

МЕДИЦИНСКИ УНИВЕРСИТЕТ – СОФИЯ
КАТЕДРА МЕДИЦИНСКА ХИМИЯ И БИОХИМИЯ

Силвия Георгиева Календерова-Вълкова

Роля на Ca^{2+} / калмодулин зависимата протеин киназа II
в пролиферацията и апоптозата на нормални и малигнени човешки
епидермални кератиноцити

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен „Доктор“

Научен ръководител:
Акад. проф. д-р Ваньо Митев, дбн

Дисертационният труд съдържа 108 страници и е онагледен с 18 фигури и 3 таблици. Библиографският списък съдържа 256 литературни източници, всички на латиница.

Дисертационният труд е обсъден и насочен за публична защита от катедрен съвет на Катедрата по Медицинска химия и биохимия при Медицински факултет на Медицински университет, София на 11.10.2018г. (Протокол №364).

Публичната защита на дисертационния труд ще се състои на 28.11.2018г. от в МБК на Медицински факултет, Медицински университет, София, ул.“Здраве“ 2, съобразено със Заповед на ректора № РК36-2537/24.10.2018г. пред научно жури в състав:

Председател:

1. Акад.проф.д-р Ваньо Иванов Митев дм.дбн -вътрешен член за МУ-София, Катедра Медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София, научен ръководител (становище).
2. Чл.-кор.проф.д-р Иван Гергов Митов дм.дмн - вътрешен член за МУ-София, Катедра по Медицинска микробиология на Медицински факултет при МУ-София (рецензия).
3. Акад.проф. Иван Георгиев Иванов дбн –външен член за МУ-София, Институт по молекулярна биология „Акад. Р. Цанев“ на БАН (становище).
- 4.Чл.-кор.проф. Румен Георгиев Панков дбн -външен член за МУ-София, Биологически факултет на Софийски университет “Св.Климент Охридски“(рецензия).
5. Проф. Татяна Иванова Влайкова дб - външен член за МУ-София, Медицински факултет при Тракийски университет- Стара Загора (становище).

Резервни членове:

1. Доц. Мария Димитрова Драгнева –вътрешен резервен член за МУ-София, Катедра Медицинска химия и биохимия на Медицински факултет при МУ-София
2. Проф. Ана Иванова Манева дбн-външен резервен член за МУ-София, Катедра химия и биохимия на Фармацевтичен факултет при МУ-Пловдив

Съдържание

1. Въведение	5
2. Цел и задачи	7
3. Материали и методи	8
4. Резултати и обсъждане	9
5. Заключение	26
6. Изводи	29
7. Приноси	29
8. Литература	30
9. Публикации във връзка с дисертационния труд	32

Съкращения

CaMKII	Ca ²⁺ / калмодулин зависима киназа
MAPK	митоген активирана протеин киназа
PI-3-K	фосфатидилинозитол-3-киназа
TNF	тумор некрозис фактор
JAK	Janus kinase
STAT	signal transducers and activators of transcription

1. Въведение

СаМКII е изолирана за първи път през 1980 г. чрез гел филтрация на калмодулин-зависими протеин кинази от предната част на мозък на плъх (1). Малко след това е пречистена чрез хроматография и нейните молекулни и каталитични свойства започват да се проучват много интензивно (2). През 2000 г. е описана структурата на активната форма на α СаМКII, чрез използването на крио-електронна микрография (3). СаМКII е от групата на мултифункционалните Ca^{2+} /калмодулин зависими Сер/Тре протеин кинази, която играе ключова роля в провеждането на вътреклетъчните калциеви сигнали към различни субстрати надолу по веригата. Тя е уникална сред останалите кинази, тъй като е известно, че отговаря не само на силата на сигнала за активиране, но и на неговата честота. СаМКII е най-добре характеризирания СаМ киназа. Има четири изоформи- α , β , γ и δ , които са продукти на различни гени (4). Поради малки различия в първичната им структура и в резултат на алтернативен сплайсинг тези протеини варират в големината си. Първите два изоензима (α и β) са специфични за мозъка и заедно съставляват приблизително 1% от общия протеин в него (5). Другите два изоензима (γ и δ) се експресират в много по-малки концентрации в различни тъкани и органи. Установено е, че във всеки клетъчен тип се експресира поне една от изоформите.

СаМКII е изградена от 8-12 субединици, най-често 12 (додекамер) (6). Всички изоформи притежават еднаква структура на субединиците. В NH_2 -края е разположен силно консервативен каталитичен домен, следван от регулаторен домен и С-краен свързващ домен, необходим за сглобяване на СаМКII холоензима в комплекс от дванадесет субединици (7-10). Предполага се, че основната функция на СаМКII холоензимът е да отговори на честите Ca^{2+} сигнали, чрез увеличена киназна активност. N-крайният каталитичен домен има двуделна структура, съдържащ АТФ-свързващ и по-голям субстрат-свързващ домен. В регулаторният участък са разположени автоинхибиращи и СаМ-свързващи последователности, както и Ca^{2+} /СаМ-зависими и Ca^{2+} -независими автофосфорилиращи се места на Тре²⁸⁶ (11, 12). Фосфорилирането на това място генерира Ca^{2+} /СаМ -независима или автономна дейност, а също така увеличава многократно афинитета на СаМКII за Ca^{2+} /СаМ известен като "СаМ- trapping". Двата ефекта заедно позволяват на киназата да остане

активирана и в отсъствието на Ca^{2+} . Два съседни остатъка в областта на СаМ-свързващия участък (Тре³⁰⁵ и Тре³⁰⁶) също могат да се автофосфорилират и това предотвратява свързването на $\text{Ca}^{2+}/\text{СаМ}$, което не води до блокиране на автономната активност на СаМКII ако Тре²⁸⁶ е фосфорилиран преди Тре^{305/306}, което прави реда на фосфорилиране критичен в регулирането на активността на СаМКII (13-16). Различията между отделните изоформи на СаМКII са във вариабилните участъци, разположени в свързващия домен на С-края и са получени в резултат на алтернативен сплайсинг.

В последните няколко години беше описан и друг начин на активиране на СаМКII. Това се получава чрез окисление на аминокиселината Метионин (Мет) и се очертава като функционално значима посттранслационна модификация.

СаМКII е разтворим и широко разпространен във всички клетки ензим, но по-късно са открити и отделни по-специфични форми. Локализирането на сигнални ензими близо до техните субстрати има важни регулаторни последствия (17), особено за ензими с широка специфичност като СаМКII. По тази причина, механизмите за клетъчната локализация на СаМКII и физиологичните функции на този ензим са интензивно проучвани.

От използваните в лабораторната практика модели на кератиноцити, за нашето изследване ние се спряхме на модела на автокринно пролифериращи човешки епидермални кератиноцити, който много сполучливо наподобява дялящите се кератиноцити от базалния слой на епидермиса *in vivo*.

СаМ-киназната сигнална каскада въобще не е изследвана в кератиноцити. Ние решихме да проучим ролята ѝ в пролиферацията на епидермалните клетки и евентуалното ѝ взаимодействие с МАРК, тъй като съществуват данни в литературата, които доказват подобно взаимодействие в други клетъчни типове.

За ролята на с-Мус в кератиноцитната пролиферация има противоречиви данни. Нашата цел бе да установим евентуална връзка между гореспоменатата киназа и експресията, фосфорилирането и активирането на с-Мус.

Тъй като в литературата няма данни за участието на PI3-K и JAK2/STAT трансдукционните пътища, ние тествахме ролята им в деленето на епидермалните кератиноцити, като използвахме селективни за тях инхибитори.

През последните години CaMKII предизвиква все по-голям интерес и във връзка с участието ѝ в процеса на програмирана клетъчна смърт, особено при нормални и трансформирани невронални, сърдечни и панкреатични клетки, както и в ракови клетки (18). Има данни и за проапоптотичната роля на CaMKII при апоптоза, индуцирана от тумор некротичен фактор (TNF α) и УВ- радиация, като и двата стимула повишават калмодулин независимата активност на киназата (19). Въпреки това ролята на CaMKII в апоптозата на кожни епителни клетки и по-специално на епидермоидна карциномна клетъчна линия A431 не е изследвана по-рано.

По-задълбоченото познаване на тази киназа, участваща в клетъчния цикъл на епидермалните кератиноцити е важно, както във фундаментален аспект за изясняването на механизмите на този процес, така и в приложен план при избора на подходи при лечението на кожните заболявания.

В такава посока бяха формулирани целите и задачите на настоящото изследване.

2. Цел и задачи

2.1. Цел

Целта на настоящата работа е да се изследва участието на Ca²⁺/калмодулин зависимата протеин киназа в клетъчния цикъл на човешки епидермални кератиноцити.

2.2. Задачи

Задачите, произтичащи от набелязаната цел бяха:

2.2.1. С помощта на специфични киназни инхибитори да се установи участието на CaM-киназната сигнална каскада в пролиферацията на епидермалните клетки.

2.2.2. Да се изследва активността на MAPK каскада и евентуалното и взаимодействие с CaM-киназите и други сигнални молекули (PI 3-K и JAK2/STAT) в поддържането на кератиноцитната пролиферация.

2.2.3. Да се изследва експресията, статуса на фосфорилиране и транскрипционната активност на с-Мус, под действието на специфични киназни инхибитори.

