

ROLUL CALCIULUI ÎN FIZIOLOGIA ȘI PATOLOGIA MELANOCITULUI

CALCIUM ROLE IN MELANOCYTE PHYSIOLOGY AND PATHOLOGY

AMALIA ELENA ANGHEL*, ILINCA NICOLAE*, SIMONA ROXANA GEORGESCU*, J.D. DIACONU*

București

Rezumat

Calciul reprezintă un ion important la nivelul organismului prin procesele numeroase și esențiale la care participă, sub reglementarea unor proteine de legare, în mediile intracelulare cât și extracelulare. S-a dovedit că melanosomii servesc drept mediatori intracelulari ai homeostaziei calciului, prin intermediul melaninei, în acest context funcționând ca proteină cu activitate de legare. Homeostazia acestui ion la nivelul melanocitului este deosebit de importantă pentru menținerea echilibrului redox și reglementarea răspunsului biologic al celulei la stresul oxidativ. De asemenea calciul participă activ la procesul central desfășurat la nivelul melanocitului, și anume melanogeneza, în primul rând prin reglarea substratului acesteia, L-tirozina. Procesul de interacțiune melanocit-keratinocit este reglat de nivelul acestui ion. Variațiile calciului în contextul melanomului cutanat, în special hipercalemia, este considerată factor de prognostic nefast.

Cuvinte cheie: calciu, melanocit, melanogeneza, status redox.

Summary

Calcium is an important ion in the body through many and essential processes involving, regulated by binding protein, in intracellular and extracellular environments. It has been shown that melanosomes serve as intracellular mediators of calcium homeostasis through melanin, here, in this context, a protein with binding activity. The ion homeostasis in the melanocyt is particularly important for maintaining redox balance and regulation of cell biological response to oxidative stress. Calcium also participates actively in the central process of melanocyt, melanogenesis, by regulating the substrate, L-tyrosine. Melanocyte-keratinocyte interaction process is regulated by the level of this ion. Calcium variations in context of cutaneous melanoma, in particular hypercalcemia is considered a worse prognostic factor.

Keywords: calcium, melanocytes, melanogenesis, redox status.

DermatoVenerol. (Buc.), 55: 299-312

Introducere

Prezența calciului în melanocit influențează numeroase căi metabolice, inclusiv menținerea echilibrului redox în celulă și reglarea melanogenezei, în principal prin modularea disponibilității de L-tirozină via fenilalanin hidroxilaza. Pigmentul conținut în melanocite, melanina, este implicat în homeostazia calciului în celulă,

Introduction

The presence of calcium in melanocytes affects numerous metabolic pathways, including the maintenance of cell redox balance and regulating melanogenesis, primarily through modulation the supply of substrate, L-tyrosine, via phenylalanine hydroxylase. The pigment contained in the melanocytes, melanin, has been

* Spitalul Clinic de Dermato-Venerologie „Prof. Dr. Scarlat Longhin”, București.

sustinându-se ipoteza conform căreia melanozomii servesc drept mediatori intracelulari ai homeostaziei calciului. Implicarea acestuia în menținerea echilibrului redox în melanocite poate juca un rol în reglementarea răspunsului biologic al celulei la stresul oxidativ. Calciul inhibă tioredoxin reductaza, o enzimă importantă cu funcție antioxidantă în celulă (Schallreuter and Wood, 1999; Wood et al., 1999). Menținerea homeostaziei calciului în melanocitele epidermice este de asemenea esențială, deoarece acestea sunt expuse în mod constant razelor UV, ce pot induce stres oxidativ prin fotogenerarea de specii reactive de oxigen. De exemplu, tioredoxin reductaza este exprimată în piele la întuneric în concentrație de cinci ori mai mare decât în mod normal în piele (Schallreuter și Wood, 2001). Deoarece nivelul calciului modulează activitatea acestei enzime, controlul acestuia este crucial pentru reglementarea echilibrului redox și prevenirea deteriorării ADN-ului în celule.

Am urmărit în acest articol să expunem aspecte legate de relația calciu-melanocit, cu efecte asupra unor procese extrem de importante în metabolismul celular.

Melanozomii - rol în reglarea homeostaziei calciului

Calciul are un rol important la nivelul organismului prin procesele la care participă, sub reglementarea unor proteine de legare (CBP-calcium binding protein), responsabile pentru trafic, semnalizare, precum și tamponare, atât în mediile intracelulare cât și extracelulare. Totuși, multe dintre aceste roluri pentru ionii de calciu, cât și pentru proteinele de legare rămân incomplet înțelese ca urmare a complexității interacțiunilor pe care le stabilesc și rețelelor de semnalizare ce le guvernează. În acest context, melanina reprezintă un chelator cunoscut al ionilor de calciu (Liu și Simon, 2005; Liu et al., 2004), implicată în reglementarea homeostaziei acestuia la nivelul melanocitelor (Hoogduijn et al., 2003).

S-a demonstrat că abilitatea melanocitelor de a funcționa ca tampon împotriva expunerii tranzitorii la niveluri ridicate de calciu depinde de cantitatea de melanină prezentă în celulă (Hoogduijn et al., 2003). Într-un studiu separat

implicat în menținerea calciului homeostasis în celulă, susținând ipoteza că melanosomii servesc drept mediatori ai homeostaziei calciului intracelulare. Implicarea acestuia în menținerea echilibrului redox în melanocite poate juca un rol în reglementarea răspunsului biologic al celulei la stresul oxidativ. Calciul inhibă tioredoxin reductaza, o enzimă importantă cu funcție antioxidantă în celulă (Schallreuter and Wood, 1999; Wood et al., 1999). Menținerea calciului homeostasis în epidermal melanocytes este de asemenea esențială, deoarece acestea sunt expuse în mod constant razelor UV, ce pot induce stres oxidativ prin generarea de specii reactive de oxigen. De exemplu, tioredoxin reductaza este exprimată în pielea închisă în concentrații de cinci ori mai mari decât în pielea deschisă (Schallreuter and Wood, 2001). Deoarece calciul modulează activitatea acestei enzime, controlul este crucial pentru reglementarea echilibrului redox și prevenirea deteriorării ADN-ului în celule.

Am propus în acest articol să expun aspecte legate de relația calciu-melanocit, cu efecte asupra unor procese extrem de importante în metabolismul celular.

Melanosomes - role in regulating calcium homeostasis

Calcium plays an important role in the body through the processes involved, under regulation of binding protein (CBP-calcium binding protein), responsible for traffic, signaling, and buffering, both in intracellular and extracellular environments. However, many of these roles for calcium ions and the binding proteins remain incompletely understood due to complexity of their interactions and signaling networks that govern them. In this context, melanin is known as a chelator of calcium ions (Liu and Simon, 2005; Liu et al., 2004), involved in the regulation of its homeostasis within melanocytes (Hoogduijn et al., 2003).

It has been shown that the ability of melanocytes to act as a buffer against transient exposure to high levels of calcium depends on the amount of melanin present in the cell (Hoogduijn et al., 2003). In a separate study involving the inner ear melanocytes, melanin has been shown to act as a biological reservoir for calcium, interfering in regulation of many calcium dependent cellular processes (Gill and

care implică melanocitele din urechea internă, s-a demonstrat că melanina poate acționa ca un rezervor biologic pentru calciu, intervenind în reglementarea mai multor procese celulare calciu dependente (Gill și Salt, 1997; Meyer zum Gottesberge, 1988). În plus, la nivelul pielii, calciul extracelular este cunoscut că poate juca un rol critic în reglarea proliferării și diferențierii keratinocitelor (Boyce și Ham, 1983). S-a postulat că melanina joacă un rol în această cale, prin capacitatea sa de a lega și tampona calciu (Buffey et al., 1993; Drager 1985; Hoogduijn et al., 2004; Panessa și Zaduwinsky, 1981; Salceda și Riesgo-Escovar, 1991; Salceda și Sanchez-Chavez, 2000). În schimb, calciu a fost dovedit a reglementa producția de melanină în melanocitele epidermice acționând ca un cofactor pentru fenilalanin hidroxilază, enzima responsabilă de sinteza L-tirozinei, un substrat critic pentru melanogenezei, din L-fenilalanină (Schallreuter și Wood, 1999). În plus, calciu este esențial pentru protejarea echilibrului redox în melanocitele epidermice și pentru a preveni deteriorarea ADN-ului în interiorul acestor celule (Schallreuter și Wood, 2001; Wood et al., 1999).

