódjában követtük nyomon egy Axopatch 200A erősítő segítségével. A kísérletekben a sejtek passzív elektromos paramétereinek meghatározásához 40 ms hosszú, -40 mV-os tartó (holding) potenciálról induló, 5 mV-os depolarizáló impulzust használtunk. A mérések során használt hipozmotikus oldatok a konvencionális mikroelektrodás technikával végzett kísérleteknél ismertett módon készültek, míg a teljes NaCl tartalom Na-glutamáttal történő helyettesítésével kaptuk a Cl<sup>-</sup>-mentes TY és Cl<sup>-</sup>-mentes TY50 oldatokat.

### *Western-blot analízis*

A tenyésztőedényben legalább 70%-os konfluenciát elért sejteket foszfát puffer (PBS) oldattal mostuk át jégen, majd homogenizáló pufferben felszedtük a sejteket. Az ultrahangos feltárás (szonikálás) után a proteintartalmat BCA protein assay segítségével határoztuk meg. A teljes sejtlizátumot SDS-PAGE pufferoldatban oldottuk és 10 percig forraltuk 100<sup>0</sup>C-os vízfürdőben. 20-30  $\mu$ g proteinmennyiséget adagoltunk a 8%-os SDS-PAGE gél egy-egy mélyedésébe, majd futtatás után nitrocellulóz membránra vittük át. A reakciót 5%-os, PBS-ben oldott tejjel blokkoltuk, majd a megfelelő elsődleges antitest-higítással kezeltük a membránt. Az általunk vizsgált PKC izoenzimek (PKC $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  és  $\zeta$ ) nyúlban termeltetett, míg a differenciálódási marker involucrin egérben termeltetett elsődleges antitestekhez

specifikusan kötődött. Az elsődleges antitestek ellen kecskében termeltetett, peroxidáz-konjugált másodlagos antitesteket immunoreaktív módon tettük láthatóvá fényérzékeny filmen.

#### *Élő sejtszám meghatározása*

Az élő sejtszám meghatározását MTT assay segítségével végeztük. A sejteket 5000 sejt/well denzitásban szélesztettük 96 lyukú tenyésztőedényben, a vizsgálni kívánt oldatokban. Minden esetben 4 párhuzamos mérést végeztünk. Az assay során a sejteket 0,5 mg/ml MTT oldattal inkubáltuk 3 órán keresztül, 37<sup>0</sup>C-ra termosztált körülmények között, majd a képződött formazán kristályok koncentrációját (mely az élő sejtszám indikátorának tekinthető) kolorimetriás úton határoztuk meg. A hipotóniás stressz proliferációra és differenciálódásra kifejtett hatásának vizsgálata során háromféle tenyésztő médiumot használtunk. A hipotóniás tenyésztőoldat (LS50) 1:1 arányban tartalmazott normál tenyésztőoldatot (NS, ≈300 mosmol/l), és steril desztillált vizet, ozmolaritása ≈150 mosmol/l volt. A normál tenyésztő oldat és steril Tyrode oldat 50-50%-os keverékeként állítottuk elő az alacsony szérum koncentrációjú, normál ozmolaritású oldatot (LS).

#### *Immunfluoreszcens vizsgálatok*

A HaCaT sejttenyészetet háromszor mostuk jéghideg PBS oldattal, majd 5 perces acetonos fixálást végeztünk 4<sup>0</sup>C-on, végül 30 percen keresztül 0,6% Triton X-100-at és 1% BSA-t tartalmazó oldattal blokkoltuk a fixálási folyamatot. Ezután a PKC izoenzimeket és a purinoreceptorokat a már leírt módon jelöltük FITC-konjugált antitesttel. A sejtmagok festésére propidium-jodidos inkubálást alkalmaztunk.

## EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

### *A proteinkináz C rendszer hatása HaCaT keratinocyták transzmembrán kalciumáramaira.*

Az Élettani Intézetben korábban kimutatták, hogy humán keratinocytákon a foszfatidil-inizitol útvonal aktiválása ATP-vel, illetve a kalciumraktárak kiürítése ciklopiazonsavval (CPA) képes a belső raktárak által vezérelt csatornákat (SOC) aktiválni. Kísérleteink első részében azt vizsgáltuk, hogy a sejtek proliferációs és differenciálódási állapota, valamint a PKC rendszer aktivitásának megváltozása befolyásolja-e a kapacitív kalciumbeáramlást.

### *PMA előkezelés hatása az extracelluláris térből történő kalciumbeáramlásra*

A PI-rendszer aktiválása 30 másodpercig tartó, ismételt ATP adagolással tranziens jellegű  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedéseket okozott a vizsgált sejteken. Az egymást követő  $[Ca^{2+}]_i$ -változások amplitúdója kismértékű csökkenést mutatott. Az intracelluláris kalciumkoncentráció a tranziensek után az eredeti értékre állt vissza ( $[Ca^{2+}]_{nyug}$ ) kontroll sejteken. Kalciummentes extracelluláris oldatban jelentősen csökkent az ATP-vel kiváltott tranziensek nagysága, azaz valószínű, hogy az  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedések kialakításában mind a belső raktárakból felszabaduló, mind a külső térből beáramló kalcium részt vesz. A sejtek 16-18 órás PMA (100 nM) előkezelésénél sem a  $[Ca^{2+}]_{nyug}$  ( $79 \pm 4$  vs.  $80 \pm 4$  nM, kontroll és előkezelt sejteknél,  $n=20$ ) értéke, sem a tranziensek alapvető kinetikai jellemzői nem változtak a kontroll esethez képest. Ez arra utal, hogy a PKC izoenzimek aktivitásának módosítása nem játszik jelentős szerepet a nyugalmi  $[Ca^{2+}]_i$ -nak illetve a PI-útvonalnak a közvetlen szabályozásában.

PMA-val kezelt sejteknél, ezzel szemben, átlagosan több, mint 20 nM-os  $[Ca^{2+}]_{nyug}$ -változást tapasztaltunk a tranzienseket követően. Ez a hatás kalciummentes körülmények között elmaradt, azaz feltételezhető volt, hogy a  $[Ca^{2+}]_{nyug}$  változását a sejtmembrán speciális fehérjéin (pl. SOC csatornák) keresztül belépett kalcium okozta.

### *PMA-kezelés hatása a CPA-val indukált kalciumbelépésre*

A következő kísérletekben a belső kalciumraktárakat kalciummentes extracelluláris oldatban alkalmazott 10  $\mu$ M CPA-val kiürítettük. A kialakult  $[Ca^{2+}]_i$ -változás amplitúdója és a tranziens maximális felszállási meredeksége nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll és PMA-kezelt sejtek esetében, ami arra utal, hogy a forbolészter nem változtatta meg az ER-ban raktározott kalcium mennyiségét. Az  $[Ca^{2+}]_i$  kiindulási értékre történő visszatérése után a külső térbe visszaadtuk a kalciumot. Ennek hatására az  $[Ca^{2+}]_i$  újabb megemelkedését

tapasztaltuk, amit a raktárak által vezérelt csatornákon keresztül a sejtbe történő kalciumbeáramlás hozott létre. A kalciumbelépés sebessége az előkezelt sejtek esetében  $\approx 47\%$ -al volt magasabb, mint kontroll sejteknél. Ez a SOC csatornák fokozott aktivációs állapotára utal PMA-kezelt sejteken.

#### *PMA előkezelés hatása keratinocyták PKC izoenzimintázatára proliferáló sejteken*

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy mely PKC izoenzim(ek) vehetnek részt az általunk vizsgált folyamatokban illetve a forbolészterrel kezelt sejteken megfigyelt változások kialakításában. Ezért Western-blot analízissel meghatároztuk az izoenzim szintjében bekövetkező változásokat. A HaCaT sejteken 6 PKC izoenzimet sikerült kimutatnunk: a klasszikus PKC $\alpha$ -t és  $\beta$ -t, az új típusú  $\delta$ ,  $\epsilon$  és  $\eta$ -t, valamint az atípusos  $\zeta$ -t. Prekonfluens sejteken a PMA előkezelés a PKC $\alpha$  downregulációját okozta, míg a többi izoenzim szintjében lényeges változást nem tapasztaltunk.