2.2.4. Да се установи ролята на CaMKII в пролиферацията на човешки епидермални кератиноцити, чрез прилагането на специфичен антисенс-олигонуклеотид за постигане на селективно инхибиране.

2.2.5. Да се изследва активността на MAPK каскадата, чрез селективно инхибиране с CaMKII антисенс олигонуклеотид.

2.2.6. Да се изследва фосфорилирането и транскрипционната активност на с-Мус при специфично инхибиране на експресията на CaMKII с антисенс олигонуклеотид.

2.2.7. Да се изследва апоптотичния статус на човешките епидермални кератиноцити под влияние на UV светлина, за да се установи участието на CaMKII в този процес.

3. Материали и методи

Култивиране на кератиноцити

- Получаване на първични култури от човешки епидермални кератиноцити.
- Пресяване на кератиноцитна култура

Включване на [³H]-тимидин

Имуноблот (Western blot) анализ на кератиноцитни лизати

- Приготвяне на белтъчни екстракти
- Денатурираща полиакриламидна гел електрофореза (SDS-PAGE).
- Имуноблот

Изследване на протеинкиназна активност

- Киназен тест за определяне на MAPK активност

Анализ на с-Мус ДНК-свързващата активност чрез електрофоретично забавяне в гел (Electrophoretic mobility shift assays -EMSA).

- Екстракция на ДНК-свързващи белтъци

- Фосфорилиране и анализ на консенсус олигонуклеотиди
- Реакции на свързване и анализ на специфичното свързване

Високо-ефективна течна хроматография (HPLC)

- Метод за каспазен анализ

Статистически анализ

- t-Тест на Student: two-sample assuming equal variances при степен на значимост $<0,05$

4. Резултати и Обсъждане

4.1. Роля на СаМ-киназите, PI 3-K и JAK2/STAT в пролиферацията на епидермалните кератинцити.

4.1.1. Изследване на ефекта на инхибиране на СаМ-киназите, PI 3-K и JAK2/STAT върху включването на радиоактивен предшественик в ДНК на кератиноцити.

Въведение

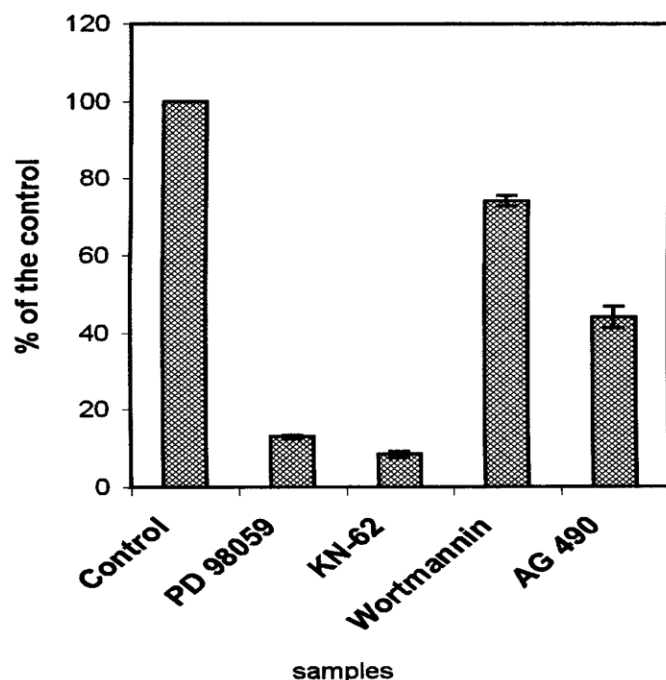
СаМ-киназната сигнална каскада въобще не беше изследвана в кератиноцити. Анализирайки литературните данни, ние решихме да установим ролята ѝ в пролиферацията на епидермалните клетки и евентуалното ѝ взаимодействие с MAPK, тъй като е доказано подобно взаимодействие в други клетъчни типове.

JAK/STAT трансдукционният път е известен като най-прекият път за предаване на информация от клетъчната мембрана до ядрото. Този механизъм е известен за суперсемејството на цитокиновите рецептори, които не притежават киназна активност. Цитозолният домен на тези рецептори разпознава и активира протеин тирозин кинази от JAK семејството, което включва JAK1, JAK2, JAK3 и TYK2 киназите. Активираните JAK стимулират чрез тирозиново фосфорилиране клас транскрипционни фактори, наречени STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription), които се пренасят в ядрото и участват в регулацията на транскрипцията на прицелни гени. Досега са идентифицирани шест белтъка от STAT семејството - от STAT1 до STAT6. Цитокините са голямо семејство извънклетъчни медиатори, в това число интерлевкини (IL), колония-стимулиращи фактори (CSF), интерферони (INF), тумор некрозис фактори (TNF), хемокини, растежни фактори. Техните

биологични ефекти са разнообразни в зависимост от типа клетки, върху които действат. Епидермалните кератиноцити в норма произвеждат множество цитокини, чийто брой нараства при възпалителни процеси, механични наранявания на епидермиса, облъчване с UV светлина, бактериални ендотоксини, форболови естери, детергенти, алергени, осмотичен стрес и др. Съществуват убедителни доказателства за важната роля на цитокините в пролиферацията на нормални и псориаитични кератиноцити. Същевременно много малко е известно по отношение на участието на JAK/STAT сигналния път в регулацията на кератиноцитната пролиферация и диференцировка. Установено е активиране на STAT3 по време на деленето и индукцията на диференцировка на миши кератиноцити. Чрез прилагането на имунохистохимични методи е изследвано разпределението на отделните членове на JAK/STAT пътя в човешкия епидермис. Всеки елемент от тази каскада се характеризира със специфична експресия в различните слоеве на епидермиса, което предполага специфичното им участие в различните етапи от диференцировка на кератиноцитите.

PI 3-киназите са семейство от свързани вътреклетъчни сигнални ензими, способни да фосфорилират трите хидроксилни групи на инозитоловия пръстен на фосфатидилинозитола (PtdIns). Семейството на фосфатидилинозитол-3-киназите включва четири различни класа: Клас I, Клас II, Клас III и Клас IV. Класификацията се основава на първичната структура, регулацията и спецификата на липидните субстрати. PI 3-киназите са свързани с извънредно разнообразни клетъчни функции, включително клетъчен растеж, пролиферация, диференциация, подвижност, оцеляване и вътреклетъчен трафик.

Целта на този експеримент беше да се установи дали преносът на сигнали от трансдукционните пътища на CaM-киназите и някои други ключови сигнални молекули като PI 3-K и JAK2/STAT участват в поддържането на кератиноцитната пролиферация. Затова третирахме субконфлуентни пролифериращи кератиноцити с 5 μ M KN-62 (инхибитор на CaM-киназите), 50 nM Wortmannin (инхибитор на PI 3-K) и 5 μ M AG 490 (инхибитор на JAK2) за 18 часа.



Фиг.1. Ефект на инхибиторите на СаМ-киназите, PI 3-К и JAK2/STAT върху пролиферацията на кератиноцити. Резултатите са представени като проценти от количеството [^3H] тимидин, включен в ДНК на нетретираните контролни клетки. Със скоби е обозначено стандартното отклонение на измерените стойности на три повторения на експеримента, $P < 0.05$.

За положителна контрола на опита използвахме клетки, третирани с инхибитора на MAPK в 40 μM концентрация. В последните два часа от третирането към средата за култивиране добавихме [^3H] тимидин, след което измерихме включването на радиоактивния предшественик в ДНК.

Използването на инхибитора на СаМ киназите - KN-62 значително инхибира включването на [^3H] тимидин в ДНК на кератиноцитите (8.4% от инкорпорирания в пролифериращите контролни клетки [^3H] тимидин). В сравнение с този силен ефект на потискане на KN-62, AG490 Wortmannin показаха по умерен ефект на въздействие върху кератиноцитната пролиферация – съответно 44% и 74% от инкорпорирания в пролифериращите контролни клетки [^3H] тимидин (фиг. 1).

4.1.2. Изследване на ефекта на инхибиране на СаМ-киназите, PI 3-K и JAK2/STAT върху активността на MAPK

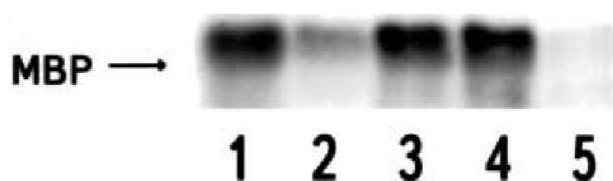
Въведение

Митоген-активираната протеин киназна (mitogen-activated protein kinase, MAPK) каскада се състои от последователно активиращи се от горностояща серин/треонин протеин кинази, в резултат на което се провеждат сигнали, постъпващи от трансмембрано разположени рецептори и/или от други сигнални пътища. Каскадата е наименована на MAPK суперфамилия, чиито членове са последното стъпало, което се активира. Активните MAPK фосфорилират различни прицелни белтъци, които са предимно транскрипционни фактори и така регулират генната експресия. Членовете на MAPK суперфамилия се групират в три класа:

1. p44 MAPK и p42 MAPK, наречени също ERK1 и ERK2, изграждат един от основните трансдукционни пътища за провеждане на митогенни сигнали в значителна част от клетъчните типове;
2. JNK1, -2, -3, наречени също SAPK γ , SAPK α и SAPK β , участват основно във функционирането на имунната система, в стрес-индуцираната апоптоза и програмирана клетъчна смърт;
3. p38 MAPK се активира от осмотичен и топлинен шок, както и от други стрес фактори. В кератиноцитите се експресират 3 изоформи на p38 MAPK – p38 α , p38 β и p38 δ , които се активират от пролиференциращи сигнали и участват в регулацията на прехода от пролиферация към кератиноцитна диференциация и в поддържането на диференциацията.

