



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΑΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ



Ταυτοποίηση ενός νέου σηματοδοτικού μονοπατιού που ελέγχει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον Μετασχηματίζοντα Αυξητικό Παράγοντα-β1 (TGF-β1)

Διδακτορική Διατριβή

Λίνα Βαρδούλη

Ηράκλειο 2005

Η μελέτη αυτή χρηματοδοτήθηκε από τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας (ΓΓΕΤ) στα πλαίσια του προγράμματος ΠΕΝΕΔ 01, # 1656.

Επιβλέπων Καθηγητής

Χρήστος Στουρνάρας, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Συμβουλευτική επιτροπή

Χρήστος Στουρνάρας, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Αχιλλέας Γραβάνης, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Δημήτριος Καρδάσης, Αν. Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Εξεταστική επιτροπή

Χρήστος Στουρνάρας, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Αχιλλέας Γραβάνης, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Δημήτριος Καρδάσης, Αν. Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Θεόδωρος Φώτσης, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Παναγιώτης Θεοδωρόπουλος, Επικ. Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Χρήστος Τσατσάνης, Επικ. Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Βενετία Ζαχαρίου, Επικ. Καθηγήτρια Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Κάθε δευτερόλεπτο της αναζήτησης είναι μια συνάντηση με το Θεό και την αιωνιότητα.

Paulo Coelho

Αντί Προλόγου.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Χρήστου Στουρνάρα, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την καθοδήγηση του όλα αυτά τα χρόνια με τις πολύτιμες ιδέες και συμβουλές του. Κυρίως τον ευχαριστώ για την ηθική στήριξη που μου παρείχε απλόχερα τις στιγμές της απογοήτευσης.

Τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, τον καθηγητή κ. Αχιλλέα Γραβάνη και τον αν. Καθηγητή κ. Δημήτρη Καρδάση, ευχαριστώ θερμά για την αξιολόγηση της πορείας της παρούσης εργασίας, καθώς και για τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους. Τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, καθ. Κ. Θ. Φώτση και τους επικ. καθηγητές κ. Π. Θεοδωρόπουλο, κ. Χ. Τσατσάνη και κ. Β. Ζαχαρίου στην κρίση των οποίων υποβάλλεται αυτή η διατριβή ευχαριστώ θερμά για την διάθεση του πολύτιμου χρόνου τους.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Άρη Μουστάκα, για την ουσιαστικής σημασίας συνεισφορά του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Τον ευχαριστώ για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την αρχή της εργασίας, η οποία αποτελεί συνέχεια δικής του δουλειάς και για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ για τέσσερις μήνες με την ομάδα του στο Ludwig Institute for Cancer Research, χάρη στην οποία ήρθα σε επαφή με νέες τεχνικές. Τον ευχαριστώ για την κριτική θεώρηση των αποτελεσμάτων μου, για τις συμβουλές του και τις επικοινωνιακές συζητήσεις μας οι οποίες αποτέλεσαν πηγή γνώσης και προβληματισμού και για την απρόσκοπτη διάθεση του πολύτιμου χρόνου του όποτε χρειάστηκα τη βοήθεια του.

Για την πολύτιμη βοήθεια της και τις χρήσιμες διορθώσεις του κειμένου της δημοσίευσής μου ευχαριστώ ιδιαίτερα την κ. Carol Murphy.

Ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου μου και γειτονικών για τη βοήθεια και την προθυμία τους αλλά και για την υπομονή τους στις σκοτεινές στιγμές της απογοήτευσης και της γκρίνιας μου. Κυρίως τους ευχαριστώ για την όμορφη και ζεστή ατμόσφαιρα που επικρατούσε πάντα στην πτέρυγα μας η οποία αποτέλεσε πηγή δημιουργικής εργασίας, αλλά και φαντασίας και γέλιου, με τη βοήθεια των οποίων ξεπερνούσαμε τα όποια προβλήματα παρουσιάζονταν στην πορεία. Ευχαριστώ ιδιαίτερα τα μέλη του εργαστηρίου μου: την Άννα Τσαπάρα, τη Λίτσα

Παπακωνσταντή και τη Γαλάτεια Καλλέργη για την βοήθεια τους στην εκμάθηση όλων των τεχνικών του εργαστηρίου στην αρχή της διατριβής μου, για τις συζητήσεις μας επιστημονικές και μη και για την απεριόριστη στήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια. Τη Ναταλία Παπαδοπούλου ευχαριστώ για την αισιοδοξία και την θετική στάση που μου μετέδωσε τα δύο τελευταία και πιο δύσκολα ίσως χρόνια της εργασίας μου.

