

## LA CALMODULINA REGULA L'EXPRESSIO DEL PCNA EN CEL·LULES ACTIVADES A PROLIFERAR.

A. López-Girona, Marta Bosch, Oriol Bachs, Neus Agell.

Dept. Biologia Cel·lular i Anatomia Patologica, Facultat de Medicina, UB.

### CALMODULINA I CALMODULIN-BINDING PROTEINS EN LÍNIES TRANSFORMADES DE LIMFOCITS.

L'administració de drogues anti-calmodulina (W12, W13) a cèl·lules proliferants en cultiu afecta la síntesi d'ADN, l'activació d'enzims replicatius com l'ADN polimerasa  $\alpha$  i l'ADN polimerasa  $\delta$  i la quantitat de proteïna PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*). El PCNA és una proteïna nuclear, imprescindible per que tingui lloc la síntesi d'ADN i identificada com a cofactor de la ADN polimerasa  $\delta$ . El fet que inhibint la calmodulina s'inhibeixi l'increment de PCNA pot ser la raó de trobar l'activitat ADN polimerasa  $\delta$  disminuïda. L'expressió del gen del PCNA està regulada a nivell transcripcional i post-transcripcional durant el cicle cel·lular, presentant un increment, tant de proteïna com de mRNA, durant la fase S quan cèl·lules quiescents han estat activades a proliferar per l'addició de serum. Per tal de determinar a quin nivell de la regulació de l'expressió del PCNA intervé la calmodulina hem analitzat per Northern blot i PCR la quantitat de mRNA durant la fase S, en presència de drogues anti-calmodulina. En ambdós casos hem detectat inhibicions d'un 70% que justifiquen el descens trobat de la quantitat de proteïna. Un dels mecanismes que regulen la quantitat de mRNA, i que podria estar afectat per la inhibició de la calmodulina, és l'estabilitat del missatger. Vam afegir a les cèl·lules, tractades o no amb drogues anti-calmodulina, actinomicina D (5  $\mu$ g/ml) i vam estudiar la degradació del missatger per PCR. Els resultats indiquen que inhibint la calmodulina l'estabilitat del missatger disminueix. Per altra banda s'han transfectat cèl·lules TK<sup>-</sup> ts13 amb un plàsmid que conté el promotor sencer del PCNA conduint la transcripció del cDNA del gen de la timidina quinasa (gen del que és defectiva aquesta línia cel·lular). Les cèl·lules transfectades s'han seleccionat amb medi gHAT. Amb aquestes cèl·lules s'han fet estudis sobre la activitat del promotor del PCNA, analitzant per Northern blot la quantitat de missatger de la timidina quinasa de les cèl·lules en presència de les drogues anti-calmodulina. Els resultats indiquen que no hi ha variació en l'activitat del promotor quan inhibim la calmodulina.

Així doncs, quan cèl·lules quiescents són activades a proliferar la calmodulina intervé en la regulació, a nivell post-transcripcional, de l'expressió del PCNA. La calmodulina actua estabilitzant el missatger però no es pot descartar que també actuï regulant fenòmens de *pausing* de la transcripció que s'ha descrit que poden intervenir en la regulació de l'expressió del PCNA i altres gens replicatius.

L'addició de KN-93, droga que inhibeix específicament la quinasa dependent de calmodulina II (CaMKII), a cèl·lules en cultiu activades a proliferar també provoca una disminució dels nivells de PCNA (detectat per immunoblot) durant la fase S. Això indica que l'acció de la CaM tindria lloc a través de fosforilacions dependents de la CaMKII.