#### *A kapacitív kalciumbeáramlás módosulása konfluens sejteken*

Kísérleteink következő szakaszában a fent említett méréseket megismételtük konfluens, differenciálódó sejteken is. Az izolált sejtekkel ellentétben itt a kalciumtranziensek gyors felszálló szárát egy lassú fázis előzte meg. Az ATP adagolással kiváltott tranziensek amplitúdója differenciálódó keratinocytákon nagyobb volt ( $155 \pm 19$  nM), mint az osztódó sejtek ( $116 \pm 8$  nM) esetében. A konfluens sejteket PMA-val előkezelve, nem tapasztaltunk változást az ATP-vel indukált kalciumtranziensek kinetikájában, s a  $[Ca^{2+}]_{nyug}$ -emelkedés kisebb mértékű volt, mint proliferáló sejteken.

Kontroll és PMA-kezelt differenciálódó sejteken a CPA-val kiváltott  $[Ca^{2+}]_i$ -változások mennyiségi és kinetikai paramétereikben nem különböztek lényegesen a prekonfluens sejteken mértéktől, ami azt valószínűsíti, hogy a sejtek differenciálódási állapota, illetve a forbolészter kezelés nem módosítja az intracelluláris raktárak kalciumtartalmát. A SOC-csatornákon keresztül létrejövő kalciumbelépés kinetikájában azonban jelentős különbségeket figyelhettünk meg. Kalciumot tartalmazó extracelluláris oldatban az osztódó sejteken folyamatos  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedést figyeltünk meg, konfluens sejteknél viszont egy korai csúcserték elérése után rögtön elkezdődött a  $[Ca^{2+}]_i$  nyugalmi értékre történő visszatérése. A kalciumbeáramlás megszűnése, illetve annak jelentős csökkenése a differenciálódó sejteken deszenzitizáció kialakulására, vagy a beáramlási mechanizmusok erőteljes inaktivációjára utal. Valószínű, hogy konfluens sejteknél a raktárak feltöltődése a külső térből rövidebb idő alatt, nagyobb sebességgel történik. A forbolészter kezelés nem változtatta meg jelentősen a

kapacitív kalciumbelépés kinetikáját, azaz a PKC rendszer kalciumbeáramlásra kifejtett szerepe konfluens sejtek esetében nem jelentős.

#### *PMA-kezelés hatása a PKC izoenzimintázatra differenciálódó keratinocytákon*

Konfluens keratinocytákon a PMA kezelés a PKC $\beta$  és  $\epsilon$  izoenzimek downregulációját okozta. A kapott eredmények arra utalnak, hogy a PKC $\alpha$  izoenzim közvetlenül szabályozza az aktiválható csatornák számát, míg a  $\beta$  és  $\epsilon$  izoenzimek valószínűleg a csatornák kinetikai jellemzőit képesek befolyásolni.

#### ***Mechanoszenzitív csatornák szerepe a membránpotenciál kialakításában és a proliferáció szabályozásában in vitro HaCaT keratinocytákon***

Méréseink második részében a hipotóniás stressz és a hidrosztatikai nyomás okozta membránpotenciál- és  $[Ca^{2+}]_i$ -változásokat vizsgáltuk HaCaT keratinocytákon. Kíváncsiak voltunk arra is, hogy az ozmotikus viszonyok módosításának hatására megfigyelhető-e valamilyen változás a sejtek proliferációjában illetve differenciálódásában.

