

## ОРИГИНАЛНИ СТАТИИ

### САМКII ДЕЛТА СТИМУЛИРА ПРОЛИФЕРАЦИЯТА НА НОРМАЛНИ ЧОВЕШКИ ЕПИДЕРМАЛНИ КЕРАТИНОЦИТИ ЧРЕЗ СТИМУЛИРАНЕ НА ERK1/2 И C-МУС АКТИВНОСТТА

П. Иванова<sup>1</sup>, Ц. Тенчева<sup>2</sup> и В. Митев<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Катедра „Химия и биохимия“, Медицински университет – София

<sup>2</sup>Институт по физиология, БАН – София

### SAMKII DELTA STIMULATES PROLIFERATION OF NORMAL HUMAN EPIDERMAL KERATINOCYTES THROUGH UPREGULATION OF ERK1/2 AND C-MYC ACTIVITY

P. Ivanova<sup>1</sup>, Z. Tencheva<sup>2</sup> and V. Mitev<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department “Chemistry and Biochemistry”, Medical University – Sofia

<sup>2</sup>Institute of Physiology, BAS – Sofia

**Резюме:** Калцият е важен интрацелуларен вторичен посредник, участващ в процеси, стимулирани от растежни фактори и хормони, в регулацията на клетъчния цикъл и генната експресия и много други. Рецептори тирозин кинази и G-протеин-свързани рецептори увеличават интрацелуларните  $Ca^{2+}$  нива чрез продукцията на инозитол-3-фосфат (IP3), който индуцира освобождаване на  $Ca^{2+}$  от ендоплазмения ретикулум чрез IP3 рецептор. Един от ключовите протеини, трансдуциращ сигнал в резултат на увеличен интрацелуларен  $Ca^{2+}$ , е калмодулинът (CaM), който от своя страна активира членовете на CaM киназното семейство. Изненадващо в литературата не съществуват данни за експресията и участието на отделните CaM киназни изоформи в регулацията на различните физиологични процеси в човешки епидермални кератиноцити. Целта на настоящото изследване беше да се установи ролята на  $Ca^{2+}$ /калмодулин-зависимата протеин киназа II  $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) в контрола на автокринната пролиферация на човешките кератиноцити. Получените от нас резултати показаха, че селективното затишаване на CaMKII $\delta$  чрез използването на специфичен антисенс-олигонуклеотид доведе до редуциране на фосфорилирането на ERK1/2, на фосфорилирането и ДНК свързващата активност на c-Мус и до инхибиране на кератиноцитната пролиферация.

**Ключови думи:** CaMKII $\delta$ , ERK1/2, c-Мус, човешки кератиноцити, пролиферация, антисенс-олигонуклеотиди

**Адрес за кореспонденция:** Петя Иванова, Катедра „Химия и биохимия“, Медицински университет, ул. „Здраве“ № 2, 1431 София, тел.: 029172-656, факс: +359-2-9520345, e-mail: pivanova@medfac.acad.bg

**Summary:** Calcium ( $Ca^{2+}$ ) is an important intracellular second messenger in such processes as growth factor and hormone signalling, cell cycle regulation, gene expression, and many others. Receptor tyrosine kinases and G-protein – coupled receptors classically increase  $Ca^{2+}$  levels by producing inositol 3 phosphate (IP3), which induces  $Ca^{2+}$  release from the endoplasmic reticulum via the IP3 receptor. One of the key proteins that transduces a signal in response to increase in intracellular  $Ca^{2+}$  is calmodulin (CaM), which in turn can activate members of CaM kinases family. Surprisingly, there is no data concerning expression and participation of different CaM kinase isoforms in different physiological processes in human epidermal keratinocytes. The aim of this study was to investigate the contribution of  $Ca^{2+}$ /calmodulin-dependent protein kinase II  $\delta$  (CaMKII $\delta$ ) in the control of keratinocyte proliferation. The obtained results showed that knock-down of CaMKII $\delta$ , using antisense oligonucleotide, led to decreased ERK1/2 phosphorylation, c-Myc phosphorylation and DNA-binding activity and inhibition of keratinocyte proliferation.

**Key words:** CaMK, ERK1/2, c-Myc, human keratinocytes, proliferation, antisense oligonucleotides

**Address for correspondence:** Petya Ivanova, Department “Chemistry and Biochemistry”, Medical University, 2 Zdrave str., Bg – 1431 Sofia, tel.: 029172-656, fax: +359-2-9520345, e-mail: pivanova@medfac.acad.bg