Importanța primordială biologică a calciului ca mesager secund necesită o reglementare strictă a homeostaziei acestuia pentru ca o celulă să funcționeze în mod normal. Concentrația de calciu liber citosolic în cele mai multe celule „în repaus” este de ordinul a 10^{-7} M, aproximativ 100 nM (Carafoli, 1987). Această concentrație este menținută în primul rând prin existența unor canale de ioni și pompe, sistemele de tampon a calciului citosolic, și depozitarele de calciu intracelular (Tsien și Tsien, 1990). Concentrațiile intracelulare de calciu = 10^{-5} M vor duce la activarea de proteaze calciu-dependente, rezultând o cascadă de evenimente ce conduc la moarte celulară (Carafoli et al., 1984; Waring, 2005). Absorbția, depozitarea, și eliberarea reglementată a calciului sunt, prin urmare, riguros controlate de proteine specializate, cum ar fi calmodulina, calbindina, anexine, parvalbumina, și S-100. Cele mai multe dintre aceste proteine de legare a calciului au prezentat constante de legare de 10^5 - 10^7 / M (Carafoli et al., 1984; Frausto da Silva și Williams, 1991), dar există un număr de proteine de stocare a calciului

Salt, 1997, Meyer zum Gottesberge, 1988). In addition, in skin, extracellular calcium is known to play a critical role regulating the keratinocyte proliferation and differentiation (Boyce and Ham, 1983). It was postulated that melanin plays a role in this way, by its ability to bind calcium and buffer (Buffey et al., 1993, Drager 1985; Hoogduijn et al., 2004; Panessa and Zaduwinsky, 1981; Salceda and Riesgo-Escovar, 1991; Salceda and Sanchez-Chavez, 2000). However, calcium has been shown to regulate production of melanin in epidermal melanocytes by acting as a cofactor for phenylalanine hydroxylase, the enzyme responsible for synthesis of L-tyrosine, a critical substrate for melanogenesis, from L-phenylalanine (Schallreuter and Wood, 1999). In addition, calcium is essential for protecting the redox balance in epidermal melanocytes and to prevent damage to DNA within these cells (Schallreuter and Wood, 2001, Wood et al., 1999).

Primary biological importance of calcium as a second messenger requires strict regulation of its homeostasis for a cell to function normally. Cytosolic free calcium concentration in most resting cells is in the order of 10^{-7} M, approximately 100 nM (Carafoli, 1987). This concentration is maintained primarily by the existence of calcium ion channels and pumps, cytosolic calcium buffer systems, and intracellular calcium stores (Tsien and Tsien, 1990). Intracellular calcium concentrations = 10^{-5} M will lead to activation of calcium-dependent proteases, resulting in a cascade of events leading to cell death (Carafoli et al., 1984, Waring, 2005). The uptake, storage, and regulated release of calcium are therefore strictly controlled by specialized proteins such as calmodulin, calbindin, annexins, parvalbumin and S-100. Most of these calcium-binding protein have binding constants 10^5 - 10^7 / M (Carafoli et al., 1984, Frausto da Silva and Williams, 1991), but there are a number of proteins with high capacity and low affinity of calcium storage, involved in sequestration and buffering calcium with binding constant of about 10^3 / M (Pozzan et al., 1994). Two good examples are calsequestrin and calreticulin, each with a binding constant (KB) of approximately 1×10^3 / M. These are known to be calcium storage protein in the lumen of sarcoplasmic reticulum of skeletal and cardiac

cu capacitate crescută și afinitate scăzută, implicate în sechestrarea și tamponarea calciului, cu constante de legare de aproximativ $10^3 / M$ (Pozzan et al., 1994). Două exemple concludente sunt calsechestrina și calreticulina, fiecare cu o constantă de legare (KB) de aproximativ $1 * 10^3 / M$. Acestea sunt cunoscute a fi proteine de stocare a calciului în lumenul reticulului sarcoplasmic din celulele musculare scheletice și cardiace, precum și în lumenul reticulului endoplasmatic în țesuturile non-musculare. (Opas și Michalak, 1992). Pe baza proprietăților de legare a calciului a tuturor proteinelor menționate mai sus, există o puternică corelație între funcția specifică a fiecărei proteine și constanta de legare a calciului (KB). Proteinele cu afinitate mare de legare ($> 10^6 / M$) au roluri specializate în transportul calciului și de semnalizare, în timp ce proteinele cu afinitate mică de legare ($< 10^4 / M$) au roluri în sechestrarea, tamponarea și stocarea de calciu. Prin urmare, melanina se dovedește și ea importantă prin rolul său funcțional în cadrul rețelei de semnalizare a calciului.

În acest scop relatăm un studiu realizat recent folosind melanina *Sepia* care prezintă proprietăți similare cu eumelanina de mamifere (Hong et al., 2004; Liu și Simon, 2005; Liu et al., 2004; Potts și UA, 1976; Szekeres, 1975). Calciul se leagă de grupări carboxil din granule de pigment (Hong și Simon, 2006), fenomen observat în toate cazurile de atașare calciu proteine de legare (Carafoli et al., 1984; Carafoli, 1987). S-a emis ipoteza că aceste grupări carboxil ar apărea în urma oligomerizării acidului 5,6-dihidroxiindol-2-carboxilic (DHICA) (Liu et al., 2004). Mai mult decât atât, melanina *Sepia* are o capacitate mare de legare a calciului cu timpi de echilibrare rapizi. (Hong et al. 2004), cuantificând legarea calciului prin titrarea calorimetrică izotermică (ITC) și spectroscopie fluorescentă. Melanina *Sepia*, sărăcită de metale, la o concentrație de 1 mg / ml, a fost tratată cu $CaCl_2$ în eșantioane celulare în microcalorimeteru, înregistrându-se căldura emanată, cu care se trasează o curbă. Aceasta depinde de numărul situsurilor de legare, nivelul ocupanței și constantele de legare asociate. Constanta de legare determinată prin acest studiu a fost de $3.3(+/-0.2)*10^3/M$, susținând rolul postulat

muscle cells and the lumen of endoplasmatic reticulum in non-muscle tissues. (Opas and Michalak, 1992). Based on the calcium binding properties of all proteins mentioned above, there is a strong correlation between the specific function of each protein and calcium binding constant (KB). High-affinity binding protein ($> 10^6 / M$) have specialized roles in calcium transport and signaling, whereas low-affinity binding proteins ($< 10^4 / M$) have roles in sequestration, buffering and storing calcium. Therefore, melanin also proves important functional role in calcium signaling network. In this way, we mention about a recent study using *Sepia* melanin with similar properties to mammalian eumelanina (Hong et al., 2004, Liu and Simon, 2005, Liu et al., 2004, Potts and AU, 1976, Szekeres, 1975). Calcium binds to carboxyl groups of pigment granules (Hong and Simon, 2006), a phenomenon observed in all cases of attachment of calcium binding proteins (Carafoli et al., 1984; Carafoli, 1987). It was hypothesized that the carboxyl groups would arise from the oligomerization of 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) (Liu et al., 2004). Moreover, *Sepia* melanin has a high capacity of calcium binding with fast equilibration times. (Hong et al. 2004), quantifying the binding of calcium by isothermal titration calorimetric (ITC) and fluorescence spectroscopy. *Sepia* melanin, poverty in metal at a concentration of 1 mg / ml, was treated with $CaCl_2$ in microcalorimeter cell samples, the heat emanating recording and trace a curve. It depends on the number of binding sites, the occupants and associated binding constants. Binding constant determined by this study was $3.3 (+/-0.2) * 10^3 / M$, supporting the previously postulated role of melanin to act as a reservoir of intracellular calcium and contribute to its homeostasis regulation in the melanocytes. At this level of binding, affinity for calcium is less than at least 100 times more, compared to intracellular calcium transport proteins, such as calmodulin (KB $10^6-10^7 / M$), calbindin (10^7 KB / M), parvalbumin (10^8 KB / M), annexin (10^6 KB / M), and calpain (10^5 KB / M) (Frausto da Silva and Williams, 1991; Carafoli et al., 1984). A binding constant of $10^3 / M$ is desirable to dab the flow of calcium. Almost all proteins that bind intracellular calcium directly involved in

