



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

Hodnocení vlivů cytokininů na lidské keratinocyty

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kristýna Rajchmanová
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Barbara Nardelliová
Konzultant:	Mgr. Jiří Voller, PhD.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kristýna Rajchmanová
Název práce	Hodnocení vlivů cytokininů na lidské keratinocyty
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Barbara Nardelliová
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Diferenciace keratinocytů je proces, během kterého se tvoří proteiny nutné pro tvorbu zrohovělého obalu, tzv. markery diferenciace keratinocytů. Změny exprese těchto markerů jsou zaznamenány u různých kožních onemocnění jakými jsou psoriáza, atopický ekzém, epidermolytická hyperkeratóza atd. V této práci jsem se zabývala látkami, které ovlivňují expresi markerů diferenciace, a mohou tak být využívány v léčbě těchto kožních onemocnění. Jednou z těchto látek je i kine- tin, rostlinný hormon ze skupiny cytokininů. Testovala jsem, jestli i další cytokininy mají vliv na lidské keratinocyty. Dále jsem se snažila zoptimalizovat protokol pro sledování vybraných markerů diferenciace pomocí PCR a imunodetekce.</p>
Klíčová slova	diferenciace, keratinocyty, biomarkery, cytokininy
Počet stran	98
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kristýna Rajchmanová
Title of thesis	Evaluation of the effects of cytokinins on human keratinocytes
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Barbara Nardelliová
The year of presentation	2016
Abstract	Proteins required for the formation of the cornified envelope are synthesized during keratinocyte differentiation. They can be used as biomarkers of the differentiation process. Aberrant changes of their expression are associated with various skin disorders such as psoriasis, atopic eczema, epidermolytic hyperkeratosis etc. In this thesis, I deal with substances that influence the expression of these biomarkers and can be used in the treatment of the skin disorders where the differentiation is altered. One of these substances is kinetin, a phytohormone from the cytokinin family. I tested whether some other cytokinins have an effect on the human keratinocytes as well. I also tried to optimize protocols for monitoring selected differentiation markers by PCR and immunoblotting.
Keywords	differentiation, keratinocytes, biomarkers, cytokinins
Number of pages	98
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že tato bakalářská práce je mým původním dílem, které jsem vytvořila samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucí své bakalářské práce Mgr. Barbaře Nardelliové za její čas, odborné vedení, vstřícnost a trpělivost. Dále bych ráda poděkovala Mgr. Jiřímu Vollerovi, PhD. za jeho cenné rady a také zaměstancům Laboratoře růstových regulátorů za jejich ochotu.

Obsah

1 Úvod a cíle práce	9
2 Současný stav řešené problematiky	10
2.1 Cytokiny	10
2.1.1 Výskyt, struktura a přenos signálu	10
2.1.2 Syntéza a degradace	11
2.1.3 Historie	11
2.1.4 Vliv cytokininů na živočišné buňky	12
2.2 Kůže	13
2.3 <i>Epidermis</i>	13
2.3.1 <i>Stratum basale</i>	14
2.3.2 <i>Stratum spinosum</i>	14
2.3.3 <i>Stratum granulosum</i>	14
2.3.4 <i>Stratum corneum</i>	15
2.4 Diferenciace keratinocytů	15
2.5 Akvaporin-3	17
2.6 Vybrané markery diferenciace keratinocytů	19
2.6.1 Keratiny	19
2.6.2 Filaggrin	21
2.6.3 Involukrin	22
2.6.4 Lorikrin	23
2.7 Látky ovlivňující diferenciaci keratinocytů	25
2.7.1 Vápník	25
2.7.2 Vitamín D	27
2.7.3 Vitamín A	29
2.7.4 Sfingolipidy	30
2.7.5 Avarol	31
2.7.6 Arzen	32
2.7.7 Glukokortikoidy	32

2.7.8	Nikotin a acetylcholin	33
2.7.9	Geraniin	33
2.7.10	Radix rubiae	34
2.7.11	Kinetin	35
2.7.12	Kurkumin, apigenin a EGCG	35
2.7.13	Oligosacharidy a polysacharidy	37
2.8	Psoriáza	38
3	Materiály a metody	41
3.1	Seznam použitých přístrojů, zařízení a chemikálií	41
3.1.1	Kultivační plasty (firma TPP)	41
3.1.2	Přístroje a zařízení	41
3.1.3	Chemikálie	42
3.1.4	Roztoky	43
3.1.5	Testované látky	45
3.1.6	Protilátky	45
3.1.7	Primery	46
3.1.8	Biologický materiál	47
3.2	Použité metody	47
3.2.1	Kultivace buněk	47
3.2.2	Příprava buněk na experimenty	47
3.2.3	Sklízení buněk	48
3.2.4	Izolace RNA klasickou metodou	48
3.2.5	Izolace RNA pomocí kolonek	49
3.2.6	Reverzní transkripce pomocí ProtoScript® First Strand cDNA Synthesis kitu	49
3.2.7	Reverzní transkripce pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription kitu	50
3.2.8	Polymerázová řetězová reakce	51
3.2.9	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase	52
3.2.10	Elektroforetická separace produktů PCR a jejich detekce	53

3.2.11	Toxicita na buněčných liniích	53
3.2.12	Sklízení buněk pro analýzu proteinů	54
3.2.13	Příprava proteinových lyzátů	54
3.2.14	Elektroforetická separace a Western blotting	55
3.2.15	Imunodetekce	55
4	Výsledky	57
4.1	Optimalizace primerů pomocí polymerázové řetězové reakce	57
4.2	Optimalizace primerů pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase	63
4.3	Imunodetekce vybraných markerů diferenciaci keratinocytů	68
4.4	Hodnocení vlivů vybraných cytokininů na viabilitu keratinocytů	69
5	Diskuze a závěr	72
6	Seznam zkratek	76

1 Úvod a cíle práce

Epidermální keratinocyty jsou vysoce specializované epiteliální buňky oddělující organismus od vnějšího prostředí. Diferenciace keratinocytů je proces, při kterém kmenové buňky bazální vrstvy pokožky postupují nahoru a získávají funkční schopnosti. Tím se tvoří jednotlivé vrstvy pokožky, v nichž keratinocyty syntetizují proteiny typické pro tyto vrstvy – tzv. markery diferenciace keratinocytů. Mezi tyto markery patří např. keratiny 1, 10 a 14, involucrin, lorikrin nebo filaggrin. Mutace genů hrajících roli v diferenciaci bývají jednou z příčin kožních onemocnění, jakými jsou psoriáza, atopická dermatitida, epidermolytická hyperkeratóza, *ichtyosis vulgaris*, Hailey-Hailey choroba a další.

Pro správnou funkci pokožky je nezbytná také přítomnost transmembránových proteinů akvaporinů, které tvoří kanály usnadňující transport vody a glycerolu. V kůži je nejhojněji zastoupen akvaporin 3, jež se podílí zejména na hydrataci pokožky, hojení ran, ale také na vývoji nádorů. Zvýšená exprese akvaporinu 3 se vyskytuje například v kůži postižené atopickým ekzémem.

V teoretické části práce se zabývám látkami, které ovlivňují expresi markerů diferenciace keratinocytů a akvaporinu 3, a tím i diferenciaci keratinocytů. Mezi nejznámější patří vápník, vitamín A a vitamín D. Zmíněné látky by mohly být využity jako potenciální léčiva nebo jsou již tímto způsobem používány. Do této skupiny lze zařadit také fytohormony cytokininy, u nichž byly, kromě ovlivnění diferenciace, prokázány také pozitivní účinky (např. oddálení stárnutí) na lidské kožní buňky.

Cílem této bakalářské práce bylo vypracování rešerše na téma vliv nízkomolekulárních látek na markery diferenciace. Experimentální část byla zaměřena na optimalizaci primerů pro dané markery diferenciace, hodnocení cytotoxicity cytokininů a imunodetekci vybraných proteinů souvisejících s patogenezí psoriázy.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Cytokininy

Rostlinné hormony (fytohormony) patří mezi přirozeně se vyskytující látky, které jsou v rostlinách přítomny ve velmi nízkých koncentracích. Ve většině případů jsou schopny se v rámci rostlinného těla přemísťovat a vázat se na specifický receptor. Mezi hlavní skupiny rostlinných hormonů patří auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, etylen, brassinosteroidy, polyaminy, jasmonáty, kyselina salicylová a strigolaktony (Frébort *et al.*, 2011).

Hlavní funkcí fytohormonů cytokininů (CK) je regulace buněčného dělení, proto je můžeme nalézt ve všech intenzivně se dělících pletivech. Mezi další funkce CK patří např. výrazné zpomalení stárnutí, udržování vysoké metabolické aktivity pletiv nebo potlačení apikální dominance. V závislosti na poměru koncentrace CK a auxinů dochází k různému ovlivnění regenerace orgánů. Při vyrovnaném poměru se vytváří nediferencované pletivo, kalus. Nadbytek CK způsobuje regeneraci prýtů a naopak nadbytek auxinů má za následek tvorbu kořenů (Procházka *et al.*, 1998).

2.1.1 Výskyt, struktura a přenos signálu

Cytokininy se v rostlinách vyskytují jako volné báze (aktivní formy), dále ve formě nukleozidů a nukleotidů (Frébort *et al.*, 2011). Jsou syntetizovány v embryích, mladých listech, v pletivu vajíček, v plodech, dále je vytvářejí houby, hmyz a hlístice (Pavlová *et Fischer*, 2011). Hlavním místem syntézy CK jsou ovšem kořeny, odkud jsou xylémem transportovány do nadzemních částí rostliny, zejména do listů. V nich přecházejí do floému a mohou být případně transportovány do jiných orgánů (Procházka *et al.*, 1998).

Přírodní CK jsou deriváty adeninu a podle konfigurace jejich N⁶-postranního řetězce je dělíme na izoprenoidní a aromatické. Nejčastěji se vyskytují CK s izoprenoidním postranním řetězcem, a to zejména ty s hydroxylovaným postranním řetězcem v poloze *trans*, jako je např. *trans*-zeatin (Mok *et Mok*, 2001). CK mohou být také konjugovány se sacharidy na N³, N⁷ a N⁹ pozici. Konjugáty mají různé formy. Pokud je v pozici N⁹ na adeninové jádro vázána ribóza jedná se o ribozid, forma ribotidu nastává v případě, že ribóza nese fosfát. Další formy jsou O-glukozid (glukóza je vázána na hydroxylovou skupinu postranního

řetězce) a N-glukozid (glukóza je vázána na N³, N⁷ nebo N⁹). O-glukozidy jsou na rozdíl od N-glukozidů velmi biologicky aktivní (Procházka *et al.*, 1998).

Stejně jako jiné signální molekuly, CK fungují v rostlinách při velmi nízkých koncentracích (1 – 50 pmol/g čerstvé hmoty) (Galuszka *et al.*, 2008). Aktivita cytokininů v určitém orgánu je regulována na různých stupních včetně syntézy *de novo*, aktivace, konjugace a degradace. Zastoupení jednotlivých typů cytokininových receptorů spoluurčuje odpověď jednotlivých tkání na působení CK. Do regulace působení CK jsou také zapojeny místní a dálkové transportní systémy (Kudo *et al.*, 2010). Principem přenosu signálu CK je postupný přenos fosfátu z receptoru na mobilní efekторы v cytozolu a v jádře. Signál CK je přijímán receptorovými histidinovými kinázami lokalizovanými v plazmatické membráně a přenášen dvousložkovým signálním systémem (Frébort *et al.*, 2011; Pavlová *et Fischer*, 2011).

2.1.2 Syntéza a degradace

Biosyntéza N⁶-substituovaných purinů byla poprvé pozorována u druhu hlenky *D. discoideum*, kde hrála roli v produkci diskadeninu (2-amino-4-[6-(3-metylbut-2-enylamino)purin-3-yl]butanová kyselina), inhibitoru klíčení spor (Taya *et al.*, 1978). První enzym pro biosyntézu CK byl identifikován v bakteriích *Agrobacterium tumefaciens* napadajících rostliny, které obsahují Ti plasmid, jehož malá část, známá jako T-DNA, je zapojena v biosyntéze CK (Akiyoshi *et al.*, 1984).

U CK existují v rostlinách dvě dráhy biosyntézy. V prvním případě dochází k navázání izopentenylového postranního řetězce z DMAPP (dimethylallyldifosfátu) na ATP nebo ADP. Další dráha vychází z transferové RNA (Kakimoto, 2001).

K inaktivaci CK dochází degradací nebo konjugací. Degradace je katalyzována enzymem cytokinin oxidázou/dehydrogenázou (CKX). Tento enzym, schopný štěpit N⁶-postranní řetězec CK, byl poprvé objeven v roce 1971 v surovém extraktu tabáku (*Nicotiana tabacum*) (Pačes *et al.*, 1971).

2.1.3 Historie

První CK byl izolován v roce 1955 z autoklávovaného sledího spermatu. Jelikož tato látka podporovala buněčné dělení neboli cytokinezi, dostala název kinetin (Miller *et al.*, 1955). Ve stejném roce bylo zjištěno, že kinetin (6-furfurylaminopurin) je "umělá" sloučenina vzni-

kající při degradaci DNA (Hall *et De Ropp*, 1955). Tato skutečnost byla vyvrácena až o 50 let později, kdy byl kinetin spolu se svým ribozidem objeven v kokosové vodě (*Cocos nucifera* L.) (Ge *et al.*, 2005). První přirozený cytokinin, zeatin, byl izolován v roce 1963 z nezralého endospermu kukuřice (*Zea mays* L.) (Letham, 1963).

6-benzylaminopurin (BAP) a jiné aromatické CK byly dlouho považovány za syntetické, ale pozdější výzkum prokázal jejich přítomnost v několika rostlinných druzích (Strnad, 1997). Např. Horgan *et al.* izolovali první CK tohoto typu ze zralých listů topolu a identifikovali jej jako 6-(2-hydroxybenzylamino)-9- β -D-ribofuranozylpurin (Horgan *et al.*, 1975). Později byla v listech topolu objevena rodina endogenních aromatických CK. Podle rostliny, ze které byly izolovány, dostaly tyto sloučeniny název *meta*-topolin (Strnad *et al.*, 1997). *Meta*-topolin (N⁶-(3-hydroxybenzyl)adenin), *ortho*-topolin (N⁶-(2-hydroxybenzyl)adenin), BAP a jejich deriváty představují přírodní aromatické cytokininy, které se od izoprenoidních CK liší jak chemicky, tak svou biologickou aktivitou (Strnad, 1997).

2.1.4 Vliv cytokininů na živočišné buňky

Přestože jsou CK rostlinné hormony, mají různé účinky i na živočišné buňky. Věnují se zejména účinkům na buňky lidské kůže - fibroblasty a keratinocyty.

Kinetin je známý pro svůj efekt zpomalující stárnutí. Při pokusu s lidskými fibroblasty přidání 40 - 200 μ M kinetinu do kultivačního média oddálilo nástup stárnutí buněk a snížilo rozsah příznaků spojených se stárnutím jako jsou změny v morfologii, buněčné velikosti, rychlosti, organizaci cytoskeletu a další (Rattan *et Clark*, 1994). Podobné účinky na fibroblasty byly později prokázány také u *trans*-zeatinu (Rattan *et Sodagam*, 2005).

Trans-zeatin dále ovlivňuje expresi akvaporinu 3 (AQP3), kterému je věnována kapitola níže. UV záření, jedna z hlavních příčin stárnutí kůže, způsobuje snížení hladiny AQP3 v keratinocytech, což vede k dehydrataci kůže a opožděnému hojení ran. V tomto procesu je zapojena dráha MEK/ERK, která je indukována UV zářením a zprostředkovává ztrátu AQP3. *Trans*-zeatin inhibuje aktivaci této dráhy a zmenšuje tak ztrátu AQP3 vyvolanou UV zářením (Ji *et al.*, 2010).

2.2 Kůže

Dále se zabývám účinkem CK a jiných nízkomolekulárních látek na markery diferenciacie keratinocytů - specifické proteiny syntetizované v jednotlivých vrstvách pokožky nutné pro tvorbu rohové vrstvy. Nejprve ale začnu popisem anatomie a morfologie lidské kůže. Zmíním se o důležitých transmembránových proteinech akvaporinech, které se v kůži podílejí zejména na hydrataci a hojení ran. Jedna kapitola je také věnována popisu jednotlivých markerů diferenciacie keratinocytů.

Kůže je největším a nejtěžším orgánem lidského těla, u dospělých tvoří cca 16 % jeho celkové hmotnosti a má plošný rozsah 1,2 - 2,3 m². Zajišťuje mnoho životně důležitých funkcí - chrání tělo před vnějšími fyzikálními, chemickými, mechanickými a biologickými vlivy, má smyslové a vylučovací funkce, dále zabraňuje nadměrné ztrátě vody, podílí se na termoregulaci a syntéze vitamínu D. Kůže je složena ze tří vrstev: pokožky (*epidermis*), škáry (*corium*) a podkožního vaziva (*tela subcutanea*). *Epidermis* je tvořena rohovějícím vrstevnatým dlaždicovým epitelem ektodermového původu a dále obsahuje melanocyty, Langerhansovy buňky a Merkelovy buňky. Škára je složena z hustého kolagenní vaziva a dodává kůži mechanickou pevnost a odolnost. Podkožní vazivo je řídká vazivová tkáň, která může obsahovat polštář tukových buněk, *panniculus adiposus*. Rozlišujeme kůži tlustého typu (dlaně a chodidla), jejíž epidermální vrstva má tloušťku 400 – 800 μm, a kůži tenkého typu (ochlupené části těla) s epidermální vrstvou silnou 75 – 150 μm. Součástí kůže jsou též kožní adnexa zahrnující vlasy, chlupy, nehty a kožní žlázy (Klika, 1986; Junqueira *et al.*, 1997; Hach *et al.*, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012).

2.3 *Epidermis*

Epidermis je neustále se obnovující, vrstevnatý, dlaždicový a rohovějící epitel. Hlavními buňkami pokožky jsou keratinocyty, dále se zde vyskytují pigmentové buňky melanocyty, Langerhansovy buňky hrající roli v imunitním systému a Merkelovy buňky, které slouží jako mechanoreceptory. Pokožka je obnovována díky epidermálním kmenovým buňkám, které se nachází v bazální vrstvě a produkují dceřinné buňky pohybující se směrem k povrchu kůže. Během této cesty keratinocyty prochází řadou biochemických a morfologických změn, které vedou ke vzniku jednotlivých vrstev *epidermis*. K obnově *epidermis* dochází za nor-

málních podmínek v průběhu 15 – 30 dnů. Hlavními vrstvami *epidermis* jsou *stratum basale* (bazální vrstva), *stratum spinosum* (ostnitá vrstva), *stratum granulosum* (granulózní vrstva) a *stratum corneum* (zrohovělá vrstva). U kůže tlustého typu lze mezi *stratum granulosum* a *stratum corneum* rozlišit ještě pátou vrstvu – *stratum lucidum* (Klika, 1986; Junqueira *et al.*, 1997; Hach *et al.*, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012).

2.3.1 *Stratum basale*

Bazální vrstva, známá též jako *stratum cylindricum*, se skládá z jedné vrstvy mitoticky aktivních cylindrických či kubických buněk. Jádra těchto buněk mají kulovitý až oválný tvar. Buňky jsou mezi sebou a s buňkami vyšších vrstev propojeny četnými desmozomy. K bazální lamině jsou ukotveny prostřednictvím hemidesmozomů (Klika, 1986; Junqueira *et al.*, 1997; Hach *et al.*, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012).

2.3.2 *Stratum spinosum*

Stratum spinosum tvoří několik vrstev polygonálních, kubických nebo lehce oploštělých buněk. Výběžky těchto buněk jsou vyplněny svazky filament, které se sbíhají do velkého počtu menších výběžků ("ostnů"). Tyto svazky končí v desmozomech, jež jsou umístěny na vrcholcích ostnitých výběžků. Do desmozomů se soustředí svazky tonofilament, tonofibrily. Jsou důležité při zachování soudržnosti mezi buňkami a společně s desmozomy zajišťují velkou mechanickou pevnost této vrstvy. *Stratum spinosum* a *stratum basale* tvoří tzv. *stratum germinativum Malpighi*, kde probíhají všechna mitotická dělení (Klika, 1986; Junqueira *et al.*, 1997; Hach *et al.*, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012).

2.3.3 *Stratum granulosum*

Stratum granulosum je složena z 3 - 5 vrstev oploštělých polygonálních buněk. Tyto buňky mají malé centrálně uložené jádro a jejich cytoplazma je vyplněna bazofilními keratohyalinovými granuly. Tyto granula jsou tvořena proteiny profilaggrinem, lorikrinem a filamenty cytokeratinu, a podílejí se na stavbě zrohovělých buněk. Kromě keratohyalinových granul se v této vrstvě vyskytují také malá oválná lamelární granula. Ta splývají s cytoplazmatickou membránou a vypuzují svůj obsah bohatý na glykoproteiny a fosfolipidy do mezibuněčných

prostor, kde se uplatňuje jako tmel bránící vstupu cizorodých látek z vnějšího prostředí do organismu a naopak (Klika, 1986; Junqueira *et al.*, 1997; Hach *et al.*, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012).

2.3.4 *Stratum corneum*

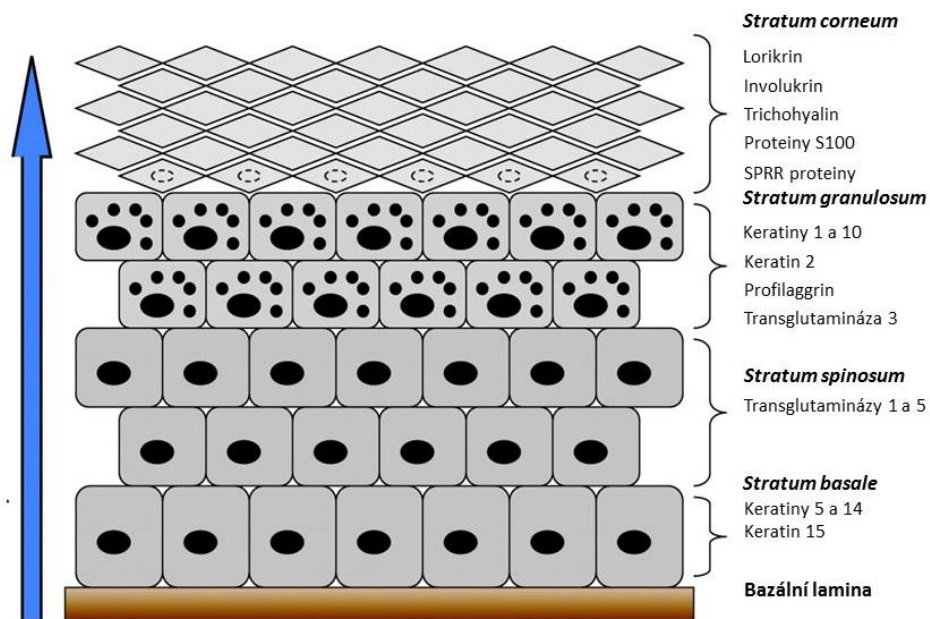
Rohovou vrstvu tvoří 15 - 20 vrstev buněk, které postrádají jádra i jiné cytoplazmatické organely. Buňky mají tvar polygonálních destiček a jejich membrána je zesílena keratinem na asi 15 nm. Buňky jsou mezi sebou propojeny modifikovanými desmozomy (korneodesmozomy), po jejichž proteolytickém rozvolnění se buňky jednotlivě odlupují. Tento proces se nazývá deskvamace (Klika, 1986; Junqueira *et al.*, 1997; Hach *et al.*, 2003; Lüllmann-Rauch, 2012).

2.4 Diferenciace keratinocytů

Diferenciace je proces, při kterém progenitorové buňky získávají funkční schopnosti (Radoja *et al.*, 2006). Diferenciace keratinocytů neboli keratinizace je geneticky naprogramovaný a přísně regulovaný komplex morfologických a metabolických změn. Výsledkem je terminálně diferencovaný mrtvý keratinocyt (korneocyt) (Chu, 2008).

V keratinocytech jsou v průběhu diferenciace syntetizovány proteiny nutné pro tvorbu zrohovělé vrstvy, tzv. markery diferenciace keratinocytů. Ve *stratum granulosum* se tvoří protein profilaggrin, který je později štěpen na monomery filaggrinu. Tyto dva proteiny jsou důležité pro agregaci cytokeratinových filament, díky níž vzniká chemicky a mechanicky odolný keratin vyplňující celou zrohovělou buňku. Okolo buněk se následně tvoří nerozpustný, odolný a pružný proteinový zrohovělý obal (cornified envelope). Během tvorby zrohovělého obalu dochází k ukládání určitých proteinů, např. lorikrinu, na vnitřní straně buňčné membrány. V tomto procesu hrají důležitou roli také transglutaminázy, které umožňují vzájemné propojení jednotlivých proteinů (Lüllmann-Rauch, 2012).

Diferenciace keratinocytů je nejvíce ovlivňována koncentrací vápníku (Hennings *et al.*, 1980). Produkce markerů je kromě vápníku ovlivňována dalšími látkami jako jsou vitamín A, vitamín D, glukokortikoidy nebo rostlinné hormony a polysacharidy. Změny v expresi markerů jsou spojeny se vznikem a rozvojem různých kožních onemocnění.



Obr. 1: Schéma epidermální diferenciace (převzato a upraveno z Sandilands et al., 2009).

Tab. 1: Prekurzory zrohovělého obalu (převzato a upraveno z Eckert et al., 2005).

Protein	Velikost (kDa)	Obsah v rohovém obalu (%)
Involukrin	65	5
Lorikrin	26	80
SPR	5 - 26	3 - 5
Cystatin A	12	2 - 5
Proelafin	10	< 1
Profilaggrin	< 400	< 1
Keratiny typu II	56 - 60	< 1
Desmoplakin	330 / 250	< 1
Envoplakin	210	< 1
Periplakin	195	< 1
S100A10 a S100A11	12	< 1
Annexin I	36	< 1
Kornifelin	12,5	

2.5 Akvaporin-3

Akvaporiny (AQP) jsou rodinou malých hydrofobních transmembránových proteinů, které tvoří vodní kanály usnadňující transport vody přes buněčné membrány. U savců bylo identifikováno 13 akvaporinů (AQP0 – AQP12), které se liší tkáňovou expresí. Akvaporiny 3, 7, 9 a 10 fungují jako akvaglyceroporiny, které kromě vody transportují také glycerol a případně další malé rozpuštěné látky, zatímco akvaporiny 1, 2, 4, 5 a 8 slouží jako transportéry molekul vody (Hara-Chikuma *et* Verkman, 2008b).