## ВЪВЕДЕНИЕ

Калцият е важен за нормалната епидермална диференциация [1, 23]. Култивирани в *in vitro* условия, първичните човешки и миши кератиноцити могат да бъдат индуцирани за диференциация посредством повишаване концентрацията на  $\text{Ca}^{2+}$  в културалната среда [1, 4, 5]. Увеличеният екстрацелуларен  $\text{Ca}^{2+}$  е физиологично значим диференциращ сигнал също *in vivo*, за което свидетелства съществуването на  $\text{Ca}^{2+}$  градиент от базалния към супрабазалните диференциращи слоеве на епидермиса [5, 6]. Увеличеният екстрацелуларен калций взаимодейства с нискоафинитетни трансмембранни калциеви рецептори от клетъчната повърхност и в резултат стимулира активността на фосфолипаза С (ФЛС), обмяната на фосфатидилинозитола и увеличава нивата на диацилглицерола (ДАГ) и инозитол-3-фосфата (ИФ3) в епидермалните кератиноцити. Повишените интрацелуларни нива на ИФ3 на свой ред индуцират бързо увеличение на интрацелуларната калциева концентрация чрез мобилизиране на калция от ендоплазмения ретикулум. Директен инфлукс на екстрацелуларен калций през неспецифични катионни канали също е детектиран, но той вероятно настъпва като сравнително късно събитие, дължащо се на вторично и продължително увеличение на базалните интрацелуларни калциеви нива по време на диференциацията [1]. Повишаването на нивата на вътреклетъчния калций индуцира активирането на множество калций-зависими протеини, като например калций/калмодулин-зависимите кинази и фосфатази [5, 6]. Изненадващо обаче в литературата все още не съществуват данни за експресията и участието на СаМ киназите в регулацията на кератиноцитната пролиферация и/или диференциация.

$\text{Ca}^{2+}$ /СаМ зависимото протеин киназно (СаМК) семейство се състои от мултифункционалните изоформи – СаМКI, II и IV, и от кинази, притежаващи един субстрат – киназа на гликоген фосфорилазата, киназа на леката верига на миозина MLCK и СаМКIII, известна още като Elongation factor-2 kinase. Най-добре характеризираната мултифункционална СаМ киназа е СаМКII. Киназата се кодира от четири различни гена ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  и  $\delta$ ) [8, 11, 21] и в резултат на алтернативен сплайсинг от тези гени се продуцират 24 полипептида. Установено е, че във всеки клетъчен тип се експресира поне една от изоформите на СаМКII. СаМКII представлява хомо-

или хетеромултимер, изграден от 8 до 12 субединици. Някои от сплайс-полипептидите, продуцирани от  $\gamma$ - и  $\delta$ -гените притежават специфична секвенция NLS (nuclear localization sequence), насочваща ензима към ядрото, където съответната киназа участва в регулацията на транскрипцията. Субклетъчната локализация на хетеромултимерите се определя от това, дали по-голямата част от съставлящите ги изоформи са с ядрена, или са с цитоплазмена локализация [8, 11, 21].

Най-често използваните СаМКII инхибитори са KN-62 и по-разтворимият му аналог KN-93. Оригиналната статия, характеризираща двата инхибитора, ги описва като СаМКII специфични. Последващи изследвания обаче демонстрират, че двете вещества инхибират също СаМКI и СаМКIV, и то в концентрации, близки до тези, инхибиращи СаМКII [21]. В допълнение, Kahl и сътр. установяват, че ефектите от използването на KN-93 в човешки диплоидни фибробласти са близки до наблюдаваните при експресията на киназа-дефицитна СаМКI, а не на неактивния СаМКII мутант [19]. В наше предишно изследване установихме, че специфичният СаМ киназен инхибитор KN-62 инхибира активността на митоген-активираната протеин киназа ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) и на транскрипционния фактор с-Мус, предполагайки наличието на функционално взаимодействие между СаМ киназите и ERK1/2 пътя за поддържане на с-Мус активността и кератиноцитната пролиферация [26]. За да проучим дали установените ефекти са следствие от инхибирането на СаМКII, в настоящото изследване приложихме специфичен антисенс-олигонуклеотид за постигане на селективно инхибиране на експресията на СаМКII $\delta$ . Получените резултати показваха, че затишаването на СаМКII $\delta$  води до инхибиране на фосфорилирането на ERK1/2 и фосфорилирането и ДНК свързващата активност на с-Мус, съпроводено с потискане на кератиноцитната пролиферация.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

### Клетъчни култури

Човешките епидермални кератиноцити бяха изолирани от кожни експлантати, получени след пластични операции на лицето и абдомена на здрави пациенти на възраст между 20 и 60 години, както е описано от Coole, Pittelkow и Shipley [3]. Кератиноцитите бяха посети в KGM (Biowhittaker) с гъстота  $5-10 \times 10^3$  клетки/ $\text{cm}^2$ .

Култивирането на първичните епидермални кератиноцити продължи, докато клетките достигнат 80% конfluентност. В този момент първичните култури бяха трипсинизирани и кератиноцитите бяха пасажирани. При достигане на 40% конfluентност клетъчните култури бяха култивирани в KBM-2 кератиноцитна среда, приготвена чрез изключване на суплементите (волски хипофизен екстракт, инсулин, трансферин, епинефрин и EGF) от KGM-2 средата. Всички експерименти в настоящата работа бяха проведени върху автокринни култури от човешки епидермални кератиноцити, 3 пасаж, изолирани от кожни експлантати от различни индивиди.

#### *Транзиторна трансфекция на тимолигонуклеотидите*

Антисенс-олигонуклеотидът за CaMKII $\delta$  5'-GCA GGT GGC GGT GGT CTC CAT-3' и сенсолигонуклеотидът 5'-ATG GAG ACC ACC GCC ACC TGC-3' бяха поръчани от Alpha DNA. Субконfluентни нормални човешки кератиноцити бяха трансфектирани с 10  $\mu$ M сенс- и антисенс-олигонуклеотиди един ден след пресяването им, без използването на трансфектиращи агенти, в KBM-2 за 18 часа.