anterior al melaninei de a acționa ca un rezervor intracelular de calciu și de a contribui la reglarea homeostaziei acestuia la nivelul melanocitelor. La acest grad de legare, afinitatea pentru calciu este mai mică de cel puțin 100 de ori în comparație cu mai multe proteine de transport intracelular al calciului, cum ar fi calmodulina (KB 10^6 - 10^7 / M), calbindina (KB 10^7 / M), parvalbumina (KB 10^8 / M), anexina (KB 10^6 / M), și calpaina (KB 10^5 / M) (Frausto da Silva și Williams, 1991; Carafoli et al., 1984). O constantă de legare de 10^3 / M este de dorit pentru a tampona fluxul de calciu. Aproape toate proteinele intracelulare ce leagă calciu, implicate direct în semnalizare, nu sunt activate, până când concentrațiile de calciu ajung la 10^{-6} - 10^{-8} M, iar concentrația extracelulară a calciului este de obicei 10^{-3} M. Mai mult, cascada proteolitică asociată cu moartea celulară este declanșată în cazul în care concentrația intracelulară a calciului depășește 10^{-5} M în cele mai multe celule. Se postulează că eumelanina reglementează homeostazia calciului în melanocite prin sechestrarea și tamponarea concentrațiilor de calciu intracelular, deoarece proprietățile de legare a calciului (afinitate scăzută, capacitate crescută) sunt bine adaptate în acest scop.

Calciul - regulator al melanogenezei

Pigmentarea cutanată este reglementată de un complex genetic compus din mai mult de 150 alele răspândite în aproximativ 90 locusuri ce codifică sinteza a numeroase enzime, proteine structurale, regulatori de transcripție, transportori, receptori, factori de creștere etc. Sunt descrise două tipuri de melanină, eumelanina și feomelanina, ce diferă structural, prin compoziția chimică, caracteristicile structurale și proprietățile fizice.

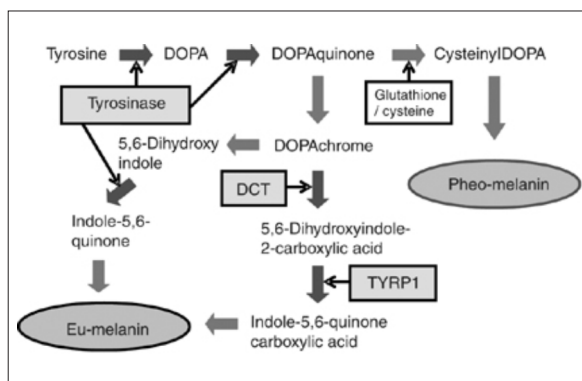
Prima etapă obligatorie, limitativă, este sinteza din L-tirozină a L-DOPA, printr-o reacție de hidroxilare, catalizată de tirozinază, enzima cheie a întregului proces. Ulterior apar multiple reacții de oxidoreducere și transformări intracelulare (vezi imagine). (Hideya Ando, Hirofumi Kondoh, Masamitsu Ichihashi and Vincent J Hearing. Approaches to Identify Inhibitors of Melanin Biosynthesis via the Quality Control of Tyrosinase, 2007)

signaling are not activated until calcium concentrations reach 10^{-6} - 10^{-8} M and extracellular calcium concentration is usually 10^{-3} M. In addition, the proteolytic cascade associated with cell death is triggered when the intracellular concentration of calcium exceeds 10^{-5} M in most cells. It postulates that eumelanin regulate calcium homeostasis in melanocytes by sequestration and buffering intracellular calcium concentrations because of calcium binding properties (low affinity, high capacity) well being suited for this purpose.

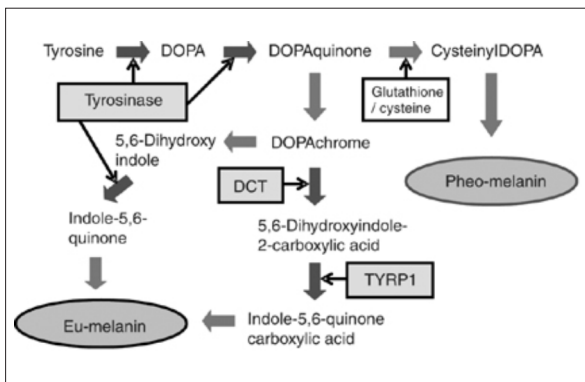
Calcium - regulator of melanogenesis

Skin pigmentation is genetically governed by a complex composed of more than 150 alleles spread in approximately 90 binding sites that encode the synthesis of many enzymes, structural proteins, transcription regulators, transporters, receptors, growth factors etc.. Are described two types of melanin, eumelanin and pheomelanin, which differ structurally, by chemical composition, structural characteristics and physical properties.

The first phase is mandatory, exhaustive, is the synthesis from L-tyrosine of L-dopa, a hydroxylation reaction, catalyzed by tyrosinase, a key enzyme of all process. Subsequently multiple reactions occur oxidoreductions and intracellular processing (see picture). (Hideya Ando, Hirofumi Kondoh, Masamitsu Ichihashi and Vincent J Hearing. Approaches to Identify inhibitor of melanin Biosynthesis via the Quality Control of tyrosine, 2007)



Substrate of this way is represented by L-tyrosine, obtained from L-phenylalanine by hydroxylation reaction under the action of



Substratul acestei căi este reprezentat de L-tirozină, obținută din L-fenilalanină printr-o reacție de hidroxilare sub acțiunea fenilalanin hidroxilazei, transport din citosol în melanozomi. L-fenilalanina este distribuită în melanozom prin intermediul unei pompe Na-Ca-ATPaza.

Calciul are o mare importanță în acest context prin intermediul căii IP₃ / DAG. În melanocite, acest semnal este controlat de către cascadele norepinefrină / α 1-adrenoreceptori, ACTH 1-17 / MC1-R și CRF / CRF-R1 (Wakamatsu et al, 1997). Semnalul IP₃ / DAG controlează activarea PKC β care, la rândul său, activează tirozinaza de 2,5 ori, prin fosforilarea a două reziduuri de Ser în domeniul C-terminal al enzimei, un concept care a fost recent promovat de către Sasaki et al. Tirozinaza este enzima cheie a melanogenezei, o glicoproteină membranară cu un singur helix transmembrantar în apropierea capatului C-terminal, ce se află la nivelul citosolului melanocitar, capatul N-terminal fiind situat la nivelul matrixului melanosomal. Multă vreme s-a crezut că substratul optim este L-DOPA, obținută din L-tirozină sub acțiunea tirozin hidroxilazei izoforma 1 (THI). Există situsuri de legare diferite pentru L-tirozină și L-DOPA, ambele fiind substraturi în cadrul melanogenezei. L-tirozina este obținută prin conversia intracelulară a L-fenilalaninei sub acțiunea fenilalanin hidroxilazei (PAH). Astfel este susținută „teoria a trei enzime”, acestea fiind fenilalanin hidroxilaza (PAH), tirozin hidroxilaza izoforma 1 (THI) și tirozinaza. (Wood et al, 1991, Olivares et al. 2002) În cadrul acestei teorii a melanogenezei, eliberarea intracelulară a calciului din RER via semnalul IP₃, controlează transportul activ de L-fenilalanină prin intermediul ATP-ază calci-calmodulin dependentă, influențând astfel turnoverul acesteia în L-tirozină și furnizarea de

phenylalanine hydroxylase, transport from citosol to melanosomes. L-phenylalanine is distributed in melanosomes through a pump, Na-Ca-ATPaza.