#### *A hidrosztatikai nyomás hatása a keratinocyták elektrofiziológiai jellemzőire*

Kísérleteink során felmerült annak a lehetősége, hogy a sejtek membránpotenciálja (MP) és a hidrosztatikai nyomás között szoros összefüggés van. Ennek ellenőrzésére változtattuk a sejt fölötti folyadékszintet és közben folyamatosan regisztráltuk a keratinocyták MP-ját a patch-clamp technika áram-clamp üzemmódjában. A mérést alacsony (3 mm) oldatszintnél indítottuk, majd folyamatosan emeltük a folyadék mennyiségét (max. 3 cm), s ezzel egyidőben a membránpotenciál folyamatos hiperpolarizációját tapasztaltuk ( $-20 \pm 6,5$  mV-ról  $-55 \pm 12,4$  mV-ra). Az oldatszint csökkentésével a membrán depolarizálódott. Ezen tapasztalatok alapján a további elektrofiziológiai méréseket alacsony, legfeljebb 5 mm-es oldatszint mellett végeztük.

#### *Hipotóniás oldatok hatása a membránpotenciálra*

A továbbiakban arra kerestük a választ, hogy a mechanikai stressz befolyásolja-e a keratinocyták membránpotenciálját. Ennek során hipotóniás oldatokban konvencionális mikroelektrodák és patch-clamp elektródák segítségével detektáltuk a sejtek MP-ját. A HaCaT sejtek nyugalmi membránpotenciálja  $-29,4 \pm 3,8$  mV-nak adódott (n=10) nagy ellenállású, konvencionális mikroelektroddal történő regisztrálás során. Hipotóniás oldat (TY75) alkalmazása a MP-t rövid időn belül negatívabb értékek felé tolta el, majd a TY50 oldat adagolásával további hiperpolarizációs irányú változást tapasztaltunk. Visszatérve a

normál ozmolaritású TY oldatra a sejtek membránpotenciálja az eredetihez közeli értékre tért vissza. A TY75 oldatban  $9,2 \pm 1,3$  mV-os, míg a TY50-es oldatban  $27,2 \pm 5,2$  mV-os hiperpolarizációt mértünk ( $n=10$ ).

Hasonló eredményekre vezettek a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációjában végzett kísérletek is. A nyugalmi membránpotenciál értéke ebben az esetben  $-19,7 \pm 2,3$  mV-nak adódott TY oldatban, amely nem különbözik szignifikánsan az előző módszerrel mért értéktől. Hipotóniás (TY50) oldat alkalmazása esetén szintén a membrán hiperpolarizációját figyelhettük meg, bár a változások itt kisebb mértékűek voltak ( $-11,4 \pm 0,5$  mV).

Mint láttuk, a proteinkináz C izoenzimek fontos szerepet játszanak a keratinocyták sejtfolyamataiban. Kíváncsiak voltunk tehát arra, hogy a sejtek hipotóniás oldatokra adott válaszát módosítja-e a PKC rendszer. A PMA-val kezelt HaCaT sejtek nyugalmi membránpotenciálja ( $-20,4 \pm 2,8$  mV) szignifikáns különbséget nem mutatott a kontroll sejtekhez képest, a csökkentett ozmolaritású (TY50) oldat adagolása azonban nagyobb mértékű ( $-38,7 \pm 3,4$  mV) MP-változást okozott a forbolészter kezelést követően.

#### *Az ozmolaritás változásának hatása a membránon átfolyó áramokra*

A hipotóniás oldatok által aktivált áramok tanulmányozására a patch-clamp technika teljes-sejtes konfigurációját használtuk. A sejt MP-ját  $-40$  mV-ra állítottuk be, majd  $-80$  mV-ról induló,  $600$  ms hosszú depolarizáló impulzusokat alkalmaztunk TY és TY50 oldatban. A hipozmotikus oldatban mért áram nagysága ( $I_{tot}$ ), amit a depolarizáló impulzus és a  $-80$  mV-os előimpulzus végén mért áramok különbségéből számítottunk ki, minden feszültség értéknél magasabb volt, mint a TY oldatban. A teljes áramokból levontuk az ohmikus komponenst, majd a sejt kapacitására normalizáltuk azokat ( $I(V_m)$ ), és vizsgáltuk az így kapott áramok membránpotenciál függését. Kontroll- és PMA-kezelt sejteken, a Tyrode oldatban mért, normalizált áram között lényeges különbség nem volt. Hipotóniás közegben mind az  $I_{tot}$ , mind a normalizált áramok szignifikánsan nagyobbak voltak az előkezelt sejteken. A kísérlet folyamán a sejtek kapacitása  $27,2 \pm 2$  pF-nak adódott ( $n=31$ ) kontroll, és  $27,9 \pm 2,6$  pF-nak ( $n=16$ ) PMA-val előkezelt keratinocytákon. Hipotóniás oldatban a sejtek kapacitása alig változott ( $28,6 \pm 2,6$  pF).