#### *[<sup>3</sup>H] тимидиново инкорпориране*

Кератиноцитите бяха култивирани в 12-ямкови плаки (Cambrex) с гъстота  $10 \times 10^3$  клетки/ $\text{cm}^2$  един ден преди трансфекцията. Клетките бяха трансфектирани с 10  $\mu$ M сенс- и антисенс-олигонуклеотиди за CaMKII $\delta$  за 18 часа. [<sup>3</sup>H] тимидин (1  $\mu$ Ci/ml) (Amersham) беше добавен през последните 3 часа от трансфекцията. След инкубацията с радиоактивния тимидин средата беше отстранена и клетките бяха промити последователно с леденостудени PBS, 10% трихлороцетна киселина (TCA) двукратно, 5% TCA трикратно и бяха лизирани в 500  $\mu$ l 0.3 N NaOH и 0.1% SDS. Радиоактивността беше измерена в 200  $\mu$ l от всяка проба с помощта на течен сцинтилационен брояч Beckman.

#### *Western blot (имуноблот)*

Лизати от трансфектирани и нетрансфектирани клетки бяха приготвени в Sample Buffer (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 4% SDS, 0.2 M DTT). Протеиновата концентрация беше определена с Bio-Rad DC protein assay (Bio-Rad Laboratories) и равни количества протеин бяха използвани за SDS полиакриламидната гелелектрофореза (PAGE). Електрофоретично разделените белтъци бяха пренесени от гела върху PVDF мембрана (Aplichem). След преноса неспе-

цифичните свързващи места върху мембраната бяха блокирани чрез блокиращ разтвор – 3% BSA в TBS, за 1 час на стайна температура и инкубирани в първичните антители: мише моноклонно анти-p-ERK1 (E-4): sc-7383, заешко поликлонно анти-ERK1 (K-23): sc-94 антители, заешко поликлонно p-c-Мус (Thr58/Ser62)-R: sc-8000-R, и мише моноклонно c-Мус (C-33): sc-42 (Santa Cruz Biotech. Inc.). Блотовете бяха инкубирани във втори пероксидаза-конюгиран антители, козе-антимише и козе-антизаешко IgGs (Santa Cruz Biotech. Inc.). Визуализацията на специфичните белтъчни ивици стана посредством хемилуминесцентен Luminol (Santa Cruz Biotech. Inc.).

#### *Приготвяне на ядрени екстракти и анализ на с-Мус ДНК свързваща активност чрез електрофоретично забавяне в гел (electrophoretic mobility-shift assay, EMSA)*

Ядрените протеини от трансфектираните и нетрансфектираните субконfluентни пролифериращи кератиноцити бяха приготвени, както беше описано по-рано [26]. Двойноверижен ДНК олигонуклеотид, съдържащ Мус-Max-Mad консенсусна секвенция (Santa Cruz Biotech. Inc.), беше белязан крайно с [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP от T4 полинуклеотид киназата. EMSA беше осъществена и свързващата реакция беше проведена на стайна температура за 20 min с 10  $\mu$ g протеин, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM дитиотреитол, 250 mM NaCl и 0.25 mM poly(dI-dC), 20% глицерол и приблизително  $5 \times 10^4$  cpm от <sup>32</sup>P-крайномаркираните двойноверижни олигонуклеотидни проби. Протеин-ДНК комплексите бяха разтворени в неденатуриращ 6% полиакриламиден гел в 0.25 x Tris-borate-EDTA буфер. Геловите бяха изсушени и подложени на автодиография.

#### *Представяне на данните и статистически анализ*

Средната стойност на инкорпорирания [<sup>3</sup>H] тимидин в трансфектираните кератиноцити е представена като относителна стойност спрямо нетрансфектираните клетки. Статистическият анализ беше направен чрез използването на Student's t-test. Статистическата значимост беше определена при P < 0.05\*.

## РЕЗУЛТАТИ

#### *Затишаването на CaMKII $\delta$ инхибира кератиноцитната пролиферация*

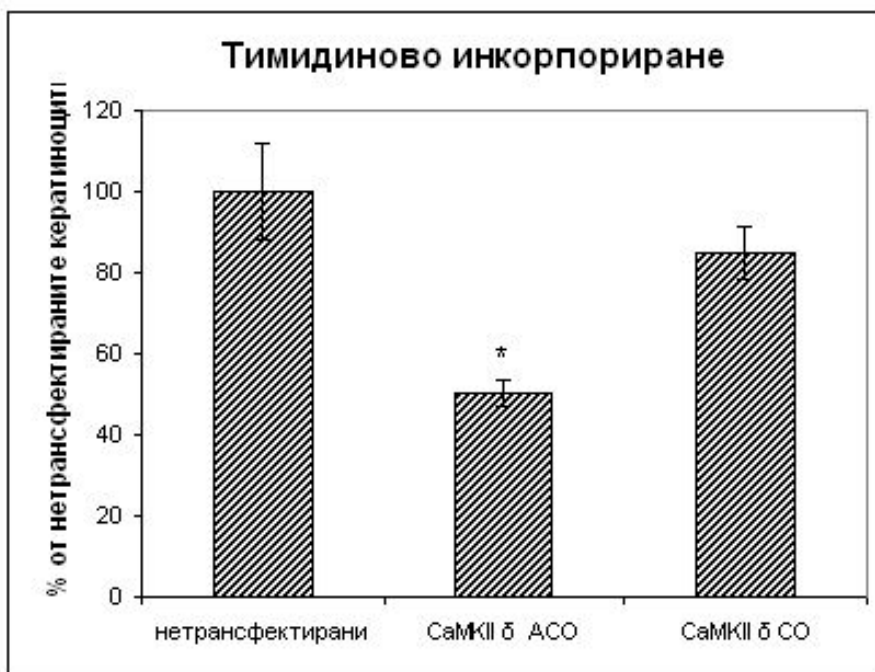
Човешки епидермални кератиноцити бяха трансфектирани с CaMKII $\delta$  антисенс- и сенс-оли-