За да разберем по-добре как се повлиява пролиферацията на кератиноцитите след инхибиране на СаМ-киназите, PI 3-K и JAK2/STAT, ние изследвахме активността на MAPK, която както вече установихме при предишни наши изследвания е пряко свързана с тези процеси, в кератиноцити, третирани със съответните специфични инхибитори. Проведохме *in vitro* киназен тест с имунни комплекси, съдържащи преципитираната активна форма на MAPK. Кератиноцитите бяха инкубирани с 5 μ M KN-62, 5 μ M AG490, 50 nM Wortmannin и 40 μ M PD98059 в продължение на 18 часа преди началото на *in vitro* киназия тест. Клетъчните лизати бяха приготвени от третираните и от контролни нетретирани клетки. Активните фосфорилирани

ERK ½ форми бяха преципитирани с моноклонално анти-p-ERK антитель-агарозен конюгат. Имунните комплекси бяха ресуспендирани в киназен буфер, съдържащ 1 μCi [γ - ^{32}P] АТР и миелин базичен протеин (МВР), като субстрат на киназната реакция и нкубирани на 30 °С за 20 мин. Пробите бяха анализирани чрез 12 % SDS-полиакриламидна гел електрофореза и активността на ERK ½ бе определена посредством автордиография на фосфорилирания МВР. Експериментът бе проведен трикратно. На фигура 2 са представени ивиците, представляващи фосфорилирания MAPK субстрат.



Фиг. 2. Инхибиране на активността на p44/p42 MAPK след третиране на кератиноцитите с инхибитора на СаМ-киназите KN-62. Пробите са както следва: Нетретиран контролни клетки (пътека 1), 40 μM PD98059 (пътека 2), 50 nM Wortmannin (пътека 3), 5 μM AG490 (пътека 4) и 5 μM KN-62 (пътека 5).

На фигурата са представени ивиците, представляващи фосфорилирания MAPK субстрат.

Ние установихме почти пълно инхибиране на активността на MAPK след третирането на кератиноцитите с инхибитора на СаМ-киназите KN-62 в сравнение с нетретираните контролни клетки, характеризиращи се с отчетлива MAPK активност. В контраст със силния инхибиращ ефект на KN-62, активността на MAPK остана непроменена след тренирането на клетките с Wortmannin и AG490 (фиг.2).

4.1.3. Изследване на експресията на с-Мус в кератиноцити, третиран с инхибитори на СаМ-киназите, PI 3-K и JAK/STAT

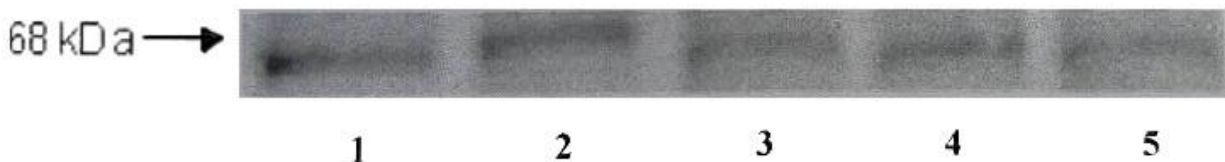
Въведение

c-Myc е част от bHLH-Zip (basic helix-loop-helix) семейството на ДНК-свързващи белтъци и повлиява транскрипцията, като образува хетеродимери с Max, който е друг член на същото семейство. Транскрипционно-компетентните c-Myc/Max хетеродимери са активната форма на c-Myc, която се свързва със специфична ДНК консенсусна секвенция-CACGTG (наричана E-box) и активира транскрипцията на прицелните гени. Семейството на E2F транскрипционните фактори контролират генната експресия на c-Myc. Пост-транскрипционната регулация на c-Myc включва фосфорилирането му от множество кинази, сред които и MAPKs .

c-Myc е добре известен *транс*-активатор на редица гени, сред които *E2f1* и *Odc* .

Тъй като третирането на кератиноцитите с инхибитора на CaM-киназите доведе до много силно инхибиране на деленето им, ние решихме да изследваме евентуалното повлияване на експресията на c-Myc в тези условия, както и след инхибирането на PI3K и JAK2, поради установената корелация между функциите на този транскрипционен фактор и кератиноцитната пролиферация.

Въпреки че, инхибиторът на CaM-киназите имаше силно изразен подтискащ ефект върху деленето на клетките, неговото действие не доведе до понижение на експресията на c-Myc (фиг.3). Не бе установена разлика в белтъчните нива на този транскрипционен фактор и след третирането на клетките с инхибиторите на PI 3-K и JAK2 – Wortmannin и AG490 съответно (фиг.3).



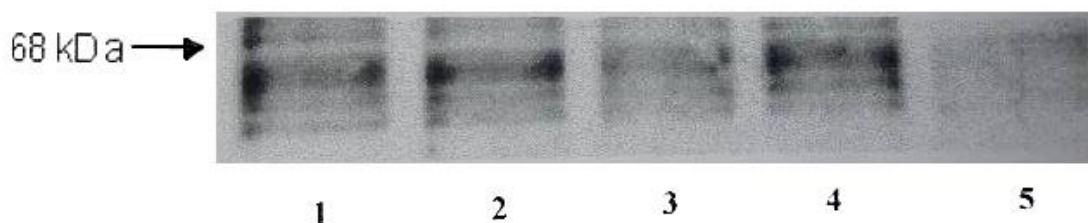
Фиг.3. Western-blot анализ на експресията на c-Myc в третиран с специфични за CaM-киназите, PI 3-K и JAK2 /STAT инхибитори кератиноцити. Белтъчни проби от тотални

клетъчни лизати на контролни клетки (пътека 1) или третирани с 40 μ M PD98059 (пътека 2), 5 μ M KN-62 (пътека 3), 5 μ M AG490 (пътека 4) и 50 nM Wortmannin (пътека 5) бяха анализирани посредством имуноблот с анти-с-Мус антитяло. Стрелката показва мястото на белтъчен маркер с молекулно тегло 68 kDa (GibcoBRL high range prestained protein molecular weight standatrs).

4.1.4. Имуноблот на p-с-Мус в кератиноцити, третирани с инхибитори на СаМ-киназите PI 3-K и JAK2 /STAT

След като не установихме повлияване на експресията на с-Мус след инхибирането на СаМ-киназите PI 3-K и JAK2 /STAT в кератиноцити, ние решихме да изследваме степента на фосфорилиране на този белтък чрез имуноблот с антифосфор-Тре-⁵⁸/Сер-⁶² с-Мус антитяло, тъй като е известно, че функционирането на този транскрипционен фактор е пряко зависимо от фосфорилирането му в този участък.

Резултатите от имублота показаха ясно забележими ивици от фосфорилиран с-Мус в контролните проби и в тези, третирани с KN-62 и Wortmannin (фиг.4). Основната и най-силна ивица отговаря на р67 фосфорилирания с-Мус. Надолу от нея се виждат по-леки ивици, които представляват фракции на с-Мус, които са с различна степен на фосфорилиране. Известно понижение на интензитета на детектираните ивици на фосфорилирания с-Мус бе установено след инхибирането на JAK2 от AG490. Както вече бе разгледано по-горе, забележително понижение на фосфорилирането на белъка бе установено в пробата, третирана с инхибитора на MEK PD98059 (фиг.4).

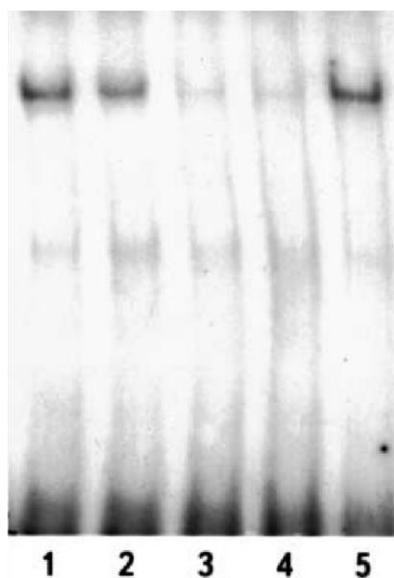


Фиг.4. Wesrn blot анализ на Тре-58/Сер-62 фосфорилиран с p-с-Мус. Представени са проби от контролни нетретирани клетки (пътека 1), както и от кератиноцити, инкубирани с 5 μ M

KN-62 (пътека 2), 5 μ M AG490 (пътека 3), 50 nM Wortmannin (пътека 4) и 40 μ M PD98059 (пътека 5) в продължение на 18 часа. Стрелката показва позицията на белтъчен маркер с молекулно тегло 68 kDa (GibcoBRL high range rpe stained protein molecular weight standatrs).