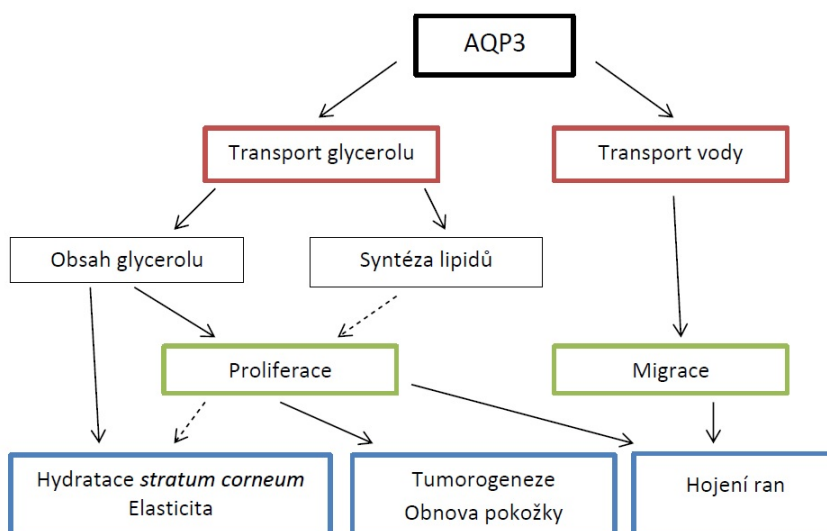
Nejhojnějším akvaporinem v kůži je AQP3, který je exprimován v plazmatických membránách bazální vrstvy keratinocytů *epidermis*, dále v ledvinách, plicích, slinivce břišní, játrech, tlustém střevě, slezině a prostatě (Sougrat *et al.*, 2002; Ishibashi *et al.*, 1995). AQP3 se v kůži podílí zejména na hydrataci a hojení ran. Roli hraje také v tumorogenezi (Hara-Chikuma *et* Verkman, 2008b). Myši s umlčeným genem pro AQP3 mají v porovnání s divokým typem snížený obsah vody ve *stratum corneum* a jejich pokožka vykazuje sníženou elasticitu (Ma *et al.*, 2002).

Exprese AQP3 je snížena pokud keratinocyty kultivujeme v přítomnosti 1,25-dihydroxyvitamínu D₃ a při zvýšené koncentraci extracelulárního Ca²⁺ (Zheng *et* Bollag, 2003). Expresi dále snižuje například tumor nekrotizující faktor α (TNF- α), který je považován za klíčový mediátor zánětu kůže (Horie *et al.*, 2009).

Kromě vápníku a vitamínu D existuje mnoho dalších látek regulujících expresi AQP3. Aktivátory PPAR- γ (peroxisome proliferators-activated receptor) výrazně stimulují expresi mRNA AQP3 v nediferencovaných i diferencovaných lidských keratinocytech. V menší míře je tato exprese zvýšena také aktivací jaterního receptoru X, retinového receptoru X a receptoru kyseliny retinové (Jiang *et al.*, 2011). Proliferaci a expresi keratinocytů dále zvyšuje chemokin CCL17, jenž je produkován dendritickými buňkami, T-buňkami a keratinocyty, a ve velké míře se vyskytuje v pokožce postižené atopickou dermatitidou (Reiss *et al.*, 2001; Nakahigashi *et al.*, 2011).

Pozměněné hladiny AQP3 jsou spojeny s některými kožními onemocněními. Zvýšená exprese AQP3 ve *stratum corneum* byla prokázána u kožních onemocnění spojených se zvýšenou transepidermální ztrátou vody (Brandner, 2007). Mezi tyto onemocnění patří např. atopický ekzém (AE). U postižených lidí byla pozorována zvýšená exprese a změněná dis-

tribuce AQP3, která přispívá ke ztrátě vody v pokožce a tím pádem ke vzniku suché kůže, což je jeden ze znaků AE (Olsson *et al.*, 2006). Při pokusech na myších bylo zjištěno, že AQP3 je silně exprimován v kůži postižené spinocelulárním karcinomem. Naopak myši s umlčeným genem pro AQP3 byly i po aplikaci nádorových iniciátorů k tvorbě nádorů rezistentní. U těchto myší bylo také pozorováno snížení obsahu glycerolu, glycerol-3-fosfátu a ATP, což naznačuje zapojení glycerolu, jehož transport je usnadněn AQP3, v buněčné proliferaci během tumorogeneze (Hara-Chikuma *et Verkman*, 2008a). Snížená hladina AQP3 byla naopak pozorována v keratinocytech depigmentované pokožky postižené vitiligem (Kim *et Lee*, 2010). Exprese AQP3 klesá s věkem a po vystavení pokožky chronickému slunečnímu záření (Bonté, 2011).



Obr. 2: Mechanismus hydratace kůže, hojení ran a tumorogeneze závislý na AQP3 (převzato a upraveno z Hara-Chikuma *et Verkman*, 2008).

2.6 Vybrané markery diferenciace keratinocytů

2.6.1 Keratiny

Keratiny (K) jsou hlavní strukturální proteiny epiteliálních buněk. Tvoří cytoplazmatickou síť 10 - 12 nm širokých intermediálních filament. Jsou kódovány rodinou více než 50 genů, které jsou specificky exprimovány v závislosti na odlišných vývojových drahách a fyziologických požadavcích (Coulombe *et Omary*, 2002; Hesse *et al.*, 2004; Schweizer *et al.*, 2006). Keratiny se dělí na keratiny typu I, kam se řadí K9 – K10, K12 – K28, K31 – K40 a keratiny typu II zahrnující K1 – K8 a K71 – K86 (Schweizer *et al.*, 2006). Keratiny typu I a II se v poměru 1:1 sestavují do heteropolymerů (Coulombe *et Omary*, 2002).

Jelikož keratiny zpevňují buňky a poskytují jim ochranu před mechanickým stresem, jejich ztráta vede k výraznému „změkčení“ buněk. Keratiny také brání intracelulární deformaci buněk a zvyšují jejich elasticitu (Fuchs *et Cleveland*, 1998; Ramms *et al.*, 2013). Jak je uvedeno dále, mutace jednotlivých keratinů způsobují různá kožní onemocnění.

Důležitou roli v regulaci organizace keratinových filament hraje reverzibilní fosforylace, což bylo pozorováno např. u K19 (Zhou *et al.*, 1999). Hyperfosforylace keratinů se objevuje jako odpověď na stres a na většinu zranění a nemocí. V případě K8 a K18 je hyperfosforylace spolehlivým ukazatelem progresu onemocnění jater, např. cirhózy nebo virové hepatitidy typu C. Význam hyperfosforylace v rozvoji jaterních onemocnění však není zcela jasný. Předpokládá se, že poskytuje buňce mechanickou ochranu nebo naopak podporuje progresi onemocnění (Toivola *et al.*, 2004).

Degradace keratinů probíhá dvěma biochemickými drahami, a to prostřednictvím kaspáz nebo pomocí ubikvitin-proteázového systému. Ubikvitinace je součástí obratu keratinů zprostředkovaného proteázami a je inhibována hyperfosforylací keratinů (Ku *et Omary*, 2000). Degradace kaspázami probíhá pravděpodobně u všech keratinů typu I. Byla prokázána u K14, K15, K17, K18 a K19 (Ku *et al.*, 1997; Ku *et Omary*, 2001; Caulín *et al.*, 1997; Badock *et al.*, 2001).

2.6.1.1 Keratin 14

Keratin K14 (typ I) je spolu s K5 (typ II) exprimován v mitoticky aktivních buňkách bazální vrstvy. Při přesunu buněk ze *stratum basale* do dalších vrstev během epidermální diferenciaci

ace je exprese K5 a K14 postupně snižována, a naopak je indukována exprese markerů K1, K10 nebo involucrinu (Fuchs *et Green*, 1980).

Zvýšené hladiny markerů diferenciaci keratinocytů a výrazně snížená buněčná proliferace jsou pozorovány u buněk, kterým chybí K14. Další známkou K14 deficientních buněk je zvýšená hladina klíčového regulátoru diferenciaci dlaždicových buněk, Notch1. Vypnutí exprese K14 také vede ke snížení tumorogenního potenciálu, což bylo dokázáno na buněčné linii získané z lidského jazyka postiženého spinocelulárním karcinomem (Alam *et al.*, 2011).

Delece K14 vede k závažnému dědičnému onemocnění *epidermolysis bullosa simplex*. K14 deficientní myši mají rozsáhlé puchýře a umírají 2 dny po porodu, což naznačuje důležitou roli K14 v zachování mechanické integrity epitelálních buněk (Chan *et al.*, 1994).

2.6.1.2 Keratin 1

Přechod keratinocytů z proliferující bazální vrstvy do postmitotické trnové vrstvy je charakterizován změnou v expresi keratinů. Místo bazálních keratinů K5, K14 a K15 jsou postupně exprimovány suprabazální keratiny K1 (typ II) a K10 (typ I) (Fuchs *et Green*, 1980; Tseng *et al.*, 1982; Stoler *et al.*, 1988). Mutace K1 jsou spojeny s různými kožními onemocněními, nejznámější je epidermolytická hyperkeratóza (Rothnagel *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1992). Naopak vzácná jsou autozomální kožní onemocnění postihující kůži dlaní a pat, *keratosis palmoplantaris striata* a *ichtyosis hystrix* typu Curth-Macklin (Whitlock *et al.*, 2002; Sprecher *et al.*, 2001).

2.6.1.3 Keratin 10

K10 je spolu s K1 exprimován v suprabazálních vrstvách *epidermis* a společně tvoří důležitou součást *stratum corneum* (Bowden *et al.*, 1984). Mutace K1 a K10 jsou spojeny s epidermolytickou hyperkeratózou. Při této nemoci dochází ke shlukování keratinových filament a k degeneraci terminálně diferencovaných epidermálních buněk. Charakteristické je zčervenání kůže a tvorba puchýřů, které postupně mizí a začíná být patrná tlustá, ichtyotická kůže (Rothnagel *et al.*, 1992; Cheng *et al.*, 1992).

2.6.2 Filaggrin

Termín filaggrin (z angl. filament-aggregating protein) byl poprvé použit v roce 1981 a popisoval třídu proteinů izolovaných ze *stratum corneum*. Filaggrin je kationický protein bohatý na histidin, který hraje důležitou roli při tvorbě rohového obalu (Steinert *et al.*, 1981). Je syntetizován v granulární vrstvě *epidermis* v pozdních fázích diferenciaci, jako velký (~400 kDa), nerozpustný a silně fosforylovaný prekurzor profilaggrin, který se akumuluje v keratohyalinových granulech (Dale *et al.*, 1979; Lonsdale-Eccles *et al.*, 1980; Harding *et al.*, 1983; McKinley-Grant *et al.*, 1989). Profilaggrin je během přechodu z granulární vrstvy do *stratum corneum* defosforylován a proteolyticky štěpen na jednotlivé molekuly filaggrinu (37 kDa). Poločas rozkladu filaggrinu je asi 6 hodin, poté je degradován na volné aminokyseliny potřebné pro zachování epidermální osmolarity a flexibility (Candi *et al.*, 2005). Přeměna profilaggrinu na filaggrin umožňuje filaggrinu fungovat jako keratin-agregující protein v korneocytech, což má za následek sdružování keratinových filamentů do makrofibril. Ty jsou stabilizovány zesíťováním s jinými proteiny prostřednictvím transglutamináz. Shlukování do makrofibril umožňuje keratinovým proteinům přežít proteolytickou remodelaci, ke které dochází v průběhu terminální diferenciaci keratinocytů (Manabe *et al.*, 1991; Candi *et al.*, 1998; Steinert *et al.*, 1995).

Exprese filaggrinu v kultivovaných keratinocytech je indukována po dosažení buněčné konfluenci, extracelulárním vápníkem a nedostatkem kyslíku (Resing *et al.*, 1993; Wong *et al.*, 2014). Dále jeho expresi indukuje cholesterol sulfát prostřednictvím zvýšené exprese ROR α (retinoid-related orphan receptor) (Hanyu *et al.*, 2012). Akumulace filaggrinu je regulována prostřednictvím epidermální kaspázy 14 (CASP14), dále serinovou proteázou matriptázou (MT-SP1), která je nezbytnou složkou při zpracování profilaggrinu (Denecker *et al.*, 2007; List *et al.*, 2003).

Filaggrin je jedním z klíčových proteinů zapojených do bariérové funkce kůže. Nedostatek filaggrinu sám o sobě narušuje tvorbu epidermální bariéry, což má mimo jiné za následek zvýšenou citlivost na UV záření (Mildner *et al.*, 2010). Mutace v genu pro filaggrin byly identifikovány jako hlavní faktor způsobující atopickou dermatitidu (AD) (Palmer *et al.*, 2006). Kůže postižená akutní AD je charakterizována výrazně sníženou expresí filaggrinu a zároveň zvýšenou expresí interleukinů IL-4 a IL-13. Keratinocyty diferencované v přítom-

mnosti těchto dvou látek vykazují výrazně sníženou expresi filaggrinu (Howell *et al.*, 2007). Filaggrin hraje roli také při vzniku běžné kožní choroby *ichthyosis vulgaris* (Sybert *et al.*, 1985).

2.6.3 Involukrin

Rozpustný cytozolický protein involukrin (INV) je dalším z prekurzorů rohového obalu (Rice *et Green*, 1979). Během tvorby tohoto obalu je INV zesíťován prostřednictvím transglutamináz a slouží jako „kostra“ pro přidávání dalších proteinů (Steinert *et Marekov*, 1997). INV je označován jako marker časně terminální diferenciaci, jelikož jeho syntéza začíná poté, co se keratinocyty přestanou dělit, ale před začátkem zesíťování proteinů (Fiona *et Watt*, 1983). Tvorba INV nastává až ve chvíli, kdy jsou keratinocyty ve značné vzdálenosti od bazální vrstvy. Je známo, že keratinocyty se během migrace z bazální vrstvy postupně zvětšují, iniciace syntézy INV tedy koreluje s buněčnou velikostí (Sun *et Green*, 1976; Watt *et Green*, 1981).

Existuje mnoho látek, které pozitivně regulují expresi INV. V keratinocytech kultivovaných *in vitro* je exprese INV indukována vápníkem, vitamínem D₃, kortikosteroidy nebo estery forbolu (Su *et al.*, 1994b; Cline *et Rice*, 1983; Takahashi *et Iizuka*, 1993). Zvýšená exprese byla zaznamenána v přítomnosti interleukinů IL-13 a IL-17A (Chen *et al.*, 2013). Mezi další látky zvyšující hladinu INV dále patří interferon IFN- γ , tumor nekrotizující faktor TNF- α a endotelin ET-1 (Takahashi *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2013). Zvýšená exprese INV byla prokázána také u buněk, jejichž plazmatické membrány postrádaly cholesterol, který se podílí na tvorbě rohového obalu (Jans *et al.*, 2004).

Zvýšená exprese INV byla detekována u psoriázy. Ve zdravé kůži se INV nachází pouze v horních vrstvách *stratum spinosum*, zatímco v lézích psoriatické kůže je detekován v celé této vrstvě (Chen *et al.*, 2013). U pacientů s AD byly naopak zaznamenány výrazně snížené hladiny INV, s čímž souvisí také snížená exprese tohoto markeru v přítomnosti cytokinů Th2, které jsou v kůži těchto pacientů nadměrně exprimovány (Kim *et al.*, 2008). Snížené hladiny INV se vyskytují také v keratinocytech postižených Hailey-Hailey chorobou (česky benigní familiární pemfigus). Toto autozomálně dominantní kožní onemocnění bylo poprvé popsáno bratry Haileyovými v roce 1939 a je charakterizováno tvorbou puchýřů a šupinatých

erytematozních plaků, které se objevují v místech tření, jakými jsou třísla, krk nebo podpaží (Aberg *et al.*, 2007; Yordanova *et* Gospodinov, 2007).

2.6.4 Lorikrin

Epidermální zrohovatělý buněčný obal pomáhá udržovat strukturální integritu pokožky a je zásadní pro správnou funkci epidermální bariéry (Hohl, 1990). Jeho hlavní složkou je lorikrin (LOR) tvořící minimálně 70 % hmoty (Steven *et* Steinert, 1994). Kromě LOR obsahuje zrohovělý obal komplex specifických proteinů, jakými jsou například involukrin, cystatin A, trichohyalin, proteinová rodina SPRR (small proline rich protein) a dalších cca 20 proteinů (Rice *et* Green, 1979; Kartasova *et al.*, 1987; Lee *et al.*, 1993; Kartasova *et* van de Putte, 1988). Exprese LOR probíhá v granulární vrstvě *epidermis*, kde je skladován v keratohyalinních granulech (Mehrel *et al.*, 1990; Steven *et al.*, 1990; Yoneda *et al.*, 1992). Během terminální diferenciace se LOR z granulí uvolňuje a spolu s dalšími uvedenými proteiny je kovalentně zesíťován prostřednictvím transglutamináz a sestaven do zrohovělého obalu (Steinert *et* Marekov, 1995; Greenberg *et al.*, 1991).

LOR je protein bohatý na glycin, serin a cystein. Skládá se z 315 aminokyselinových zbytků a má velikost 26 kDa (Mehrel *et al.*, 1990; Hohl *et al.*, 1991b). Intenzita exprese LOR se liší podle části těla, hojně se vyskytuje např. v perianální oblasti, méně v kůži v oblasti nohou (Hohl *et* Piérard, 1993).

In vitro je transkripce genu pro LOR indukována prostřednictvím vápníku, protein kinázy C a buněčnou konfluencí, a naopak je potlačena působením kyseliny retinové (Hohl *et al.*, 1991a; Dlugosz *et* Yuspa, 1993). Snížená exprese LOR a INV je zaznamenána v kůži pacientů postižených AD (Kim *et al.*, 2008). Tito pacienti mají zvýšené hodnoty interleukinů IL-4 a IL-13 (Hamid *et al.*, 1994). Bylo prokázáno, že keratinocyty diferencující se v přítomnosti těchto interleukinů, výrazně inhibují indukci LOR a INV (Kim *et al.*, 2008). Snížená exprese LOR byla prokázána také u psoriázy (Giardina *et al.*, 2004).

Heterozygotní mutace LOR byly identifikovány ve dvou formách dominantně dědičných kožních onemocnění. Prvním z nich je ichtyotická varianta Vohlwinklova syndromu a druhým je specifická varianta progresivní symetrické erythrokeratodermie (*erythrokeratoderma progressiva symmetrica*). Pro tyto poruchy byl zaveden souhrnný název lorikrinová keratoderma. Kůže pacientů trpících onemocněními spojenými s mutací LOR je postižena hyper-

keratózou dlaní a plosek nohou (palmoplantární hyperkeratóza) a má „voštinovitý“ vzhled (Maestrini *et al.*, 1996; Korge *et al.*, 1997; Ishida-Yamamoto *et al.*, 1997; Ishida-Yamamoto *et al.*, 1998; Armstrong *et al.*, 1998). Léčba těchto onemocnění není jednoduchá, nejčastěji se využívá systémová terapie pomocí retinoidů.

2.7 Látky ovlivňující diferenciaci keratinocytů

Kapitola se zabývá nejrůznějšími látkami, které ovlivňují expresi markerů diferenciaci keratinocytů. Některé z těchto látek jsou díky svým účinkům používány jako součást léčivých přípravků, např. deriváty vitamínů A a D jsou využívány při léčbě psoriázy. U jiných je potenciální využití v léčivech studováno.

2.7.1 Vápník

V roce 1980 Hennings a jeho kolegové dokázali, že proliferace a iniciace diferenciaci keratinocytů závisí na koncentraci vápenatých iontů (Ca^{2+}). Po zvýšení koncentrace extracelulárního Ca^{2+} z 0,09 mM na 1,2 mM se proliferující keratinocyty začaly velmi rychle diferencovat (Hennings *et al.*, 1980). Hennings pracoval s myšími epidermálními buňkami, ale jeho závěry byly později potvrzeny i na lidských keratinocytech (Pillai *et al.*, 1988). Ca^{2+} zahajuje proces diferenciaci prostřednictvím na transkripci závislých i nezávislých drah (Bikle *et al.*, 2012). Na transkripci nezávislým mechanismem je např. tvorba desmozomů, které pokožce poskytují mechanickou oporu. Po zvýšení koncentrace na 1,2 mM se desmozomy začaly tvořit za méně než 5 minut (Hennings *et Holbrook*, 1983). Na transkripci závislá dráha zahrnuje aktivaci promotorů zodpovědných za odpověď na Ca^{2+} , jako je aktivační protein 1 (AP1), jehož přítomnost byla dokázána u INV nebo K1 (Ng *et al.*, 1996; Huff *et al.*, 1993).

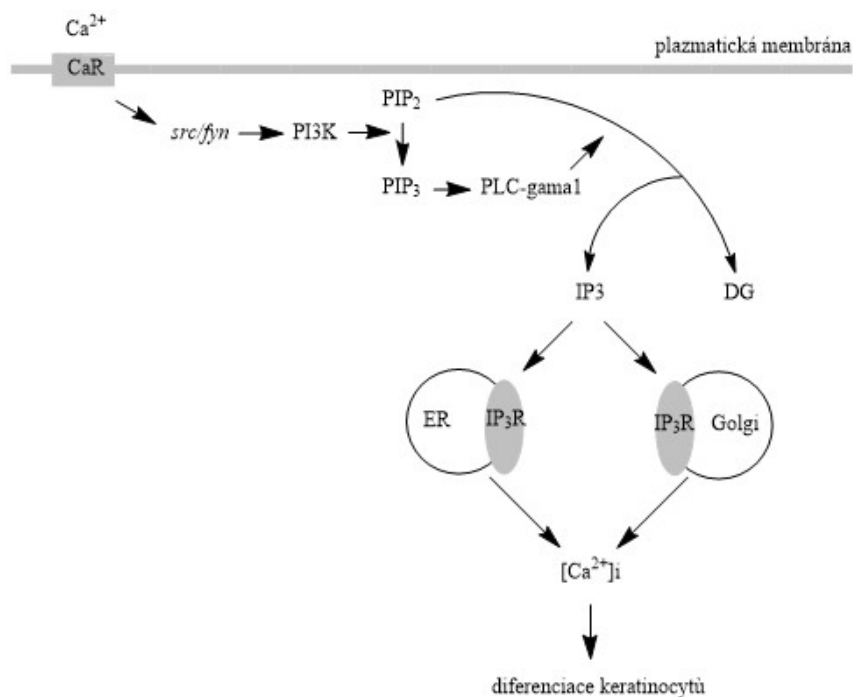
Při nízkých koncentracích extracelulárního Ca^{2+} (např. 0,03 mM) se keratinocyty rychle množí a produkují fenotyp bazálních buněk. Pokud je koncentrace zvýšena nad 0,1 mM (tzv. vápníkový prepínač), keratinocyty se začínají diferencovat a prochází morfologickými změnami zahrnujícími zejména tvorbu buněčných kontaktů, které jsou pro diferenciaci nezbytné (Hennings *et al.*, 1980; Bikle *et al.*, 2012). Mezi tyto kontakty patří adherentní spoje, těsné spoje a desmozomy (Müller *et al.*, 2008a; Niessen, 2007). Vápenaté ionty aktivují fosfolipázu C, která hydrolyzuje fosfatidylinozitol-4,5-bifosfát na diacylglycerol a inozitol-1,4,5-trifosfát (IP3). IP3 aktivuje protein kinázu C (PKC) a mobilizuje intracelulární Ca^{2+} (Jaken *et Yuspa*, 1988; Tu *et Bikle*, 2013). Zvýšená hladina Ca^{2+} poté indukuje buněčnou adhezi zprostředkovanou E-kadherinem a ta následně aktivuje další signální molekuly, které jsou nezbytné pro správný průběh diferenciaci a přežití buněk. Mezi tyto signální molekuly

patří např. fosfatidylinozitol-3-kináza (PI3K), Akt nebo fosfolipáza C γ 1 (PLC γ 1) (Pece *et al.*, 2000; Pece *et al.*, 1999; Xie *et al.*, 2005).

Změny v koncentracích vápníku keratinocyty vnímají prostřednictvím vápníkového receptoru spřaženého s G-proteinem (calcium receptor, CaR) (Bikle *et al.*, 1996). Inaktivace CaR zabraňuje buněčné adhezi zprostředkované E-kadheriny a následné aktivaci PLC γ 1 (Tu *et al.*, 2008). Důležitou roli v diferenciaci hraje kromě CaR množství vápníkových kanálů, mezi nimi i "superrodina" kanálů TRP, dělí se do 6 podskupin. Např. aktivace kanálu TRPC6 specifickým aktivátorem hyperforinem je dostačující k zahájení diferenciaci. Naopak umlčení tohoto kanálu prostřednictvím siRNA silně potlačuje diferenciaci keratinocytů (Elsholz *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2008b).

Pro správný průběh diferenciaci je důležitá koncentrace jak extracelulárního Ca²⁺, tak intracelulárního. Extracelulární Ca²⁺ je zodpovědný za buněčnou soudržnost zprostředkovanou tvorbou desmozomů, adherentních a těsných spojů, intracelulární signalizace má za následek stabilitu těchto komplexů a podporuje tak proces diferenciaci (Bikle *et al.*, 2012). Ve skutečnosti zvýšená koncentrace extracelulárního Ca²⁺ vede ke zvýšení hladiny intracelulárního Ca²⁺ (Bikle *et al.*, 1996).

V *epidermis* existuje strmý gradient vápenatých iontů, který dosahuje maxima ve *stratum granulosum* (> 20 μ M) a poté směrem ke *stratum corneum* klesá. Velmi nízký obsah vápníku ve *stratum corneum* (< 3 μ M) je způsobem tím, že relativně "vysušené" buňky této vrstvy nejsou schopny rozpouštět ionty (Menon *et al.*, 1985; Komuves *et al.*, 2002; Celli *et al.*, 2010). Většina intracelulárního Ca²⁺ je skladována v Golgiho aparátu (GA) a endoplazmatickém retikulu (ER) (Celli *et al.*, 2010). Zabráněním exprese CaR prostřednictvím stimulace vápníkových pump ER a GA (SERCA2 a SPCA1), dochází k redukci intracelulárních zásob Ca²⁺ a k omezení množství vápníku, který může být uvolněn po přidání extracelulárního Ca²⁺ (Tu *et al.*, 2007). Mutace těchto vápníkových pump jsou příčinou Hailey-Hailey choroby a Darierovy choroby, které jsou charakteristické sníženou hladinou Ca²⁺ v ER a GA (Hu *et al.*, 2000; Sakuntabhai *et al.*, 1999).