гонуклеотиди в концентрация 10  $\mu\text{M}$  за 18 часа. Трансфекцията на кератиноцитите с CaMKII $\delta$  антисенс-олигонуклеотид доведе до 50% инхибиране на кератиноцитната пролиферация в сравнение с нетрансфектираните клетки, установено чрез измерване на инкорпорирания в кератиноцитната ДНК радиоактивно белязан тимидин. Инхибирането на кератиноцитната пролиферация при използването на CaMKII $\delta$  антисенс-олигонуклеотид е специфично поради факта, че сенс-олигонуклеотидът не инхибира статистически значимо клетъчната пролиферация – фиг. 1. При наши предишни изследвания използването на специфичния CaM киназен инхибитор KN-62, доведе до значително инхибиране на кератиноцитната пролиферация с 91,6% спрямо нетретираните клетки.

*CaMKII $\delta$  антисенс-олигонуклеотидът редуцира ERK1/2 фосфорилирането в нормални човешки епидермални кератиноцити (НЧЕК)*

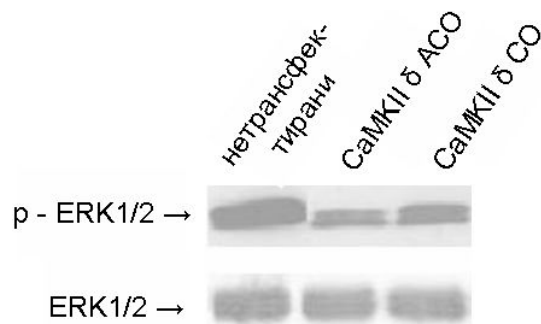
ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases), известна още като класическа митоген-киназна каскада, се експресира в различна степен във

всички тъкани и има важно значение при трансдуцирането на различни екстрацелуларни стимули, водещи до промяна в клетъчната функция. Данните в литературата предполагат участието на ERK в процесите, регулиращи кератиноцитната пролиферация и оцеляване, докато p38, друг член на MAPK (mitogen-activated protein kinases) семейството, участва в регулиране на диференциацията и апоптозата [7, 29]. При предишни наши изследвания, използвайки PD98059, специфичен MEK1/2 инхибитор, установихме силно инхибиране на кератиноцитната пролиферация и значително инхибиране на ERK1/2 фосфорилирането (активността) [26, 27]. Третирането на кератиноцитите с KN-62 почти напълно инхибира ERK1/2 активността. Транзиторната трансфекция на CaMKII $\delta$  антисенс-олигонуклеотид също значително инхибира ERK1/2 фосфорилирането, но в по-малка степен от това, установено при използването на KN-62. За определяне на протеиновото съдържание в пробите детектирахме нивата на ERK1/2 експресията чрез Western blot – фиг. 2.



**Фиг. 1. Затишаването на CaMKII $\delta$  значително намалява ДНК синтеза в нормални човешки епидермални кератиноцити (НЧЕК)**

НЧЕК бяха транзиторно трансфектирани с антисенс (ACO) и сенс (CO) олигонуклеотиди за CaMKII $\delta$ , както е описано в Материали и методи. Три часа преди края на трансфекцията към средата за култивиране беше добавен 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  [ $^3\text{H}$ ] тимидин. Нивата на клетъчната пролиферация бяха определени чрез измерване на радиоактивността на [ $^3\text{H}$ ]-белязания тимидин, инкорпорирани в кератиноцитната ДНК. Три отделни експеримента потвърдиха резултатите. Звездата (\*) показва статистически достоверното инхибиране на пролиферацията при трансфекцията на CaMKII $\delta$  антисенс спрямо трансфектираните със сенс-олигонуклеотид клетки, анализирани със Student's t-test със значимост  $P < 0.05^*$