4.1.5. Изследване на с-Мус ДНК-свързващата активност в кератиноцити, в които е инхибирана сигнализацията през MAPK, CaM-кинази, PI 3-K и JAK2/STAT трансдукционните пътища

Редица литературни данни свидетелстват за наличието на тясна взаимовръзка между пролиферацията на кератиноцити и функциите на с-Мус. За да изследваме ефекта на инхибиране на преноса на сигнали от трандукционните пътища на MAPK, CaM-киназите, PI 3-K и JAK2/STAT върху с-Мус ДНК-свързващата активност, ние приготвихме ядрени екстракти от кератиноцити, третирани със съответните инхибитори в продължение на 18 часа, както и от пролифериращи контролни клетки. Екстрактите бяха използвани за анализ на с-Мус ДНК-свързващата активност в различните условия на третиране на клетките чрез електрофоретично забавяне в гел (electrophoretic mobility-shift assay, EMSA).



Фиг.5. Инхибиращ ефект на PD98059 и KN-62 върху ДНК-свързващата активност на с-Мус. Представени са резултатите от Мус/Max/Mad EMSA на ядрени екстракти от пролифериращи контролни клетки (пътека 1), както и от кератиноцити, третирани с 50 nM Wortmannin (пътека 2), 40 μ M PD98059 (пътека 3), 5 μ M KN-62 (пътека 4), μ M AG490 (пътека 5).

Значително понижение на свързването на ядрените екстракти към синтетичния олигонуклеотид, съдържащ Мус/Max/Mad консенсусната последователност бе установено в кератиноцити, третирани с 5 μ M KN-62 и 40 μ M PD98059. В същото време не бе установена промяна в Мус/Max/Mad свързващата активност в клетките, третирани с 50 nM Wortmannin и 5 μ M AG490 (Фиг.5).

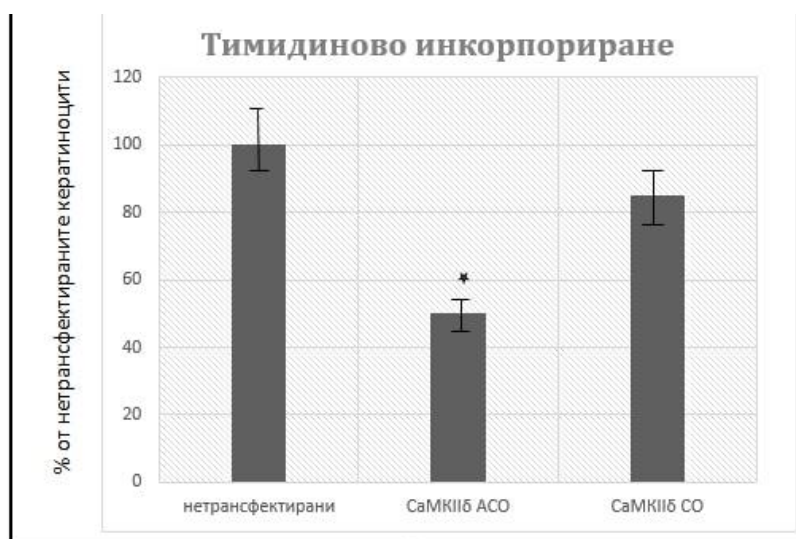
Специфичността на образуващия се ДНК-белтъчен комплекс бе доказана с конкурентни проби, съдържащи излишък от небелязан консенсус олигонуклеотид както и с такива, съдържащи мутантен олигонуклеотид (данните не са представени на фигурата).

4.2. Проследяване ролята на Ca^{2+} /калмодулин-зависимата протеин киназа II δ (СаМКII δ) в контрола на автокринната пролиферация на човешките кератиноцити.

4.2.1. Ефект на селективното потискане на СаМКII δ , чрез използването на специфичен антисенс-олигонуклеотид.

Ние трансфектирахме нормални човешки епидермални кератиноцити с СаМКII δ антисенс- и сенс-олигонуклеотиди в концентрация 10 μ M за 18 часа. Към средата за култивиране добавихме 1 μ Ci/ml [^3H] тимидин три часа преди края на трансфекцията. Резултатът от трансфекцията на кератиноцитите с СаМКII δ антисенс-олигонуклеотид показва до 50% инхибиране на кератиноцитната пролиферация в сравнение с нетрансфектираните клетки, установено чрез измерване на включения в кератиноцитната ДНК радиоактивно белязан тимидин. Според нас инхибирането на

кератиноцитната пролиферация при използването на CaMKII δ антисенс-олигонуклеотид е специфично поради факта, че сенс-олигонуклеотидът не инхибира статистически значимо клетъчната пролиферация (фиг. 6). За сравнение предишните ни изследвания проведени със специфичния CaM киназен инхибитор KN-62, показаха 91,6% инхибиране на кератиноцитната пролиферация спрямо нетретираните клетки.

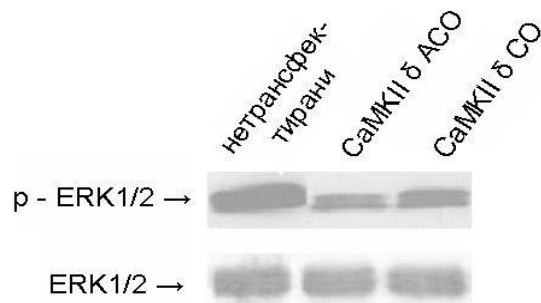


Фиг.6. Ефект на подтискане на CaMKII δ след трансфектиране с антисенс (ACO) и сенс (CO) олигонуклеотиди върху нивата на пролиферацията на кератиноцити, определени чрез измерване радиоактивността на [3 H]-белязания тимидин, инкорпориран в кератиноцитната ДНК. Резултатите са потвърдени с три отделни експеримента. Звездата (*) показва статистически достоверното инхибиране на пролиферацията при трансфекцията. Анализът е направен с Student's t-test със значимост $P < 0.05^*$.

4.2.2. Имуноблот на p- ERK1/2 в кератиноцити третирани с CaMKII δ антисенс-олигонуклеотид.

ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases) или p44/p42 MAPK е известна още като класическа митоген-киназна каскада и се експресира в различна степен във всички тъкани, като има важно значение при провеждането на

различни извънклетъчни стимули, водещи до промяна в клетъчната функция. В литературата има данни, които предполагат участието на ERK в процесите, регулиращи кератиноцитната пролиферация и оцеляване. В предишни наши изследвания ние установихме че, PD98059 специфичен MEK1/2 инхибитор, силно инхибира кератиноцитната пролиферация и значително инхибира активността на ERK1/2. Третирането на кератиноцитите с KN-62 почти напълно инхибира фосфорилирането на ERK1/2. Трансфектирането с CaMKII δ антисенс-олигонуклеотид също показва значително инхибиране на ERK1/2 фосфорилирането, но в по-малка степен от това, установено при използването на KN-62. За да определим протеиновото съдържание в пробите проведохме Western blot анализ за детектиране нивото на експресия на ERK1/2 (фиг.7).

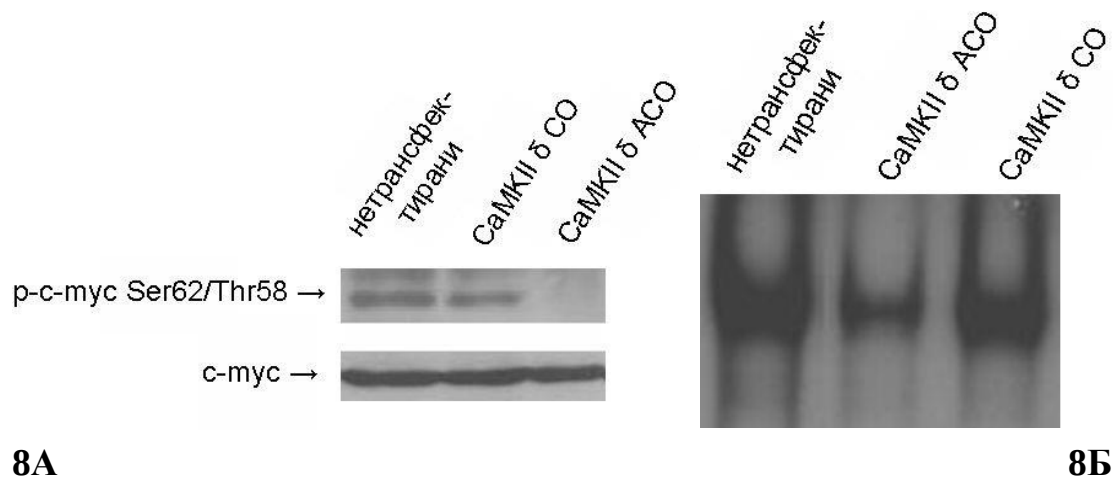


Фиг.7. Фосфорилиране и експресия на ERK1/2 в нормални човешки епидермални кератиноцити, трансфектирани с антисенс и сенс олигонуклеотиди за CaMKII δ . Клетъчните лизати бяха сепарирани чрез SDS-PAGE и нивата на p-ERK1/2 и тотален ERK1/2 бяха установени чрез имуноблот. Резултатите са потвърдени с три отделни експеримента.

4.2.3. Ефект от подтискането на CaMKII δ върху Тре⁵⁸/ Сер⁶² фосфорилирането на с-Мус и с-Мус свързващата активност в нормални човешки епидермални кератиноцити.