Obr. 3: Navrhovaný model aktivace signální dráhy diference keratinocytů indukované vápníkem (převzato a upraveno z Xie *et al.*, 2005).

2.7.2 Vitamín D

Kůže je hlavním zdrojem vitamínu D, jehož aktivní formou je 1,25-dihydroxyvitamín D_3 ($1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$) (Bikle *et Pillai*, 1993). Vitamín D_3 je v kůži tvořen dvoustupňovým mechanismem ze 7-dehydrocholesterolu (7-DHC). UV záření přemění 7-DHC na previtamín D_3 , který následně izomerizuje na vitamín D_3 neboli cholekalciferol (Holick, 1981). Tento druhý krok tvorby vitamínu D_3 zajišťuje jeho trvalé uvolňování do těla, kde prochází metabolickými reakcemi. Nejprve je v játrech přeměněn na 25-hydroxyvitamín D_3 ($25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$), poté v různých tkáních dochází k přeměně na další metabolity, z nichž nejúčinnější je $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ (Bikle *et Pillai*, 1993). Kromě tvorby v kůži je vitamín D získáván též ve formě D_2 a D_3 z potravy (Jones *et al.*, 1998).

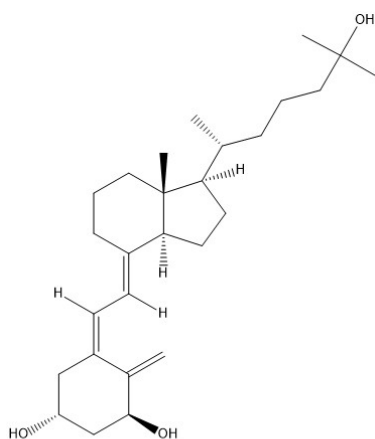
$1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ je známý tím, že inhibuje proliferaci keratinocytů a podporuje jejich diferenciaci. Tyto účinky jsou zprostředkovány receptorem pro vitamín D (VDR). $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ se váže na VDR a ten následně aktivuje transkripci genů, v jejichž promotorech se nachází sekvence označovaná jako vitamín D-responzivní element (Haussler *et al.*, 1998). Indukce

diferenciace keratinocytů vitamínem 1,25-(OH)₂D₃ byla poprvé pozorována v 1983 na myších buňkách (Hosomi *et al.*, 1983).

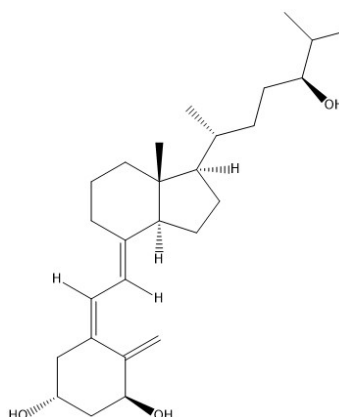
Vitamín D má na diferenciaci keratinocytů podobné účinky jako vápník. V přítomnosti 1,25-(OH)₂D₃ dochází ke zvýšení hladin mRNA INV a transglutamináz (Su *et al.*, 1994a). Je ale důležité podotknout, že efekt 1,25-(OH)₂D₃ na keratinocyty závisí na dávce a na kulti-vačních podmínkách (Su *et al.*, 1994a; Gniadecki, 1996). Dalším důkazem, že 1,25-(OH)₂D₃ hraje roli v indukci diferenciace keratinocytů je fakt, že zvyšuje hladinu intracelulárního váp- níku (Pillai *et Bikle*, 1991). V přítomnosti 1,25-(OH)₂D₃ jsou zaznamenány zvýšené hladiny mRNA vápníkového receptoru CaR. Je pravděpodobné, že zvýšení hladin CaR zesiluje od- pověď intracelulárního Ca²⁺ na extracelulární a přispívá tak ke zvýšenému influxu vápníku kanály. To je jeden z možných způsobů, kterými 1,25-(OH)₂D₃ zvyšuje hladinu intracelulár- ního Ca²⁺ a podporuje tak vápníkem indukovanou diferenciaci (Ratnam *et al.*, 1999).

Na regulaci tvorby 1,25-(OH)₂D₃ se podílí několik cytokinů a růstových faktorů včetně interferonu- γ (IFN- γ) (Bikle *et al.*, 1989), tumor nekrotizujícího faktoru- α (TNF- α) (Bikle *et al.*, 1991), epidermálního růstového faktoru EGF a transformujícího růstového faktoru TGF- α (Lehmann, 1997).

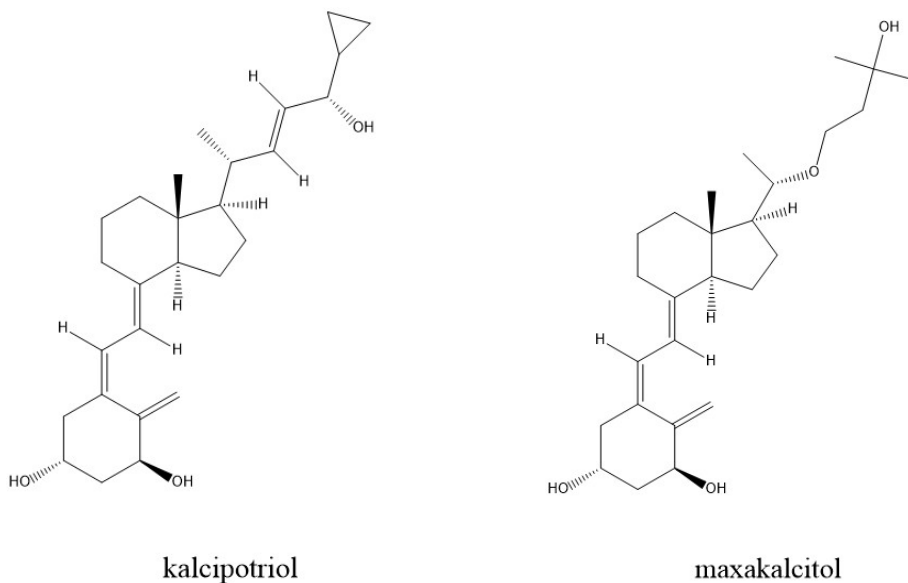
Takalcitol, kalcipotriol a maxakalcitol jsou analoga 1,25-(OH)₂D₃, která se úspěšně pou- žívají k léčbě psoriázy. Bylo zjištěno, že tato analoga potlačují proliferaci keratinocytů a sti- mulují tvorbu zrohovělého obalu s podobnou účinností jako 1,25-(OH)₂D₃ (Takahashi *et al.*, 2003).



1,25-dihydroxyvitamín D₃



takalcitol



Obr. 4: Chemické struktury vitamínu D₃, takalcitolu, kalcipotriolu a maxakalcitolu.

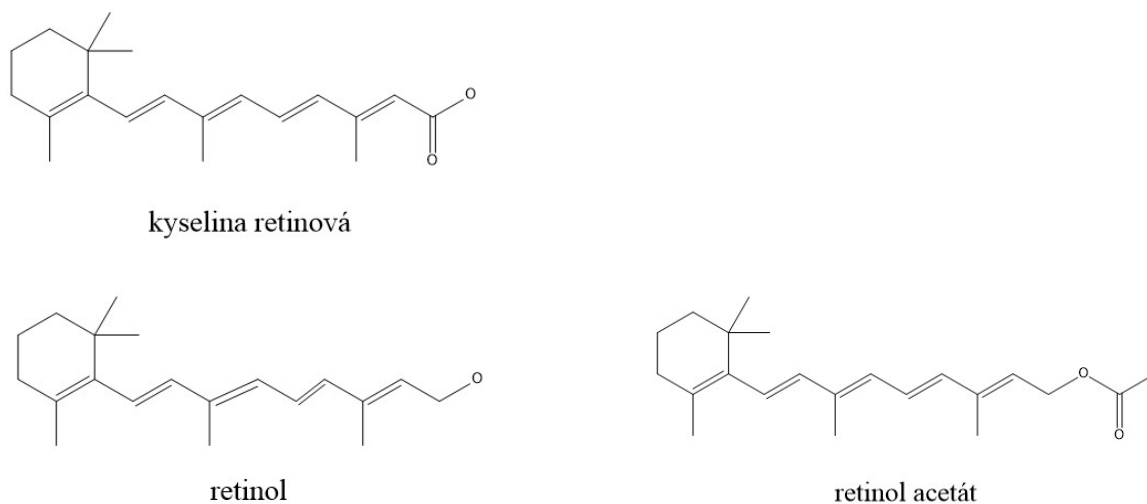
2.7.3 Vitamín A

Vitamín A (retinol) a jeho deriváty retinoidy mají zásadní význam pro udržování homeostázy tkání a regulaci epiteliální diferenciace. U zvířat je deficit vitamínu A spojen s rozvojem dlaždicových metaplazií epitelu oka, nosní sliznice a respiračního traktu, slinných žláz, slinivky břišní, pohlavních a močových cest (Lotan, 1980).

Nejvyšší koncentrace vitamínu A v pokožce byly identifikovány v rohové a granulární vrstvě (1,06 $\mu\text{g/g}$ proteinu), v dalších vrstvách se jeho koncentrace postupně snižuje (Törmä *et Vahlquist*, 1990). Mezi nejčastěji se vyskytující retinoidy v pokožce patří kyselina retinová, retinol, acylestery retinolu a 3-dehydroretinylu (Vahlquist, 1982). Bylo dokázáno, že kyselina retinová ovlivňuje diferenciaci keratinocytů tím, že potlačuje transkripci genu pro LOR (Hohl *et al.*, 1991a).

Pokud epidermální keratinocyty kultivujeme v nepřítomnosti vitamínu A, buňky se shlukují, jsou stratifikované a začínají syntetizovat K1, naopak syntéza keratinů K13 a K19 je redukována. Po přidání retinol acetátu (přírodně se vyskytující forma vitamínu A) do média je syntéza K1 zcela potlačena, zatímco syntéza K13 a K19 je jeho účinkem zvýšena (Fuchs *et Green*, 1981).

Retinoidy jsou už desítky let ve velké míře využívány v dermatologii, později se některé z nich začaly uplatňovat také v jiných oblastech medicíny, např. v onkologii. Příznivé účinky retinoidů byly pozorovány v léčbě akné, psoriázy, ichtyózy, keratodermý nebo rakoviny kůže. Uplatňují se také jako látky oddalující stárnutí kůže (Futoryan *et* Gilchrest, 1994).



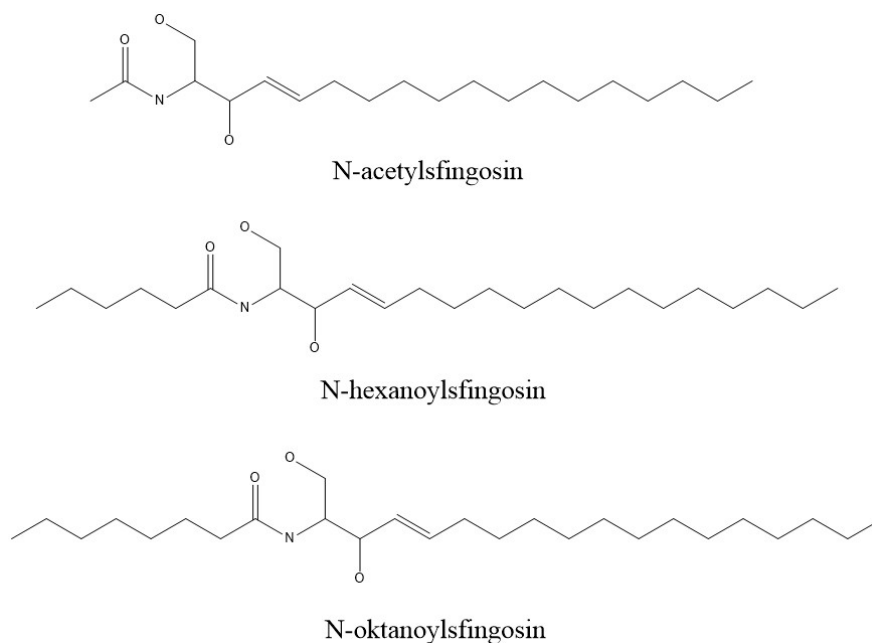
Obr. 5: Chemické struktury derivátů vitamínu A.

2.7.4 Sfingolipidy

Během diferenciaci keratinocyty akumulují velké množství lipidů, které jsou využity k tvorbě lamel *stratum corneum* (Schürer *et al.*, 1991). Přibližně 50 % lipidů *stratum corneum* tvoří sfingolipidy, v rámci nichž převažují ceramidy (Paragh *et al.*, 2008).

Některé sfingolipidy mají vliv na proliferaci a diferenciaci keratinocytů. Například v přítomnosti syntetických analogů ceramidů s krátkým řetězcem, N-acetylsfingosinu, N-oktanoylsfingosinu a N-hexanoylsfingosinu je stimulována syntéza INV a tvorba zrohovělého obalu, inhibována proliferace a zvýšena aktivita transglutamináz. Na druhé straně, při vhodné koncentraci sfingosinu může docházet k mírné stimulaci proliferace buněk (Wakita *et al.*, 1994).

Také deriváty sfingolipidu sfinganin, hexanoylsfingosin, hexanoylfytsfingosin, sfingosinsalicylát a fytsfingosinsalicylát podporují diferenciaci keratinocytů a potenciálně tak mohou být využity pro kosmetické a dermatologické účely (Paragh *et al.*, 2008).

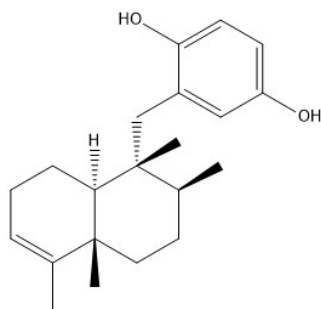


Obr. 6: Chemické struktury sfingolipidů.

2.7.5 Avarol

Avarol je seskviterpenoidní hydrochinon izolovaný z mořské houby *Dysidea avara* (Minale *et al.*, 1974), u kterého byly zjištěny významné farmakologické účinky včetně protizánětlivé, protinádorové a antivirové aktivity (Ferrándiz *et al.*, 1994; Kurelec *et al.*, 1985; Loya *et Hizi*, 1990).

Bylo zjištěno, že při koncentraci 10 μ M avarol potlačuje expresi K10. Ve stejném experimentu byly také použity estery avarolu označené 2 - 4, aminoderiváty 6 - 15 a derivát číslo 5, ošetřený kyselinou salycilovou. U derivátů 10, 13, 14 a 15 byla prokázána schopnost inhibovat růst keratinocytů. Derivát 13 také výrazně inhiboval hladiny mRNA TNF- α . Jelikož v léčbě psoriázy se uplatňují látky blokuující signální dráhu TNF- α , byl tento benzylaminový derivát avarolu navržen jako potenciální antipsoriatické léčivo (Amigó *et al.*, 2006).



avarol

Obr. 7: Chemická struktura avarolu.

2.7.6 Arzen

Chronické vystavení organismu anorganickému arzenu je spojeno s mnoha nepříznivými účinky na zdraví, včetně rakoviny plic, kůže nebo močového měchýře. Arsen v oxidačních stavech III+ a V+ způsobuje reverzibilní potlačení diferenciaci normálních i maligních keratinocytů, což bylo dokázáno pozorováním snížené exprese INV, FLG a transglutaminázy 1. V případě INV je toto potlačení částečně zprostředkováno prvky odezvy promotoru AP-1 (Jessen *et al.*, 2001).

2.7.7 Glukokortikoidy

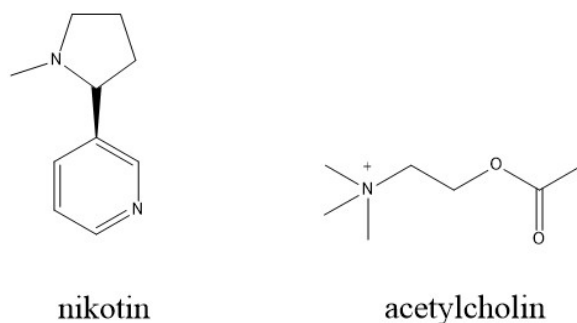
Glukokortikoidy hrají důležitou roli v regulaci různých fyziologických procesů jako metabolismus, buněčná proliferace a diferenciaci nebo zánětlivé a imunitní odpovědi. Lokální terapie pomocí glukokortikoidů byla představena v roce 1952 Sulzbergerem a Wittenem a od té doby je používána k léčbě mnoha dermatologických onemocnění včetně psoriázy, atopické a seboroické dermatitidy, intertriga a ekzému.

Glukokortikoidy mají specifické účinky na diferenciaci keratinocytů. Aplikace glukokortikoidů indukuje expresi transglutaminázy 1 a FLG.

Na expresi INV mají glukokortikoidy opačný, inhibiční efekt. Je zajímavé, že k potlačení exprese INV dochází pouze v nižších suprabazálních vrstvách, zatímco ve vyšších granulárních vrstvách ke změně nedochází. Tyto výsledky naznačují, že glukokortikoidy inhibují časné stádia diferenciaci a podporují terminální diferenciaci (Stojadinovic *et al.*, 2007).

2.7.8 Nikotin a acetylcholin

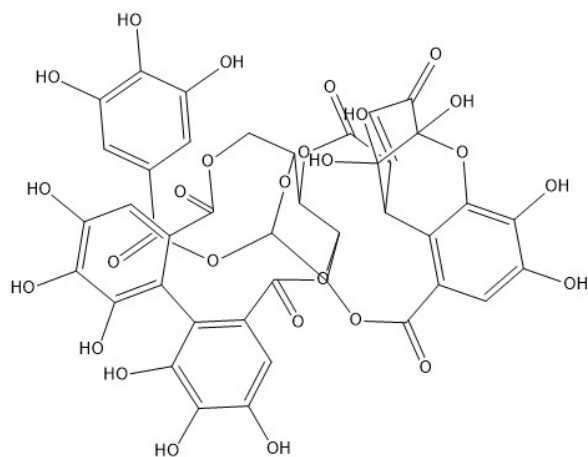
Do diferenciaci keratinocytů jsou zapojeny také acetylcholin a nikotin. Acetylcholin reguluje transmembránový transport a intracelulární metabolismus Ca^{2+} . Je syntetizován, vylučován a degradován keratinocyty. Acetylcholin je v těle rozpoznáván dvěma typy receptorů, nikotinovými a muskarinovými. Oba typy jsou exprimovány na povrchu keratinocytů (Grando *et al.*, 1993, 1995a,b). Aktivací nikotinových receptorů je stimulován vstup vápníku do keratinocytů. Dále se zvyšuje počet buněk tvořících rohový obal a exprimujících K10, transglutaminázu I, INV a FLG, čímž dochází k urychlení procesu diferenciaci (Grando *et al.*, 1996).



Obr. 8: Chemické struktury nikotinu a acetylcholinu.

2.7.9 Geraniin

Listy rostliny *Phyllanthus muellerianus* (Kuntze) se v západní Africe tradičně používají k hojení ran. Dominantní látkou v extraktu je geraniin. Geraniin je taninový derivát ze skupiny ellagitaninů, který pozitivně ovlivňuje diferenciaci keratinocytů. Po ošetření buněk touto látkou byla podstatně zvýšena exprese markerů INV, K1 a K10 (Agyare *et al.*, 2011).

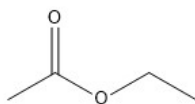


geraniin

Obr. 9: Chemická struktura geraniinu.

2.7.10 *Radix rubiae*

Kořen rostliny *Rubia cordifolia* L. (mořena srdčitá) neboli *Radix rubiae* je v čínské medicíně tradičně využíván k léčbě psoriázy. Jednou z frakcí *Radix rubiae* je etylacetát. Pokud keratinocyty kultivujeme v médiu s různými koncentracemi etylacetátu více než 2 dny, dochází k výrazné stimulaci tvorby rohového obalu. Je zajímavé, že *Radix rubiae* podporuje diferenciaci keratinocytů silněji než vápenaté ionty. Po 4 dnech kultivace je také podstatně zvýšena exprese INV a transglutaminázy 1. Etylacetát ovlivňuje i expresi keratinů. Hladiny K5 a K14, které jsou exprimovány v bazální vrstvě *epidermis* a souvisí s buněčnou proliferací, jsou po 4 dnech kultivace výrazně sníženy. Na druhé straně, exprese markerů terminální diferenciaci K1 a K10 je po ošetření etylacetátem zvýšena. Tyto poznatky naznačují, že *Radix rubiae* je schopný zvyšovat tvorbu rohového obalu a indukovat terminální diferenciaci keratinocytů (Zhou *et al.*, 2012).

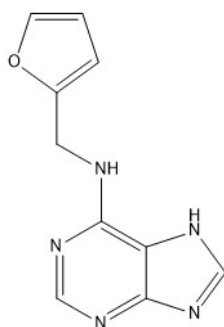


etylacetát

Obr. 10: Chemická struktura etylacetátu.

2.7.11 Kinetin

U rostlinného hormonu kinetinu bylo zaznamenáno několik účinků na lidské buňky, včetně zpomalení stárnutí (Rattan *et Clark*, 1994). Později byl dokázán jeho vliv také na diferenciaci keratinocytů. V přítomnosti kinetinu jsou zaznamenány zvýšené hladiny K10 a INV, zatímco vyšší koncentrace kinetinu (např. 80 μM) způsobují snížení K14. I když kinetin sám o sobě není silným induktorem diferenciaci, v kombinaci s vápníkem se jeho efekt na diferenciaci keratinocytů zvyšuje (Berge *et al.*, 2006).



kinetin

Obr. 11: Chemická struktura kinetinu.

2.7.12 Kurkumin, apigenin a EGCG

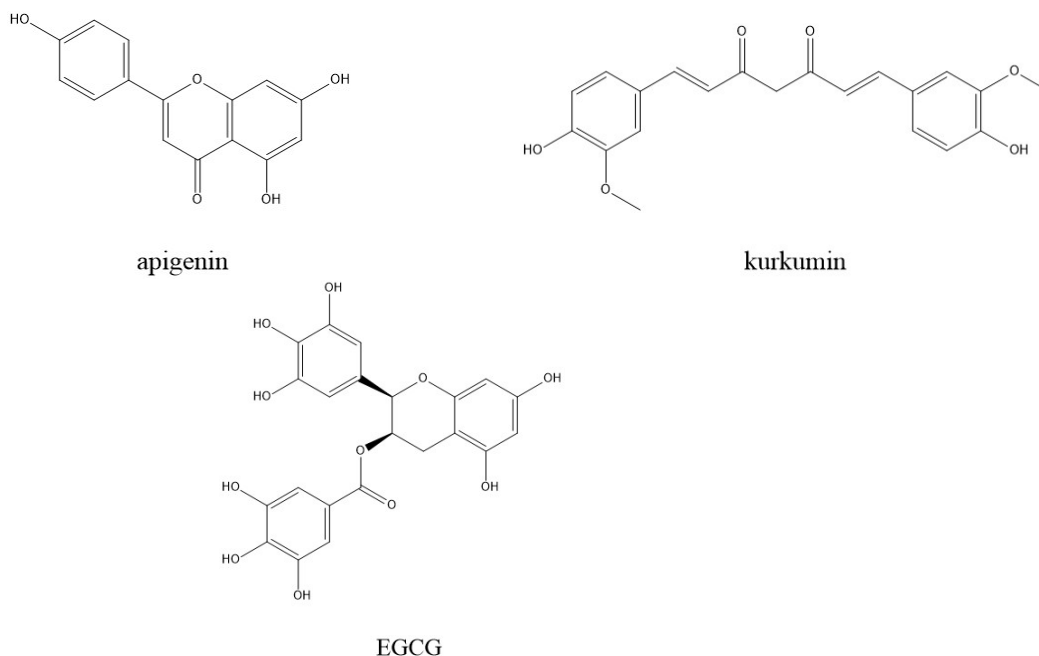
EGCG (epigalokatechin-3-galát) je bioaktivní polyfenol s antioxidační aktivitou získaný ze zeleného čaje. V keratinocytech zvyšuje aktivitu promotoru involukrinu, a tím i jeho expresi. Aktivace transkripce INV je řízena p38 MAPK signální kaskádou, která zahrnuje protein kinázu C, Ras, MEKK1, MEK3 a p38. MAPK kaskáda řídí expresi INV prostřednictvím regulace hladiny faktoru AP-1, která je v přítomnosti EGCG zvýšena (Balasubramanian *et al.*, 2002). Bylo zjištěno, že aktivace této dráhy prostřednictvím EGCG má za následek zvýšení hladiny proteinů vázajících se na zesilovač transkripce CCAAT (C/EBP) a zvyšuje tvorbu komplexu na vazebném místě C/EPB DNA promotoru INV, což je spojeno se zvýšenou aktivitou promotoru. (Balasubramanian *et Eckert*, 2004).

Dalším účinkem EGCG je zvyšování počtu zrohovělých buněk, čímž napomáhá k tvorbě zrohovělého obalu. S podporou diferenciaci souvisí také snížená buněčná proliferace. Bylo

dokázáno, že proliferace keratinocytů je v přítomnosti EGCG inhibována (Balasubramanian *et al.*, 2002).

Antagonistou EGCG je antioxidant kurkumin (diferuloylmetan), polyfenol izolovaný z rostliny *Curcuma longa*, který je známý svými protinádorovými účinky (Aggarwal *et al.*, 2003). Kurkumin inhibuje nárůst hladiny C/EPB a endogenního INV, a snižuje tak aktivaci promotoru závislou na EGCG. Kurkumin a EGCG mají tedy protichůdné účinky na genovou expresi INV prostřednictvím regulace funkce transkripčního faktoru C/EPB (Balasubramanian *et Eckert*, 2004).

Podobné účinky jako kurkumin má flavonoid apigenin vyskytující se v petrželi, tymiánu, máté peprné a dalších bylinách (Balasubramanian *et Eckert*, 2007). Apigenin má inhibiční efekt na proliferaci rakovinných buněk, což naznačuje jeho možné chemopreventivní využití (Sarkar *et Li*, 2004). Současná aplikace apigeninu nebo kurkuminu s EGCG potlačuje zvýšení v aktivitě promotoru involukrinu pINV-241, které je závislé na EGCG. Apigenin, stejně jako kurkumin, inhibuje EGCG-dependetní aktivaci exprese endogenního proteinu INV. Apigenin s kurkuminem tedy mohou bránit pozitivnímu účinku EGCG na diferenciaci keratinocytů (Balasubramanian *et Eckert*, 2007).



Obr. 12: Chemické struktury apigeninu, kurkuminu a EGCG.