**Фиг. 2. Затишаването на CaMKII $\delta$  инхибира фосфорилирането на ERK1/2 в НЧЕК**

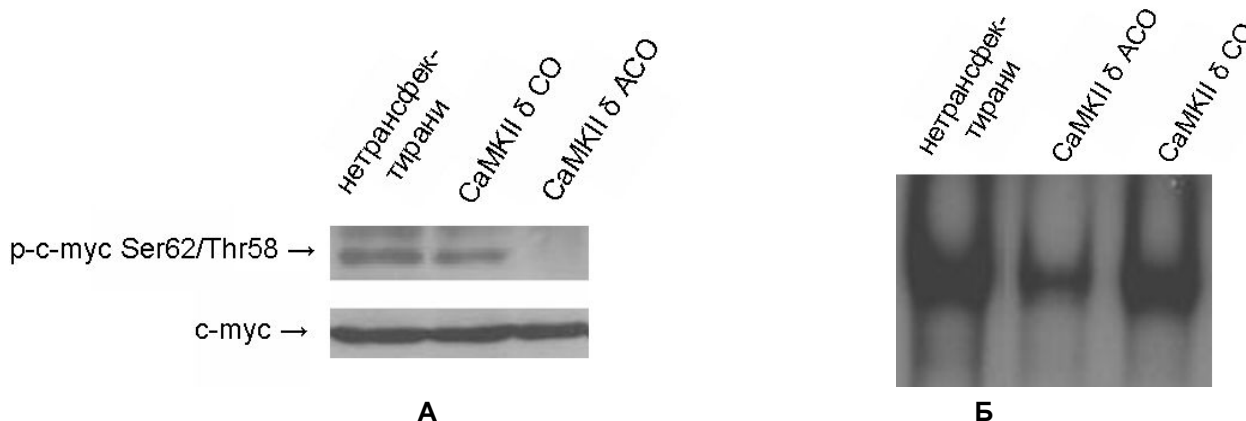
НЧЕК бяха транзитивно трансфектирани с антисенс (ACO) и сенс (CO) олигонуклеотиди за CaMKII $\delta$ , както е описано в Материали и методи. Клетъчните лизати бяха сепарирани чрез SDS-PAGE и нивата на p-ERK1/2 и ERK1/2 тотал бяха установени чрез имуноблот. Три отделни експеримента потвърдиха резултатите.

**Затишаването на CaMKII $\delta$  намалява Тре58/Сер62 фосфорилирането на с-Мус и с-Мус свързващата активност в НЧЕК**

Продуктът на протоонкогена с-Мус участва в регулацията на клетъчното делене, диференциацията и апоптозата. Абнормната му експресия е често срещано събитие при множество човешки неопластични трансформации. Фосфорилирането на Сер62 в с-Мус е отговорно за стабилизирането и акумулирането на Мус, последващо Ras/Raf/MEK/ERK активацията, в няколко различни клетъчни типа [22, 30]. За да установим влиянието на CaMKII $\delta$ -ERK1/2 пътя върху с-Мус транскрипционния фактор, ние анализирахме с-Мус фосфорилирането и експресията, след трансфекцията на CaMKII $\delta$  антисенс-олигонуклеотид, чрез Western blot. Специфичното затишаване на CaMKII $\delta$  доведе до намалено фосфорилиране на с-Мус (Тре58/Сер62) без промяна в експресията на транскрипционния фактор – фиг. 3А, предполагащо участието на CaMKII $\delta$  в регулирането на с-Мус фосфо-

рилирането, индиректно чрез промяна в активността на ERK1/2.

За да установим дали редуцираното Тре58/Сер62 фосфорилиране на с-Мус е свързано с промяна в ДНК свързващата активност на този транскрипционен фактор, приготвихме ядрени екстракти и проведохме електрофоретично забавяне в гел (EMSA). Транзиторната трансфекция на CaMKII $\delta$  антисенс-олигонуклеотида значително редуцира свързването на ядрените екстракти към синтетичния олигонуклеотид, съдържащ Мус/Max/Mad консенсусна секвенция, в сравнение с нетрансфектираните и трансфектираните със сенс-олигонуклеотиди проби – фиг. 3Б. При наши предишни изследвания установихме значително намалено свързване на ядрените екстракти към синтетичния олигонуклеотид в кератиноцити, третирани с инхибиторите KN-62 и PD98059 [26]. Установеното намаление беше в много по-голяма степен, отколкото наблюдаваното при използването на CaMKII $\delta$  антисенс-олигонуклеотида.



**Фиг. 3. Затишаването на CaMKII $\delta$  редуцира Тре58/Сер62 фосфорилирането на с-Мус и с-Мус свързващата активност в НЧЕК**

НЧЕК бяха транзитивно трансфектирани с антисенс (ACO) и сенс (CO) олигонуклеотиди, специфично инхибиращи експресията на CaMKII $\delta$ , както е описано в Материали и методи. **А:** Клетъчните лизати бяха сепарирани чрез SDS-PAGE и чрез имуноблот бяха установени нивата на p-с-Мус и с-Мус експресията. **Б:** EMSA на ядрените екстракти от пролифериращите контролни клетки (1), екстракти от кератиноцити, трансфектирани с антисенс (2) и сенс (3) олигонуклеотиди. Представен е репрезентативен резултат от три експеримента