Kloridmentes, normál ozmolaritású oldatban a sejtek nyugalmi MP-ja  $-14,2 \pm 2,8$  mV-nak adódott ( $n=6$ ), míg kloridmentes hipotóniás oldat hatására a membránpotenciál  $-19,4 \pm 3,9$  mV-ra változott. A hiperpolarizáció mértéke tehát itt jelentősen kisebb ( $p < 0,05$ ) volt, mint amit a normál  $Cl^-$ -tartalmú oldatok esetében megfigyeltünk. Ezzel együtt a

kapacitásra normált áramok hipotóniás oldatban megfigyelt növekedése is elmaradt az extracelluláris kloridionok hiányában. Ezek a megfigyelések arra utalnak, hogy a keratinocyták ozmotikus stresszre adott válaszaiban a kloridionoknak kitüntetett szerepük van.

#### *Hipotóniás stressz hatása az intracelluláris kalciumkoncentrációra*

Tekintettel arra, hogy a mechanoszenzitív csatornák aktivációját sok esetben az  $[Ca^{2+}]_i$  növekedése kíséri, megvizsgáltuk, hogy az általunk alkalmazott hipotóniás oldatok megváltoztatják-e a keratinocyták intracelluláris kalciumszintjét. A sejtek működőképességét a foszfatidil-inozitol agonista ATP adagolásával teszteltük.

Az ozmotikus stressz hatására kialakult  $[Ca^{2+}]_i$ -változásokat azok időbelisége és karakterisztikája alapján két csoportba osztottuk. Ha az  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedés jól definiálható csúccsal rendelkezett és a kalciumszint-növekedés már a hipotóniás oldat jelenléte alatt csökkenni kezdett, akkor tranziens jellegű változásról beszéltünk. Amennyiben a hipozmotikus oldat lassan kialakuló, elhúzódó választ hozott létre, és ez csak a normál oldatban szűnt meg, azt lassú  $[Ca^{2+}]_i$ -változásként értékeltük. A tranziens változások mind TY75, mind TY50-es oldatokban detektálhatók voltak és az ozmolaritás nagyobb mértékű csökkenése az  $[Ca^{2+}]_i$  kifejezettebb emelkedését idézte elő. A lassú típusú változásokat csak TY50 alkalmazásakor figyelhettük meg. PMA-val kezelt keratinocytákon, hipozmotikus oldatok jelenlétében mind tranziens-, mind lassú típusú  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedéseket tapasztaltunk, s ezek szignifikánsan nagyobbak voltak, mint kontroll sejteken. Mind a kontroll-, mind az előkezelt keratinocytákon végzett mérési sorozat esetében azt tapasztaltuk, hogy az ozmotikus stressz okozta  $[Ca^{2+}]_i$ -emelkedések az extracelluláris kalcium jelenlététől függték. Megfigyeléseink tehát arra utalnak, hogy hipotóniás stressz hatására, sejtfelszíni csatornákon keresztül, kalciumbeáramlás indult meg a vizsgált sejtekbe és ez okozta a citoplazma kalciumkoncentrációjának a megemelkedését. A kialakuló kalciumtranziensek nagysága változott abban az esetben, ha a sejtek PKC izoenzim rendszerének aktivitását tartós PMA előkezeléssel módosítottuk.