2.7.13 Oligosacharidy a polysacharidy

V tradiční medicíně je pro dermatologickou léčbu využíváno široké spektrum rostlin s vysokým obsahem sacharidů. Mnoho z těchto látek ovlivňuje proliferaci a diferenciaci keratinocytů. Rostlinné polysacharidy jsou mnohdy součástí krémů, kde fungují jako stabilizující a aktivní komponenty nebo jako složky tvořící gel. Také lidské mateřské mléko obsahuje směs oligosacharidů, které mají vliv na diferenciaci keratinocytů (Deters *et al.*, 2005a).

Při kultivaci buněk s polysacharidy izolovanými z orobince širokolistého (*Typha latifolia* L.) a chaluhy bublinaté (*Fucus vesiculosus* L.), a s oligosacharidy mateřského mléka, keratinocyty zastavují svůj normální růst vedoucí k typickým epiteliálním monovrstvám, a naopak prochází silnou trojrozměrnou diferenciací, pro kterou je charakteristická tvorba tmavých buněčných kup. Stejně chování buňky vykazují po přidání ionoforu A23187, což je typický induktor diferenciaci. Polysacharidy z uvedených rostlin a mléčné oligosacharidy výrazně stimulují expresi INV (Deters *et al.*, 2005a).

Polysacharidy izolované z ibišku súdánského (*Hibiscus sabdariffa* L.) také vyvolávají zvýšenou expresi INV a indukují tak časnou diferenciaci keratinocytů. Kromě toho silně stimulují proliferaci těchto buněk (Brunold *et al.*, 2004).

Mírné zvýšení v expresi markeru diferenciaci INV bylo zaznamenáno i po ošetření keratinocytů polysacharidy z osemení jitrocele vejčitého (*Plantago ovata* Forssk.) (Deters *et al.*, 2005b).

Silným induktorem terminální diferenciaci keratinocytů je polysacharid xyloglukan získaný ze semen lichořeřišnice větší (*Tropaeolum majus* L.). V přítomnosti této látky dochází ke zvýšení hladiny INV, LOR a K10, zatímco FLG není xyloglukanem ovlivněn. Xyloglukan inhibuje aktivaci receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR). EGFR signalizace vede k aktivaci transkripčního faktoru CREB, který iniciuje přechod buňky z proliferační fáze do stádia terminální diferenciaci (Zacharski *et al.*, 2015).

2.8 Psoriáza

Psoriáza neboli lupénka je autoimunitní zánětlivé kožní onemocnění charakteristické hyperproliferací a abnormální diferenciací epidermálních keratinocytů. Toto onemocnění postihuje přibližně 2 - 3 % populace. Existuje více typů psoriázy, z nichž nejčastější je chronická ložisková psoriáza představující 85 - 90 % všech případů (Zhang *et al.*, 2012). Na základě rozsahu postižení a ovlivnění kvality života pacientů rozlišujeme lehkou, střední a těžkou formu psoriázy (Krueger *et al.*, 2000).

Psoriatická pokožka je erytematózní, zesílená a šupinatá. Tyto znaky jsou vysvětleny zvýšeným růstem a dilatací povrchových krevních cév, a stejně působivou hyperplazií *epidermis*. V postižené *epidermis* keratinocyty velmi rychle proliferují a dozrávají, ale proces terminální diferenciace není úplný. Keratinocyty v rohové vrstvě stále obsahují neporušené jádro (parakeratóza) a uvolňují jen několik extracelulárních lipidů, které normálně napomáhají adhezi korneocytů. Neschopnost psoriatických keratinocytů se hromadit a vylučovat extracelulární lipidy způsobuje šupinatění pokožky a zhroucení ochranné bariéry, zatímco výrazné rozšíření cév v *dermis* způsobuje viditelné zčervenání postižených míst.

V pokožce postižené psoriázou je počet proliferujících buněk zdvojnásoben, zatímco buněčný cyklus je asi 8 krát kratší. Denní produkce keratinocytů je asi 28 krát vyšší než v normální *epidermis* (Weinstein *et al.*, 1985). Při vzniku onemocnění hrají důležitou roli T-lymfocyty, které spouští řetězec buněčných a molekulárních reakcí vedoucích k tvorbě psoriatických lézí. Kromě T-buněk jsou pozorovány imunitní abnormality také u B-lymfocytů, monocytů, neutrofilů a erytrocytů. Psoriáza je podmíněna především Th1 lymfocyty (T helper 1), jež pod vlivem interleukinu 12 (IL-12) produkují IFN- γ a TNF- α . Existuje stále více důkazů o důležitosti nové populace T-lymfocytů, Th17, v rozvoji této choroby. Th17 buňky jsou stimulovány IL-23 k produkci IL-17 a IL-22. Tyto 2 interleukiny jsou odpovědné za rozvoj akantózy (rozšíření pokožky v důsledku ztlustění *stratum spinosum*) v psoriatické kůži. V rozvoji onemocnění hrají důležitou roli také genetické faktory a vnější prostředí.

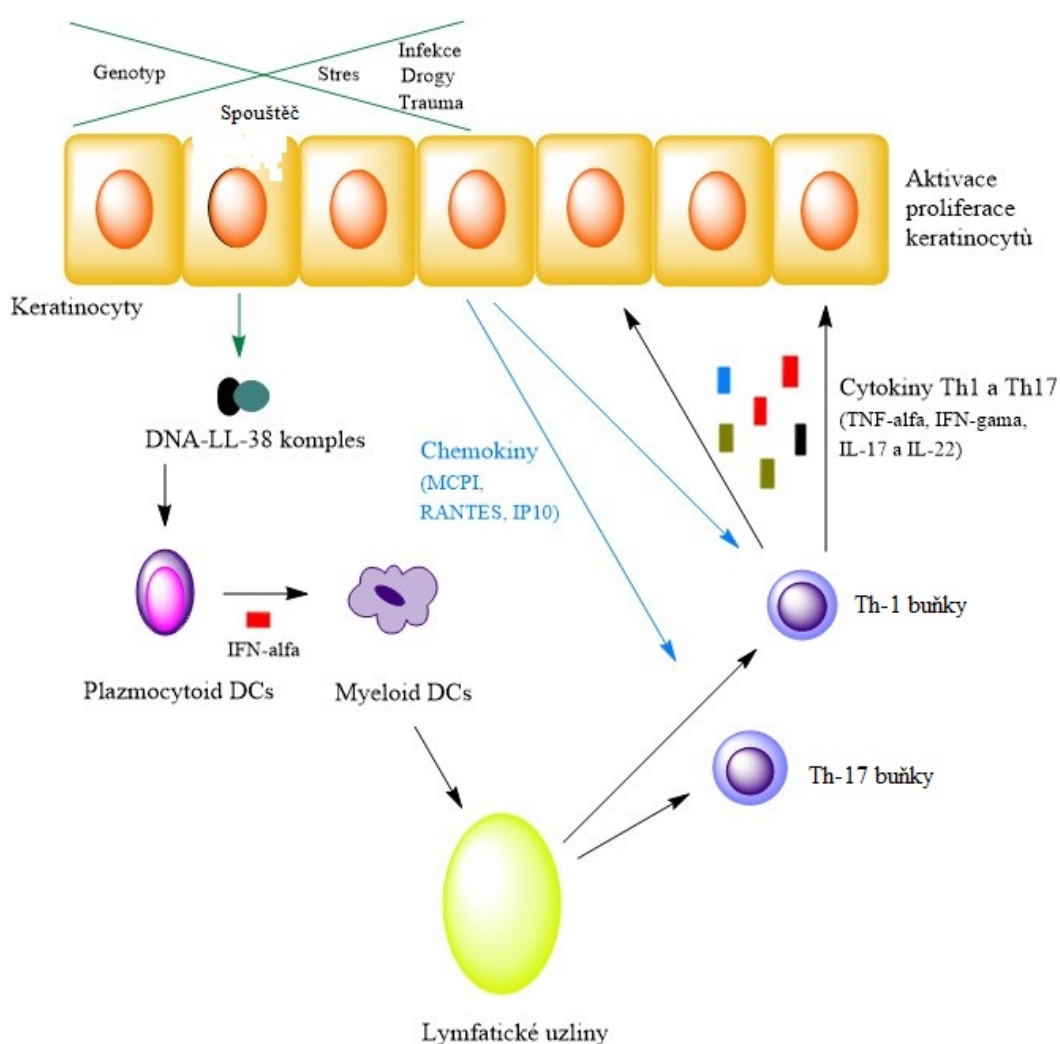
Klíčové procesy v udržování nemoci jsou uvolňování IL-23 kožními dendritickými buňkami, produkce prozánětlivých mediátorů IL-17A, IL-17F, IL-22 buňkami Th17 a Tc17 (cytotoxické buňky typu 17) a produkce IFN- γ a TNF- α Th1 a Tc1 buňkami. Tyto mediátory působí na keratinocyty, což vede k aktivaci, proliferaci a produkci antimikrobiálních

peptidů, chemokinů a proteinů S100. Tyto látky působí zpětně na imunitní buňky produkující mediátory zánětu, a tím se udržuje cyklus nemoci. I když jsou pro rozvoj psoriázy klíčové změny v keratinocytech, deregulace funkce fibroblastů nebo endoteliálních buněk může také k patogenezi přispívat (Balato *et al.*, 2012).

Jak již bylo uvedeno, s psoriázou souvisí změny některých markerů diferenciaci keratinocytů. V pokožce postižené lupénkou jsou zaznamenány zvýšené hladiny proteinu INV. Stejný efekt můžeme pozorovat u normálních keratinocytů kultivovaných v přítomnosti cytokinů charakteristických pro psoriázu IFN- γ , TNF- α , IL-13 nebo IL-17A (Chen *et al.*, 2013). Odlišné účinky má psoriáza na expresi LOR, která je v psoriatické pokožce výrazně snížena. Je ovšem zajímavé, že ve zdravé kůži byla zaznamenána podstatně nižší exprese LOR než v oblasti lézí od stejného pacienta (Giardina *et al.*, 2004).

K léčbě psoriázy jsou využívány různé metody, od lokálních přípravků pro mírnější formy až po fototerapii a systémovou léčbu pro těžší formy onemocnění. Indikace pro léčbu vychází z lokálních symptomů (bolest, svědění, snížená manuální zručnost), kosmetických problémů nebo ze spojení obou. Cílem léčby je snížení závažnosti a rozsahu onemocnění tak, aby pacientovi nepřekáželo v osobním, pracovním ani společenském životě. K lokální léčbě se velmi často využívají různé zvláčňující přípravky a krémy, které hydratují a změkčují šupinatý povrch kůže. Pravděpodobně nejpoužívanějším keratolytickým (změkčujícím zrohovatělou vrstvu pokožky) přípravkem je mast s obsahem kyseliny salicylové a to buď samostatně, nebo v kombinaci s uhelným dehtem nebo lokálními kortikosteroidy. Léčba za pomoci přípravků s uhelným dehtem se většinou provádí společně s UVB fototerapií. Použití těchto přípravků je ale omezené. Na normální kůži mají i v nízkých koncentracích dráždivý účinek, způsobují aknotické vyrážky, kromě toho nepříjemně zapáchají. Ve vzácných případech byl po léčbě uhelným dehtem zaznamenán vznik rakoviny kůže. Dalšími látkami využívanými k lokální léčbě jsou kalcipotrien, kortikosteroidy a anthralin. Kalcipotrien patří mezi analoga vitamínu D a má minimální efekt na metabolismus vápníku. Používá se pro pacienty s lehkou až střední formou psoriázy. Na systémovou léčbu psoriázy jsou využívány např. systémové kortikosteroidy, etretinát (derivát vitamínu A) nebo cyklosporin (Greaves *et Weinstein*, 1995). Psoriáza je také úspěšně léčena již uvedenými analogy 1,25-(OH) $_2$ D $_3$, takalcitolem a maxakalcitolem, která potlačují proliferaci a indukují diferenciaci keratinocytů (Takahashi *et al.*, 2003).

Existuje také přírodní způsob léčby psoriázy. Tradiční čínská medicína využívá k léčbě lupénky několik bylin. Mezi nejpoužívanější patří *Oldenlandia diffusa*, podzemní stonek *Smilax glabra*, květ světlíce barvířské (*Carthamus tinctorius*), dále kořeny rostlin rehmánie lepkavé (*Rehmania glutinosa*), anděliky čínské (*Angelica sinensis*), šalvěje červenokořenné (*Salvia miltiorrhiza*), pivoňky čínské (*Paeonia lactiflora*), *Dictamnus dasycarpus*, *Lithospermum erythrorhizon* a *Glycyrrhiza uralen* (Tse, 2003). Slibným léčivem je také již zmíněný *Radix rubiae*, jenž inhibuje proliferaci keratinocytů a podporuje tvorbu rohového obalu (Zhou *et al.*, 2012).



Obr. 13: Schéma patogeneze psoriázy (převzato a upraveno z Balato *et al.*, 2012).

3 Materiály a metody

3.1 Seznam použitých přístrojů, zařízení a chemikálií

3.1.1 Kultivační plasty (firma TPP)

Kultivační lahve s víčkem 75 cm²

Kultivační destička 96-jamková 0,33 cm²

Kultivační misky

Škrabky

3.1.2 Přístroje a zařízení

analyzér luminiscence FLA-7000	FUJIFILM
automatické pipety	Eppendorf
Bürkerova komůrka	Marienfeld
CO ₂ inkubátor MCO-18AIC	SANYO
CFX96™ Real-Time System	Bio-Rad
cykler DNA Engine Peltier Thermal Cycler	Bio-Rad
cykler C100 Touch	Bio-Rad
destičkový spektrofotometr	Sunrise (Tecan)
dokumentační systém (CCD kamera)	LAS-4000 (FUJIFILM)
elektroforetická sestava Mini-Plus	Hoefer
elektroforetický zdroj EC 105	E-C Apparatus Laboratories
elektroforetický zdroj EC 3000P	E-C Apparatus Laboratories
flowbox s vertikálním prouděním vzduchu TC 48	Gelaire, Flow Laboratories
fluorescenční reader pro mikrotitrační destičky	Fluoroskan Ascent (Thermo Labsystems)
chlazená centrifuga BR4i	Jouan
kamera DP71	Olympus
mikroskop IX51	Olympus
NanoDrop 1000 Spectrophotometer	Thermo Scientific
stolní centrifuga Mini Spin	Eppendorf

sestava pro elektroforézu a blot Mini-PROTEAN	Tetra System (Bio-Rad)
spektrofotometr EnSpire™ Multimode Plate Reader	Perkin Elmer
světlocitlivá kazeta BAS Cassette 2025	FUJIFILM
termomixér Thermomixer Comfort	Eppendorf
třepací inkubátor Mixing Block MB-102	BIOER
třepačka KS 260 Basic	IKA
ultrazvuk HD 2200	BANDELIN SONOPLUS
ultrazvuková lázeň RK31	BANDELIN SONOREX
váhy 440-33N	Kern
vortex Minishaker MS2	IKA
vortex V-1 Plus	Biosan
vývěva KIF LAB	Laboport
zdroj světla TH4-200	Olympus

3.1.3 Chemikálie

2-merkaptoetanol	SERVA
50bp DNA ladder	BioSystems
AA - akrylamid	SERVA Electrophoresis
acetát sodný	Sigma
agaróza	Sigma
aprotinin	Sigma-Aldrich
APS - persíran amonný	SERVA Electrophoresis
BIS - N,N'-metylenbisakrylamid	SERVA Electrophoresis
bromfenolová modř	Sigma-Aldrich
BSA - hovězí sérový albumin	Sigma-Aldrich
destilovaná voda	LRR Olomouc
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen
DMSO - dimetylsulfoxid	Sigma-Aldrich
EDTA - etylendiamintetraoctové kyseliny	Sigma-Aldrich

EGTA - etylenglykoltetraoctová kyselina	Sigma-Aldrich
etanol 70%	Lach Ner s.r.o.
etanol 96%	Lach Ner s.r.o.
fetální sérum	Sigma-Aldrich
glutamin	Sigma
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits	Thermo Fisher Scientific
chloroform	Sigma-Aldrich
izopropanol	Sigma
JumpStart™ Taq DNA polymeráza	Sigma-Aldrich
KiCqStart® qPCR ReadyMix™	Sigma-Aldrich
Large DNA ladder	BioSystems
luminol substrát	Thermo Scientific
N ₂ tekutý dusík	Linde
n-butanol	Sigma-Aldrich
penicilin-streptomycin roztok	Sigma-Aldrich
Ponceau S	Sigma-Aldrich
ProtoScript® First Strand cDNA Syntesis Kit	New England Biolabs
SDS - dodecylsírán sodný	Lach Ner s.r.o.
Temed - tetrametyletylenediamin	Sigma-Aldrich
TRIS	SERVA Electrophoresis
TRITON X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin	Sigma-Aldrich
Tween 20	MP

3.1.4 Roztoky

- AA+Bis roztok (200 ml): 58,4 g AA; 1,6 g Bis+AA (rozpuštěno v objemu 200 ml H₂O)
- APS 10%: 0,1 g APS; 1 ml H₂O
- blotovací pufr 10x: 30,3 g TRIS + 144 g Glycin + 1 l H₂O

- DNA nanášecí pufr 10×: 25 mg bromfenolová modř; 1 ml 10% SDS; 7 ml H₂O; 3 ml glycerol
- EDTA 0,5 mM (500 ml): 0,073 g EDTA; 450 ml PBS
- EGTA 0,5% (500 ml): 2,5 g EGTA; 500 ml PBS; úprava pH na 7,2; přefiltrováno přes 0,22 μm filtr
- ELFO pufr 10× (1 l): 30,24 g TRIS; 144 g glycin; 10 g SDS
- kultivační médium DMEM 10% (500 ml): 440 ml DMEM; 50 ml fetální sérum; 5 ml penicilin-streptomycin roztok; 5 ml glutamin
- lyzační pufr: 1 ml RIPA pufr; 1 μl 1000× leupeptin; 1 μl 1000× aprotinin; 10 μl 100× PMSF; 1 μl 1M DDT
- PBS (1 l): 3,58 g Na₂HPO₄ · 12 H₂O; 0,2 g KH₂PO₄; 8 g NaCl; 0,2 g KCl; 950 ml H₂O; úprava pH na hodnotu 7,4; doplnění do 1 l, přefiltrování přes 0,22 μm filtr
- SDS 10% : 5 g SDS + 50 ml H₂O
- SDS 5x (10 ml): 3,1 ml 1M TRIS pH 6,8 + 1 g SDS + 5 ml Glycerol + 0,5 ml 1% BPB + 0,5 ml
- TAE pufr 10× (0.5 l): 199,8 ml 1M TRIS pH 8,8; 8 ml koncentrované ledové octové kyseliny; 10 ml 0.5M EDTA (úprava pH na hodnotu 8 a doplnění H₂O do 0,5 l)
- TBS: 4,84 g TRIS; 58,44 g NaCl; 1 l voda; úprava pH na hodnotu 7,5; doplnění do 2 l
- TRIS pH 6,8: 24,23 g 1M TRIS; 200 ml HCl
- TRIS pH 8,8: 48,46 g 1M TRIS; 400 ml HCl
- trizol (100 ml): 40,65 g fenol; 9,46 g guanidine thiokyanát; 3,16 g thiokyanát amonný; 3,33 ml 3M acetát sodný (pH 5); 5 ml glycerol

3.1.5 Testované látky

V rámci praktické části bakalářské práce byly testovány tyto látky z chemické knihovny Laboratoře růstových regulátorů:

2-[(8,9-dihydro-7H-purin-6-ylamino)metyl]fenol, <i>orto</i> -topolin	<i>o</i> T
3-[(8,9-dihydro-7H-purin-6-ylamino)metyl]fenol, <i>meta</i> -topolin	<i>m</i> T
4-[(8,9-dihydro-7H-purin-6-ylamino)metyl]fenol, <i>para</i> -topolin	<i>p</i> T
6-(4-hydroxy-3-metylbut-2-enylamino)purin, <i>trans</i> -zeatin	<i>t</i> Z
6-(4-hydroxy-3-metylbut-2-enylamino)purin, <i>cis</i> -zeatin	<i>c</i> Z
6-izopentenylaminopurin	iP
6-izopentenylaminopurin ribozid	iPR
6-benzylaminopurin	BAP
6-benzylaminopurin ribozid	BAPR
N ⁶ -(2-hydroxy)benzyladenozin, <i>ortho</i> -topolin ribozid	<i>o</i> TR
N ⁶ -(3-hydroxy)benzyladenozin, <i>meta</i> -topolin ribozid	<i>m</i> TR
N ⁶ -(4-hydroxy)benzyladenozin, <i>para</i> -topolin ribozid	<i>p</i> TR
N ⁶ -(<i>trans</i> -4-hydroxy-3-metyl-2-buten-1-yl)adenozin, <i>trans</i> -zeatin ribozid	<i>t</i> ZR
N ⁶ -(<i>cis</i> -4-hydroxy-3-metyl-2-buten-1-yl)adenozin, <i>cis</i> -zeatin ribozid	<i>c</i> ZR
N ⁶ -furfuryladenin, kinetin	Kin
N ⁶ -furfuryladenozin, kinetin ribozid	KR

3.1.6 Protilátky

- K1 - koží protilátka (sc-17091) proti králičímu IgG (sc-2768, Santa Cruz) s navázanou křenovou peroxidázou, ředění 1:1000
- K10 - myší protilátka (sc-23877) proti králičímu IgG (sc-358914, Santa Cruz) s navázanou křenovou peroxidázou, ředění 1:1000
- K14 - myší protilátka (sc-53253) proti králičímu IgG (sc-358914, Santa Cruz) s navázanou křenovou peroxidázou, ředění 1:1000

- INV - myší protilátka (sc-21748) proti králíčimu IgG (sc-358914, Santa Cruz) s navázanou křenovou peroxidázou, ředění 1:1000

3.1.7 Primery

- K10_F: 5'-AATCAGATTCTCAACCTAACAAAC-3' (Minner *et al.*, 2010)
- K10_R: 5'-TTCCTCTTGCTTTGATGGG-3' (Minner *et al.*, 2010)
- K10_F: 5'-ATGTCTGTTTCGATACAGCTCAAG-3' (Cherbuin *et al.*, 2015)
- K10_R: 5'-CTCCACCAAGGGAGCCTTTG-3' (Cherbuin *et al.*, 2015)
- K10_F: 5'-TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC-3' (Borowiec *et al.*, 2013)
- K10_R: 5'-GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTTCA-3' (Borowiec *et al.*, 2013)
- K1_F: 5'-TCAATCTCGGTTGGATTCGGA-3' (Lee *et al.*, 2009)
- K1_R: 5'-CCACCTTGGTCATATAAGCACC-3' (Lee *et al.*, 2009)
- K1_F: 5'-ATTTCTGAGCTGAATCGTGTGATC-3' (Borowiec *et al.*, 2013)
- K1_R: 5'-CTTGGCATCCTTGAGGGCATT-3' (Borowiec *et al.*, 2013)
- K1_F: 5'-GGTGCTTATATGACCAAGGTGG-3' (Cherbuin *et al.*, 2015)
- K1_R: 5'-ATGCTGTCCAGGTCGAGACT-3' (Cherbuin *et al.*, 2015)
- K14_F: 5'-CGATGGCAAGGTGGTGTC-3' (Minner *et al.*, 2010)
- K14_R: 5'-GGGTGAAGCAGGGTCCAG-3' (Minner *et al.*, 2010)
- AQP3 p912_F: 5'-TTTGGCTTTGCTGTCACTCTG-3' (Pisarchik *et al.*, 2004)
- AQP3 p913_R: 5'-AAGCACATGGCAAAGGTCAC-3' (Pisarchik *et al.*, 2004)
- IVL_F: 5'-TGAAACAGCCAACTCCAC-3' (Minner *et al.*, 2010)
- IVL_R: 5'-CTCATCCAGCACCTACG-3' (Minner *et al.*, 2010)
- LOR_F: 5'-TCATGATGCTACCCGAGGTTTG-3' (Minner *et al.*, 2010)

- LOR_R: 5'-CAGAACTAGATGCAGCCGGAGA-3' (Minner *et al.*, 2010)
- FLG_F: 5'-GGGCACTGAAAGGCAAAAAG-3' (Minner *et al.*, 2010)
- FLG_R: 5'-CACCATAATCATAATCTGCACTACCA-3' (Minner *et al.*, 2010)

3.1.8 Biologický materiál

- SVK14 - nediferencované imortalizované lidské kožní keratinocyty
- HaCaT - diferencované imortalizované lidské kožní keratinocyty
- kromě HaCaT pěstovaných ve standartních podmínkách jsem použila i buňky kultivované v médiu se sníženou koncentrací vápenatých iontů, u kterých se předpokládá ztráta diference
- BJ - lidské kožní fibroblasty

Celková RNA izolovaná z linie SVK14.

3.2 Použité metody

3.2.1 Kultivace buněk

Obě buněčné linie byly kultivovány v plastových kultivačních lahvích T75 (75 cm²) vhodných pro adherentní linie. Buňky byly kultivovány v živném médiu DMEM obsahující 10 % fetálního bovinního séra, glutamin o finální koncentraci 3,97 M, antibiotika streptomycin (100 µg/ml) a penicilin (100 IU/ml). Kultivace probíhala v inkubátoru, kde byly udržovány tyto podmínky: teplota 36,5 - 37,5 °C, podíl CO₂ v atmosféře 5,5 % a 100% relativní vlhkost vzduchu. Pasážování buněk probíhalo cca při 80% konfluenci. Veškerá manipulace s buněčnými liniemi probíhala ve sterilním prostředí laminárního boxu.

3.2.2 Příprava buněk na experimenty

Z kultivačních láhví bylo odsáto médium. Buňky byly omyty 2 ml EGTA (0,5 mM), čímž byly odstraněny zbytky média. K odlepení buněk ze dna lahve byl použit 1 ml trypsinu (0,5 g prasečí protein/1 l média) a lahve byly po dobu jeho působení (cca 5 minut) umístěny

do inkubátoru. Po odlepení byly buňky opláchnuty 4 ml média a přeneseny do zkumavky. Následovala centrifugace při laboratorní teplotě (1 000 g, 5 min). Médium s trypsinem bylo odsáto a pelet byl resuspendován přesně v 5 ml média. Buňky byly spočítány za pomoci Bürkerovy komůrky. Suspenze byla vhodně zředěna médiem na požadovanou koncentraci a buňky byly nasazeny do kultivačních lahví nebo mikrotitračních desek. Teplota média i roztoků byla vždy cca 37 °C.

Do kultivačních lahví byly následující den přidány testované látky rozpuštěné v DMSO, jehož obsah byl obvykle nižší než 0,1 %. Ke kontrolním buňkám bylo přidáno DMSO a to ve stejném objemu jako testované látky. Buňky byly s testovanými látkami inkubovány různě dlouhou dobu, obvykle 24, 72 nebo 168 hodin.