Calcium has a great importance in this context, through IP₃ / DAG pathway. In melanocytes, this signal is controlled by cascades of norepinephrine / α 1-adrenoreceptors, ACTH 1-17 / MC1-R and CRF / CRF-R1 (Wakamatsu et al, 1997). Signal IP₃ / DAG controls the activation of PKC β , which, in its turn, activates tyrosinase 2.5 times by phosphorylation of two Ser residues in the C-terminal domain of the enzyme, a concept which was recently fostered by Sasaki et al. Tyrosinase is the key enzyme of melanogenesis, a membrane glycoprotein with a single transmembrane helix near to its C-terminal, located in the melanocytic cytosol, the N-terminal is located in the melanosome matrix. For a long time, it has been known that the best substrate is L-dopa, obtained from L-tyrosine under the action of tyrosine hydroxylase isoform 1 (THI). There are different binding sites for L-tyrosine and L-dopa, both substrates in the melanogenesis. L-tyrosine is produced by intracellular conversion of L-phenylalanine by the action of phenylalanine hydroxylase (PAH). So it is supported „three enzymes theory”, those being phenylalanine hydroxylase (PAH), tyrosine hydroxylase isoform 1 (THI) and tyrosinase (Wood et al, 1991, Olivares et al. 2002). In this context of the „three enzyme theory” of melanogenesis, release intracellular calcium from the RER by IP₃ controls the active transport of L-phenylalanine via calcium-calmodulin-dependent ATP-ase, such influencing its turnover to L-tyrosine and providing sufficient concentrations of substrate to support melanogenesis. Moreover, POMC processing requires calcium. All of the POMC processing convertases (PC1, PC2, Furin, PACE4) have two specific calcium binding domain which are essential for their activity. Lerner and McGuire are the first to have recognized the influence of MSH α and β on skin pigmentation. Subsequent studies have supported this theory proven by directly regulating on melanosomes tyrosinase activity in a receptor independent manner. Interaction MSH-MC1R (melanocortin receptor 1) through G proteins, the modulation of AC / AMPc, is

concentrații suficiente de substrat pentru a susține melanogeneza. Mai mult decât atât, prelucrarea POMC necesită calciu. Toate convertazele de prelucrare POMC (PC1, PC2, Furin, PACE4) au două situsuri specifice de calciu, cu caracter obligatoriu, care sunt esențiale pentru activitatea lor. Lerner și McGuire sunt primii care au recunoscut influența MSH α și β asupra pigmentării cutanate. Studiile ulterioare au susținut această teorie dovedind capacitatea de reglare directă în melanozomi a activității tirozinazei, într-un mod receptor independent. Interacțiunea MSH-MC1R (melanocortin receptor 1) prin intermediul proteinelor G, cu modularea AC/AMPC, este reglată in vitro de schimbările concentrației de calciu. MSH este internalizat în interiorul melanozomilor, prin intermediul unor situsuri de legare. De asemenea, α/β MSH poate lega cu afinitate crescută 6/7 BH4, recunoscuți inhibitori ai tirozinazei, ceea ce conduce la o enzimă funcțională.

Rolul calciului în interacțiunea melanocit-keratinocit

Melanocitele produc melanina în interiorul melanozomilor, ce sunt transferați keratinocitelor vecine din epiderm și rezultă pigmentarea vizibilă a pielii. Contactul fizic între melanocite și keratinocite este o condiție prealabilă pentru transferul de melanozomi, dar semnalele celulare induse în timpul sau după contact nu sunt pe deplin înțelese. Se presupune că interacțiunile dintre membranele plasmatică ale acestor două tipuri de celule au indus un semnal intracelular de calciu la nivelul keratinocitelor care va fi necesar pentru transferul de pigment. Acest semnal intracelular de calciu are loc ca urmare a eliberării de calciu din depozitele intracelulare. Transferul de pigment observat în coculturile melnocite-keratinocite a fost inhibat, în condițiile în care calciul intracelular în keratinocitelor a fost chelatat. S-a lansat ideea unei interacțiuni de tip „ligand-receptor” între melanocite și keratinocite care declanșează mobilizarea intracelulară de calciu la nivelul keratinocitelor și mediază transferul de melanină. Procesul de transfer de melanozomi este un proces unic biologic, care este încă neînțeles. Ipoteze diferite, cum ar fi eliberarea de melanozomi de către melanocite, urmată de endocitoza lor în keratinocite, inocularea directă (injectare) de melanozomi în

regulated in vitro by calcium concentration changes. MSH is internalized inside melanosomes through binding sites. Also, α/β MSH can bind with high affinity 6/7 BH4, tyrosinase recognized inhibitors, leading to a functional enzyme.

Role calcium in melanocyte-keratinocyte interaction

The melanocytes produce melanin within melanosomes, which is transferred to their neighbors, keratinocytes in the epidermis, resulting visible skin pigmentation. Physical contact between melanocytes and keratinocytes is a prerequisite for the transfer of melanosomes, but cellular signals induced during or after contact are not fully understood. It is assumed that the interactions between plasma membranes of these two cell types were induced by intracellular calcium signal in the keratinocytes this being necessary for the transfer of pigment. This intracellular calcium signal is due to release of calcium from intracellular stores. Pigment transfer observed in melanocyte-keratinocytes cocultures was inhibited when intracellular calcium in keratinocytes was chelated. It is proposed the idea of a „ligand-receptor” type of interaction between melanocytes and keratinocytes that triggers intracellular calcium mobilization in the keratinocytes and mediates melanin transfer. The process of melanosomes transfer is a unique biological process, which is still incomprehensible. Different assumptions, such as release of melanosomes by melanocytes, followed by their endocytosis into keratinocytes, direct inoculation (injection) of melanosomes into keratinocytes and keratinocyte-melanocyte membrane fusion have been proposed as possible mechanism (Boissy, 2003, Nguyen and Wei, 2004). There are methods in the literature to study pigment transfer in vitro (Aspengren et al., 2006, Berens et al., 2005). Some surface molecules have been identified on keratinocytes governing the process of melanosomes phagocytosis. Some of these include keratinocyte growth factor receptor and protease-activated receptor (2) (PAR-2) (Boissy, 2003; Cardinali et al., 2005). It was shown that modulation of PAR-2 can influence melanosomes phagocytosis, a process in which the melanocyte-keratinocyte contact is essential

keratinocite și fuziunea membranelor melanocit-keratinocit au fost propuse ca mecanism posibil (Boissy, 2003; Nguyen și Wei, 2004). Există metode în literatura de specialitate pentru a studia transferul de pigment *in vitro* (Aspengren et al., 2006; Berens et al., 2005). Anumite molecule de suprafață au fost identificate pe keratinocite care reglementează procesul de fagocitoză a melanozomilor. Unele dintre acestea includ receptorul factorului de creștere a keratinocitelor și receptorul activatorului de protează(2)(RAP-2) (Boissy, 2003; Cardinali et al., 2005). A mai fost arătat că modularea RAP-2 poate influența fagocitoza melanozomilor, un proces în care contactul melanocit-keratinocit este esențial (Seiberg, 2001; Seiberg et al., 2000). În interacțiunea melanocit-keratinocit sunt implicate probabil evenimente precum formarea de procese dendritice și filopode care se extind de la melanocite spre keratinocite și formarea homodimerului E-cadherină între melanocite și keratinocite (Scott, 2002; Scott et al., 2002; Tang et al., 1994). Mecanismele implicate în recunoașterea melanocit - keratinocit în prezent nu sunt cunoscute. Interacțiunea celulă-celulă este responsabilă pentru reglementarea formei celulare, a motilității și structurii țesuturilor. Complexele proteice care se găsesc la punctele de contact dintre celule sunt integrate în căi de semnalizare intracelulară care conduc la adeziune celulară, proliferare, diferențiere și apoptoză (Braga și Harwood, 2001). Aceste procese celulare sunt de obicei mediate prin semnal intracelular de calciu care este considerat evenimentul inițial de semnalizare. Este cunoscut faptul că semnalizarea intracelulară generată de calciu controalează procesele de creștere, diferențiere și apoptoză a keratinocitelor epidermice (Gniadecki și Gajkowska, 2003).