с-Мус участва в регулацията на клетъчното делене, диференциацията и апоптозата. Неговата неправилна експресия е често срещано събитие при различни неопластични трансформации. В няколко клетъчни типа е установено, че фосфорилирането на Сер⁶² в с-Мус е отговорно за неговото

стабилизиране и акумулиране, последващо активирането на Ras/Raf/MEK/ERK. За да установим какво е влиянието на CaMKII δ -ERK1/2 пътя върху с-Мус транскрипционния фактор, ние направихме Western blot за анализиране с-Мус фосфорилирането и експресията, след трансфекцията на CaMKII δ антисенс-олигонуклеотид. Специфичното подтискане на CaMKII δ доведе до намалено фосфорилиране на с-Мус (Тре⁵⁸/Сер⁶²) без промяна в експресията на транскрипционния фактор (фиг.8А), което предполага участието на CaMKII δ в регулирането на с-Мус фосфорилирането индиректно, чрез промяна в активността на ERK1/2. За да проследим дали редуцираното Тре⁵⁸/Сер⁶² фосфорилиране на с-Мус е свързано с промяна в ДНК свързващата активност на транскрипционния фактор, приготвихме ядрени екстракти и проведохме EMSA анализ. Получените резултати показаха, че транзиторната трансфекция на CaMKII δ 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. 8Б). В сравнение с предишните ни изследвания в кератиноцити, третирани с инхибиторите KN-62 и PD98059 това намалено свързване на ядрените екстракти към синтетичния олигонуклеотид е изразено в по-малка степен.



Фиг. 8. Инхибиращ ефект на сенс- и антисенс CaMKII δ олигонуклеотиди върху Тре⁵⁸/Сер⁶² фосфорилирането на с-Мус и с-Мус свързващата активност в кератиноцити.

8А: Имуноблот на р-с-Мус и с-Мус експресия в клетъчни лизати **8Б:** EMSA на ядрените екстракти от пролифериращи контролни клетки, екстракти от кератиноцити, трансфектирани с антисенс и сенс олигонуклеотиди. Резултатът е от три експеримента.

4.3. Роля на СаМКII в индуцирането на апоптоза в А431 клетъчната линия

4.3.1. Ефект на UV светлина върху активиране на СаМКII чрез фосфорилиране на Тре 286 в А431 клетъчна линия.

Въведение

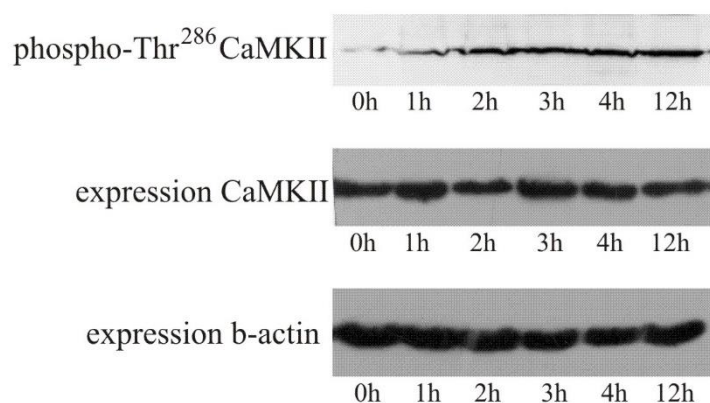
През последните години СаМКII предизвиква все по-голям интерес във връзка с участието ѝ в процеса на програмирана клетъчна смърт, особено при нормални и трансформирани невронални, сърдечни и панкреатични клетки, както и в ракови клетки.

Предполага се, че калциевата сигнализация допринася за специфичното при апоптоза продължително активиране на JNK през СаМКII. Има данни и за проапоптотичната роля на СаМКII при апоптоза, индуцирана от тумор некротичен фактор (TNF α) и ултравиолетова радиация, като и двата стимула повишават калмодулин независимата активност на киназата. СаМКII изглежда важна и за стрес индуцираната апоптоза в ендоплазмения ретикулум (ER), която е свързана с повишената концентрация на цитозолен Ca²⁺, водеща до промени в Ca²⁺-зависимите сигнални пътища. Въпреки това ролята на СаМКII в апоптозата на кожни епителни клетки и по-специално на епидермоидна карциномна клетъчна линия А431 не е изследвана по-рано.

А431 клетките експресират абнормно високи нива на рецептора на епидермалния растежен фактор (EGFR) и се използват в изследванията на клетъчния цикъл и свързаните с онкогенезата сигнални пътища. Те често служат като положителна контрола за експресията на EGFR. Те не съдържат функционален р53, мощен тумор-супресорен ген и са силно чувствителни към митогенни стимули.

Клетки от човешката епидермоидна карциномна клетъчна линия А431 бяха облъчени с ултравиолетова светлина с дължина на вълната 312 nm за 1

час. Активността и нивото на белтъка на CaMKII бяха анализирани чрез Western blot. При контролните нетретирани A431 клетки базалната активност на CaMKII е ниска и UV лъчението индуцира ензима по начин, зависим от концентрацията, без да се засяга нивото на белтъка на CaMKII. Активността и белтъчното ниво на CaMKII бяха проследени за период от 24 часа след UV облъчването (Фиг.9). Максималната активност на CaMKII, оценена спрямо нивото на фосфорилиране на Тре 286, се достига 3 часа след облъчването и остава стабилна до края на експеримента. През цялата продължителност на експеримента количеството на белтъка на CaMKII остава непроменено.



Фиг. 9. Western blot анализ на калмодулин-зависима протеин киназа II (CaMKII) в епидермоидната клетъчна линия A431 след ултравиолетово облъчване за 1 час. Пробите се събират 0-12 часа след облъчването. Phospho-Thr²⁸⁶ CaMKII показва количеството на активната киназа, докато експресията на CaMKII се отнася до общото количество на протеина. Експресията на b-актин се използва като контрол за натоварването с протеини.

4.3.2. Измерване на каспазната активност, предизвикана от стимулирана с UV радиация апоптоза в A431 клетъчна линия.

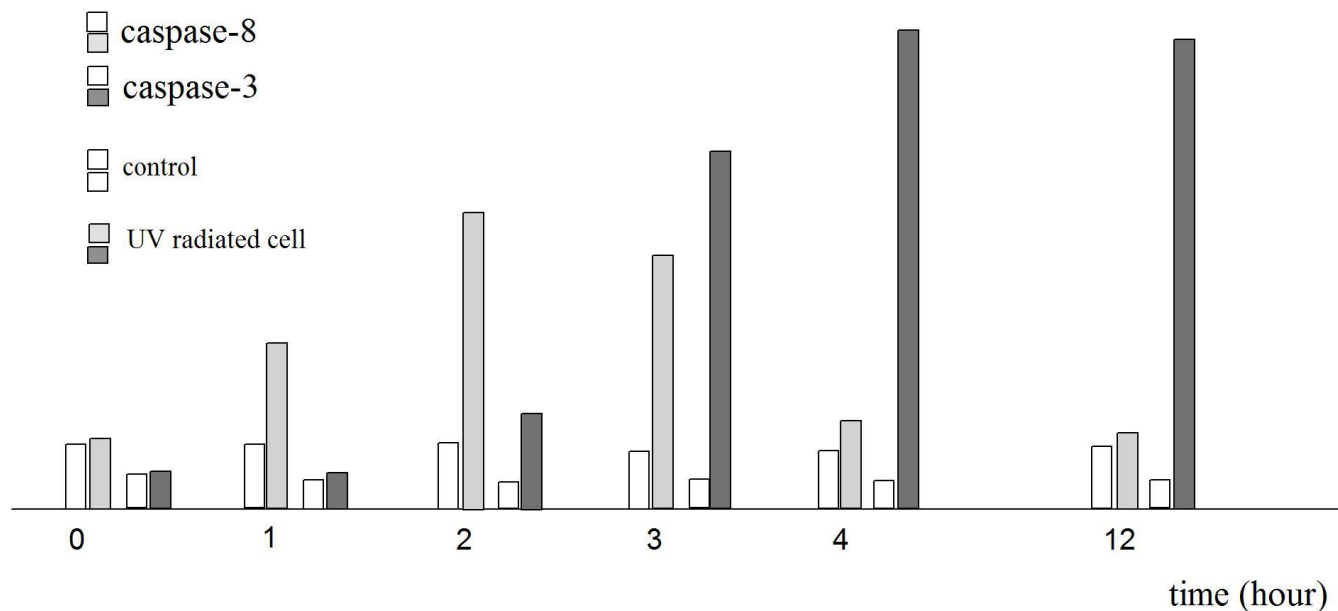
Въведение

Един от основните процеси на клетъчна смърт, предизвикани от UV радиация, е апоптозата. Апоптозата или програмираната клетъчна смърт се наблюдава широко в различни клетъчни видове и в различни организми. Този

процес има уникален морфологичен модел на събития, характеризиращи се с кондензация на хроматин, образуване на пори/кухини в мембраните и фрагментация на ДНК. Добре установено е, че човешката епидермоидна карциномна клетъчна линия A431 претърпява апоптоза след излагане на ултравиолетова светлина, а апоптотичният процес се контролира както от външни (медиращи рецептори на смъртта), така и от вътрешни (митохондриални) пътища. Активирането на каспазите играе ключова роля както в етапите на инициране, така и в протичането на апоптозата. Последните постижения в изследванията с каспази значително подобриха нашите познания за включването на каспазните каскади в апоптозата, в отговор на различни стимули. Каспазите обикновено присъстват в клетките като неактивни проензими, които изискват ограничена протеолиза, за да бъдат превърнати в активната форма. Тези ензими се разделят на два класа: активаторни и ефекторни каспази. Класът на активаторните каспази включва каспаза-8, -9 и -10, докато каспаза-3, -6 и -7 принадлежат към класа на ефекторните каспази.