3.2.3 Sklizení buněk

Po dané době inkubace bylo z kultivačních nádob odsáto médium. Buňky byly seškrábány do 1 ml trizolu a přeneseny do 1,5 ml zkumavky. Buňky byly v trizolu inkubovány 10 minut při pokojové teplotě a poté uloženy do -80 °C nebo ihned zpracovány.

3.2.4 Izolace RNA klasickou metodou

Vzorek v trizolu byl rozmražen na ledu a promíchán pomocí vortexu. Ke vzorku bylo přidáno 200 μ l chloroformu, po dobu 30 s byl vortexován a poté inkubován 10 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci byl vzorek stočen v centrifuze (12 000 rcf, 15 min, 4 °C) a jednotlivé složky byly rozděleny na lipidy (spodní část), DNA (zakalený prstenec) a RNA (horní složka). RNA byla přepipetována do nové sterilní 1,5 ml mikrozkušavky do níž bylo přidáno stejné množství izopropanolu a vrstvy byly krátkým protřepáním promíchány. Vzorek byl 5 minut inkubován při pokojové teplotě a opět zcentrifugován (12 000 rcf, 10 min, 4 °C). Po odstranění supernatantu byl pelet promyt 1,5 ml 75% ethanolu a vzorek byl lehce promíchán, aby došlo pouze k odlepení peletu. Vzorek byl následně stočen v centrifuze (12 000 rcf, 10 min, 4 °C). Supernatant byl odpipetován, vzorek v otevřené mikrozkušavce byl sušen do zprůhlednění peletu. Finálně byl vzorek rozpuštěn ve 40 μ l sterilní vody a opakovaným pipetováním byl promíchán. Následovala inkubace po dobu 10 min při 60 °C, poté byl vzorek ihned ochlazen na ledové tříšti a byl uložen do mrazáku (-80°C).

3.2.5 Izolace RNA pomocí kolonek

Izolace RNA kolonkovou metodou probíhala za použití PureLink® RNA Mini kitu. Ke vzorku buněk v 1 ml trizolu bylo napipetováno 200 μl chloroformu a zkumavka byla důkladně protřepána po dobu 15 s. Následovala tříminutová inkubace při laboratorní teplotě a poté byla zkumavka stočena v centrifuze (12 000 g, 15 min, 4 °C). Vodná fáze s RNA byla přepipetována do nové zkumavky a bylo k ní přidáno stejné množství 70% ethanolu, obsah byl promíchán na vortexu. Poté bylo 700 μl vzorku přeneseno na kolonku, zkumavky byly stočeny v centrifuze při laboratorní teplotě (12 000 g, 15 s). Ke vzorku bylo přidáno 700 μl promývacího pufru I, zkumavka byla zcentrifugována (12 000 g, 15 s) a obsah byl přenesen do nové zkumavky. Následně byl vzorek dvakrát promyt pomocí promývacího pufru II a zkumavka byla opět zcentrifugována (12 000 g, 1 min). Centrifugace probíhala při laboratorní teplotě. Po centrifugaci bylo na střed kolonky nanášeno 30 μl RNase-free vody, následovala inkubace po dobu 60 s. Mikrozkušavka byla stočena v centrifuze při laboratorní teplotě (12 000 g, 2 min). Vzorky byly uloženy do mrazáku (-80 °C). Čistota a koncentrace RNA byla změřena na NanoDropu.

3.2.6 Reverzní transkripce pomocí ProtoScript® First Strand cDNA Syntesis kitu

Reverzní transkripce byla provedena pomocí dvou druhů kitů - ProtoScript® First Strand cDNA Syntesis kitu, nebo High-Capacity cDNA Reverse Transcription kitu. Při použití prvního zmíněného kitu byly komponenty směsi připraveny dle následující tabulky (Tab. 2).

Tab. 2: Složení RT-PCR směsi ProtoScript® First Strand cDNA Syntesis kitu.

	Objem na 1 reakci [μl]
2× reakční pufr	10
10× enzymový mix	2
d(T)23 VN	2
RNA	podle koncentrace
RNase-free voda	podle objemu RNA

Před provedením reverzní transkripce byla koncentrace RNA změřena na NanoDropu. Do reakce byla RNA naředěna s RNase-free vodou tak, aby její koncentrace byla 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

Reakce probíhala v termobloku při 42 °C, 1 hodinu. Následně byla teplota zvýšena na 80 °C po dobu 5 minut, čímž došlo k inaktivaci enzymů. Po dokončení reakce byly vzorky ihned použity pro polymerázovou řetězovou reakci nebo uloženy do mrazáku (-20 °C).

3.2.7 Reverzní transkripce pomocí High-Capacity cDNA Reverse Transcription kitu

Reverzní transkripce byla provedena za použití High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kits. Jednotlivé složky byly napipetovány do stripů (viz Tab. 3) a krátce stočeny v minicentrifuze.

Tab. 3: Složení RT-PCR směsi High-Capacity cDNA Reverse Transcription kitu.

	Objem na 1 reakci [μl]
10× reakční pufr	2
25× dNTP Mix	0,8
10× RT Random primery	2
MultiScribe™ reverzní transkriptáza	1
Nuclease-free voda	4,2
RNA	podle koncentrace
RNase-free voda	podle objemu RNA

Koncentrace vyizolované RNA byla změřena na NanoDropu. Do RT reakce byla RNA naředěna s RNase-free vodou tak, aby její koncentrace byla 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Celkový objem RT-PCR směsi jednoho vzorku činil 20 μl .

Reakce probíhala v cykleru pomocí programu pro RT (viz Tab. 4). Po dokončení reakce byly vzorky uloženy do -20 °C nebo ihned použity pro polymerázovou řetězovou reakci.

Tab. 4: Teplota a doba jednotlivých kroků programu pro RT.

	Teplota [°C]	Čas [min]
Krok 1	25	10
Krok 2	37	120
Krok 3	85	5

3.2.8 Polymerázová řetězová reakce

Chemikálie pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) byly rozmrazeny na ledu, promíchány pomocí vortexu a krátce stočeny v minicentrifuze. Následně byly připraveny podle tabulky (viz Tab. 5).

Tab. 5: Složení PCR směsi.

	Objem na 1 reakci [μ l]
sterilní voda	14,52
10mM deoxynukleotidy	0,72
10× PCR pufr	2
forward primer	0,18
reverse primer	0,18
JumpStar polymeráza	0,4
cDNA	2

Uvedená množství jednotlivých složek byla napipetována do sterilních stripů. Stripy byly krátce stočeny v minicentrifuze a umístěny do cykleru, kde prošly daným počtem cyklů za následujících podmínek (viz Tab. 6).

Podle potřeby byl měněn počet cyklů reakce od 30 do 37. Po skončení finální extenze byly vzorky v cykleru ochlazeny na 4 °C a uloženy do mrazáku (-20 °C) nebo ihned zpracovány.

Tab. 6: Teplota a doba jednotlivých kroků PCR.

	Teplota [°C]	Čas [s]
počáteční denaturace	94	300
denaturace	94	40
annealing	podle použitých primerů	30
extenze	72	90
finální extenze	72	300

3.2.9 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

Potřebné komponenty pro polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (Real-Time PCR) byly rozmrazeny na ledu a napipetovány do sterilních stripů (viz Tab. 7).

Tab. 7: Složení Real-Time PCR směsi.

	Objem na 1 reakci [μ l]
KiCqStart® SYBR® Green qPCR ReadyMix™	10
forward primer	0,18
reverse primer	0,18
sterilní voda	8,64
cDNA	1

Po napipetování všech složek do stripů byly stripy krátce stočeny v minicentrifuze a umístěny do cykleru s danými podmínkami (viz Tab. 8). Po ukončení procesu byly vzorky ochlazeny cyklerem na 4 °C a poté byly ihned zpracovány nebo umístěny do mrazáku (-20 °C).

Tab. 8: Teplota a doba jednotlivých kroků Real-Time PCR.

	Teplota [°C]	Čas [s]
počáteční denaturace	95	180
denaturace	95	15
annealing	podle použitých primerů	30
extenze	60	30
finální extenze	72	5

3.2.10 Elektroforetická separace produktů PCR a jejich detekce

Elektroforetická separace probíhala v horizontálním uspořádání v 1% agarózovém gelu, později byl použit gel 1,5%.

Agaróza v $1 \times$ TAE pufru byla rozvařena v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí na asi 60 °C bylo k agaróze přidáno barvivo GelRed (v objemu 5 μ l na 100 ml) a gel byl nalit do elektroforetické vany. Po ztuhnutí gelu a vyjmutí hřebíků byla vana naplněna $1 \times$ TAE puftrem.

Do první jamky bylo nanášeno 3 μ l markeru molekulové hmotnosti (50bp DNA ladder). Do dalších jamek byly napipetovány vzorky z PCR (10 μ l), které byly nejprve smíchány s $10 \times$ DNA nanášecím puftrem. Elektroforéza probíhala 30 - 60 min při napětí cca 100 V.

Pro detekci a vizualizaci byl použit UV-transiluminátor FLA-4000 (Fujifilm). Byly pořízeny snímky gelů se zviditelněnými produkty.

3.2.11 Toxicita na buněčných liniích

Hodnocení toxicity testovaných látek bylo provedeno v 96-jamkových deskách. Nejdříve byly nasazeny buňky v daném počtu do jamek (80 μ l/ jamka), druhý den byly k buňkám přidány testované látky. Deska vždy obsahovala také kontrolu a slepý vzorek kvůli odečtení pozadí. Látky byly aplikovány v ředící řadě o 6 koncentracích, v triplicátu. Desky byly po dobu 3 dnů uloženy v inkubátoru. Poté bylo k buňkám přidáno barvivo resazurin a následovala tříhodinová inkubace v inkubátoru. Resazurin je v buňkách redukován na fluoreskující růžové barvivo resorufin. Fluorescence byla změřena pomocí spektrofotometru EnSpire™ Multi-mode Plate Reader při vlnové délce excitace 544 nm a emise 590 nm. Dále byla změřena absorbance při vlnové délce excitace 570 nm a emise 600 nm.

3.2.12 Sklizení buněk pro analýzu proteinů

Z kultivační lahve bylo odsáto médium. Do lahve bylo přidáno 10 ml vychlazeného 1× PBS a buňky do něj byly seškrábány. Po stočení do zkumavek následovala centrifugace při 1620 g, 5 min, 4 °C. Supernatant byl odsán a pelet resuspendován v 10 ml ledového 1× PBS. Zkumavky byly za stejných podmínek opět stočeny na centrifuze, pelet byl resuspendován v 1 ml 1× PBS a suspenze byla opět zcentrifugována. Po odsátí supernantu byl pelet ve zkumavce ponořen do tekutého dusíku. Vzorek byl zamražen v -80 °C nebo byl ihned zlyzován. Veškerá manipulace se vzorky probíhala na ledu.

3.2.13 Příprava proteinových lyzátů

Pro lýzování buněk byl nejprve připraven lyzační roztok dle tabulky (viz Tab. 9).

Tab. 9: Složení lyzačního roztoku.

	Objem [μ l]
RIPA	9987
1M DTT	1
1000× aprotinin	1
1000× leupeptin	1
100 mM PMST	10

K peletu ve zkumavce byl přidán lyzační roztok, jehož objem byl určen na základě velikosti peletu. Pelet byl v roztoku resuspendován a poté sonifikován ultrazvukovou sondou (10 s, 3 cykly) nebo inkubován 30 min na ledě. Suspenze byla stočena na centrifuze (30 min, 17090 g, 4 °C). Supernatant byl přepipetován do nové mikrozukumavky a jeho objem byl zaznamenán. Pomocí metody Bradfordové byla stanovena celková koncentrace proteinů. Ke vzorkům byl přidán lyzační pufr a 5× SDS s merkaptetanolem tak, aby se docílilo stejné koncentrace u všech proteinových vzorků.

3.2.14 Elektroforetická separace a Western blotting

Mikrozkumavky s lyzáty byly zdenaturovány v termobloku (95 °C, 2 min). Separace probíhala pomocí vertikální elektroforézy. Objem vzorku pipetovaného do jamek 12,5% SDS-PAA gelu (složení viz Tab. 10) závisel na koncentraci proteinů. Množství proteinů aplikované do jamek bylo v rozmezí 25 - 40 μg . Do první jamky byl nanesen hmotnostní proteinový standard. Elektroforéza probíhala cca 2 hodiny při napětí 70 - 120 V v 1 \times ELFO pufru.

Tab. 10: Složení lyzačního roztoku.

	Dělicí 12,5% gel	Zaostřovací 5% gel
	Objem [ml]	Objem [ml]
H ₂ O	0,97	1,75
AA + Bis	1,95	0,42
Tris pH 8,8 / 6,8	1,75	0,31
temed	0,0031	0,0025
10% SDS	0,047	0,025
10% APS	0,0187	0,015

Po dokončení byly proteiny za pomoci western blottingu přeneseny na nitrocelulózovou membránu. Blotování probíhalo po dobu 2 hodin při napětí 270 mA v blotovacím aparátu. Poté byla membrána s proteiny obarvena v roztoku Ponceau S, opláchnuta destilovanou vodou a usušena.

3.2.15 Imunodetekce

Membrána s přenesenými proteiny byla nařezána na proužky dle velikosti cílového proteinu. Následně byla promyta v PBS do úplného odbarvení Ponceau S a blokována na třepačce v 5% mléku v PBS nebo v 5% BSA v TBS/0,1% Tween 1 hod při laboratorní teplotě. Poté byla na membránu nanášena primární protilátka naředěná podle potřeby 100 - 2000 \times . Membrána byla inkubována přes noc v uzavřené vlhké komůrce v lednici. K ukončení inkubace došlo opakovaným promýváním v PBS/TBS s 0,1% Tweenem na třepačce. Membrána byla umístěna na parafilm a byla na ni nanášena sekundární protilátka značená křenuvou pero-

xidázou (ředění 1:1000). Následovala hodinová inkubace ve vlhké komůrce při laboratorní teplotě. Po dokončení inkubace byla membrána opět promyta v PBS/TBS s 0,1% Tweenem. Osušená membrána byla převrstvena roztokem luminol/peroxid (1:1). Pomocí CCD kamery byly v různých časech (1 s - 1 hod) zachyceny fotografie signálů.

4 Výsledky

4.1 Optimalizace primerů pomocí polymerázové řetězové reakce

Pro optimalizaci primerů pro markery diferenciaci keratinocytů byla použita metoda PCR následovaná elektroforetickou separací v agarózovém gelu. Optimalizace byla prováděna na buněčných liniích HaCaT, SVK14 a v některých případech také na linii BJ. V případě linií BJ a HaCaT byl k optimalizaci použit pouze kontrolní vzorek, který místo testované látky obsahoval DMSO. U linie SKV14 byly kromě kontrolního vzorku použity také vzorky ovlivněné různými cytokininy. U všech primerů byl optimalizován počet cyklů a teplota nasedání primerů. Rozmezí testovaných teplot bylo určeno na základě doporučené teploty získané z programů Primer-BLAST a Primer3.

Pro jednotlivé primery byly použity různé přístupy testování (viz Tab. 11), fotografie gelů tedy nemají jednotnou formu. Ze všech testů byl pro každou dvojici primerů vybrán pouze jeden názorný snímek s nejlepšími výsledky.

Tab. 11: Přehled vyzkoušených teplot a buněčných linií pro optimalizaci primerů. XX - tvorba nesprávného nebo žádného produktu, X - kromě správného produktu se vytvořil i nespecifický produkt, OK - produkt požadované velikosti, ok - slabý produkt požadované velikosti.

Testované primery	Buněčná linie	50 °C	51 °C	52 °C	53 °C	54 °C	55 °C	56 °C	57 °C	58 °C	59 °C	60 °C	61 °C	62 °C	63 °C
AQP3 (Pisarchik <i>et al.</i> , 2004)	SVK14									XX	XX	X	X	X	
	HaCaT												OK	OK	
	BJ												X	X	
K1 (Lee <i>et al.</i> , 2009)	SVK14									XX					
	SVK14														XX
K1 (Cherbuin <i>et al.</i> , 2015)	HaCaT									OK	OK	OK	OK	OK	
	SVK14	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX	XX			
K10 (Minner <i>et al.</i> , 2010)	HaCaT	XX	XX	XX	XX	XX	XX								
	SVK14								ok	ok	ok	ok	ok	ok	ok
K10 (Borowiec <i>et al.</i> , 2013)	HaCaT								OK	OK	OK	OK	OK	OK	OK
	SVK14								OK	OK	OK	OK	OK	OK	
K14 (Minner <i>et al.</i> , 2010)	SVK14								OK	OK	OK	OK	OK		
	HaCaT										OK				
	BJ										OK				
INV (Minner <i>et al.</i> , 2010)	SVK14			X	X	X	X	X	ok	XX	XX	XX			
	BJ											XX			
LOR (Minner <i>et al.</i> , 2010)	SVK14									XX	XX	XX	XX	XX	XX
	HaCaT									X	X	X	X	X	X

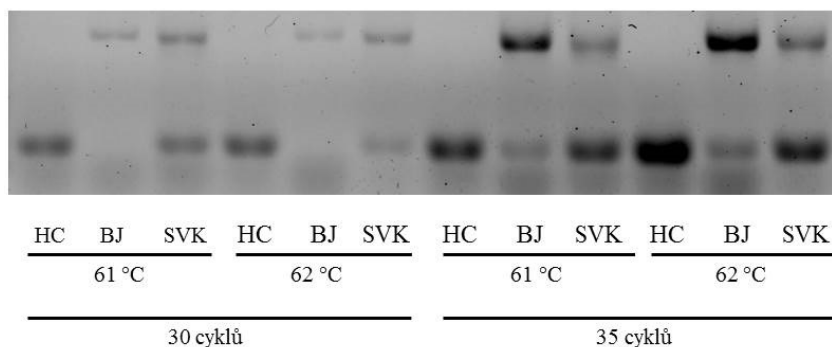
Akvaporin 3

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-TTTGGCTTTGCTGTCCTCTG-3' (Pisarchik *et al.*, 2004)
5'-AAGCACATGGCAAAGGTCAC-3' (Pisarchik *et al.*, 2004)

Velikost očekávaného produktu je 89 bp.

U primerů pro AQP3 byly vyzkoušeny teploty 58 - 62 °C a počet cyklů 30 nebo 35. Při teplotách 58 a 59 °C nedošlo k tvorbě produktu. Při použití vyšších teplot (60, 61, 62 °C) se u linií BJ a SVK14 vytvořil navíc druhý nespecifický produkt. Nejlepších výsledků bylo dosaženo na buněčné linii HaCaT, kdy se po 35 cyklech při teplotě nasedání primerů 62 °C vytvořil silný produkt odpovídající velikosti.



Obr. 14: Fotografie agarózového gelu s PCR produkty. Optimalizace počtu cyklů a teploty nasedání primerů pro AQP3. Testované linie BJ, HaCaT a SVK14.

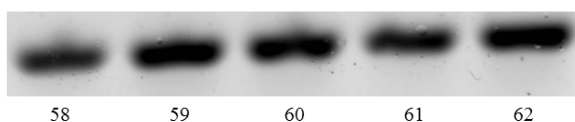
Keratin 1

Pro optimalizaci byly testovány následující páry primerů:

- 5'-TCAATCTCGGTTGGATTCGGA-3' (Lee *et al.*, 2009)
5'-CCACCTTGGTCATATAAGCACC-3' (Lee *et al.*, 2009)
- 5'-GGTGCTTATATGACCAAGGTGG-3' (Cherbuin *et al.*, 2015)
5'-ATGCTGTCCAGGTCGAGACT-3' (Cherbuin *et al.*, 2015)

Velikost očekávaného produktu primerů (Lee *et al.*, 2009) je 155 bp, primerů (Cherbuin *et al.*, 2015) 173 bp.

Pro optimalizaci byla použita linie SVK14 ošetřená vybranými cytokininy. Pro první dvojici primerů byla vyzkoušena teplota 58 °C, PCR reakce proběhla v 30 cyklech. Za těchto podmínek se vytvořil produkt o velikosti cca 1000 bp, místo požadované velikosti 155 bp. Byly tedy vyzkoušeny primery (Cherbuin *et al.*, 2015), pro které byla zvolena teplota 62 °C, počet cyklů zůstal stejný. Velikost produktu se zmenšila na asi 350 bp, požadované velikosti 173 bp se ovšem nepodařilo docílit. Jelikož optimalizace na linii SVK14 nebyla úspěšná, dvojice primerů (Cherbuin *et al.*, 2015) byla použita také na kontrolním vzorku linie HaCaT, kde se vytvořil produkt správné velikosti. Byl vyzkoušen gradient 5 teplot, počet cyklů zůstal stejný (30).



Obr. 15: Fotografie agarózového gelu s PCR produkty. Optimalizace počtu cyklů a teploty nasedání primerů (Cherbuin *et al.*, 2015) pro K1 na linii HaCaT. Gradient teplot (°C).

Keratin 10

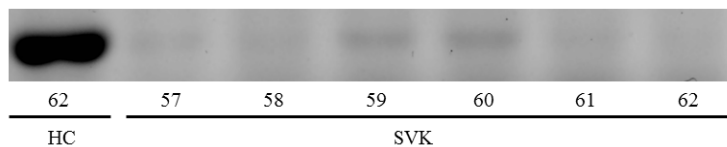
Pro optimalizaci byly testovány následující páry primerů:

- 5'-AATCAGATTCTCAACCTAACAAC-3' (Minner *et al.*, 2010)
5'-TTCCTCTTGCTTTGATGGG-3' (Minner *et al.*, 2010)
- 5'-TGATGTGAATGTGGAAATGAATGC-3' (Borowiec *et al.*, 2013)
5'-GTAGTCAGTTCCTTGCTCTTTTCA-3' (Borowiec *et al.*, 2013)

Velikost očekávaného produktu primerů (Minner *et al.*, 2010) je 162 bp, primerů (Borowiec *et al.*, 2013) 147 bp.

Pro první dvojici primerů byly vyzkoušeny teploty 50 - 60 °C, počet cyklů byl vždy 30. Primery byly testovány na liniích HaCaT i SVK14, ale k tvorbě produktu nedošlo v žádném z experimentů. Dále byla použita dvojice primerů (Borowiec *et al.*, 2013). Tyto primery byly testovány na kontrolních vzorcích linií SVK14 a HaCaT za použití teplot v rozmezí 57 - 62 °C. PCR reakce proběhla v 30 nebo 35 cyklech. V případě linie SVK14 došlo při nastavení 35 cyklů a při teplotách 59 a 60 °C k tvorbě velmi slabých produktů. Na linii

HaCaT se při teplotě 62 °C vytvořil požadovaný produkt. Pro tuto linii byl tedy následně vyzkoušen teplotní gradient 57 - 62 °C s dvojicí primerů (Borowiec *et al.*, 2013). Za těchto podmínek došlo ke tvorbě správného produktu za všech použitých teplot.



Obr. 16: Fotografie agarózového gelu s PCR produkty. Optimalizace počtu cyklů a teploty nasedání primerů (Borowiec *et al.*, 2013) pro K10. Kontrolní vzorky linií SVK14 a HaCaT, počet cyklů 35.

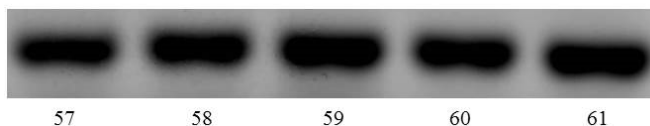
Keratin 14

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-CGATGGCAAGGTGGTGTC-3' (Minner *et al.*, 2010)
5'-GGGTGAAGCAGGGTCCAG-3' (Minner *et al.*, 2010)

Velikost očekávaného produktu je 160 bp.

Primery byly testovány na kontrolním vzorku linie SVK14 v teplotním gradientu 57 - 61 °C. PCR reakce proběhla v 35 cyklech. Následnou gelovou elektroforézou byla ověřena správná velikost produktů. Primery byly testovány také na linii SVK14, která byla ošetřena různými cytokininy. V tomto experimentu byl počet cyklů snížen na 30. Výsledné produkty měly správnou velikost, ale byly velmi slabé.



Obr. 17: Fotografie agarózového gelu s PCR produkty. Optimalizace počtu cyklů a teploty nasedání primerů pro K10. Kontrolní vzorek linie SVK14. Teplotní gradient (°C).

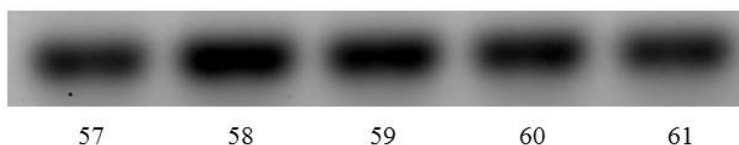
Filaggrin

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-GGGCACTGAAAGGCAAAAAG-3' (Minner *et al.*, 2010)
5'-CACCATAATCATAATCTGCACTACCA-3' (Minner *et al.*, 2010)

Velikost očekávaného produktu je 80 bp.

Optimalizace primerů pro FLG byla prováděna na buněčných liniích SVK14, HaCaT i BJ. Byly použity teploty v rozmezí 57 - 61 °C. Byl vyzkoušen různý počet cyklů - 30, 33, 35, 36 a 37. Optimalizace primerů pro FLG se podařila nejlépe ze všech testovaných primerů, při teplotě 59 °C a použití vyššího počtu cyklů (např. 36) se vytvořily správné a silné produkty i na linii SVK14 ošetřené cytokininy.



Obr. 18: Fotografie agarózového gelu s PCR produkty. Optimalizace počtu cyklů a teploty nasedání primerů pro FLG. Kontrolní vzorek linie SVK14. Teplotní gradient (°C), 35 cyklů.

Involukrin

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-TGAAACAGCCA ACTCCAC-3' (Minner *et al.*, 2010)
- 5'-TTCCTCTTGCTTTGATGGG-3' (Minner *et al.*, 2010)

Velikost očekávaného produktu je 83 bp.

Pro optimalizaci byly použity buněčné linie SVK14, HaCaT i BJ. PCR reakce probíhala v 30, 33 nebo 35 cyklech. Byly testovány teploty v rozmezí 52 - 60 °C. Při 30 cyklech se za teploty 57 °C na linii SVK14 vytvořil velice slabý produkt, v ostatních případech se produkt vůbec nevytvořil nebo došlo k vytvoření mnoha nespecifických produktů.