În acest scop cităm un studiu în care a fost cercetat rolul concentrației intracelulare de calciu liber în recunoașterea keratinocit-melanocit și transferul de melanină. Pentru a studia procesul de transfer a melaninei, precum și rolul calciului intracelular în acest fenomen, a fost dezvoltat un test de transfer *in vitro* a melaninei. S-au utilizat culturi de celule de melanom cu culturi celulare de keratinocite epidermoide, observându-se o atașare a celulelor de melanom la cele keratinocitare în decurs de 2 ore, transferul de pigment monitorizându-se cu ajutorul colorației Fontana-Masson. După 24 de ore de co-cultivare,

(Seiberg, 2001, Seiberg et al., 2000). În melanocyte-keratinocyte interactions are probably involved events such as formation of dendritic processes and filopodia that extend from melanocytes towards keratinocytes and E-cadherin homodimer formation between melanocytes and keratinocytes (Scott 2002, Scott et al., 2002, Tang et al., 1994). The mechanisms involved in recognizing melanocyte - keratinocyte is currently not known. Cell-cell interaction is responsible for regulating cell shape, motility and tissue structure. Protein complexes found at points of cell contact are integrated into intracellular signaling pathways leading to cell adhesion, proliferation, differentiation and apoptosis (Braga and Harwood, 2001). These cellular processes are usually mediated by intracellular calcium signal that is considered as the initial signaling event. It is known that intracellular calcium signaling controls growth, differentiation and apoptosis of epidermal keratinocytes (Gniadecki and Gajkowski, 2003).

In this way we mentioned a study in which was investigated the role of intracellular concentration of free calcium to keratinocyte-melanocyte in recognition and transfer of melanin. To study the process of melanin transfer and the role of intracellular calcium in this phenomenon, a test was developed *in vitro* transfer of melanin. Were used cell culture of melanoma cell, cultures of epidermoid keratinocytes, observing the attachment of melanoma cells to keratinocytes within 2 hours, transfer of pigment monitoring with the Fontana-Masson coloration. After 24 hours of co-cultivation, there was a presence of pigment in the $60 \pm 5\%$ of keratinocytes. The experiment was repeated with human melanocytes, observing a loading rate with pigment within $55 \pm 5\%$ of keratinocytes. Precondition for the transfer of melanin is the contact between melanocytes and keratinocytes (Seiberg, 2001, Seiberg et al., 2000). In melanocyte-keratinocyte co-cultures, melanocytes extend filopodia to keratinocyte, but technically is not feasible to monitor intracellular signaling during the actual event of physical contact. Therefore, it was investigated the ability of membrane fractions isolated from melanoma cells to induce signaling in the keratinocytes. By

s-a observat o prezență de pigment în $60 \pm 5\%$ dintre keratinocite. Experimentul s-a repetat și cu ajutorul melanocitelor umane, observandu-se o rata de încărcare cu pigment la $55 \pm 5\%$ dintre keratinocite. Condiția prealabilă pentru transferul de melanină este reprezentată de contactul dintre melanocite și keratinocite (Seiberg, 2001; Seiberg et al., 2000). În aceste coculturi melanocit-keratinocit, s-au observat filopode ale melanocitelor în jurul keratinocitelor, dar punct de vedere tehnic nu este fezabil a se monitoriza semnalizarea intracelulară în timpul evenimentului real de contact fizic. Prin urmare, a fost investigată capacitatea unor fracțiuni de membrană din celulele izolate de melanom dacă pot induce semnalizare la nivelul keratinocitelor. Prin adăugarea acestor fracțiuni membranare s-a observat o creștere tranzitorie a calciului intracelular la nivelul keratinocitelor, specific acestei interacțiuni. Această modificare nu s-a observat când se folosește un alt tip de fracțiuni membranare tumorale sau dacă proteinele membranare au fost distruse prin inhibitori de proteine sau înghețare. De aici s-a desprins concluzia conform căreia semnalizarea intracelulară a calciului la nivelul keratinocitelor necesită prezența proteinelor membranei melanocitelor într-o conformație activă. Creșterea calciului la nivelul keratinocitelor se datorează eliberării intracelulare din depozite. Aceste date confirmă faptul că recunoașterea keratinocitelor de către melanocite este specifică. Se sugerează că o astfel de interacțiune fizică duce la generarea unui semnal de calciu intrakeratinocitar, esențial în procesul de transfer al melanosomilor. Interacțiunea melanocit-keratinocit este practic baza colorației pielii, realizată prin transferul de melanină în direcția menționată, în plus keratinocitele pot afecta alte funcții ale melanocitelor, inclusiv procesul de sinteză a melaninei, proliferarea melanocitelor, etc (Duval et al., 2002; Nakazawa et al., 1995a, b; Valyi-Nagy et al., 1993). Acest studiu demonstrează practic, utilizând coculturi din sisteme diferite, o interacțiune de tipul „ligand-receptor like”, ce conduce la o semnalizare intracelulară a calciului la nivelul keratinocitelor, generată de interacțiuni de tipul proteină-proteină în urma unui contact fizic al acestor două tipuri de celule. Acest mecanism a fost descris și în alte sisteme celulare (de exemplu, activarea limfocitelor B de către celulele T (Kim et al., 2001) și controlul

adding these membrane fractions was observed a transient increase in intracellular calcium in the keratinocyte, specifically this interaction. This change was not observed when using another type of tumor membrane fractions or membrane proteins were destroyed by inhibitors of protein or freezing. Hence the conclusion that split off intracellular calcium signaling in the keratinocyte membrane proteins requires the presence of melanocytes in an active conformation. Increased calcium in the keratinocytes is due to release from intracellular stores. These data confirm that recognition of the melanocyte keratinocyte is specific. It is suggested that such a physical interaction results in generating a calcium signal inside keratinocyte essential in the transfer of melanosomes. Melanocyte-keratinocyte interaction is practically the basis of skin colour, achieved by transfer of melanin in mentioned direction, and keratinocytes affect other functions of melanocytes, including the process of melanin synthesis, the proliferation of melanocytes, etc. (Duval et al., 2002, Nakazawa et al., 1995a, b; Valyi-Nagy et al., 1993). This study demonstrates, using co-cultures of different systems, an interaction of „ligand-receptor like” type, leading to an intracellular calcium signaling in the keratinocytes, caused by protein-protein interactions generated by physical contact between these two cell types. This mechanism was described in other cellular systems too (eg., B cell activation by T cells (Kim et al., 2001) and control of axonal outgrowth in neurons from myelin membrane (Hunt et al., 2002). Nogo or MAG proteins present on the myelin membrane bind to Nogo receptor on the neuronal growth cone membrane, and induce release of calcium and activate other signalling pathways, which in turn control axonal growth. Bush and Simon (2007) have shown that melanosomes can sequester calcium and help maintain calcium homeostasis in melanocytes. In vivo, the possibility exists for calcium signals to be generated by keratinocyte through release of calcium from melanosomes transferred to keratinocytes. Thus there is clear evidence that plasma membrane interaction of melanocytes with keratinocytes induced calcium signaling in the keratinocytes.

creșterii axonale în neuroni prin membrana de mielină (Hunt et al., 2002). Proteinele NOGO sau MAG prezente pe membrana de mielină se leagă de receptorul NOGO de pe membrana neuronală și induc eliberarea calciului cu activarea altor căi de semnalizare, ce controlează creșterea axonală. Bush și Simon (2007) au arătat că melanozomi pot sechestra calciu și ajută la menținerea homeostaziei acestuia în melanocite. In vivo, există posibilitatea generării de semnale intra-keratinocitare calciu-inductibile, prin eliberarea de calciu din melanozomi transferați keratinocitelor. Astfel există dovezi clare că interacțiunea membranei plasmatică a melano-citelor cu keratinocitele induce semnalizare de calciu la nivelul keratinocitelor.