За по-нататъшно изясняване на ролята на CaMKII при UV-предизвикана апоптоза, ние измерихме активността на 10 различни каспази, като използвахме по-рано разработен оригинален метод за тяхното едновременно откриване. Ензимните активности се измерват в определен момент, на всеки час за период от 6 часа след облъчването. Бяха анализирани и проби при 12, 24 и 36 часа след облъчването.

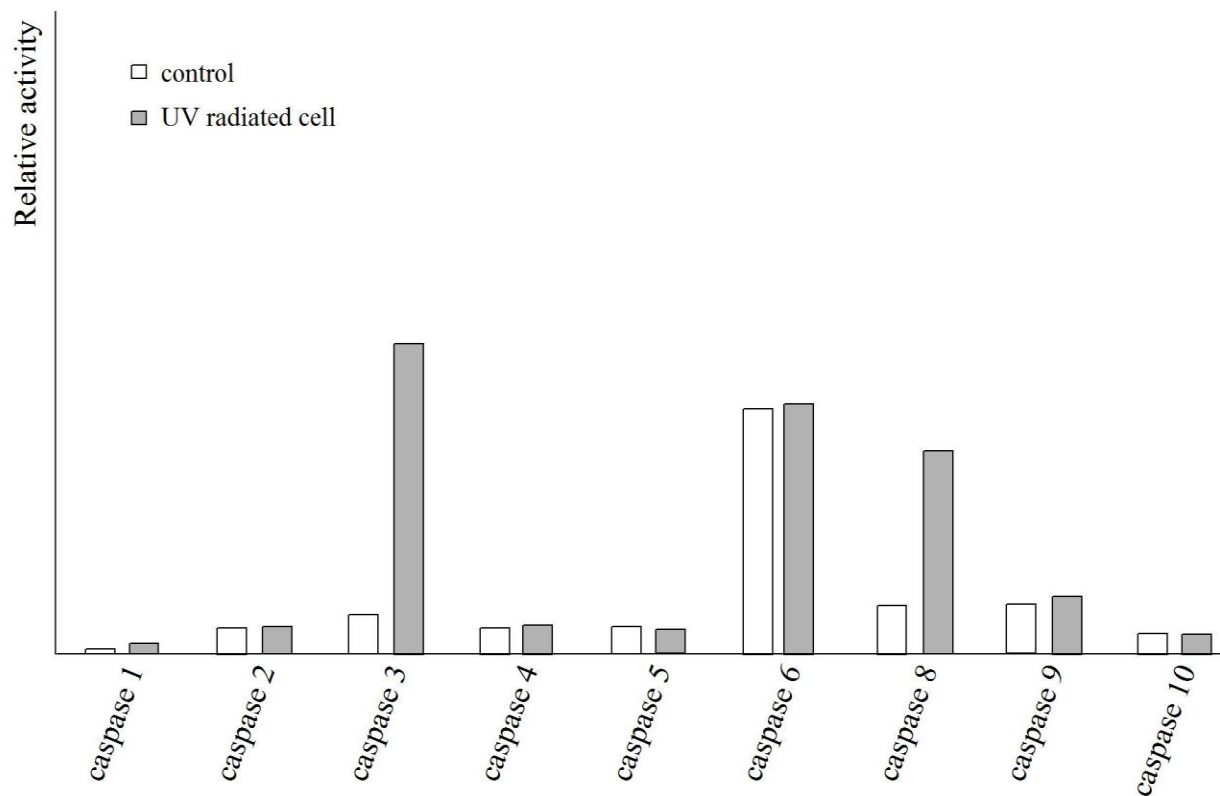
Получените резултати показват, че ултравиолетовото лъчение е способно да индуцира апоптоза в клетъчната линия A431. Още в първия час след облъчването има активиране на каспаза-8, като пика на активност се достига през втория час. Каспаза-3 се активира по време на втория час и достига максимална активност на четвъртия час, като тази активност остава постоянна до дванадесетия час (Фиг.10).



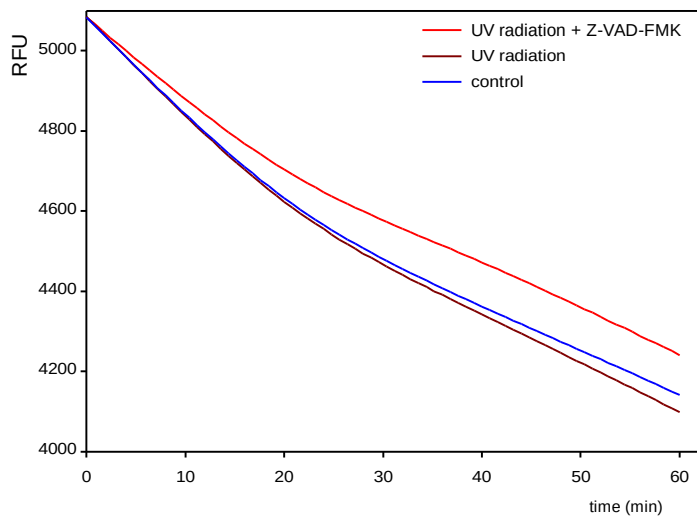
Фиг.10. Кинетика на активиране на каспаза-8 и каспаза-3 след UV-лъчева обработка на клетъчната линия A431.

Не се наблюдава забележима промяна в активността на другите изпитвани каспази при използваните експериментални условия (Фиг.11).

Интересно е, че активността на каспаза-6 както в нетретирани, така и в UV-облъчени клетки е висока в сравнение с всички останали тествани каспазни ензими. За да се изясни тази констатация, ние допълнително тествахме активността на каспаза-6 в присъствието на инхибитора Z-VAD-FMC (Фигура11). Z-VAD-FMC или карбобензокси-валил-аланил-аспартил- [О-метил] -флуорометил-кетон е неселективен клетъчно пропусклив инхибитор на каспаза-1 и каспаза-3 протеази, който се свързва необратимо към активните места на тези ензими. В присъствието на инхибитора активността на каспаза-6 е частично инхибирана, затова направихме заключението, че използваният субстрат за каспаза-6 (Ac-VEID-AMAC) е потенциално добър субстрат за други клетъчни ензими и тяхната активност пречи на правилната оценка на активността на каспаза-6. Доколкото ни е известно, няма специфичен необратим инхибитор на каспаза-6, който да ни позволи правилно да определим активността на каспаза-6 в човешката карциномна клетъчна линия A431.



Фиг.11. Каспазни активности в UV облъчени и контролни A431 клетки.



Фиг.12. Кинетичен анализ на каспаза-6 в клетъчната линия A431 4 часа след UV облъчване

В обобщение, UV лъчението увеличава активността на СаМКII в човешки епидермоидни туморни A431 клетки, водещо първо до активиране на активаторната каспаза-8 и след това на ефекторната каспаза-3. Нашето проучване демонстрира нова функция за СаМКII при предаването на сигнали, предизвикващи апоптоза в човешката епидермоидна карциномна клетъчна линия A431.

5. Заключение

Значението на СаМКII за съществуването на клетката се обуславя от конститутивната ѝ активност и високата ѝ плеiotропност. Участието ѝ в различни клетъчни процеси е многократно изследвано в разнообразни моделни системи.

Ние се насочихме към изследване на ролята на СаМКII в клетъчния цикъл на човешки епидермални кератиноцити по няколко причини. Първо, настоящата работа е част от по-мощно проучване на Лабораторията по сигнална трансдукция върху основните сигнални пътища, участващи в пролиферацията на епидермалните клетки и би допринесла за изясняването на закономерностите, на които се подчинява кератиноцитната пролиферация в норма. Второ изясняването на регулацията на кератиноцитната пролиферация би спомогнало в търсенето на стратегии за лечението на хиперпролиферативните заболявания на епидермиса, например чрез прилагането на специфични протеин киназни инхибитори. Друга причина беше, че през последните години СаМКII предизвиква все по-голям интерес във връзка с участието ѝ в процеса на програмирана клетъчна смърт, особено при нормални и трансформирани невронални, сърдечни и панкреатични клетки, както и в ракови клетки.