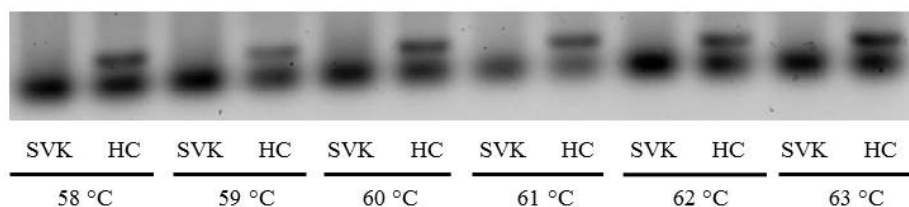
Lorikrin

Pro optimalizaci byl testován následující pár primerů:

- 5'-TCATGATGCTACCCGAGGTTTG-3' (Minner *et al.*, 2010)
- 5'-CAGAACTAGATGCAGCCGGAGA-3' (Minner *et al.*, 2010)

Velikost očekávaného produktu je 87 bp.

Testování probíhalo na buněčných liniích HaCaT a SVK14. PCR reakce proběhla v 30 cyklech. Byly použity teploty v rozmezí 58 - 63 °C. U obou linií došlo k tvorbě nespecifického produktu, u linie HaCaT se navíc vytvořil i požadovaný produkt.



Obr. 19: Fotografie agarózového gelu s PCR produkty. Optimalizace počtu cyklů a teploty nasedání primerů pro LOR. Kontrolní vzorky linií SVK14 a HaCaT. 30 cyklů.

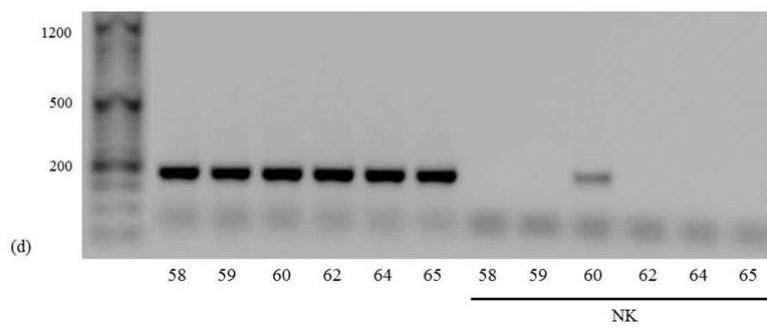
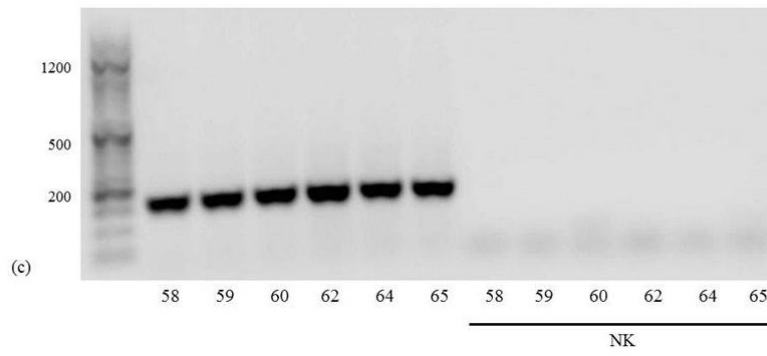
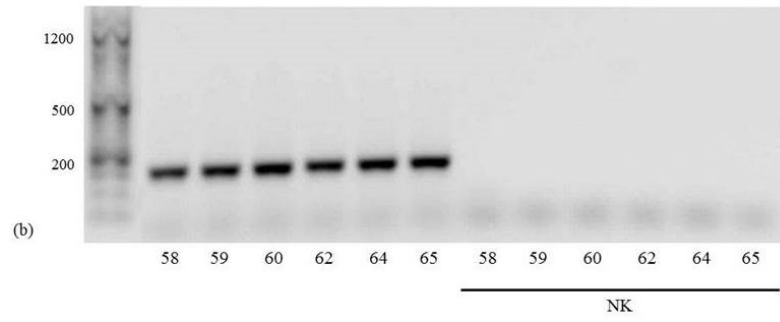
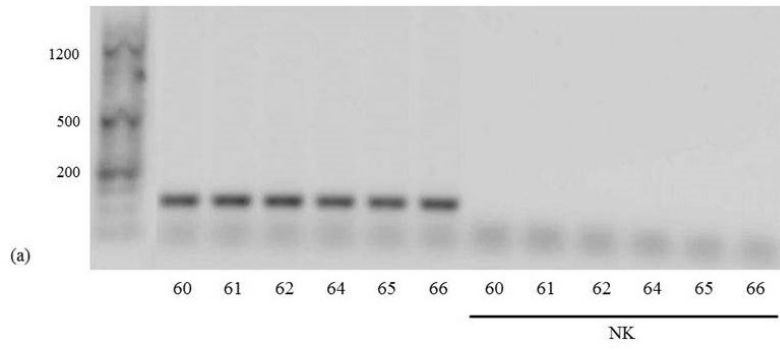
4.2 Optimalizace primerů pomocí polymerázové řetězové reakce v reálném čase

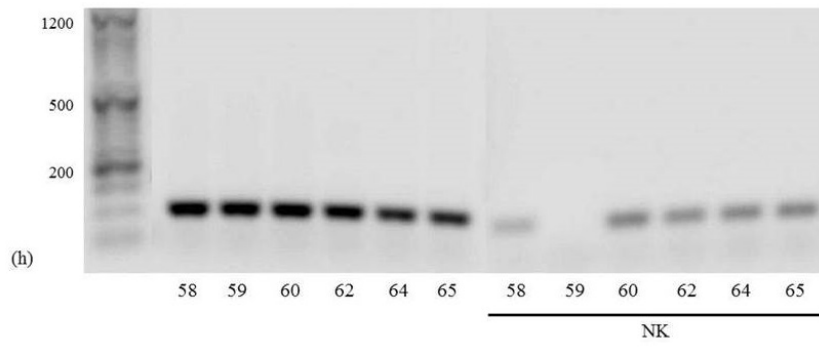
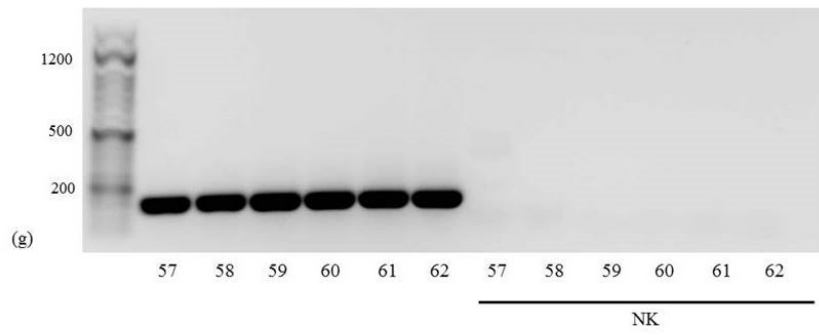
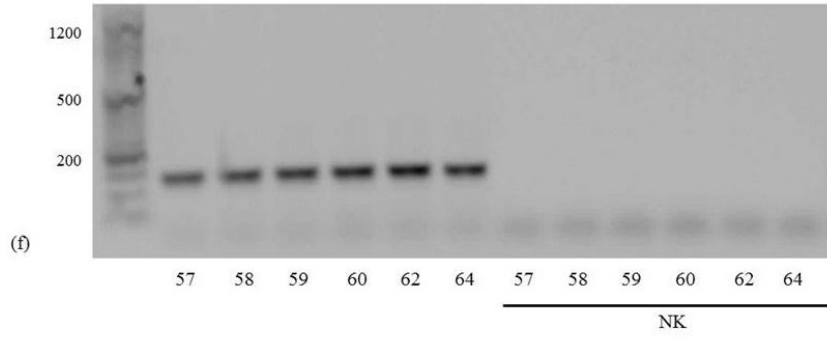
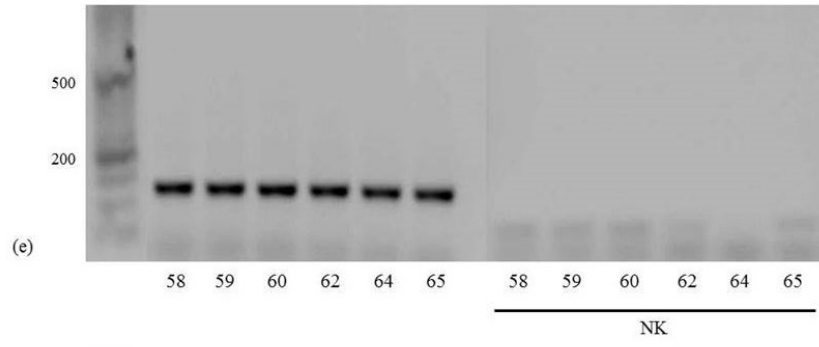
Pro optimalizaci primerů byla kromě klasické PCR použita také metoda Real-Time PCR (polymerázová řetězová reakce v reálném čase). Tato metoda zaznamenává množství DNA v průběhu každého cyklu. Reakce využívá přítomnosti fluorescenčních barviv, která se interkalují mezi báze DNA. Intenzita fluorescence je sledována pomocí detektoru a je přímo úměrná množství produktu. Po proběhnutí PCR reakce byla velikost produktů ověřena elektroforézou v agarózovém gelu. Pro každý pár primerů byl vyzkoušen gradient 6 teplot. Všechny experimenty byly prováděny na kontrolním vzorku (bez testované látky) buněčné linie HaCaT. Ke zjištění případných kontaminací byla zároveň pro všechny vzorky vytvořena negativní kontrola (NK) bez cDNA. Rozmezí testovaných teplot bylo opět určeno na základě doporučené teploty získané z programů Primer-BLAST a Primer3.

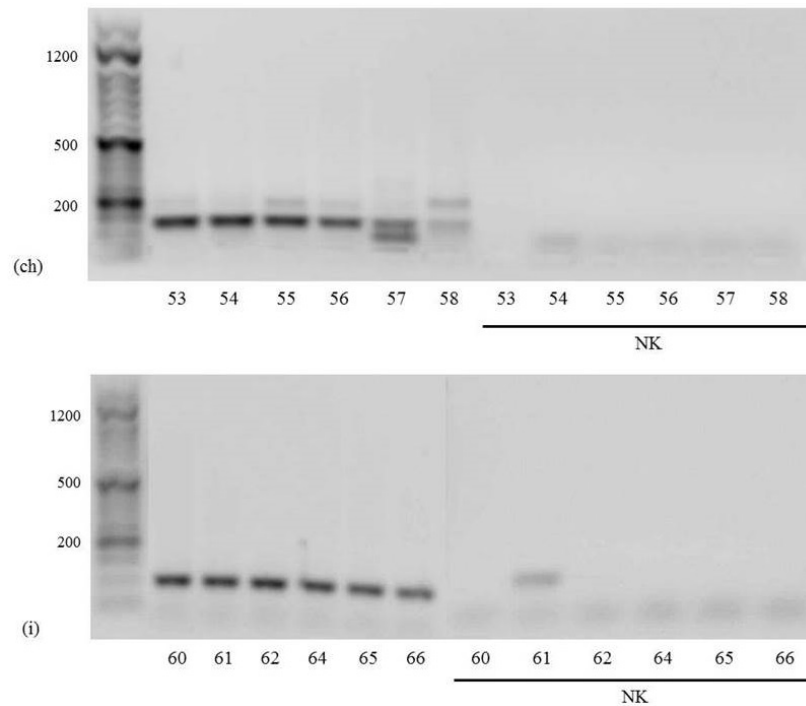
Pro Real-Time PCR byly použity stejné dvojice primerů jako v případě klasické PCR. Navíc byla použita dvojice primerů pro K1 (Borowiec *et al.*, 2013) a dvojice primerů pro K10 (Cherbuin *et al.*, 2015).

- 5'-ATTTCTGAGCTGAATCGTGTGATC-3' (Borowiec *et al.*, 2013)
- 5'-CTTGGCATCCTTGAGGGCATT-3' (Borowiec *et al.*, 2013)
- 5'-ATGTCTGTTCGATACAGCTCAAG-3' (Cherbuin *et al.*, 2015)
- 5'-CTCCACCAAGGGAGCCTTTG-3' (Cherbuin *et al.*, 2015)

U většiny primerů se silný produkt správné velikosti vytvořil při použití všech teplot. Nejmarkantnější rozdíl v použití různých teplot byl zaznamenán u dvojice primerů pro INV, kdy se nejvíce produktu se vytvořilo při nejnižší použité teplotě (53 °C). Se zvyšující se teplotou velikost produktu postupně klesala a začaly se tvořit další nespecifické produkty. V některých případech jsou fotografie gelů kvůli přehlednosti upraveny tak, aby zobrazovaly jen dráhy na gelu patřící k popisovanému experimentu.

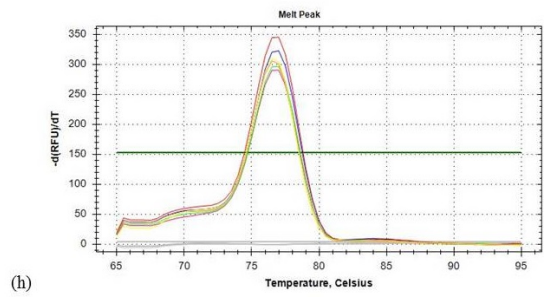
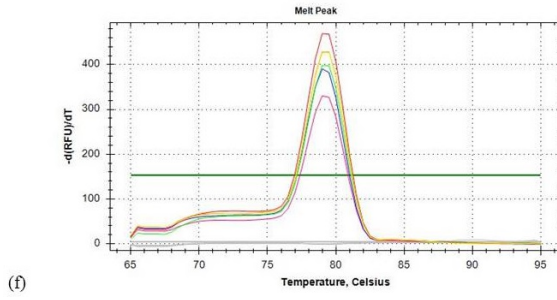
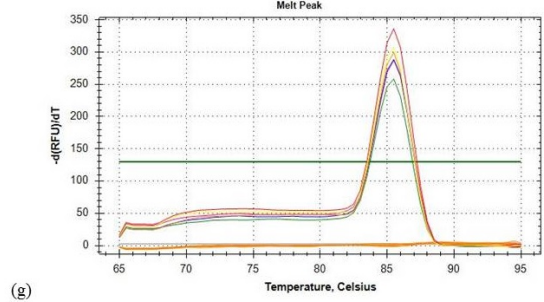
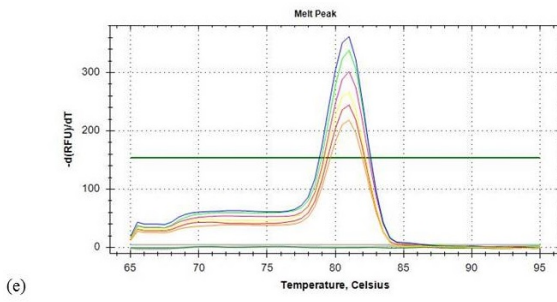
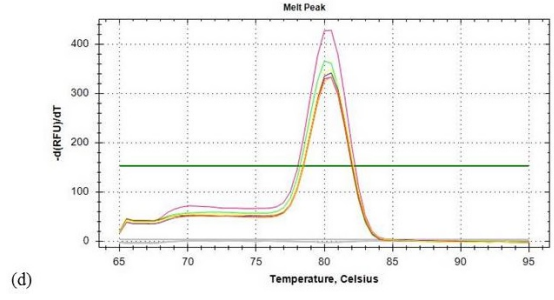
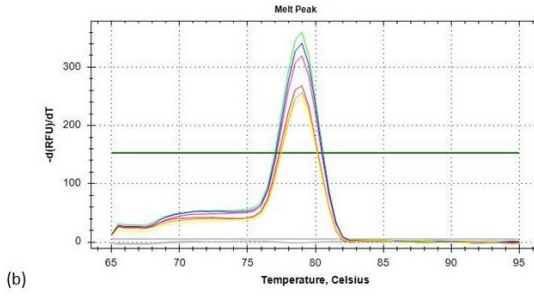
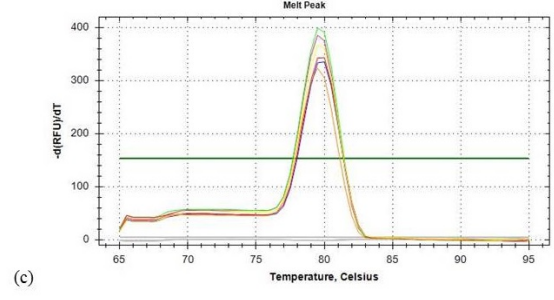
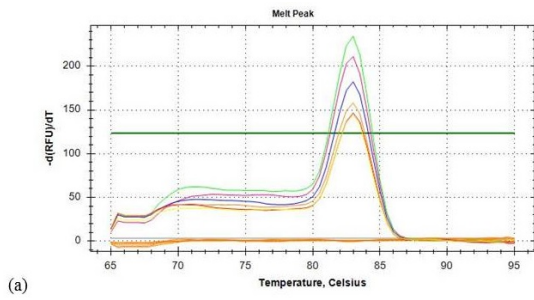


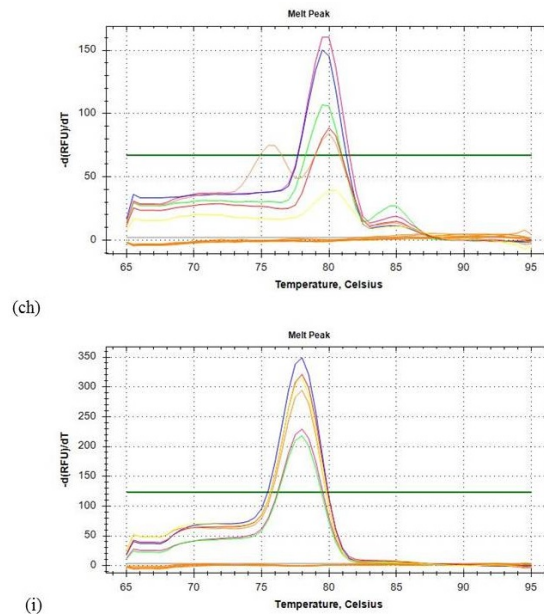




Obr. 20: Fotografie agarózových gelů s PCR produkty. Optimalizace teploty ($^{\circ}\text{C}$) a nasezení primerů pomocí Real-Time PCR. Optimalizace primerů pro (a) *AQP3* (Pisarchik et al., 2004), (b) *K1* (Lee et al., 2009), (c) *K1* (Cherbuin et al., 2015), (d) *K1* (Borowiec et al., 2013), (e) *K10* (Cherbuin et al., 2015), (f) *K10* (Borowiec et al., 2013), (g) *K14* (Minner et al., 2010), (h) *FLG* (Minner et al., 2010), (ch) *INV* (Minner et al., 2010), (i) *LOR* (Minner et al., 2010). Vedle vzorku vždy negativní kontrola (NK) bez *cDNA*.

Dále jsou uvedeny obrázky křivek teplot tání pro jednotlivé primery, kdy jsou barevně odlišeny vzorky, pro které byla použita různá teplota (viz výše). Tyto grafy byly vytvořeny v programu Bio-Rad CFX Manager. V ideálním případě by křivky jednotlivých vzorků měly mít jeden vrchol, což se zcela nepodařilo ani u jednoho vzorku. Více vrcholů může být způsobeno přítomností dalšího produktu, který je obvykle také viditelný na agarózovém gelu, jak můžeme vidět např. u *INV*. Dalším důvodem může být tvorba dimerů primerů. Známý jsou také případy dvoufázového tání produktu.





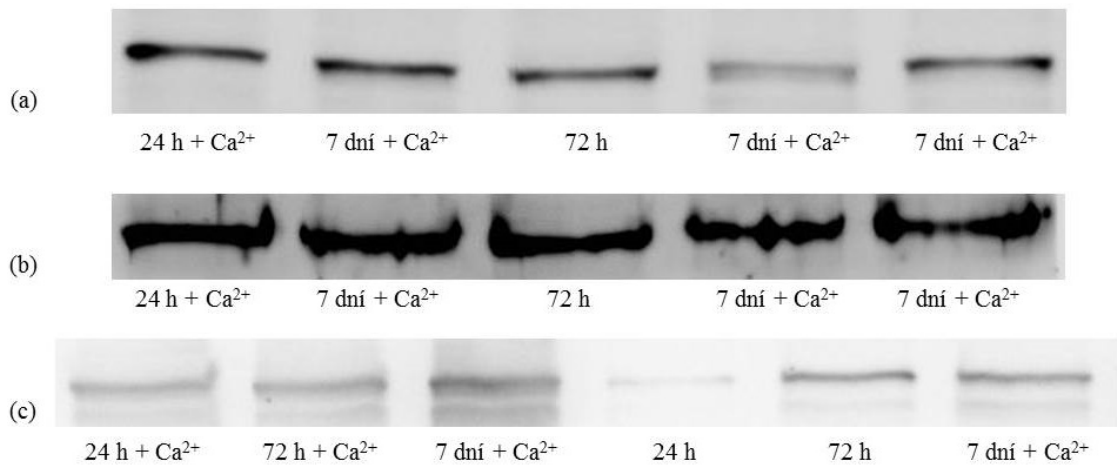
Obr. 21: Grafy křivek tání produktů Real-Time PCR. Buněčná linie HaCaT s vybranými primery. (a) AQP3 (Pisarchik et al., 2004), (b) K1 (Lee et al., 2009), (c) K1 (Cherbuin et al., 2015), (d) K1 (Borowiec et al., 2013), (e) K10 (Cherbuin et al., 2015), (f) K10 (Borowiec et al., 2013), (g) K14 (Minner et al., 2010), (h) FLG (Minner et al., 2010), (ch) INV (Minner et al., 2010), (i) LOR (Minner et al., 2010).

4.3 Imunodetekce vybraných markerů diferenciaci keratinocytů

Jak již bylo zmíněno, vápník je hlavním regulátorem diferenciaci keratinocytů. Keratinocyty kultivované při nízké koncentraci vápníku rychle proliferují, ale nediferencují se. Diferenciaci keratinocytů je iniciována, pokud je koncentrace vápníku zvýšena nad 0,1 mM (Hennings *et al.*, 1980).

Pro imunodetekci byly vybrány 4 markery diferenciaci keratinocytů - INV a keratiny K1, K10 a K14. Kromě HaCaT kultivovaných za standardních podmínek, byly použity i buňky kultivované v médiu se sníženým obsahem vápenatých iontů (sérum se sníženým obsahem vápníku pomocí chelexace). Cílem tohoto postupu provedeného podle (Deyrieux *et al.*, 2007) bylo navodit dediferenciaci těchto keratinocytů. Pracovala jsem s buňkami, u kterých jsme již předpokládali dokončenou dediferenciaci. V případě úspěšné dediferenciaci by proteiny K1, K10 a INV (tedy markery diferenciaci) neměly být v těchto buňkách přítomny. Z fotografie membrány je patrné, že dediferenciaci buněk nebyla úspěšná. Na membráně

byly detekovány proteiny K10, K14 a INV. Protein K1 nebyl za daných podmínek detekován vůbec.



Obr. 22: Fotografie membrán s detekovanými proteiny. Různá doba kultivace buněčné linie HaCaT v médiu se zvýšeným obsahem vápníku (2,8 mM; + Ca²⁺) a linie HaCaT kultivované v médiu s nízkým obsahem vápníku, u kterých jsem předpokládala dediferenciaci. (a) K14, (b) K10, (c) INV.

4.4 Hodnocení vlivů vybraných cytokininů na viabilitu keratinocytů

Cytokinininy mají různé účinky na diferenciaci keratinocytů a jednotlivé markery. Pokud jsou primární keratinocyty kultivovány v přítomnosti 40 - 200 μ M kinetinu, dochází k výraznému zpomalení buněčného růstu, které je spojeno s nástupem diferenciaci. Kinetin zvyšuje hladinu markerů K10 a INV. Hladina K14 je naopak po ošetření kinetinem snížena. Tyto výsledky vedou k závěru, že by kinetin mohl podporovat diferenciaci keratinocytů (Berge *et al.*, 2006).

Pro hodnocení vlivů cytokininů na lidské keratinocyty byl použit test cytotoxicity založený na redukci barviva resazurinu. Bylo testováno několik vybraných cytokininů a jejich ribozidů. Pomocí spektrofotometru byly naměřeny hodnoty fluorescence a absorbance, ze kterých byla následně vypočítána hodnota IC₅₀. Tato hodnota udává koncentraci testované látky, při které dochází ke smrti 50 % buněk. Z testovaných cytokininů byly obecně více toxické ribozidy, z nichž nejvyšší toxicitu vykazovaly BAPR, iPR, KR a oTR.

Tab. 12: Vliv vybraných cytokininů na viabilitu buněčné linie HaCaT.

Látka	Test	Průměr IC50 [μM]	Směrodatná odchylka IC50 [μM]	Počet měření
BAPR	absorbance	3,85	0,03	2
	fluorescence	4,63	0,30	
cZ	absorbance	>100	-	1
	fluorescence	>100	-	
cZR	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
iPR	absorbance	5,91	0,16	2
	fluorescence	6,60	0,02	
Kin	absorbance	>100	-	4
	fluorescence	>100	-	
KR	absorbance	8,48	0,25	2
	fluorescence	11,67	0,64	
mT	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
mTR	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
oT	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
oTR	absorbance	6,83	2,10	4
	fluorescence	9,15	3,46	
pT	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
pTR	absorbance	>100	-	1
	fluorescence	>100	-	
tZ	absorbance	>100	-	1
	fluorescence	>100	-	
tZR	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	

Tab. 13: Vliv vybraných cytokininů na viabilitu buněčné linie SVK14.

Látka	Test	Průměr IC50 [μM]	Směrodatná odchylka IC50 [μM]	Počet měření
BAPR	absorbance	5,53	0,19	2
	fluorescence	6,40	0,06	
cZ	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
cZR	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
iPR	absorbance	6,10	0,57	2
	fluorescence	7,92	1,48	
Kin	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
KR	absorbance	13,14	0,02	2
	fluorescence	16,23	0,55	
mT	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
mTR	absorbance	>100	-	1
	fluorescence	>100	-	
oT	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
oTR	absorbance	3,75	0,57	4
	fluorescence	6,39	0,78	
pT	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
pTR	absorbance fluorescence	>100	-	1
tZ	absorbance	>100	-	2
	fluorescence	>100	-	
tZR	absorbance fluorescence	>100 >100	- -	2

5 Diskuze a závěr

Během procesu diferenciaci keratinocytů dochází k syntéze proteinů nezbytných pro tvorbu zrohovělé vrstvy *epidermis*. Mezi tyto tzv. markery diferenciaci patří například filaggrin, involukrin a některé keratiny. Jejich exprese může být ovlivněna některými látkami, jejichž aktuální přehled se nachází v teoretické části této práce. Mezi tyto látky patří také fytohormony cytokininy. Předchozí studie ukázaly, že některé cytokininy, zejména kinetin a *trans*-zeatin, mají pozitivní účinky na buňky lidské kůže jakými jsou fibroblasty nebo keratinocyty (Rattan *et al.*, 1994; Rattan *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2010). U kinetinu byla prokázána schopnost inhibovat růst primárních keratinocytů. Tento účinek byl zesílen v kombinaci s vápenatými ionty. Kultivace keratinocytů v médiu se zvýšeným obsahem vápenatých iontů a 40 μM kinetinu vedla ke snížení množství keratinu 14 exprimovaného v bazální vrstvě *epidermis* a naopak byla zvýšena hladina suprabazálních markerů keratinu 10 a involukrinu. Tyto výsledky naznačují možný diferenciací efekt kinetinu (Berge *et al.*, 2006).