Rolul calciului în reglarea echilibrului Redox

Calciul este un ion cu rol important în potențialul antioxidant al pielii controlat prin nivelurile intracelulare ale acestuia. Concentrațiile intracelulare de calciu $\geq 10^{-5}$ M duc la activarea de proteaze calciu-dependente, rezultând o cascadă de evenimente corelate cu moarte celulară (Carafoli et al., 1984; Waring, 2005).

Sunt descrise trei mecanisme prin care calciul influențează echilibrul redox. Primul este reprezentat de inhibarea tioredoxin reductazei și creșterea oxidării tioredoxinei, care este și cel mai important. Schllreuter et. al. au raportat acest efect de inhibare a tioredoxin reductazei în celule melanomului uman. Tioredoxina în mod normal convertește continuu punțile S-S proteice în dithioli reduși. Pentru aceste reacții este necesară participarea unei enzime în formă redusă ce se realizează sub acțiunea tioredoxin reductazei. Consecința inhibării acestei enzime este reprezentată de acumularea 2-peroxiredoxin-S2, ce are două efecte principale, conduce la oxidarea rapidă a tioredoxinei, ce participă la rândul său la oxidarea altor proteine cu efect intrinsec de oxidare a grupurilor thiol proteice. Pe lângă conversia sus menționată, tioredoxina contribuie la legarea regulatorie selectivă al thiolului tioredoxinei la alte proteine funcționale. Prin urmare tioredoxina are două funcții și anume catalizator redox și regulator redox sensibil prin interacțiuni proteină-proteină. De asemenea, tioredoxina este asociată porțiunii N-terminală a

Role of calcium in Redox balance regulation

Calcium is an ion with important antioxidant potential of skin, controlled by its intracellular levels. Intracellular calcium concentrations $\geq 10^{-5}$ M lead to activation of calcium-dependent proteases, resulting in a cascade of events related to cell death (Carafoli et al., 1984, Waring, 2005).

Are described three mechanisms by which calcium affects the redox balance. The first is the inhibition of thioredoxin reductase and increased oxidation of thioredoxin, which is the most important. Schllreuter et al. were reported this effect of thioredoxin reductase inhibition in human melanoma cells. Thioredoxin normally converts continuously protein SS bridges in reduced dithiols. These reactions requires the involvement of an enzyme in reduced form, realized under the action thioredoxin reductase. The consequence of this enzyme inhibition is the accumulation of 2-peroxiredoxin-S2, which has two main effects, lead to rapid oxidation of thioredoxin, which in his turn participate at oxidation of other proteins with intrinsic effect of protein thiol groups oxidation. In addition to the aforementioned conversion, tioredoxin contribute to selective regulatory binding of tioredoxin thiol to other functional proteins. Therefore tioredoxin has two functions, redox catalyst and redox-sensitive regulator by protein-protein interactions. Thioredoxin also by its N-terminal domain bind to ASK-1 in vivo and in vitro, being a physiological inhibitor of this in its reduced form. The ASK-1 effect is conditiont by redox status of thioredoxin. In this context with thioredoxin reductase inhibition dependent by increased calcium levels and accumulation of thioredoxin in oxidized form, there is an activation of ASK-1 with subsequent increased of JNK/p38 MAP kinases and cell death (Danon Avihai and Carlos Gitler, 2003).

The second mechanism is the stimulation of NADPH oxidase, leading to an explosive synthesis of superoxide ions with cytoplasmic accumulation of hydrogen peroxide, which inhibits phosphorylation of receptor kinases through fosfotyrosine.

The third mechanism is the ability of cytoplasmic calcium redox regulation to oxidate SS protein bridges.

ASK-1 in vivo și in vitro, fiind un inhibitor fiziologic al acesteia în forma sa redusă. Efectul ASK-1 este condiționat de statusul redox al tioredoxinei. În acest context al inhibării tioredoxin reductazei dependente de concentrații crescute ale calciului și acumulării tioredoxinei în formă oxidată, se constată o activare a ASK-1 cu amplificarea subsecventă a căii kinazelor JNK/p38 MAP și moartea celulară (Gitler Carlos and Danon Avihai, 2003)

Cel de-al doilea mecanism este reprezentat de stimularea NADPH oxidazei, ce conduce la o sinteză explozivă de ioni superoxid, cu acumularea de peroxid de hidrogen citoplasmatic, care inhibă fosforilarea receptorului kinazic prin intermediul fosfotirozinei.

Al treilea mecanism este reprezentat de capacitatea de reglare redox a calciului citoplasmatic prin oxidarea punților S-S proteice.

Toate aceste mecanisme conduc la cumulare de kinaze, asociate cu moarte celulară, arătând importanța reglării homeostaziei calciului.

Perturbarea homeostaziei calciului în melanomul uman

Tumorile cutanate maligne se caracterizează prin acumularea excesivă a metalelor. Prin metode fizice (INAA, PIXE) și chimice (spectrometrie) autorii au constatat existența unui raport supranumerar între concentrația calciului din țesutul tumoral și țesutul sănătos adiacent (rezultate nepublicate).

Variațiile nivelurilor plasmatică ale calciului în malignități, în cazul de față în melanomul cutanat, prezintă importanță prin aprecierea asupra prognosticului. Cel mai frecvent se vorbește de *hipercalcemie*, rar manifestare inițială a malignității, asociată cu un prognostic sever (supraviețuire sub 6 luni, decesul survenind la 50% dintre pacienți în 30 zile). Hipercalcemia apare la 5-10% dintre acești pacienți, după unele studii până la 20-30% (Fisken et al., 1980; Rolston et al., 1990). Hipercalcemia înregistrată la 1.37% dintre pacienții cu melanom cutanat se asociază cu prognostic sumbru (Nicolae I., Anghel A., 2009). Aprecierea hipercalcemiei PTH independentă, semnalată într-un studiu amplu, efectuat pe 950 pacienți, în perioada 2000-2010, s-a făcut pe baza cCaT (calciu total corectat), în funcție de nivelul albuminei circulante (Nicolae I., Anghel A., 2009). Au fost descrise trei mecanisme

All these mechanisms lead to the accumulation of kinase associated with cell death, indicating the importance of calcium homeostasis regulation.

Calcium homeostasis disruption in human melanoma

Malignant skin tumors are characterized by excessive accumulation of metals. By physical methods (INAA, PIXE) and physico-chemical (spectrophotometry) the authors have found existence of a supernumerary between calcium concentration in tumor tissue and adjacent healthy tissue (unpublished results).