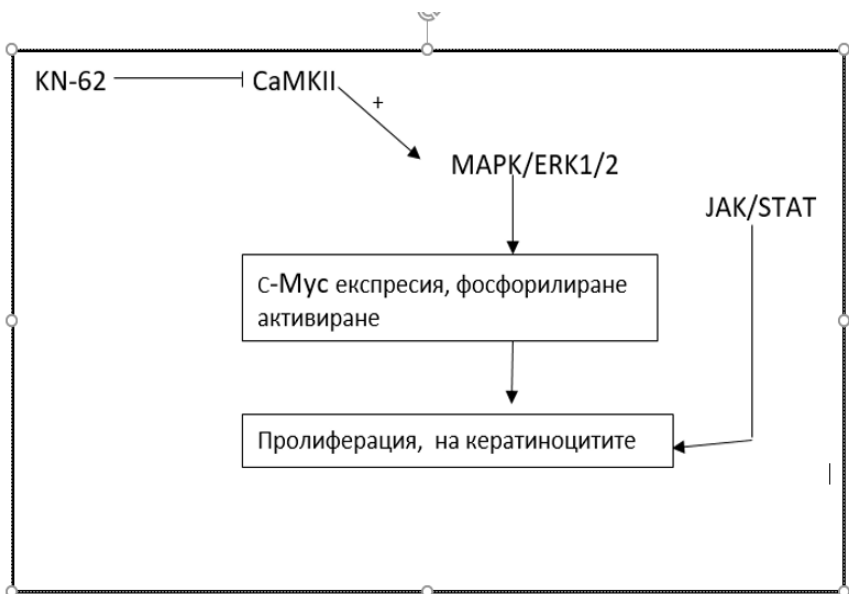
До момента нямаше данни кои от СаМ-киназите се експресират в кератиноцити.

В настоящата работа чрез прилагането на най-селективният до този момент инхибитор на СаМКII KN-62 и специфичен СаМКII δ антисенс олигонуклеотид, бяха установени няколко основни аспекта от функционирането на тази киназа в епидермални кератиноцити.

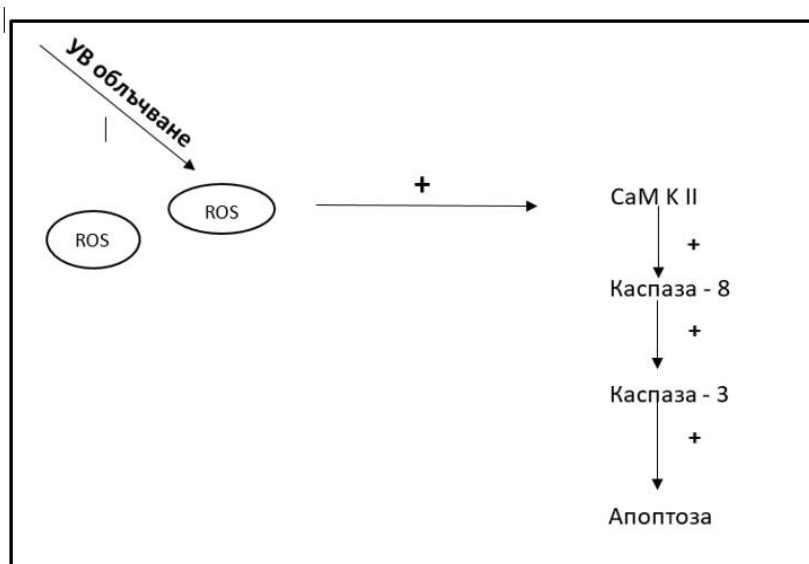
CaMKII е важно звено на клетъчната сигнализация, участващо в пролиферацията на човешките епидермални кератиноцити. Ние показахме тясна взаимовръзка между функционирането на трансдукционния път на CaMKII и този на MAPK каскада. Вероятно тази киназа играе важна регулаторна роля, тъй като инхибирането на активността ѝ, блокира активирането на ERK1/2, свързването на c-Myc/ Max/ Mad към ДНК и инхибира клетъчното делене. Тези резултати бяха потвърдени и с използването на специфичен CaMKII δ антисенс олигонуклеотид, но степента на редуциране на ERK1/2 и c-Myc активността е по-ниска. Вероятното предположение е, че човешките кератиноцити може да експресират и други изоформи на CaMKII, подобно на VSMC клетките (20).

Нашите резултати показаха съществуването и на друг независим от MAPK автокринен път на активиране на деленето на кератиноцитите – този на JAK/STAT трансдукционния път. Не е изключено съществуването и на алтернативен път на активиране на STAT белтъците в автономно делящи се кератиноцити директно от рецептора на Епидермалния растежен фактор (EGF).

Освен важната регулаторна роля на CaMKII в поддържането на автокринната пролиферация на кератиноцити, ние показахме и участието ѝ като медиатор в UV-стимулираната апоптоза в епидермални клетки. Вероятният механизъм, по който се активират каспазите 8 и 3 е в следствие повишената активност на CaMKII предизвикано от свръхпроизводството на свободни радикали при UV-облъчване.



Фиг.13. Участие на СаМКII в пролиферацията на нормални човешки епидермални кератиноцити.



Фиг.14. Роля на СаМКII в апоптозата на А431 клетъчната линия

6. Изводи

- 6.1. СаМ-киназите са важно звено на клетъчната сигнализация, участващо в пролиферацията на човешките епидермални кератиноцити.
- 6.2. СаМ-киназите активират MAPK каскада и свързването на с-Мус / Max/ Mad към ДНК.
- 6.3. JAK / STAT трансдукционният път е независим от MAPK автокринен път на активиране на деленето на кератиноцитите.
- 6.4. СаМКII е вероятната киназа, която е необходима за MAPK- зависимата кератиноцитна пролиферация.
- 6.5. СаМКII / ERK1/2 зависимата кератиноцитна пролиферация се осъществява чрез фосфорилиране на с-Мус при Тре⁵⁸/Сер⁶², стимулиращо с-Мус свързващата активност.
- 6.6. СаМКII участва в процеса на UV-стимулирана апоптоза, активирайки първо каспаза-8 и след това ефекторната каспаза-3.

7. Приноси

- 7.1. За първи път се изследва СаМ-киназната каскада в епидермални кератиноцити, като се демонстрира стимулиращият ѝ ефект върху MAPK киназната каскада и пролиферацията на кератиноцити.
- 7.2. За първи път се демонстрира прякото участие на δ СаМКII изоформата в пролиферацията на епидермални кератиноцити.
- 7.3. Установено е, че СаМКII участва в процеса на UV-стимулирана апоптоза в епидермални кератиноцити, активирайки първо каспаза-8 и след това ефекторната каспаза-3.
- 7.4. Установено е участието на JAK / STAT трансдукционният път в пролиферацията на кератиноцити.

8. Литература

1. Yamauchi T., Fujisawa H. (1983) Purification and characterization of the brain calmodulin-dependent protein kinase (kinase II), which is involved in the activation of tryptophan 5-monooxygenase. *Eur. J. Biochem.* 132, 15-21
2. Takashi Yamauchi. (2005) Neuronal Ca^{2+} /Calmodulin-Dependent Protein Kinase II-Discovery, Progress in a Quarter of a Century, and Perspective: Implication for Learning and Memory *Biol. Pharm. Bull.* 28(8) 1342—1354
3. Kolodziej S J., Hudmon A., Waxham M N., Stoops J K. (2000) Three-dimensional reconstructions of calcium/calmodulin-dependent (CaM) kinase II α and truncated CaM kinase II α reveal a unique organization for its structural core and functional domains. *J Biol Chem.* 275, 14354-14359.
4. Tobimatsu T., Fujisawa H. (1989) Tissue-specific expression of four types of rat calmodulin-dependent protein kinase II mRNAs. *J Biol Chem.* 264, 17907–17912.
5. Swulius M T and Waxham M. N. (2008) Ca^{2+} /Calmodulin-dependent Protein Kinases. *Cell Mol Life Sci* .65(17) 2637–2657.
6. Rosenberg O S., Deindl S., Comolli L R., Hoelz A., Downing K H., Nairn A C., Kuriyan J. (2006) Oligomerization states of the association domain and the holoenzyme of Ca^{2+} /CaM kinase II. *FEBS J.* 273, 682–694.
7. Bunkoczi G., Debreczeni J E., Salah E., Gileadi O., Rellos P., Arrowsmith C H., Edward A., Sundstrom M., Weigelt J., Von Delft F., Turnbull A., Pike, A C W., Knapp, S.(2007) Structure of the Oligomerisation Domain of Calcium-Calmodulin-Dependent Protein Kinase II Gamma.. <http://www.pdb.org>,
8. Vallano M L. (1989) Separation of isozymic forms of type II calcium/calmodulin-dependent protein kinase using cation-exchange chromatography. *J Neurosci Methods.* 30, 1–9.
9. Bennett M K., Erondy N E., Kennedy M B. (1983) Purification and characterization of a calmodulin dependent protein kinase that is highly concentrated in brain. *J Biol Chem.* 258, 12735– 12744.
10. Bayer K U., Harbers K and Schulman H. (1998) α KAP is an anchoring protein for a novel CaM kinase II isoform in skeletal muscle. *EMBOJ.*17, 5598–5605
11. Brickey D A., Bann J G., Fong Y L., Perrino L., Brennan R G.and Soderling T R. (1994) Mutational analysis of the autoinhibitory domain of calmodulin kinaseII. *J.Biol.Chem.*269, 29047–29054

12. Yang E and Schulman H. (1999) Structural examination of autoregulation of multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *J. Biol. Chem.* 274, 26199–26208
13. Waxham MN Tsai A L and Putkey J A. (1998) A Mechanism for Calmodulin (CaM) Trapping by CaM-kinase II Defined by a Family of CaM-binding Peptides. *J. Biol. Chem.* 273, 17579–17584
14. Hanson P I., Meyer T., Stryer L and Schulman H. (1994). Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. *Neuron*. 12, 943–956
15. Bradshaw J M., Hudmon A., Schulman H. (2002) Chemical quenched flow kinetic studies indicate an intramolecular autophosphorylation mechanism for Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II. *J Biol Chem.* 277, 20991–20998.
16. Meyer T., Hanson P I., Stryer L., Schulman H. (1992) Calmodulin trapping by calcium-calmodulin dependent protein kinase. *Science*. 256, 1199–1202.
17. Scott J D and Pawson T. (2000) Cell Communication: The Inside Story, *Sci. Am.* 282, 72–79
18. Berchtold M W., Villalobo A. (2014). The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* .1843, 398–435
19. Tanaka H., Matsumura I., Ezoe S., Satoh Y., Sakamaki T., Albanese C., Machii T., Pestell R., Kanakura Y. (2002) E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF- κ B activity that facilitates Mn SOD-mediated ROS elimination. *Mol. Cell*. 9, 1017-1029
20. Lu K K et al. (2005) Adhesion-dependent activation of CaMKII and regulation of ERK activation in vascular smooth muscle. – *Am. J. Physiol. Cell Ph.*, 289, 1343-1350.