Cílem práce bylo zavést některé metody, které by umožnily hodnotit schopnost cytokinínů indukovat diferenciaci keratinocytů. Jako model byly vybrány immortalizované linie HaCaT a SVK14. První z nich podle literatury exprimuje markery pozdní diferenciaci, druhá ne (Boukamp *et al.*, 1988; Bernard *et al.*, 1985). Jako vhodná metoda se jeví detekce markerů diferenciaci pomocí PCR po reverzní transkripci mRNA. Daleko pracnější imunodetekce po elektroforéze a westernovém přenosu může sloužit k potvrzení změn na proteinové úrovni. Primery pro markery diferenciaci keratiny 1, 10 a 14, filaggrin, involukrin a lorikrin byly převzaty z literatury (Minner *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2009; Borowiec *et al.*, 2013; Cherbuin *et al.*, 2015). Dále byla optimalizována PCR reakce pro akvaporin 3, kanál transportující vodu a glycerol přes buněčné membrány. Primery pro akvaporin 3 byly převzaty z (Pisarchik *et al.*, 2004). Výchozí reakční podmínky vycházely z literatury, k nalezení vhodné teploty nasedání primerů byl použit teplotní gradient.

Kromě keratinocytů SVK14 a HaCaT byly v některých experimentech použity i fibroblasty BJ, které by neměly exprimovat geny spojené s tvorbou rohové obálky. Některé geny - např. filaggrin, které jsou tradičně spojovány s diferenciací keratinocytů, ale exprimují, což bylo v mých experimentech potvrzeno.

V optimalizačních experimentech byla nejprve používána klasická PCR s následnou analýzou produktů na agarózovém gelu. Přestože bylo provedeno několik experimentů pro každý pár primerů, výsledky nebyly ideální. V některých případech produkt vůbec nevznikl nebo vznikl produkt nesprávné velikosti (např. u primerů pro involukrin a keratin 10 (Minner *et al.*, 2010)). Nejlepších výsledků bylo dosaženo s primery pro filagrin, kde se produkt vytvořil u všech 3 testovaných linií. Zajímavé je pozorování, že produkt správné velikosti v reakci s primery pro keratin 10 (Borowiec *et al.*, 2013) vznikl i v linii SVK14 s narušenou diferenciací. Signál byl ale velice slabý. Je možné, že buňky exprimují i malé množství tohoto genu nebo že se v populaci buněk nachází malá frakce buněk diferencovaných. Nelze ani vyloučit, že pozorované produkty nejsou produkty cílovými.

Protože naše laboratoř získala přístroj pro PCR v reálném čase, která nabízí oproti klasické metodě řadu výhod (rychlost, snadnější možnost kvantifikace), v dalších optimalizacích klasickou metodou jsem nepokračovala. PCR v reálném čase - zatím jen s cDNA s linií HaCaT - poskytla velice rychle podstatně lepší výsledky. Produkty vznikaly pro všechny primery napříč gradientem teplot obvykle od 57 do 66 °C. Ověření na agarózovém gelu potvrdilo, že vzniká produkt přibližně očekávané velikosti. Ve většině případů byl přítomen pouze cílový produkt. Problematická je zatím reakce s involukrinem, kde vznikají i produkty nežádoucí, jak bylo patrné již z křivek tání. Nežádoucím jevem byl také v některých případech vznik slabých produktů ve vzorcích bez cDNA. Je možné, že šlo o kontaminaci.

Další optimalizace, experimenty s ostatními liniemi a vypracování protokolu pro kvantifikaci cílových cDNA bude předmětem navazující diplomové práce. Jako jedno z možných zlepšení bych navrhla použití klonovaných sekvencí cílových ampliconů jako pozitivních kontrol. I moje experimenty ukazují, že přirozená kontrola se nemusí chovat dle očekávání - viz. možná slabá exprese keratinu 10 v linii SVK14.

Dále jsem testovala možnost detekovat některé markery diferenciacie pomocí imunodetekce po westernovém přenosu. K dispozici jsem měla protilátky proti keratinům 1, 10 a 14 a proti involukrinu. Jako biologický materiál byly použity buňky HaCaT dlouhodobě kultivované v médiu s nízkou koncentrací vápenatých iontů (0,03 mM), což by mělo vést k dediferenciaci těchto buněk (Hennings *et al.*, 1980). Buňky byly před sklizní kultivovány (24 - 168 hodin) v prostředí buď s nízkou nebo vysokou koncentrací vápenatých iontů. Použitím imunodetekce jsem zjistila, že buňky exprimují markery keratin 10, keratin 14 a involukrin

bez ohledu na kultivační podmínky. Přitom keratin 10 a involucrin by v případě úspěšné dediferenciace neměly být v této linii detekovány. Výsledky tedy ukazují, že dediferenciace nebyla úspěšná. A to i přes to, že buňky podrobené dediferenčním protokolu měly odlišnou morfologii. Keratin 1 nebyl v tomto experimentu detekován vůbec, důvody jsou nejasné. Je možné, že je třeba optimalizovat dále podmínky imunodetekce.

Dále jsem testovala vliv kinetinu a dalších přirozených cytokininů na viabilitu keratinocytů. V souboru byly zastoupeny jak cytokininové báze tak ribozidy. Efekt byl sledován pomocí testu, jehož principem bylo měření metabolické redukce modrého barviva resazurinu na růžový fluoreskující resofurin. U testovaných látek byla stanovena hodnota IC50, která byla vypočítána z naměřených hodnot fluorescence a absorbance. Experiment byl prováděn na liniích keratinocytů SVK14 a HaCaT. U kinetinu byly toxické účinky zaznamenány až při koncentracích vyšší než 100 μM . Nepodařilo se tedy potvrdit pozorování (Berge *et al.*, 2006), že by i nižší koncentrace kinetinu (např. 40 - 100 μM), měly na proliferaci keratinocytů výrazný inhibující efekt. Je nutné ale zmínit, že (Berge *et al.*, 2006) na rozdíl ode mne používali primární keratinocytovou linii. U obou linií byla nejvyšší toxicita pozorována u ribozidů BAPR, iPR, KR a oTR, kdy pro inhibici 50 % buněk stačily koncentrace do 20 μM . Smyslem tohoto experimentu bylo zjistit vhodné koncentrace pro budoucí diferenační experimenty.

Výše uvedené experimenty ukazují, že používání imortalizovaných linií má významné stinné stránky. Vhodnější by proto bylo pracovat s primárními liniemi. Jejich nevýhodou je podstatně vyšší cena kultivačních médií a také potřeba vyčlenit speciální inkubátor, protože kultivace vyžaduje jinou koncentraci oxidu uhličitého (5,0 %) než běžná kultivace v naší laboratoři (5,5 %).

V rámci experimentální části této práce jsem kromě vyhodnocení vlivu souboru přirozených cytokininů na viabilitu keratinocytových linií také provedla sérii experimentů s cílem optimalizovat protokol pro sledování diferenciace keratinocytů na úrovni transkriptomu a proteomu. PCR v reálném čase s primery převzatými z literatury umožnila kvantitativní detekci keratinů 1, 10 a 14, filaggrinu, involucrinu, lorikrinu a akvaporinu 3. Pomocí imunodetekce po denaturační elektroforéze (SDS-PAGE) a westernovém přenosu se mi podařilo detekovat proteiny keratin 10, keratin 14 a involucrin. Tyto metody budou po další optimali-

zaci v rámci diplomové práce použity k hodnocení diferenciačního účinku cytokininů.

6 Seznam zkratek

1,25-(OH) ₂ D ₃	1,25-dihydroxyvitamín D ₃
7-DHC	7-dehydrocholesterol
AD	atopická dermatitida
AE	atopický ekzém
AQP	akvaporin
BAP	6-benzylaminopurin
BAPR	6-benzylaminopurin ribozid
CASP14	epidermální kaspáza 14
CaR	vápníkový receptor
CK	cytokininy
CKX	cytokinin oxidáza/dehydrogenáza
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
<i>cZR</i>	<i>cis</i> -zeatin ribozid
DMAPP	dimetylallyldifosfát
EGCG	epigalokatechin-3-galát
ER	endoplazmatické retikulum
DMSO	dimetylsulfoxid
FLG	filaggrin
GA	Golgiho aparát
HC	buněčná linie HaCaT
IFN- γ	interferon γ
IL	interleukin
INV	involukrin
iP	N ⁶ -izopentenyladenin
iPR	N ⁶ -izopentenyladenozin
IP3	inozitol-1,45-trifosfát
K	keratin
Kin	kinetin

KR	kinetin ribozid
LOR	lorikrin
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
<i>mTR</i>	<i>meta</i> -topolin ribozid
MT-SP1	serinová proteáza matriptáza
NK	negativní kontrola
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin
<i>oTR</i>	<i>ortho</i> -topolin ribozid
PI3K	fosfatidylinozil-3-kináza
PKC	protein kináza C
PLC γ 1	fosfolipáza C γ 1
<i>pT</i>	<i>para</i> -topolin
<i>pTR</i>	<i>para</i> -topolin ribozid
SDS	dodecylsulfát sodný
SVK	buněčná linie SVK14
TNF- α	tumor nekrotizující faktor α
TRIS	tris(hydroxymetyl)aminometan
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatin ribozid
VDR	receptor pro vitamín D

Reference

- K. M. Aberg, E. Racz, M. J. Behne, and T. M. Mauro. Involucrin expression is decreased in hailey–hailey keratinocytes owing to increased involucrin mrna degradation. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(8):1973–1979, 2007.
- B. B. Aggarwal, A. Kumar, Alok C. Bharti, *et al.* Anticancer potential of curcumin: preclinical and clinical studies. *Anticancer res*, 23(1A):363–398, 2003.
- Ch. Agyare, M. Lechtenberg, A. Deters, F. Petereit, and A. Hensel. Ellagitannins from *phyllanthus muellerianus* (kuntze) exell.: Geraniin and furosin stimulate cellular activity, differentiation and collagen synthesis of human skin keratinocytes and dermal fibroblasts. *Phytomedicine*, 18(7):617–624, 2011.
- D. E. Akiyoshi, H. Klee, R. M. Amasino, E. W. Nester, and M. P. Gordon. T-dna of agrobacterium tumefaciens encodes an enzyme of cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81(19):5994–5998, 1984.
- H. Alam, L. Sehgal, S. T. Kundu, S. N. Dalal, and M. M. Vaidya. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Molecular biology of the cell*, 22(21):4068–4078, 2011.
- M. Amigó, J. Schalkwijk, D. Olthuis, S. De Rosa, M. Payá, M. C. Terencio, and E. Lamme. Identification of avarol derivatives as potential antipsoriatic drugs using an in vitro model for keratinocyte growth and differentiation. *Life sciences*, 79(25):2395–2404, 2006.
- D. K. B. Armstrong, K. E. McKenna, and A. E. Hughes. A novel insertional mutation in loricrin in vohwinkel’s keratoderma. *Journal of investigative dermatology*, 111(4):702–704, 1998.
- V. Badock, U. Steinhilber, K. Bommert, B. Wittmann-Liebold, and A. Otto. Apoptosis-induced cleavage of keratin 15 and keratin 17 in a human breast epithelial cell line. *Cell death and differentiation*, 8(3):308–315, 2001.

- S. Balasubramanian and R. L. Eckert. Green tea polyphenol and curcumin inversely regulate human involucrin promoter activity via opposing effects on ccaat/enhancer-binding protein function. *Journal of Biological Chemistry*, 279(23):24007–24014, 2004.
- S. Balasubramanian and R. L. Eckert. Keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis—differential mechanisms of regulation by curcumin, egcg and apigenin. *Toxicology and applied pharmacology*, 224(3):214–219, 2007.
- S. Balasubramanian, T. Efimova, and R. L. Eckert. Green tea polyphenol stimulates a ras, mekk1, mek3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 277(3):1828–1836, 2002.
- A. Balato, F. Ayala, M. Schiattarella, M. Megna, N. Balato, and S. Lembo. *Pathogenesis of psoriasis: the role of pro-inflammatory cytokines produced by Keratinocytes*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- U. Berge, P. Kristensen, and S. I. S. Rattan. Kinetin-induced differentiation of normal human keratinocytes undergoing aging in vitro. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1067(1):332–336, 2006.
- B. A. Bernard, S. M. Robinson, A. Semat, and M. Darmon. Reexpression of fetal characters in simian virus 40-transformed human keratinocytes. *Cancer research*, 45(4):1707–1716, 1985.
- D. D. Bikle and S. Pillai. Vitamin d, calcium, and epidermal differentiation*. *Endocrine reviews*, 14(1):3–19, 1993.
- D. D. Bikle, S. Pillai, E. Gee, and M. Hincenbergs. Regulation of 1, 25-dihydroxyvitamin d production in human keratinocytes by interferon- γ *. *Endocrinology*, 124(2):655–660, 1989.
- D. D. Bikle, S. Pillai, E. GEE, and M. Hincenbergs. Tumor necrosis factor- α regulation of 1, 25-dihydroxy vitamin d production by human keratinocytes*. *Endocrinology*, 129(1):33–38, 1991.

- D. D. Bikle, A. Ratnam, T. Mauro, J. Harris, and S. Pillai. Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. potential role of the calcium receptor. *Journal of Clinical Investigation*, 97(4):1085, 1996.
- D. D. Bikle, Z. Xie, and Ch.-L. Tu. Calcium regulation of keratinocyte differentiation. 2012.
- F. Bonté. Skin moisturization mechanisms: new data. In *Annales pharmaceutiques françaises*, volume 69, pages 135–141. Elsevier, 2011.
- A.-S. Borowiec, P. Delcourt, E. Dewailly, and G. Bidaux. Optimal differentiation of in vitro keratinocytes requires multifactorial external control. *PloS one*, 8(10):e77507, 2013.
- P. Boukamp, R. T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and Norbert E. Fusenig. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *The Journal of cell biology*, 106(3):761–771, 1988.
- P. E. Bowden, R. A. Quinlan, D. Breitkreutz, and N. E. Fusenig. Proteolytic modification of acidic and basic keratins during terminal differentiation of mouse and human epidermis. *European Journal of Biochemistry*, 142(1):29–36, 1984.
- J. M. Brandner. Pores in the epidermis: aquaporins and tight junctions. *International journal of cosmetic science*, 29(6):413–422, 2007.
- C. Brunold, A. Deters, F. Knoepfel-Sidler, J. Hafner, B. Müller, and A. Hensel. Polysaccharides from hibiscus sabdariffa flowers stimulate proliferation and differentiation of human keratinocytes. *Planta medica*, 70(4):370–373, 2004.
- E. Candi, E. Tarcsa, J. J. Digiovanna, J. Compton, P. M. Elias, L. N. Marekov, and P. M. Steinert. A highly conserved lysine residue on the head domain of type ii keratins is essential for the attachment of keratin intermediate filaments to the cornified cell envelope through isopeptide crosslinking by transglutaminases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5):2067–2072, 1998.
- E. Candi, R. Schmidt, and G. Melino. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Nature reviews Molecular cell biology*, 6(4):328–340, 2005.

- C. Caulín, G. S. Salvesen, and R. G. Oshima. Caspase cleavage of keratin 18 and reorganization of intermediate filaments during epithelial cell apoptosis. *The Journal of cell biology*, 138(6):1379–1394, 1997.
- A. Celli, S. Sanchez, M. Behne, T. Hazlett, E. Gratton, and T. Mauro. The epidermal calcium gradient: measurement using the phasor representation of fluorescent lifetime imaging. *Biophysical journal*, 98(5):911–921, 2010.
- Y.-M. Chan, I. Anton-Lamprecht, Q.-Ch. Yu, A. Jäckel, B. Zabel, J.-P. Ernst, and E. Fuchs. A human keratin 14 "knockout": the absence of k14 leads to severe epidermolysis bullosa simplex and a function for an intermediate filament protein. *Genes & development*, 8(21):2574–2587, 1994.
- J.-Q. Chen, X.-Y. Man, W. Li, J. Zhou, L. Landeck, S.-Q. Cai, and M. Zheng. Regulation of involucrin in psoriatic epidermal keratinocytes: the roles of erk1/2 and gsk-3 β . *Cell biochemistry and biophysics*, 66(3):523–528, 2013.
- J. Cheng, A. J. Syder, Q.-Ch. Yu, A. Letal, A. S. Paller, and E. Fuchs. The genetic basis of epidermolytic hyperkeratosis: a disorder of differentiation-specific epidermal keratin genes. *Cell*, 70(5):811–819, 1992.
- T. Cherbuin, M. M. Movahednia, W. S. Toh, and T. Cao. Investigation of human embryonic stem cell-derived keratinocytes as an in vitro research model for mechanical stress dynamic response. *Stem Cell Reviews and Reports*, 11(3):460–473, 2015.
- D. H. Chu. Development and structure of skin. *Fitzpatrick's dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: McGraw-Hill, pages 57–73, 2008.
- P. R. Cline and R. H. Rice. Modulation of involucrin and envelope competence in human keratinocytes by hydrocortisone, retinyl acetate, and growth arrest. *Cancer research*, 43(7):3203–3207, 1983.
- P. A. Coulombe and M. B. Omary. 'hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Current opinion in cell biology*, 14(1):110–122, 2002.

- B. A. Dale and S. Y. Ling. Immunologic cross-reaction of stratum corneum basic protein and a keratohyalin granule protein. *Journal of Investigative Dermatology*, 72(5):257–261, 1979.
- G. Denecker, E. Hoste, B. Gilbert, T. Hochepeid, P. Ovaere, S. Lippens, C. Van den Broecke, P. Van Damme, K. D’Herde, J.-P. Hachem, *et al.* Caspase-14 protects against epidermal uvb photodamage and water loss. *Nature cell biology*, 9(6):666–674, 2007.
- A. M. Deters, Ch. Lengsfeld, and A. Hensel. Oligo- and polysaccharides exhibit a structure-dependent bioactivity on human keratinocytes in vitro. *Journal of ethnopharmacology*, 102(3):391–399, 2005a.
- A. M. Deters, K. R. Schröder, T. Smiatek, and A. Hensel. Ispaghula (*plantago ovata*) seed husk polysaccharides promote proliferation of human epithelial cells (skin keratinocytes and fibroblasts) via enhanced growth factor receptors and energy production. *Planta medica*, 71(1):33–39, 2005b.
- A. F. Deyrieux and Van G. Wilson. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the hacat cell line. *Cytotechnology*, 54(2):77–83, 2007.
- A. A. Dlugosz and S. H. Yuspa. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase c. *The Journal of cell biology*, 120(1):217–225, 1993.
- F. Elsholz, Ch. Harteneck, W. Muller, and K. Friedland. Calcium—a central regulator of keratinocyte differentiation in health and disease. *European Journal of Dermatology*, 24(6):650–661, 2014.
- M. L. Ferrándiz, M. J. Sanz, G. Bustos, M. Payá, M. J. Alcaraz, and S. De Rosa. Avarol and avarone, two new anti-inflammatory agents of marine origin. *European journal of pharmacology*, 253(1):75–82, 1994.
- M. Fiona and D. P. Watt. Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. *J Invest Dermatol*, 81:100–103, 1983.
- I. Frébort, M. Kowalska, T. Hluska, J. Frébortová, and P. Galuszka. Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation. *Journal of Experimental Botany*, 62(8):2431–2452, 2011.

- E. Fuchs and D. W. Cleveland. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*, 279(5350):514–519, 1998.
- E. Fuchs and H. Green. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*, 19(4):1033–1042, 1980.
- E. Fuchs and H. Green. Regulation of terminal differentiation of cultured human keratinocytes by vitamin a. *Cell*, 25(3):617–625, 1981.
- T. Futoryan and B. A. Gilchrest. Retinoids and the skin. *Nutrition reviews*, 52(9):299–310, 1994.
- P. Galuszka, L. Spíchal, D. Kopečnỳ, P. Tarkowski, J. Frébortová, M. Šebela, and I. Frébort. Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation and plant development. *Studies in natural products chemistry*, 34:203–264, 2008.
- L. Ge, J. W. H. Yong, N. K. Goh, L. S. Chia, S. N. Tan, and E. S. Ong. Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*cocos nucifera* l.) water using a combined approach of liquid chromatography–tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B*, 829(1):26–34, 2005.
- E. Giardina, F. Capon, M. C. De Rosa, R. Mango, G. Zambruno, A. Orecchia, S. Chimenti, B. Giardina, and G. Novelli. Characterization of the loricrin (*lor*) gene as a positional candidate for the psors4 psoriasis susceptibility locus. *Annals of human genetics*, 68(6):639–645, 2004.
- R. Gniadecki. Stimulation versus inhibition of keratinocyte growth by 1,25-dihydroxyvitamin d3: dependence on cell culture conditions. *Journal of investigative dermatology*, 106(3):510–516, 1996.
- S. A. Grando, D. A. Kist, M. Qi, and M. V. Dahl. Human keratinocytes synthesize, secrete, and degrade acetylcholine. *Journal of Investigative Dermatology*, 101(1):32–36, 1993.
- S. A. Grando, R. M. Horton, E. F. R. Pereira, B. M. Diethelm-Okita, P. M. George, E. X. Albuquerque, and B. M. Conti-Fine. A nicotinic acetylcholine receptor regulating cell adhesion and motility is expressed in human keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 105(6):774–781, 1995a.

- S. A. Grando, B. D. Zelickson, D. A. Kist, D. Weinshenker, P. L. Bigliardi, G. Wendelschafer-Crabb, W. R. Kennedy, and M. V. Dahl. Keratinocyte muscarinic acetylcholine receptors: immunolocalization and partial characterization. *Journal of investigative dermatology*, 104(1):95–100, 1995b.
- S. A. Grando, R. M. Horton, T. M. Mauro, D. A. Kist, T. X. Lee, and M. V. Dahl. Activation of keratinocyte nicotinic cholinergic receptors stimulates calcium influx and enhances cell differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 107(3):412–418, 1996.
- M. W. Greaves and G. D. Weinstein. Treatment of psoriasis. *The New England journal of medicine*, 332(9):581–588, 1995.
- Ch. S. Greenberg, P. J. Birckbichler, and R. H. Rice. Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *The FASEB Journal*, 5(15):3071–3077, 1991.
- P. Hach, I. Těšík, and Z. Jirsová. *Histologie II*. Praha: Karolinum, 2003.
- R. H. Hall and R. S. De Ropp. Formation of 6-furfurylaminopurine from dna breakdown products. *Journal of the American Chemical Society*, 77(23):6400–6400, 1955.
- Q. Hamid, M. Boguniewicz, and D. Y. Leung. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. *Journal of Clinical Investigation*, 94(2):870, 1994.
- O. Hanyu, H. Nakae, T. Miida, Y. Higashi, H. Fuda, M. Endo, A. Kohjitani, H. Sone, and Ch. A. Strott. Cholesterol sulfate induces expression of the skin barrier protein filaggrin in normal human epidermal keratinocytes through induction of ror α . *Biochemical and biophysical research communications*, 428(1):99–104, 2012.
- M. Hara-Chikuma and A. S. Verkman. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. *Molecular and cellular biology*, 28(1):326–332, 2008a.
- M. Hara-Chikuma and A. S. Verkman. Roles of aquaporin-3 in the epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 128(9):2145–2151, 2008b.

- C. R. Harding and I. R. Scott. Histidine-rich proteins (flaggrins): structural and functional heterogeneity during epidermal differentiation. *Journal of molecular biology*, 170(3):651–673, 1983.
- M. R. Haussler, G. K. Whitfield, C. A. Haussler, J.-Ch. Hsieh, P. D. Thompson, S. H. Selznick, C. E. Dominguez, and P. W. Jurutka. The nuclear vitamin d receptor: biological and molecular regulatory properties revealed. *Journal of Bone and Mineral Research*, 13(3):325–349, 1998.
- H. Hennings and K. A. Holbrook. Calcium regulation of cell-cell contact and differentiation of epidermal cells in culture: an ultrastructural study. *Experimental cell research*, 143(1):127–142, 1983.
- H. Hennings, D. Michael, Ch. Cheng, P. Steinert, K. Holbrook, and S. H. Yuspa. Calcium regulation of growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture. *Cell*, 19(1):245–254, 1980.
- M. Hesse, A. Zimek, K. Weber, and T. M. Magin. Comprehensive analysis of keratin gene clusters in humans and rodents. *European journal of cell biology*, 83(1):19–26, 2004.
- D. Hohl. Cornified cell envelope. *Dermatology*, 180(4):201–211, 1990.
- D. Hohl and G. E. Piérard. Expression patterns of loricrin in dermatological disorders. *The American journal of dermatopathology*, 15(1):20–27, 1993.
- D. Hohl, U. Lichti, D. Breitzkreutz, P. M. Steinert, and D. R. Roop. Transcription of the human loricrin gene in vitro is induced by calcium and cell density and suppressed by retinoic acid. *Journal of investigative dermatology*, 96(4):414–418, 1991a.
- D. Hohl, T. Mehrel, U. Lichti, M. L. Turner, D. R. Roop, and P. M. Steinert. Characterization of human loricrin. structure and function of a new class of epidermal cell envelope proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 266(10):6626–6636, 1991b.
- M. F. Holick. The cutaneous photosynthesis of previtamin d3: a unique photoendocrine system. *Journal of Investigative Dermatology*, 77(1):51–58, 1981.