## ОБСЪЖДАНЕ

Човешките епидермални кератиноцити поддържат своята автокринна пролиферация в отсъствието на екзогенни растежни фактори и достатъчна клетъчна конfluентност (над 40%) [3]. Главните автокринни растежни фактори в този клетъчен модел са представители на EGF (epidermal growth factor) семейството [25], които са лиганди на EGFR (EGF receptor), известен още като HER1 или ErbB1. Активирането на EGFR от няколко лиганда, като EGF (epidermal growth factor), HB-EGF (heparin binding-EGF), Amphiregulin и TGF- $\alpha$  (transforming growth factor- $\alpha$ ), води до хомо- или хетеродимеризиране с други членове на ErbB семейството, което стимулира трансирозиновото фосфорилиране на интрацелуларните С-крайни домени на рецептора. Тези фосфорилирани тирозинови остатъци функционират като свързващи места за множество сигнални молекули и пътища, включително Ras/Raf/MEK/ERK пътя, фосфолипаза С  $\gamma$  (ФЛС $\gamma$ ), SRC, фосфатидилинозитол-3-фосфат (ФИ-3-К), сигнални трансдуктори и активатори на транскрипцията 3 (STAT3) [18]. Така един сигнал или множество сигнали, предадени през един рецептор, могат да генерират едновременно различни вторични посредници.

Калцият е важен интрацелуларен вторичен посредник, участващ в процеси, стимулирани от растежни фактори и хормони, в регулацията на клетъчния цикъл и генната експресия и много други. Интрацелуларната  $Ca^{2+}$  концентрация е около 100 nM – концентрация, приблизително 20 000 пъти по-малка от тази на екстрацелуларния  $Ca^{2+}$ . Различни сигнали стимулират вълни или пикове на увеличен интрацелуларен  $Ca^{2+}$  с концентрации, достигащи 1-2  $\mu$ M. Източникът на увеличаване на  $Ca^{2+}$  зависи от сигнала. Рецептори тирозин кинази, като EGFR, и G-протеин-свързани рецептори увеличават  $Ca^{2+}$  нива чрез продукцията на инозитол-3-фосфат (IP3), който индуцира освобождаване на  $Ca^{2+}$  от ендоплазмения ретикулум чрез IP3 рецептор. Един от ключовите протеини, трансдуциращ сигнал в отговор на увеличен интрацелуларен  $Ca^{2+}$ , е калмодулинът (CaM), който на свой ред активира членовете на CaM киназното семейство [11, 13].

Получените в настоящото изследване резултати показват, че затишаването на CaMKII $\delta$  инхибира ERK1/2 зависимата кератиноцитна пролиферация. В тиреоидни TAD-2 клетки, както и в хепатомната клетъчна линия Hep3B, CaMKII е необходима, но недостатъчна за ERK1/2 сти-

мулираната пролиферация, индуцирана от интегрините, и взаимодействието между двата трансдукционни пътя е на нивото на Raf-1 [15]. Ролята на CaMKII и нейните изоформи е проучена най-добре във VSMCs (vascular smooth muscle cells), вероятно защото тези клетки претърпяват забележителни промени във фенотипа си от диференциращ контрактилен до пролиферативен, в зависимост от източника и динамиката на калциевия сигнал. Тези промени във фенотипа са свързани с патогенезата на атеросклеротичните плаки и други васкуларни заболявания. Наскоро беше доказано, че CaMKII $\delta_2$ , сплайс-вариант на  $\delta$ -гена, медира серум-стимулираната пролиферация на VSM клетки [12]. В същите клетки адхезионнозависимата активация на CaMKII благоприятства ERK1/2 активацията чрез интегрин-зависим и интегрин-независим механизъм, вероятен път за регулиране фокалната динамика на адхезия [20] и участващ в регулацията на гладкомускулната миграция [12]. Получените от нас резултати предполагат, че в нормални човешки кератиноцити трансдукционният път, активиран от членове на EGF семейството/EGFR/PLC $\gamma$ /IP3/ $Ca^{2+}$ /Cam/CaMKII $\delta$ , е вероятен механизъм за регулация на ERK1/2 активността и клетъчната пролиферация, въпреки че са необходими допълнителни изследвания за доказване на тази хипотеза.

Смята се, че основната роля, която с-Мус изпълнява при прогресията на клетъчния цикъл, е като хетеродимерен транскрипционен активатор. Димерализирането му с Max протеина и свързването им към ДНК са необходими събития за осъществяване биологичните ефекти на Мус. За разлика от Мус, Max може също да формира хомо- или хетеродимери със семейство от протеини, наречено Mad, Mxi-1 и Mnt (Rox) [2]. Те могат да инхибират трансактивирането на гени, чиято транскрипция зависи от Мус, чрез хетеродимеризиране с Max, свързвайки се към същите Мус:Max свързващи участъци и блокирайки транскрипцията на тези гени.

С инициране на диференциацията на човешки първични кератиноцити се индуцира експресията на Mad, а експресията на Мус се инхибира, водещо до превключване от с-Мус:Max до Mad:Max хетеродимери. В нормален епидермис и в дебелочревната лигавица експресията на с-Мус е ограничена в пролифериращите клетки, докато Mad се експресира в диференциращите клетки [14]. Според Hashiro и сътр. с-Мус антисенс-олигонуклеотид инхибира клетъчния растеж, но не индуцира диференциация в нормални човешки кератиноцити [10]. В епидермис на

трансгенни мишки, в които експресията на HPV16 E6 и E7 онкогени е прицелна за базалните кератиноцити, настъпва неопластична прогресия, характеризираща се с експанзия на с-Мус експресиращи базалноподобни клетки. Експресия на *mad* е установена само в диференциращи клетки в краищата на пренеопластичните лезии [14]. В друг трансгенен миши модел *ML.myc2*, свързано експресиращ с-Мус в епидермиса, се наблюдава епидермална хиперпролиферация, забавена късна диференциация и проява на значително намалена чувствителност към UV-B индуцирана апоптоза, водещо до удебелен кожен фенотип [31]. От друга страна, в *Myc knockout* миши модел се наблюдава тежка кожна патология – кожата е опъната и нежна, лесно се протрива на местата на механично триене и проявява нарушено заздравяване. Епидермисът е изтънен със загуба на пролиферативния компартмент и преждевременна диференциация. Размерът на кератиноцитите, растежът и ендорепликацията са редуцирани, а пролиферацията на стволовите епидермални клетки е нарушена [33].