Variations in serum calcium levels in malignancies, in our case in cutaneous melanoma, is important in assessing the prognosis. The most frequently speaks of hypercalcemia, a rare initial manifestation of malignancy, associated with a severe prognosis (survival under 6 months, death occurring in 50% of patients in 30 days). Hypercalcemia occurs in 5-10% of these patients, as some studies up to 20-30% (Fisken et al., 1980, Rolston et al., 1990). Hypercalcemia registered at 1.37% of patients with cutaneous melanoma is associated with bad prognosis (Nicholas I., Anghel A., 2009). PTH-independent hypercalcemia assessment, in a reported large study conducted on 950 patients, in period 2000-2010, was based on cCaT (corrected total calcium), the level of circulating albumin (Nicholas I., Anghel A., 2009). Have been described three mechanisms of its occurrence, like the synthesis of PTH-like substances (PTHrP) identified in the tumor, bone osteolytic metastases and tumor production of calcitriol. The first mechanism that is most important, being responsible for approx. 80% of tumor hypercalcemia. PTHrP is noted as a new hormone, without function, but with important physiological role, different structures of PTH, but with amino-terminal domain common, which makes the protein PTHrP active to the PTH receptor, equipotente for them and the same acute effects (Kemp et al., 1987). This feature together with similarities in gene structure suggested origin in a common ancestral gene (Yasudo, 1989, Stream, 1989, Kemp et al., 1987). From the different roles of PTH and PTHrP was launched the idea PTHrP receptor, which also identifies and PTH. Note the secretion of

de apariție a acesteia și anume sinteza unei substanțe PTH-like(PTHrP)identificată la nivel tumoral, metastazele osoase osteolitice și producția tumorală de calcitriol. Primul mecanism menționat este cel mai important, fiind responsabil de aprox. 80% dintre hipercalcemiile tumorale. PTHrP este notat a fi un nou hormon, fără funcție, dar cu rol fiziologic important, diferită structural de PTH, dar cu capătul amino-terminal comun, ceea ce face ca proteina PTHrP să fie activă pe receptorii PTH fiind equipotente pentru aceștia, având aceleași efecte acute(Kemp et all., 1987). Această caracteristică împreună cu asemănările în structura genelor au sugerat originea într-o genă ancestrală comună(Yasudo, 1989; Suvo, 1989; Kemp et all., 1987). Pornind de la rolurile diferite ale PTH și PTHrP a fost lansată ideea receptorilor de PTHrP, ce identifică de asemenea și PTH. De notat și secreția de citokine(TNF α , IL1 β , IL6, RANKL) de către tumoră asociată celei de PTHrP ce acționează sinergic pentru apariția hipercalcemiei (Suvo et all, 1987) .

Hipocalcemia este rar asociată malignității și cunoaște în primul rând două mecanisme și anume instalarea leziunilor osteoblastice metastazice condiție în care calciul extracelular utilizat pentru mineralizarea osului nou, și sindromul de liză tumorală în care tumora eliberează ioni intracelulari, precum fosfat, potasiu, acid uric(Mundy et all., 1990). Creșterea fosfatului implică scăderea rapidă a calciului seric. Evaluările experimentale ale autorilor, pe o perioadă de 10 ani, au evidențiat hipocalcemie la 27,6% dintre pacienții cu melanom (date nepublicate).

Concluzii

Calciul reprezintă un ion cu implicații majore în procesele fiziologice normale, esențiale, ce se desfășoară la nivelul melanocitului precum melanogeneza și echilibrul redox, participând la interacțiunea intercelulară melanocit-keratinocit. Este demonstrat că melanocitul participă activ la homeostazia calciului prin melanină, în acest context proteină cu funcție de legare. Variațiile nivelului de calciu în mod special hipercalcemia asociată procesului malign aduce aprecieri asupra severității prognosticului.

Intrat în redacție: 10.02.2010

cytokines (TNF α , IL1 β , IL6, RANKL) by tumor, associated with that of PTHrP which act synergistically for the development of hypercalcemia (Stream et all, 1987). Hypocalcemia is rarely associated with malignancy and known primarily two mechanisms, the installation of osteoblastic metastatic lesions in which extracellular calcium is used for new bone mineralization, and tumor lysis syndrome in which releases intracellular ions such as phosphate, potassium, uric acid (Mundy et all., 1990). Increasing phosphate involves rapid decrease in serum calcium. Experimental evaluations of authors, over a period of 10 years showed hypocalcemia in 27.6% of patients with melanoma (unpublished data).

Conclusions

Calcium is an ion with major implications in normal essential physiological processes, that takes place in melanocytes like melanogenesis and redox balance, participating in melanocyte-keratinocyte intercellular interaction. Melanocyte is shown to actively participate in calcium homeostasis by melanin, in this context a protein with binding function. Changes in the calcium level in specifically hypercalcemia associated with malignant process bring assessment about prognostic severity.

Received: 10.02.2010

Bibliografie/Bibliography

1. Aspengren, S., Hedberg, D., and Wallin, M. (2006). – Studies of pigment transfer between *Xenopus laevis* melanophores and fibroblasts in vitro and in vivo. *Pigment Cell Res.* 19, 136–145.
2. Berens, W., Van Den Bossche, K., Yoon, T.J., Westbroek, W., Valencia, J.C., Out, C.J., Naeyaert, J.M., Hearing, V.J., and Lambert, J. (2005). – Different approaches for assaying melanosome transfer. *Pigment Cell Res.* 18, 370–381.
3. Boissy, R.E. (2003). – Melanosome transfer to and translocation in the keratinocyte. *Exp. Dermatol.* 12 (Suppl. 2), 5–12.
4. Boyce, S.T., and Ham, R.G. (1983). – Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J. Invest. Dermatol.* 81, 33s–40s.
5. Braga, V., and Harwood, A.J. (2001). – ‘Super glue’. *Nat. Cell Biol.* 3, E168–E170.
6. Bush, W.D., and Simon, J.D. (2007). – Quantification of Ca²⁺ binding to melanin supports the hypothesis that melanosomes serve a functional role in regulating calcium homeostasis. *Pigment Cell Res.* 20, 134–139.
7. Buffey, J.A., Edgecombe, M., and MacNeil, S. (1993). – Calcium plays a complex role in the regulation of melanogenesis in murine B16 melanoma cells. *Pigment Cell Res.* 6, 385–393.
8. Carafoli, E. (1987). – Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 395–433.
9. Carafoli, E., Guiseppe, I., and Rosen, B.P. (1984). – Calcium transport across biological membranes. In *Metal Ions in Biological Systems*, Vol. 17, H. Sigel, ed. (New York, NY: Marcel Dekker), pp.129–186.
10. Cardinali, G., Ceccarelli, S., Kovacs, D., Aspite, N., Lotti, L.V., Torrisi, M.R., and Picardo, M. (2005). – Keratinocyte growth factor promotes melanosome transfer to keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 125, 1190–1199.
11. Drager, U.C. (1985). – Calcium binding in pigmented and albino eyes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82, 6716–6720.
12. Duval, C., Smit, N.P.M., Kolb, A.M., Régnier, M., Pavel, S., and Schmidt, R. (2002). – Keratinocytes control the pheo / eumelanin ratio in cultured normal human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 15, 440–446.
13. Fiskin RA, Heath DA, Bold AM – Hypercalcaemia - A hospital survey. *Q J Med* 1980; 196: 405-415.
14. Frausto da Silva, J.J.R., and Williams, R.J.P. (1991). – *The Biological Chemistry of the Elements* (New York, NY: Oxford University Press), pp. 268–296.
15. Gill, S.S., and Salt, A.N. (1997). – Quantitative differences in endolymphatic calcium and endocochlear potential between pigmented and albino guinea pigs. *Hear. Res.* 113, 191–197.
16. Gitler Carlos and Danon Avihai (2003) – Cellular implications of radox signaling, 276-284.
17. Gniadecki, R., and Gajkowska, B. (2003). – Intracellular calcium pool emptying induces DNA synthesis in HaCaT keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 12, 453–459.
18. Hunt, D., Coffin, R.S., and Anderson, P.N. (2002). – The Nogo receptor, its ligands and axonal regeneration in the spinal cord; A review. *J. Neurocytol.* 31, 93–120.
19. Hong, L., and Simon, J.D. (2006). – Insight into the binding of divalent cations to Sepia eumelanin from IR absorption spectroscopy. *Photochem. Photobiol.* 82, 1265–1269.
20. Hong, L., Liu, Y., and Simon, J.D. (2004). – Binding of metal ions to melanin and their effects on the aerobic reactivity. *Photochem. Photobiol.* 80, 477–481.
21. Hoogduijn, M.J., Smit, N.P., Van Der Laarse, A., Van Nieuwpoort, A.F., Wood, J.M., and Thody, A.J. (2003). – Melanin has a role in Ca²⁺ homeostasis in human melanocytes. *Pigment Cell Res.* 16, 127–132.
22. Hoogduijn, M.J., Cemeli, E., Ross, K., Anderson, D., Thody, A.J., and Wood, J.M. (2004). – Melanin protects melanocytes and keratinocytes against H₂O₂-induced DNA strand breaks through its ability to bind Ca²⁺. *Exp. Cell Res.* 294, 60–67.
23. Kim, S., Braunstein, N.S., Leonard, E.F., and Thomas, J.L. (2001). – Controlling duration of contact between T cells and antigenpresenting cells. *J. Immunol. Meth.* 249, 73–84.
24. Kemp BE, Moseley JM, Rodda CP, et al – Parathyroid hormone-related protein of malignancy: Active synthetic fragments. *Science* 1987; 238:1568-1570.
25. Liu, Y., and Simon, J.D. (2003). – The effect of preparation procedures on the morphology of melanin from the ink sac of *Sepia officinalis*. *Pigment Cell Res.* 16, 72–80.
26. Liu, Y., and Simon, J.D. (2005). – Metal-ion interactions and the structural organization of Sepia eumelanin. *Pigment Cell Res.* 18, 42–48.
27. Liu, Y., Hong, L., Kempf, V.R., Wakamatsu, K., Ito, S., and Simon, J.D. (2004). – Ion-exchange and adsorption of Fe(III) by Sepia melanin. *Pigment Cell Res.* 17, 1–8.
28. Mangin M, Ikeda K, Dreyer BE, Broadus AE – Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2408-2412.
29. Meyer zum Gottesberge, A.M. (1988). – Physiology and pathophysiology of inner ear melanin. *Pigment Cell Res.* 1, 238–249.