### *Az ozmotikus stressz hatása a keratinocyták proliferációjára és differenciálódására*

A továbbiakban azt vizsgáltuk, hogy a tenyésztőoldat szérum koncentrációjának illetve ozmolaritásának csökkentése megváltoztatja-e a HaCaT sejtek proliferációját. A sejtek hipozmotikus tenyésztő oldatban (LS50) nem osztódtak, és a differenciálódási markerek szintje sem volt jelentős. Ezt nem az oldat szérumtartalmának csökkenése okozta, hiszen a normál ozmolaritású, de csökkentett szérumtartalmú oldatban (LS) a sejtek növekedése folyamatos volt. Az LS oldatban, a kontroll állapothoz képest lecsökkent proliferációt az involukrin szintjének emelkedése követte, ami a sejtek fokozott differenciálódását jelzi. Megfigyeltük azt is, hogy a hirtelen alkalmazott hipotóniás stressz fokozta a sejtek osztódását, és egyúttal az involukrin termelést is csökkentette. Mindezen megfigyelések alapján feltételezhetjük, hogy a folyamatosan hipozmotikus hatásnak kitett sejtek megakadtak a sejtciklus egyik fázisában (amit a sejtszám növekedésének és a differenciálódásnak az elmaradása jelez). Ezzel szemben a keratinocytákat ért hirtelen ozmotikus stressz a sejtek osztódásának fokozódását váltja ki, háttérbe szorítva a differenciálódás kialakulását.

### ***Intracelluláris kalcium-függő szabályozó folyamatok szerepe HaCaT keratinocyták oxidatív stresszel szembeni érzékenységében***

#### *Peroxinitrit hatása a kalciuminflux mechanizmusokra keratinocytákon*

10  $\mu\text{M}$  peroxinitrit alkalmazása az  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  drasztikus emelkedését váltotta ki, amely a szer megvonása után csak minimális reverzibilitást mutatott. Méréseink szerint a peroxinitrit membránkárosító hatásánál fogva fokozta a sejtekbe történő kalciumbeáramlást. Mivel sem a módosított Tyrode oldat, mint közvetítő közeg, sem a PN lebomlási termékei nem okoztak mérhető intracelluláris kalciumkoncentráció-emelkedést, feltehető, hogy az említett hatásokat közvetlenül a PN, mint erőteljes oxidáns váltotta ki.

#### *A SIN-1 intracelluláris kalciumkoncentrációra kifejtett hatása HaCaT keratinocytákon*

Méréseink során vizsgáltuk egy másik oxidáns anyag, a SIN-1  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -ra kifejtett hatását is. A SIN-1-et 1, 2,5 valamint 5 mM-os koncentrációban alkalmaztuk extracelluláris kalcium jelenlétében és annak hiányában. A belső raktárak megfelelő kalciumtartalmának ellenőrzésére ismét a foszfadil-inozitol rendszer ismert aktiválószerét, az ATP-t használtuk. Az ATP-t 180  $\mu\text{M}$ -os koncentrációban 20 s-ig alkalmaztuk a SIN-1 adagolása (300 s) előtt és után. Extracelluláris kalcium jelenlétében a növekvő koncentrációban adagolt SIN-1 egyre nagyobb  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -emelkedést okozott. A SIN-1 alkalmazása előtt és után mért, ATP-vel kiváltott kalciumtranziensek amplitúdói között azonban különbséget nem tapasztaltunk.

Kalciummentes extracelluláris oldatban megismételve a kísérleteket azt tapasztaltuk, hogy a SIN-1 ilyen körülmények között is, bár jelentősen kisebb mértékben megemelte az  $[Ca^{2+}]_i$ -t. Ezzel párhuzamosan a SIN-1 dózisfüggően csökkentette a második ATP-adagolással kiváltott kalciumtranziens nagyságát. Mindezen eredmények arra engednek következtetni, hogy a SIN-1 által kiváltott oxidáció nemcsak a sejtmembránon át történő kalciumbeáramlást aktiválja, de a belső kalciumraktárból is képes kalciumot felszabadítani.

## ÖSSZEFOGLALÁS

Kísérleteink során HaCaT keratinocyták kalciumhomeosztázisát, transzmembrán áramait, proliferációját, differenciálódását, ezen folyamatok változásait és szabályozási lehetőségeit tanulmányoztuk.