Друг, на пръв поглед противоположен резултат също беше публикуван и той предполага, че конститутивната експресия на с-Мус стимулира късната кератиноцитна диференциация чрез деплетирание на стволовите клетки и превръщането им в транзиторно пролифериращи клетки [32]. В базалния епидермален слой са разположени два клетъчни типа – дялящите се клетки, способни да регенерират епидермиса, съответстващи на стволови клетки, и транзиторно пролифериращи клетки, притежаващи ограничен пролиферативен потенциал (от три до пет деления) и възможност за диференциация [9, 32]. Според авторите продължителната активация на с-Мус стимулира кератиноцитната ендорепликация, иницира кератиноцитната късна диференциация, предшестваща ареста на клетъчния цикъл, водещо до цикли от ДНК репликация без завършване на митозата и акумулирането на кератиноцитите в G2/M фаза. В резултат се увеличава полиплоидността – ендомитоза, последвана от появата на мултинуклеарни клетки и увеличение на клетъчните размери [9].

Противоречията в литературата, свързани с ролята на този транскрипционен фактор в процесите, регулиращи кератиноцитната пролиферация и диференциация, ни мотивираха да изследваме ролята на с-Мус в СаМКII $\delta$  зависимата ERK1/2 активност, свързана с кератиноцитната пролиферация в модела на автокринно пролифериращи кератиноцити (наподобяващ базалните епидермални кератиноцити). Получените

резултати показват, че СаМКII $\delta$ /ERK1/2 зависимата кератиноцитна пролиферация се осъществява чрез фосфорилиране на с-Мус на Тре58/Сер62, стимулиращо с-Мус свързващата активност. Стимулирането на активността на този транскрипционен фактор потвърждава пролиферативното му действие, установено и в наши предишни изследвания [24, 26, 28].

В заключение, резултатите от това изследване ни дават основание да предположим, че СаМКII $\delta$  сигналният път се активира паралелно с други сигнални пътища, като PKC $\mu$ , известна още като PKD1, вероятно PKC $\alpha$  [27, 33], ODC [28] и SK-2 [16], от автокринните растежни фактори, регулиращи ERK1/2 активността и кератиноцитната пролиферация. Резултатите са аналогични на тези, получени от СаМ киназия инхибитор KN-62, но степента на редуциране на ERK1/2 и с-Мус активността при използването на антисенс-олигонуклеотид е по-ниска. Това предполага, че човешките кератиноцити вероятно експресират други изоформи на СаМКII, подобно на VSMC клетките [12], или дори други СаМК изоформи, свързани с регулация на кератиноцитната пролиферация.

*Благодарности:*

*Това изследване беше финансирано от МОН – Грант № ВУ-Б 03-2005, и от Грант на МУ – София.*

## БИБЛИОГРАФИЯ

1. Bickle, D. D. et al. Changes in calcium responsiveness and handling during keratinocyte differentiation. – *J. Clin. Invest.*, **97**, 1996, № 4, 1085-1093.
2. Bouchard, C., P. Staller et M. Eilers. Control of cell proliferation by Myc. – *Trends Cell Biol.*, **8**, 1998, 202-206.
3. Cook, P. W., M. R. Pittelkow et G. D. Shipley. Growth factor-independent proliferation of normal human neonatal keratinocytes: production of autocrine- and paracrine-acting mitogenic factors. – *J. Cell Physiol.*, **146**, 1991, 277-289.
4. Deucher, A., T. Efimova et R. L. Eckert. Calcium-dependent involucrin expression inversely regulated by protein kinase C (PKC) $\alpha$  and PKC $\delta$ . – *J. Biol. Chem.*, **277**, 2002, № 1, 17032-17040.
5. Dotto, G. P. Signal transduction pathways controlling the switch between keratinocyte growth and differentiation. – *Crit. Rev. Oral Biol. M.*, **10**, 1999, № 4, 442-457.
6. Dotto, P. The keratinocyte growth-differentiation switch. – *Front Biosci.*, **3**, 1998, № 3, 502-509.
7. Eckert, R. et al. Keratinocyte survival, differentiation, and death: many roads lead to Mitogen-activated protein kinase. – *J. Invest. Dermatol.*, **7**, 2002, 36-40.
8. Fujisawa, H. Regulation of the activities of multifunctional Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinases. – *J. Biochem.*, **129**, 2001, № 2, 193-199.
9. Gandarillas, A., D. Davies et J. M. Blanchard. Normal and c-Myc-promoted human keratinocyte differentiation both occur via a novel cell cycle involving cellular growth and endoreplication. – *Oncogene*, **19**, 2000, 3278-3289.