30. Mundy GR (1990). – Calcium hoemostasis: Hypercalcemia and hypocalcemia. London UK. *Martin Dunitz Publisher*.
31. Nakazawa, K., Nakazawa, H., Bonnard, M., Damour, O., and Collombel, C. (1995a). – Ca²⁺ and UVB radiation have no effect on E-Cadherin-mediated melanocyte–keratinocyte adhesion. *Pigment Cell Res.* 8, 255–262.
32. Nakazawa, K., Nakazawa, H., Collombel, C., and Damour, O. (1995b). – Keratinocyte extracellular matrix-mediated regulation of normal human melanocyte function. *Pigment Cell Res.* 8, 10–18.
33. Nguyen, T., and Wei, M.L. (2004). – Characterization of melanosomes in murine Hermansky–Pudlak Syndrome: mechanisms of hypopigmentation. *J. Invest. Dermatol.* 122, 452–460.
34. Nicolae I., Anghel A., etc. – Aspecte legate de homeostazia calciului în melanomul malign. *Revista Societății Romane de Dermatologie*, Nr. 2, 2009, 115-119.
35. Nicolae I., Anghel A., etc. – Managementul pacienților cu hipercalcemie tumorală. *Revista Societății Romane de Dermatologie*, Nr. 3, 2009, 161-164.
36. Olivares C, Garcia-Borrón J C, Solano F. – Identification of active site residues involved in metal cofactor binding and stereospecific substrate recognition in Mammalian tyrosinase. Implications to the catalytic cycle. *Biochemistry* 2002; 41: 679–686.
37. Panessa, B.J., and Zadunaisky, J.A. (1981). – Pigment granules: a calcium reservoir in the vertebrate eye. *Exp. Eye Res.* 32, 593–604.
38. Pozzan, T., Rizzuto, R., Volpe, P., and Meldolesi, J. (1994). – Molecular and cellular physiology of intracellular calcium stores. *Physiol.Rev.* 74, 595–636.
39. Ralston SH, Gallacher SJ, Patel U, Campbell J, Boyle IT – Cancer-associated hypercalcemia: Morbidity and mortality-Clinical experience in 126 treated patients. *Ann Intern Med* 1990; 112:499-504.
40. Salceda, R., and Riesgo-Escovar, J.R. (1991). – Characterization of calcium uptake in chick retinal pigment epithelium. *Pigment Cell Res.* 3, 141–145.
41. Salceda, R., and Sanchez-Chavez, G. (2000). – Calcium uptake, release and ryanodine binding in melanosomes from retinal pigment epithelium. *Cell Calcium* 27, 223–229.
42. Schallreuter, K.U., and Wood, J.M. (1999). – The importance of L-phenylalanine transport and its autocrine turnover to L-tyrosine for melanogenesis in human epidermal melanocytes. *Biochem.*
43. Schallreuter K U, Wood J M. – The importance of L-phenylalanine transport and its autocrine turnover to L-tyrosine for melanogenesis in human epidermal melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 262: 423–428.
44. Schallreuter K U, Wazir U, Kothari S, Gibbons N C, Moore J, Wood J M. – Human phenylalanine hydroxylase is activated by H₂O₂: a novel mechanism for increasing the L-tyrosine supply for melanogenesis in melanocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 322: 88–92.
45. Scott, G. (2002). – Rac and Rho: The story behind melanocyte dendrite formation. *Pigment Cell Res.* 15, 322–330.
46. Scott, G., Leopardi, S., Printup, S., and Madden, B.C. (2002). Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J. Cell Sci.* 115, 1441–1451.
47. Seiberg, M., Paine, C., Sharlow, E., Andrade-Gordon, P., Costanzo, M., Eisinger, M., and Shapiro, S.S. (2000). The protease-activated receptor 2 regulates pigmentation via keratinocyte–melanocyte interactions. *Exp. Cell Res.* 254, 25–32.
48. Suva LJ, Winslow GA, Wettenhall REH, et al – A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: Cloning and expression. *Science* 1987; 237: 893-896.
49. Suva LJ, Mather KA, Gillespie MT, et al – Structure of the 5' flanking region of the gene encoding human parathyroid-hormone-related protein (PTHrP). *Gene* 1989; 77: 95-105.
50. Tsien, R.W., and Tsien, R.Y. (1990). – Calcium channels, stores, and oscillations. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 715–760.
51. Valyi-Nagy, I.T., Hirka, G., Jensen, P.J., Shih, I.M., Juhasz, I., and Herlyn, M. (1993). Undifferentiated keratinocytes control growth, morphology, and antigen expression of normal melanocytes through cell-cell contact. *Lab. Invest.* 69, 152–159.
52. Waring, P. (2005). – Redox active calcium ion channels and cell death. *Arch. Biochem. Biophys.* 434, 33–42.
53. Wakamatsu K, Graham A, Cook D, Thody A J. Characterisation of ACTH peptides in human skin and their activation of the melanocortin-1 receptor. *Pigment Cell Res* 1997; 10: 288–297.
54. Wood J M, Schallreuter K U. – Studies on the reactions between human tyrosinase, superoxide anion, hydrogen peroxide and thiols. *Biochim Biophys Acta* 1991; 1074: 378–385.
55. Wood J M, Schallreuter-Wood K U, Lindsey N J, Callaghan S, Gardner L G. – A specific tetrahydrobiopterin binding domain on tyrosinase controls melanogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 206: 480–485.
56. Yasuda T, Banville D, Hendy GN, Goltzman D – Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene-Functional and evolutionary aspects. *J Biol Chem* 1989; 264:7720-7725