9. Публикации във връзка с дисертационния труд

1. Praskova M., **Kalenderova S.**, Miteva L., Poumay Y., Mitev V. (2002) Ca²⁺/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, 198–202. **IF-2.148, цитирания 27**

2. **Kalenderova S.**, Lozanova V., Praskova M., Lozanov V. (2018) UV-light stimulated activation of CaMKII in human epidermoid carcinoma A431 cells. *JBCR* (in press).

3. **Календерова С.**, Митев В. (2009) Ca²⁺ / калмодулин зависими протеин кинази. *Медицина и спорт.* 3, 16-20

4. **Календерова С.**, Праскова М. (2001) От плазмената мембрана до ядрото. *Съвременна медицина.* 4, 23-28.

Научни прояви във връзка с дисертационния труд

Kalenderova S., Ivanova P, Miteva L, Mitev V. Role of Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinases (CaMK) in human epidermal keratinocyte proliferation. The Third EADV Spring Symposium, 19-22 May Sofia, 2005.

Praskova M, **Kalenderova S.**, Miteva L, Poumay Y, V Mitev. Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase pathway in human keratinocyte proliferation. *Congres Mondial Dermatologie*, Paris, 2002, P1438.

Цитирания във връзка с дисертационния труд

M. Praskova, **S. Kalenderova**, L. Miteva, Y. Poumay, V. Mitev, 'Ca²⁺/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 of Dermatol Res*, July 2002, Volume 294, Issue 4, pp 198–202, IF-2.148, цитирания 27

Цитирания в списания с ISI импакт фактор

1. Berchtold MW and Villalobo A 'The many faces of calmodulin in cell proliferation, programmed cell death, autophagy, and cancer, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research*, Volume 1843, Issue 2, February 2014, Pages 398-435
2. Azriel-Tamir H, Sharir H, Schwartz B, Hershfinkel M 'Extracellular zinc triggers ERK-dependent activation of Na⁺/H⁺ exchange in colonocytes mediated by the zinc-sensing receptor, *Journal of Biological Chemistry* 279 (50):51804-51816, 2004
3. S. Macfarlane, C Sloss, P Cameron, T Kanke, R McKenzie, R Plevin 'The role of intracellular Ca²⁺ in the regulation of proteinase-activated receptor-2 mediated nuclear factor kappa B signalling in keratinocytes', *British Journal of Pharmacology* (2005) 145, 535-544
4. F Desarnaud, B Macone, S Datta 'Activation of extracellular signal-regulated kinase signaling in the pedunculo pontine tegmental cells is involved in the maintenance of sleep in rats ' *Journal of neurochemistry*, 2011 - Wiley Online Library, *J. Neurochem.*(2011) 116, 577–587
5. E Nikolova, V Mitev, F Minner, C Deroanne, Y Poumay 'The inhibition of the expression of the small Rho GTPase Rac1 induces differentiation with no effect on cell proliferation in growing human adult *keratinocytes*' *Journal of Cellular Biochemistry* 9999:1-8 (2007) (2008), Wiley Online Library, <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.21455>
6. A Eapen, R Kulkarni, S Ravindran 'Dentin phosphophoryn activates Smad protein signaling through Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II in undifferentiated mesenchymal cells' *JBC*, First published on January 28, 2013, DOI 10.1074/jbc.M112.413997
7. E Nikolova, V Mitev, N Zhelev, CF Deroanne 'The small Rho GTPase Rac1 controls normal human dermal fibroblasts proliferation with phosphorylation of the oncoprotein c-myc', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 359, Issue 3, 3 August 2007, Pages 834-839
8. J Ma, S Shui, X Han, D Guo, T Li, L Yan 'microRNA-200a silencing protects neural stem cells against cerebral ischemia/reperfusion injury', - *PloS one*, 2017 - [journals.plos.org](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172178), February 21, 2017 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172178>
9. MW O'Malley, S Datta 'REM sleep regulating mechanisms in the cholinergic cell compartment of the brainstem' - *Indian journal of sleep medicine*, 2013 - ncbi.nlm.nih.gov, Indian J Sleep Med. 2013; 8(2): 58–66.doi: 10.5958/j.0974-0155.8.2.009

10.G Gambardella, I Peluso 'A reverse-engineering approach to dissect post-translational modulators of transcription factor's activity from transcriptional data' *BMC Bioinformatics* 2015 16:279, <https://doi.org/10.1186/s12859-015-0700-3>

11.Ca²⁺/钙调蛋白依赖性蛋白激酶在细胞增殖中的作用 proliferation

赵岚 · 陆融 · 姚智 - 细胞生物学杂志, 2007 - cqvip.com

影响细胞的生长和分裂. CaMKs 在调节不同组织正常细胞及恶性细胞的细胞周期进程 ...

12. P Das 'Phosphorylation of the human papillomavirus type 16 E1 E4 protein' Das - 2006 - *discovery.ucl.ac.uk*

13.Yuxia DongJihong XingJiao JiaQiaoyun WengZhimin HaoJingao Dong 'Research Article Cloning and pharmaceutical analysis of CaMK gene of *Botrytis cinerea*' *Frontiers of Agriculture in China*, Volume 5, Number 3, 2011, 299-304, DOI:10.1007/s11703-011-1085-3

14.反义 PKC ξ 对角质形成细胞增殖的调节

张晓艳 · 马雷 · 柳惠图 · 马圣清 - 中国麻风皮肤病杂志, 2006 - cqvip.com

15.Zhang Xiaoyan, Ma Lei, Lui Huitu "The regulatory effect of anti-sense PKC on the proliferation of keratinocytes. *China Journal of Leprosy and Skin Diseases*. 2006, 3:34-38 scholsr.ilib.cn

Цитирания в национални списания.

1.PV Ivanova, AI Maneva. Comparison analysis of Basocellular Carcinoma and Spinocellular Carcinoma-Protein Kinase D1, Wnt/ β -catenin and Epithelial to Mesenchymal Transition'- International Journal of Contemporary Research, 2018

2.E Nikolova, G Jolivet 'Effect of chemical blockade of different signal transduction pathways on map kinase tyrosine phosphorylation in rabbit mammary cells', Dokladi na B ..., 2007 - Balgarska akademiâ na naukite

3.Нейчев В, Н. Желев „Значението на вида, количеството и формата на въглехидратния прием за оптималния ресинтез на мускулния гликоген в първата възстановителна фаза“. Медицина и спорт, 2005р 2. 24-26

4.Исаева А, Петров С, N Zhelev „Значение на полиамините в нормалната и злокачествена клетъчна полиферация“. Онкологос, 2005

5. Nadka Boyadjieva and Vladimir Naidenov "Psoriasis".

6.Атанасова Г, Н. Желев „Приложение на фармакологичните инхибитори на циклин-зависимите кинази в анти-туморната терапия, Свр.Мед. LVIII, 2007, 80-85

Цитирания в дисертации

- 1.Христов К „Тирозиново фосфорилиране и дефосфорилиране в сигналните каскади на антигенния рецептор и CD40, регулиращи пролиферацията и апоптозата на лимфоидната клетъчна линия – RAMOS“ Дисертационен труд за присъждане на научна степен „Доктор по биология“, 2007:168 стр.
- 2.Атанасова Г „Ефект на CDK-инхибитора CYC202 в нормални папиломно-трансформирани епидермални кератиноцити. Дисертационен труд за присъждане на научната степен „Доктор по медицина“, 2007:94
- 3.Николова К „Изследване на ролята на Rac1 в регулацията на човешки епидермални кератиноцити. Дисертационен труд за присъждане на научна степен „Доктор“, 2007:125 стр.
- 4.Lan Zhao, Rong Lu, Zhi Yao JE “Effect of Ca²⁺/calmodulin Dependent Protein Kinases on Cell Proliferation. *ChinaJ*©. 2008, 11-15
- 5.Броцилова-Николова ВК “Промените в полиаминния метаболизъм при доброкачествени кератиноцитни пролиферации “Дисертационен труд за присъждане на научната степен „Доктор по медицина“ 2011:102 стр.
- 6.Войчева Х. „Дизайн и оптимизиране на лекарстводоставящи системи със забавено освобождаване с кверцетин. Дисертационен труд за присъждане на научан степен „Доктор по фармация“, 2014. 117 стр.