10. Hashiro, M. et al. Growth inhibition of human keratinocytes by antisense c-Myc oligomer is not coupled to induction of differentiation. – *BBRC*, **174**, 1991, № 1, 287-292.
11. Hook, S. S. et A. R. Means. Ca<sup>2+</sup>/CaM-dependent kinases: from activation to function. – *Annu. Rev. Pharmacol. Tox.*, **41**, 2001, 471-505.
12. House, S. J. et al. Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II- $\delta$  isoform regulation of vascular smooth muscle cell proliferation. – *J. Physiol. Cell Ph.*, **292**, 2007, 2276-2287.
13. Hudson, A. et H. Schulman. Neuronal Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-dependent protein kinase II: The role of structure and auto-regulation in cellular function. – *Annu. Rev. Biochem.*, **71**, 2002, 473-510.
14. Hurlin, P. J. et al. Regulation of Myc and Mad during epidermal differentiation and HPV-associated tumorigenesis. – *Oncogene*, **11**, 1995, № 12, 2487-2501.
15. Illario, M. et al. Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase II binds to Raf-1 and modulates integrin-stimulated ERK activation. – *J. Biol. Chem.*, **278**, 2003, № 46, 45101-45108.
16. Isaeva, A., G. Atanasova et V. Mitev. Inhibition of CK2 activity provokes opposite effects on ERK1/2 phosphorylation and p38 MAPK phosphorylation in normal human keratinocytes. – *Comptes Rendus Bulg. Acad. Sci.*, **60**, 2007, № 8, 909-912.
17. Ivanova, P. et al. Knock-down of PKD1 in normal human epidermal keratinocytes increases mRNA expression of Keratin 10 and Involucrin – early markers of keratinocyte differentiation. – *Arch. Dermatol. Res.*, 2007; in press.
18. Jost, M. et al. Epidermal Growth Factor Receptor-dependent control of keratinocyte survival and Bcl-xL expression through a MEK-dependent pathway. – *J. Biol. Chem.*, **276**, 2001, № 9, 6320-6326.
19. Kahl, C. R. et A. R. Means. Regulation of Cyclin D1/Cdk4 complexes by Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase I. – *J. Biol. Chem.*, **279**, 2004, № 9, 15411-15419.
20. Lu, K. K. et al. Adhesion-dependent activation of CaMKII and regulation of ERK activation in vascular smooth muscle. – *Am. J. Physiol. Cell Ph.*, **289**, 2005, 1343-1350.
21. Means, A. R. Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. – *Mol. Endocrinol.*, **14**, 2000, № 1, 4-13.
22. Murphy, L. O., J. P. MacKeigan et J. Blenis. A network of immediate early gene products propagates subtle differences in Mitogen-activated protein kinase signal amplitude and duration. – *Mol. Cell Biol.*, **24**, 2004, № 1, 144-153.
23. Ng, C. D. et al. Regulation of involucrin gene expression by calcium in normal human keratinocytes. – *Front Biosci.*, **1**, 1996, 16-24.
24. Nikolova, E. Et al. The inhibition of the expression of the small Rho GTPases Rac1, induces differentiation with no effect on cell proliferation in growing adult keratinocytes. – *J. Cell Biochem.*, **103**, 2008, № 3, 857-864.
25. Piepkorn, M., M. R. Pittelkow et P. W. Cook. Autocrine regulation of keratinocytes: the emerging role of heparin-binding, epidermal growth factor-related growth factors. – *J. Invest. Dermatol.*, **111**, 1998, 715-721.
26. Prasova, M. et al. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (CaM-kinase) inhibitor KN-62 suppresses the activity of mitogen-activated protein kinase (MAPK), c-Myc activation and human keratinocyte proliferation. – *Arch. Dermatol. Res.*, **294**, 2002, 198-202.
27. Praskova, M, et al. The ornithine decarboxylase inhibitor, difluoromethylornithine, inhibits casein kinase II activity, c-Myc expression and normal human keratinocyte proliferation. – *Arch. Dermatol. Res.*, **293**, 2002, 590-593.
28. Praskova, M. et al. Dual role of protein kinase C on mitogen-activated protein kinase activation and human keratinocyte proliferation. – *Exp. Dermatol.*, **11**, 2002, № 4, 344-348.
29. Roux, P. P. et J. Blenis. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. – *Microbiol Mol Biol Rev.*, **68**, 2004, № 2, 320-344.
30. Sears, R. et al. Multiple Ras-dependent phosphorylation pathways regulate Myc protein stability. – *Genes Dev.*, **14**, 2000, 2501-2514.
31. Wakeel, R. L., X. J. Wang et D. R. Roop. Targeted expression of c-Myc in the epidermis alters normal proliferation, differentiation and UV-B induced apoptosis. – *Oncogene*, **18**, 1999, 4870-4878.
32. Watt, F. M. Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. – *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.*, **353**, 1998, 831-837.
33. Zanet, J. et al. Endogenous Myc controls mammalian epidermal cell size, hyperproliferation, endoreplication and stem cell amplification. – *J. Cell Sci.*, **118**, 2005, 1693-1704.

Постъпила – 5 ноември 2007 г.