Megállapítottuk, hogy a kapacitív kalciumbeáramlás, mely a belső raktárakból történő kalciumfelszabaduláshoz szorosan kapcsolódó folyamat, HaCaT sejtek esetében is aktiválható a foszfoinozitol-útvonalon keresztül. Keratinocyták hosszú ideig tartó előkezelése PMA-val a klasszikus, kalcium-dependens PKC $\alpha$  szelektív downregulációját okozta proliferáló sejteken. Bár az előkezelés után a PI-útvonalban nem tapasztaltunk változást, a kapacitív kalciumbeáramlás fokozódott. Ez arra utal, hogy a PKC rendszer közvetlenül a transzmembrán áramot befolyásolja. Megfigyeléseinket megerősítették a ciklopijonsavval végzett kísérletek is, hisz a kalciumbelépés mértéke 47%-al nagyobb volt PMA-val kezelt sejteken, mint kontroll esetben. Konfluens, azaz differenciálódó keratinocytákban módosult a kapacitív kalciumbeáramlás kinetikája is, ami a csatornák részleges inaktivációjára utal. Konfluens sejtek PMA-val történő előkezelése a PKC $\beta$  és PKC $\epsilon$  izoenzimek downregulációját okozta, de nem változtatta meg a SOC aktivitását a kontroll állapothoz képest. Ezen megfigyelésekből arra következtettünk, hogy számos PKC izoenzimnek van szabályozó szerepe a kapacitív kalciumbeáramlás szabályozásában, de ezek a hatások eltérőek, esetenként akár ellentétesek is lehetnek.

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

növekedését. Ha azonban az izotóniás tenyésztőoldatban növekvő sejteken az oldatot hipotóniásra cseréltük le, a proliferáció növekedését és a terminális differenciálódási marker involucrin szintjének csökkenését tapasztaltuk. Ezen megfigyeléseink a mechanikai feszülés megváltoztatásának, mint a proliferáció szabályozásában szerepet játszó külső ingernek a fontosságára mutattak rá.

A különböző gyulladási folyamatok során megnövekvő citotoxikus anyagok apoptózist és nekrozist kialakító hatása a sejtek többségénél összefüggésbe hozható a kalciumhomeosztázis befolyásolásával. Ezt tapasztaltuk a HaCaT sejtek esetében is, ahol mind a peroxinitrit, mind ennek prekuzora, a SIN-1 növelte a sejtek intracelluláris kalciumkoncentrációját. A SIN-1 hatásának kialakításában mind a belső raktárakból felszabadult, mind az extracelluláris térből bejutott kalcium részt vett és a kalciumkoncentrációban bekövetkező változások reverzibilisek voltak. Ezzel ellentétben a PN a sejtmembrán integritásának csökkenését, és ezzel egyidőben az intracelluláris tér kalciumkoncentrációjának folyamatos emelkedését idézte elő.

**Az értekezés alapjául szolgáló *in extenso* közlemények:**

**M. Gönczi**, H. Papp, T. Bíró, L. Kovács, L. Csernoch: Effect of protein kinase C on transmembrane calcium fluxes in HaCaT keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2002: 11:25-33. **IF: 2,234**

E. Bakondi, **M. Gönczi**, É. Szabó, P. Bai, P. Pacher, P. Gergely, L. Kovács, J. Hunyadi, Cs. Szabó, L. Csernoch, L. Virág: Role of intracellular calcium mobilization and cell density-dependent signaling in oxidative stress-induced cytotoxicity in HaCaT keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* (közlésre elfogadva) **IF: 4,645**

**M. Gönczi**, N. Szentandrassy, E. Bodó, J. Magyar, T. Bíró, P.P. Nánási, L. Kovács, L. Csernoch: Stretch-activated channels influence the membrane potential and alter the proliferation of HaCaT keratinocytes in vitro. *J. Invest. Dermatol.* (közlésre beküldve)

**További *in extenso* közlemény:**

H. Papp, G. Czifra, J. Lázár, J. Boczán, **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.* 2003: 12:1-14. **IF: 2,234**

**Idézhető absztraktok az értekezés témájában:**

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

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

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