- R. Horgan, E. W. Hewett, J. M. Horgan, J. Purse, and P. F. Wareing. A new cytokinin from populus x robusta. *Phytochemistry*, 14(4):1005–1008, 1975.
- I. Horie, M. Maeda, S. Yokoyama, A. Hisatsune, H. Katsuki, T. Miyata, and Y. Isohama. Tumor necrosis factor- α decreases aquaporin-3 expression in djm-1 keratinocytes. *Biochemical and biophysical research communications*, 387(3):564–568, 2009.
- J. Hosomi, J. Hosoi, E. Abe, T. Suda, and T. Kuroki. Regulation of terminal differentiation of cultured mouse epidermal cells by $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin d3*. *Endocrinology*, 113(6):1950–1957, 1983.
- M. D. Howell, B. E. Kim, P. Gao, A. V. Grant, M. Boguniewicz, A. DeBenedetto, L. Schneider, L. A. Beck, K. C. Barnes, and D. Y. M. Leung. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120(1):150–155, 2007.
- Z. Hu, J. M. Bonifas, J. Beech, G. Bench, T. Shigihara, H. Ogawa, S. Ikeda, T. Mauro, and E. H. Epstein. Mutations in atp2c1, encoding a calcium pump, cause hailey-hailey disease. *Nature genetics*, 24(1):61–65, 2000.
- C. A. Huff, S. H. Yuspa, and D. Rosenthal. Identification of control elements 3' to the human keratin 1 gene that regulate cell type and differentiation-specific expression. *Journal of Biological Chemistry*, 268(1):377–384, 1993.
- K. Ishibashi, S. Sasaki, F. Saito, T. Ikeuchi, and F. Marumo. Structure and chromosomal localization of a human water channel (aqp3) gene. *Genomics*, 27(2):352–354, 1995.
- A. Ishida-Yamamoto and H. Iizuka. Structural organization of cornified cell envelopes and alterations in inherited skin disorders. *Experimental dermatology*, 7(1):1–10, 1998.
- A. Ishida-Yamamoto, J. A. McGrath, H. Lam, H. Iizuka, R. A. Friedman, and A. M. Christiano. The molecular pathology of progressive symmetric erythrokeratoderma: a frameshift mutation in the loricrin gene and perturbations in the cornified cell envelope. *The American Journal of Human Genetics*, 61(3):581–589, 1997.

- S. Jaken and S. H. Yuspa. Early signals for keratinocyte differentiation: role of ca^{2+} -mediated inositol lipid metabolism in normal and neoplastic epidermal cells. *Carcinogenesis*, 9(6):1033–1038, 1988.
- R. Jans, G. Atanasova, M. Jadot, and Y. Poumay. Cholesterol depletion upregulates involucrin expression in epidermal keratinocytes through activation of p38. *Journal of investigative dermatology*, 123(3):564–573, 2004.
- B. A. Jessen, Q. Qin, M. A. Phillips, D. L. Phillips, and R. H. Rice. Keratinocyte differentiation marker suppression by arsenic: Mediation by ap1 response elements and antagonism by tetradecanoylphorbol acetate. *Toxicology and applied pharmacology*, 174(3):302–311, 2001.
- Ch. Ji, Y. Yang, B. Yang, J. Xia, W. Sun, Z. Su, L. Yu, S. Shan, S. He, L. Cheng, *et al.* Transzeatin attenuates ultraviolet induced down-regulation of aquaporin-3 in cultured human skin keratinocytes. *International journal of molecular medicine*, 26(2):257–263, 2010.
- Y. J. Jiang, P. Kim, Y. F. Lu, and K. R. Feingold. Ppargamma activators stimulate aquaporin 3 expression in keratinocytes/epidermis. *Experimental dermatology*, 20(7):595–599, 2011.
- G. Jones, S. A. Strugnell, and H. F. DeLuca. Current understanding of the molecular actions of vitamin d. *Physiological reviews*, 78(4):1193–1231, 1998.
- L. C. U. Junqueira, J. Carneiro, and R. O'Kelley. *Základy histologie*. Jinočany: H + H, 1997.
- T. Kakimoto. Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: Atp/adp isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, 42(7):677–685, 2001.
- T. Kartasova and P. van de Putte. Isolation, characterization, and uv-stimulated expression of two families of genes encoding polypeptides of related structure in human epidermal keratinocytes. *Molecular and cellular biology*, 8(5):2195–2203, 1988.
- T. Kartasova, B. J. C. Cornelissen, P. Belt, and P. van de Putte. Effects of uv, 4nqo and tpa on gene expression in cultured human epidermal keratinocytes. *Nucleic acids research*, 15(15):5945–5962, 1987.

- B. E. Kim, D. Y. M. Leung, M. Boguniewicz, and M. D. Howell. Loricrin and involucrin expression is down-regulated by th2 cytokines through stat-6. *Clinical Immunology*, 126(3):332–337, 2008.
- N.-H. Kim and A.-Y. Lee. Reduced aquaporin3 expression and survival of keratinocytes in the depigmented epidermis of vitiligo. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(9):2231–2239, 2010.
- E. Klika. *Histologie: učebnice pro lékařské fakulty*. Praha: Avicenum, 1986.
- L. Komuves, Y. Oda, Ch.-I. Tu, W. H. Chang, Ch. L. Ho-Pao, T. Mauro, and D. D. Bikle. Epidermal expression of the full-length extracellular calcium-sensing receptor is required for normal keratinocyte differentiation. *Journal of cellular physiology*, 192(1):45–54, 2002.
- B. P. Korge, A. Ishida-Yamamoto, C. Punter, P. J. C. Dopping-Hepenstal, H. Iizuka, A. Stephenson, R. A. J. Eady, and C. S. Munro. Loricrin mutation in vohwinkel’s keratoderma is unique to the variant with ichthyosis. *Journal of investigative dermatology*, 109(4):604–610, 1997.
- G. G. Krueger, S. R. Feldman, Ch. Camisa, M. Duvic, J. T. Elder, A. B. Gottlieb, J. Koo, J. G. Krueger, M. Lebwohl, N. Lowe, *et al.* Two considerations for patients with psoriasis and their clinicians:: What defines mild, moderate, and severe psoriasis? what constitutes a clinically significant improvement when treating psoriasis? *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43(2):281–285, 2000.
- N.-O. Ku and M. B. Omary. Keratins turn over by ubiquitination in a phosphorylation-modulated fashion. *The Journal of cell biology*, 149(3):547–552, 2000.
- N.-O. Ku, J. Liao, and M. B. Omary. Apoptosis generates stable fragments of human type i keratins. *Journal of Biological Chemistry*, 272(52):33197–33203, 1997.
- Nam-On Ku and M Bishr Omary. Effect of mutation and phosphorylation of type i keratins on their caspase-mediated degradation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(29):26792–26798, 2001.
- T. Kudo, T. Kiba, and H. Sakakibara. Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1):53–60, 2010.

- B. Kurelec, R. K. Zhan, M. J. Gasić, S. Britvić, D. Lucić, and W. E. G. Müller. Antimutagenic activity of the novel antileukemic agents, avarone and avarol. *Mutation Research Letters*, 144(2):63–66, 1985.
- D.-D. Lee, O. Stojadinovic, A. Krzyzanowska, C. Vouthounis, M. Blumenberg, and M. Tomic-Canic. Retinoid-responsive transcriptional changes in epidermal keratinocytes. *Journal of cellular physiology*, 220(2):427–439, 2009.
- S.-C. Lee, I. G. Kim, L. N. Marekov, E. J. O’Keefe, D. A. Parry, and P. M. Steinert. The structure of human trichohyalin. potential multiple roles as a functional ef-hand-like calcium-binding protein, a cornified cell envelope precursor, and an intermediate filament-associated (cross-linking) protein. *Journal of Biological Chemistry*, 268(16):12164–12176, 1993.
- B. Lehmann. Hacat cell line as a model system for vitamin d3 metabolism in human skin. *Journal of investigative dermatology*, 108(1):78–82, 1997.
- D. S. Letham. Zeatin, a factor inducing cell division isolated from zea mays. *Life sciences*, 2(8):569–573, 1963.
- K. List, R. Szabo, P. W. Wertz, J. Segre, C. C. Haudenschild, S.-Y. Kim, and T. H. Bugge. Loss of proteolytically processed filaggrin caused by epidermal deletion of matriptase/mtsp1. *The Journal of cell biology*, 163(4):901–910, 2003.
- J. D. Lonsdale-Eccles, J. A. Haugen, and B. A. Dale. A phosphorylated keratohyalin-derived precursor of epidermal stratum corneum basic protein. *Journal of Biological Chemistry*, 255(6):2235–2238, 1980.
- R. Lotan. Effects of vitamin a and its analogs (retinoids) on normal and neoplastic cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 605(1):33–91, 1980.
- S. Loya and A. Hizi. The inhibition of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase by avarol and avarone derivatives. *FEBS letters*, 269(1):131–134, 1990.
- R. Lüllmann-Rauch. *Histologie*. Praha: Grada, 2012.

- T. Ma, M. Hara, R. Sougrat, J.-M. Verbavatz, and A. S. Verkman. Impaired stratum corneum hydration in mice lacking epidermal water channel aquaporin-3. *Journal of Biological Chemistry*, 277(19):17147–17153, 2002.
- E. Maestrini, A. P. Monaco, J. A. McGrath, A. Ishida-Yamamoto, Ch. Camisa, A. Hovnanian, D. E. Weeks, M. Lathrop, J. Uitto, and A. M. Christiano. A molecular defect in loricrin, the major component of the cornified cell envelope, underlies vohwinkel’s syndrome. *Nature genetics*, 13(1):70–77, 1996.
- M. Manabe, M. Sanchez, T.-T. Sun, and B. A. Dale. Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris. *Differentiation*, 48(1):43–50, 1991.
- L. J. McKinley-Grant, W. W. Idler, I. A. Bernstein, D. A. Parry, L. Cannizzaro, C. M. Croce, K. Huebner, S. R. Lessin, and P. M. Steinert. Characterization of a cDNA clone encoding human filaggrin and localization of the gene to chromosome region 1q21. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86(13):4848–4852, 1989.
- T. Mehrel, D. Hohl, J. A. Rothnagel, M. A. Longley, D. Bundman, Ch. Cheng, U. Lichti, M. E. Bisher, A. C. Steven, P. M. Steinert, *et al.* Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell*, 61(6):1103–1112, 1990.
- G. K. Menon, S. Grayson, and P. M. Elias. Ionic calcium reservoirs in mammalian epidermis: ultrastructural localization by ion-capture cytochemistry. *Journal of Investigative Dermatology*, 84(6):508–512, 1985.
- M. Mildner, J. Jin, L. Eckhart, S. Kezic, F. Gruber, C. Barresi, C. Stremnitzer, M. Buchberger, V. Mlitz, C. Ballaun, *et al.* Knockdown of filaggrin impairs diffusion barrier function and increases uv sensitivity in a human skin model. *Journal of Investigative Dermatology*, 130(9):2286–2294, 2010.
- C. O. Miller, F. Skoog, M. H. Von Saltza, and F. M. Strong. Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid1. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5):1392–1392, 1955.

- L. Minale, R. Riccio, and G. Sodano. Avarol a novel sesquiterpenoid hydroquinone with a rearranged drimane skeleton from the sponge disidea avara. *Tetrahedron Letters*, 15(38): 3401–3404, 1974.
- F. Minner, F. Herphelin, and Y. Poumay. Study of epidermal differentiation in human keratinocytes cultured in autocrine conditions. *Epidermal Cells: Methods and Protocols*, pages 71–82, 2010.
- D. W. S. Mok and M. C. Mok. Cytokinin metabolism and action. *Annual review of plant biology*, 52(1):89–118, 2001.
- E. J. Müller, L. Williamson, C. Kolly, and M. M. Suter. Outside-in signaling through integrins and cadherins: a central mechanism to control epidermal growth and differentiation? *Journal of Investigative Dermatology*, 128(3):501–516, 2008a.
- M. Müller, K. Essin, K. Hill, H. Beschmann, S. Rubant, Ch. M. Schempp, M. Gollasch, W. H. Boehncke, Ch. Harteneck, W. E. Müller, *et al.* Specific trpc6 channel activation, a novel approach to stimulate keratinocyte differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 283(49):33942–33954, 2008b.
- K. Nakahigashi, K. Kabashima, A. Ikoma, A. S. Verkman, Y. Miyachi, and M. Hara-Chikuma. Upregulation of aquaporin-3 is involved in keratinocyte proliferation and epidermal hyperplasia. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(4):865–873, 2011.
- D. C. Ng, M.-J. Su, R. Kim, and D. D. Bikle. Regulation of involucrin gene expression by calcium in normal human keratinocytes. *Front Biosci*, 1:16–24, 1996.
- C. M. Niessen. Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(11):2525–2532, 2007.
- M. Olsson, A. Broberg, M. Jernås, L. Carlsson, M. Rudemo, M. Suurküla, P.-A. Svensson, and M. Benson. Increased expression of aquaporin 3 in atopic eczema. *Allergy*, 61(9): 1132–1137, 2006.
- V. Pačes, E. Werstiuk, and R. H. Hall. Conversion of n6-(δ^2 -isopentenyl) adenosine to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology*, 48(6):775–778, 1971.

- C. N. A. Palmer, A. D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S. P. Lee, D. R. Goudie, A. Sandilands, L. E. Campbell, F. J. D. Smith, *et al.* Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics*, 38(4):441–446, 2006.
- G. Paragh, P. Schling, P. Ugocsai, A. E. Kel, G. Liebisch, S. Heimerl, Ch. Moehle, Y. Schiemann, M. Wegmann, M. Farwick, *et al.* Novel sphingolipid derivatives promote keratinocyte differentiation. *Experimental dermatology*, 17(12):1004–1016, 2008.
- L. Pavlová and L. Fischer. *Růst a vývoj rostlin*. Karolinum, 2011.
- S. Pece and J. S. Gutkind. Signaling from e-cadherins to the mapk pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *Journal of Biological Chemistry*, 275(52):41227–41233, 2000.
- S. Pece, M. Chiariello, C. Murga, and J. S. Gutkind. Activation of the protein kinase akt/pkb by the formation of e-cadherin-mediated cell-cell junctions evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the e-cadherin adhesion complex. *Journal of Biological Chemistry*, 274(27):19347–19351, 1999.
- S. Pillai and D. D. Bikle. Role of intracellular-free calcium in the cornified envelope formation of keratinocytes: Differences in the mode of action of extracellular calcium and 1, 25 dihydroxyvitamin d3. *Journal of cellular physiology*, 146(1):94–100, 1991.
- S. Pillai, D. D. Bikle, M. Hincenbergs, and P. M. Elias. Biochemical and morphological characterization of growth and differentiation of normal human neonatal keratinocytes in a serum-free medium. *Journal of cellular physiology*, 134(2):229–237, 1988.
- A. Pisarchik, J. Wortsman, and A. Slominski. A novel microarray to evaluate stress-related genes in skin: effect of ultraviolet light radiation. *Gene*, 341:199–207, 2004.
- S. Procházka, I. Macháčková, J. Krekule, and J. Šebánek. *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 1998.
- N. Radoja, A. Gazel, T. Banno, S. Yano, and M. Blumenberg. Transcriptional profiling of epidermal differentiation. *Physiological genomics*, 27(1):65–78, 2006.

- L. Ramms, G. Fabris, R. Windoffer, N. Schwarz, R. Springer, Ch. Zhou, J. Lazar, S. Stiefel, N. Hersch, U. Schnakenberg, *et al.* Keratins as the main component for the mechanical integrity of keratinocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(46): 18513–18518, 2013.
- A. V. Ratnam, D. D. Bikle, and J.-K. Cho. 1, 25 dihydroxyvitamin d3 enhances the calcium response of keratinocytes. *Journal of cellular physiology*, 178(2):188–196, 1999.
- S. I. S. Rattan and B. F. C. Clark. Kinetin delays the onset of aging characteristics in human fibroblasts. *Biochemical and biophysical research communications*, 201(2):665–672, 1994.
- S. I. S. Rattan and L. Sodagam. Gerontomodulatory and youth-preserving effects of zeatin on human skin fibroblasts undergoing aging in vitro. *Rejuvenation research*, 8(1):46–57, 2005.
- Y. Reiss, A. E. Proudfoot, Ch. A. Power, J. J. Campbell, and E. C. Butcher. Cc chemokine receptor (ccr) 4 and the ccr10 ligand cutaneous t cell-attracting chemokine (ctack) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *The Journal of experimental medicine*, 194(10): 1541–1547, 2001.
- K. A. Resing, N. al Alawi, C. Blomquist, P. Fleckman, and B. A. Dale. Independent regulation of two cytoplasmic processing stages of the intermediate filament-associated protein filaggrin and role of ca²⁺ in the second stage. *Journal of Biological Chemistry*, 268(33): 25139–25145, 1993.
- R. H. Rice and H. Green. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell*, 18(3): 681–694, 1979.
- J. A. Rothnagel, A. M. Dominey, L. D. Dempsey, M. A. Longley, D. A. Greenhalgh, T. A. Gagne, M. Huber, E. Frenk, D. Hohl, and D. R. Roop. Mutations in the rod domains of keratins 1 and 10 in epidermolytic hyperkeratosis. *Science*, 257(5073):1128–1130, 1992.
- A. Sakuntabhai, V. Ruiz-Perez, S. Carter, N. Jacobsen, S. Burge, S. Monk, M. Smith, C. S.

- Munro, M. O'Donovan, N. Craddock, *et al.* Mutations in *atp2a2*, encoding a Ca^{2+} pump, cause darier disease. *Nature genetics*, 21(3):271–277, 1999.
- F. H. Sarkar and Y. Li. Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 555(1):53–64, 2004.
- N. Y. Schürer, G. Plewig, and P. M. Elias. Stratum corneum lipid function. *Dermatology*, 183(2):77–94, 1991.
- J. Schweizer, P. E. Bowden, P. A. Coulombe, L. Langbein, E. B. Lane, T. M. Magin, L. Maltais, M. B. Omary, D. A. D. Parry, M. A. Rogers, *et al.* New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of cell biology*, 174(2):169–174, 2006.
- R. Sougrat, M. Morand, C. Gondran, P. Barré, R. Gobin, F. Bonté, M. Dumas, and J.-M. Verbavatz. Functional expression of *aqp3* in human skin epidermis and reconstructed epidermis. *Journal of investigative dermatology*, 118(4):678–685, 2002.
- E. Sprecher, A. Ishida-Yamamoto, O. M. Becker, L. Marekov, Ch. J. Miller, P. M. Steinert, K. Neldner, and G. Richard. Evidence for novel functions of the keratin tail emerging from a mutation causing ichthyosis hystrix. *Journal of investigative dermatology*, 116(4):511–519, 2001.
- P. M. Steinert and L. N. Marekov. The proteins elafin, filaggrin, keratin intermediate filaments, loricrin, and small proline-rich proteins 1 and 2 are isodipeptide cross-linked components of the human epidermal cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 270(30):17702–17711, 1995.
- P. M. Steinert and L. N. Marekov. Direct evidence that involucrin is a major early isopeptide cross-linked component of the keratinocyte cornified cell envelope. *Journal of Biological Chemistry*, 272(3):2021–2030, 1997.
- P. M. Steinert, J. S. Cantieri, D. C. Teller, J. D. Lonsdale-Eccles, and B. A. Dale. Characterization of a class of cationic proteins that specifically interact with intermediate filaments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78(7):4097–4101, 1981.

- A. C. Steven and P. M. Steinert. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *Journal of cell science*, 107(2):693–700, 1994.
- A. C. Steven, M. E. Bisher, D. R. Roop, and P. M. Steinert. Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin—two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes. *Journal of structural biology*, 104(1):150–162, 1990.
- O. Stojadinovic, B. Lee, C. Vouthounis, S. Vukelic, I. Pastar, M. Blumenberg, H. Brem, and M. Tomic-Canic. Novel genomic effects of glucocorticoids in epidermal keratinocytes inhibition of apoptosis, interferon- γ pathway, and wound healing along with promotion of terminal differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 282(6):4021–4034, 2007.
- A. Stoler, R. Kopan, M. Duvic, and E. Fuchs. Use of monospecific antisera and crna probes to localize the major changes in keratin expression during normal and abnormal epidermal differentiation. *The Journal of cell biology*, 107(2):427–446, 1988.
- M. Strnad. The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101(4):674–688, 1997.
- M. Strnad, J. Hanuš, T. Vaněk, M. Kamínek, J. A. Ballantine, B. Fussell, and D. E. Hanke. Meta-topolin, a highly active aromatic cytokinin from poplar leaves (*populus* \times *canadensis* moench., cv. *robusta*). *Phytochemistry*, 45(2):213–218, 1997.
- M.-J. Su, D. D. Bikle, M.-L. Mancianti, and S. Pillai. 1, 25-dihydroxyvitamin d3 potentiates the keratinocyte response to calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20):14723–14729, 1994a.
- M.-J. Su, D. D. Bikle, M.-L. Mancianti, and S. Pillai. 1, 25-dihydroxyvitamin d3 potentiates the keratinocyte response to calcium. *Journal of Biological Chemistry*, 269(20):14723–14729, 1994b.
- T.-T. Sun and H. Green. Differentiation of the epidermal keratinocyte in cell culture: formation of the cornified envelope. *Cell*, 9(4):511–521, 1976.
- V. P. Sybert, B. A. Dale, and K. A. Holbrook. Ichthyosis vulgaris: identification of a defect in synthesis of filaggrin correlated with an absence of keratohyaline granules. *Journal of investigative dermatology*, 84(3):191–194, 1985.

- H. Takahashi and H. Iizuka. Analysis of the 5'-upstream promoter region of human involucrin gene: activation by tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Journal of investigative dermatology*, 100(1):10–15, 1993.
- H. Takahashi, K. Asano, S. Nakamura, A. Ishida-Yamamoto, and H. Iizuka. Interferon- γ -dependent stimulation of human involucrin gene expression: Stat1 (signal transduction and activators of transcription 1) protein activates involucrin promoter activity. *Biochem. J*, 344:797–802, 1999.
- H. Takahashi, M. Ibe, M. Kinouchi, A. Ishida-Yamamoto, Y. Hashimoto, and H. Iizuka. Similarly potent action of 1, 25-dihydroxyvitamin d3 and its analogues, tacalcitol, calcipotriol, and maxacalcitol on normal human keratinocyte proliferation and differentiation. *Journal of dermatological science*, 31(1):21–28, 2003.
- Y. Taya, Y. Tanaka, and S. Nishimura. 5'-amp is a direct precursor of cytokinin in dictyostelium discoideum. 1978.
- D. M. Toivola, N.-O. Ku, E. Z. Resurreccion, D. R. Nelson, T. L. Wright, and M. B. Omary. Keratin 8 and 18 hyperphosphorylation is a marker of progression of human liver disease. *Hepatology*, 40(2):459–466, 2004.
- H. Törmä and A. Vahlquist. Vitamin a esterification in human epidermis: a relation to keratinocyte differentiation. *Journal of Investigative Dermatology*, 94(1):132–138, 1990.
- T. W. Tse. Use of common chinese herbs in the treatment of psoriasis. *Clinical and experimental dermatology*, 28(5):469–475, 2003.
- S. C. G. Tseng, M. J. Jarvinen, W. G. Nelson, J.-W. Huang, J. Woodcock-Mitchell, and T.-T. Sun. Correlation of specific keratins with different types of epithelial differentiation: monoclonal antibody studies. *Cell*, 30(2):361–372, 1982.
- Ch.-L. Tu and D. D. Bikle. Role of the calcium-sensing receptor in calcium regulation of epidermal differentiation and function. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 27(3):415–427, 2013.

- Ch.-L. Tu, W. Chang, and D. D. Bikle. The role of the calcium sensing receptor in regulating intracellular calcium handling in human epidermal keratinocytes. *Journal of Investigative Dermatology*, 127(5):1074–1083, 2007.
- Ch.-L. Tu, W. Chang, Z. Xie, and D. D. Bikle. Inactivation of the calcium sensing receptor inhibits e-cadherin-mediated cell-cell adhesion and calcium-induced differentiation in human epidermal keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(6):3519–3528, 2008.
- A. Vahlquist. Vitamin a in human skin: I. detection and identification of retinoids in normal epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 79(2):89–93, 1982.
- H. Wakita, Y. Tokura, H. Yagi, K. Nishimura, F. Furukawa, and M. Takigawa. Keratinocyte differentiation is induced by cell-permeant ceramides and its proliferation is promoted by sphingosine. *Archives of dermatological research*, 286(6):350–354, 1994.
- F. M. Watt and H. Green. Involucrin synthesis is correlated with cell size in human epidermal cultures. *The Journal of cell biology*, 90(3):738–742, 1981.
- G. D. Weinstein, J. L. McCullough, and P. A. Ross. Cell kinetic basis for pathophysiology of psoriasis. *Journal of investigative dermatology*, 85(6):579–583, 1985.
- N. V. Whittock, F. J. Smith, H. Wan, R. Mallipeddi, W. A. Griffiths, P. Dopping-Hepenstal, G. H. Ashton, R. A. Eady, W. H. I. McLean, and J. A. McGrath. Frameshift mutation in the v2 domain of human keratin 1 results in striate palmoplantar keratoderma. *Journal of investigative dermatology*, 118(5):838–844, 2002.
- W. J. Wong, T. Richardson, J. T. Seykora, G. Cotsarelis, and M. C. Simon. Hypoxia-inducible factors regulate filaggrin expression and epidermal barrier function. *Journal of Investigative Dermatology*, 2014.
- Z. Xie, P. A. Singleton, L. Y. W. Bourguignon, and D. D. Bikle. Calcium-induced human keratinocyte differentiation requires src-and fyn-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of phospholipase c- γ 1. *Molecular biology of the cell*, 16(7):3236–3246, 2005.
- K. Yoneda, D. Hohl, O. W. McBride, M. Wang, K. U. Cehrs, W. W. Idler, and P. M. Steinert. The human loricrin gene. *Journal of Biological Chemistry*, 267(25):18060–18066, 1992.

- I. Yordanova and D. K. Gospodinov. Familial benign chronic pemphigus (hailey-hailey disease). *Journal of IMAB–Annual Proceeding Scientific Papers*, 13(1):60–62, 2007.
- K. Zhang, G. Yin, J. Li, R. Liu, R. Hou, X. Li, and X. Niu. *Psoriasis and Stem Cells*. INTECH Open Access Publisher, 2012.
- X. Zheng and W. B. Bollag. Aquaporin 3 colocalizes with phospholipase d2 in caveolin-rich membrane microdomains and is downregulated upon keratinocyte differentiation. *Journal of investigative dermatology*, 121(6):1487–1495, 2003.
- L.-L. Zhou, Z.-X. Lin, K.-P. Fung, Ch.-T. Che, M. Zhao, Ch. H. K. Cheng, and Z. Zuo. Ethyl acetate fraction of radix rubiae inhibits cell growth and promotes terminal differentiation in cultured human keratinocytes. *Journal of ethnopharmacology*, 142(1):241–247, 2012.
- X. Zhou, J. Liao, L. Hu, L. Feng, and M. B. Omary. Characterization of the major physiologic phosphorylation site of human keratin 19 and its role in filament organization. *Journal of Biological Chemistry*, 274(18):12861–12866, 1999.