Ευχαριστώ την Βέτα Παπακώστα, τη Βίκυ Προκόβα, τον Γιώργο Κουτσοδόνη, τη Βαρβάρα Νικολαΐδου, την Ελευθερία Βασιλάκη, την Έφη Θυμακού και το Θωμά Βρεκούση για την άψογη συνεργασία μας και τη φιλία τους. Όλα αυτά τα χρόνια με έκαναν πάντα να νιώθω μέλος και του δικού τους εργαστηρίου.

Τον σύντροφό μου Γιώργο τον ευχαριστώ για την κατανόηση και την απεριόριστη υπομονή του. Με στήριξε στις προσπάθειες μου μετατρέποντας την απόγνωση και την απελπισία σε πείσμα, αισιοδοξία και χαμόγελο. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Σίσυ η οποία τα δύο τελευταία χρόνια φρόντιζε για το πρωϊνό μου ξύπνημα.

Τέλος ευχαριστώ θερμά τους γονείς μου, Βιορέλη και Ιφιγένεια για την αγάπη και την κατανόηση τους όλα αυτά τα χρόνια της απουσίας μου. Η ηθική και οικονομική στήριξη που μου προσέφεραν ήταν καθοριστικής σημασίας για την εκπόνηση της διδακτορικής μου διατριβής την οποία και τους αφιερώνω.

Τη διατριβή αυτή αφιερώνω στη μητέρα μου Αργυρώ, που δεν βρίσκεται πια κοντά μου, αλλά η μνήμη της παραμένει πάντα ζωντανή στην ψυχή μου.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ-ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

Τμήματα της παρούσας διδακτορικής διατριβής παρουσιάστηκαν σε συνέδρια με τη μορφή προφορικών ανακοινώσεων ή πόστερ και αποτέλεσαν αντικείμενο δημοσίευσης σε έγκριτα επιστημονικά περιοδικά.

Δημοσιεύσεις

1. **Vardouli L.**, Moustakas A., Stournaras C., (2005): Lim-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by TGF- β . *J Biol Chem*, 280 (12): 11448-11457
2. Charalampopoulos I., Dermitzaki E., **Vardouli L.**, Tsatsanis C., Stournaras C., Margioris A. N., Gravanis A., (2005): Dehydroepiandrosterone Sulfate and Allopregnanolone directly stimulate Catecholamine production via induction of Tyrosine Hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinology* (accepted)

Ανακοινώσεις σε συνέδρια

1. Ανάρτηση poster στο 27^ο συνέδριο της Federation of the European Biochemical Societies (FEBS), Λισαβόνα, 30 Ιουνίου-5 Ιουλίου 2001 με θέμα: «Rho GTPases are involved in the Transforming Growth Factor- β signaling pathway leading to reorganization of the actin cytoskeleton.» **L. Vardouli**, *A. Moustakas and C. Stournaras*.
2. Προφορική παρουσίαση στο 53^ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας – Μοριακής Βιολογίας, 13-15 Δεκεμβρίου 2001, Αθήνα, Ελλάδα με θέμα: «Transforming Growth Factor β (TGF- β) induces reorganization of the actin cytoskeleton by activation of the Rho GTPases» **Vardouli L.**, *Moustakas A., Stournaras C.*
3. Ανάρτηση poster στο 54^ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας – Μοριακής Βιολογίας, 25-27 Οκτωβρίου, 2002, Ιωάννινα, Ελλάδα με θέμα: «Transforming Growth Factor- β (TGF- β) induced actin cytoskeleton reorganization via a Smad independent signaling pathway.» **Vardouli L.**, *Kardassis D., Moustakas A., Stournaras C.*
4. Προφορική παρουσίαση στο 55^ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας – Μοριακής Βιολογίας, 13-15 Νοεμβρίου, 2003, Αθήνα, Ελλάδα με θέμα: “Phosphorylation of Limk2 and cofilin are necessary for the Transforming Growth Factor-beta (TGF- β) induced actin cytoskeleton reorganization” **Vardouli L.**, *Moustakas A., Stournaras C.*
5. Προφορική παρουσίαση στο 56^ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας – Μοριακής Βιολογίας, 25-27 Νοεμβρίου, 2004, Λάρισα, Ελλάδα με θέμα: “Crosstalk of the Transforming Growth Factor- β (TGF- β) signalling and actin

cytoskeleton: Smad7 blocks RhoA activation and the downstream actin microfilament reorganization ” *Vardouli L., Moustakas A., Stournaras C.*

6. Ανάρτηση poster στο 56^ο συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας – Μοριακής Βιολογίας, 25-27 Νοεμβρίου, 2004, Λάρισα, Ελλάδα με θέμα: “Neurosteroids stimulate catecholamine secretion and synthesis in adrenomedullary cells.” *I. Charalampopoulos, E. Dermitzaki, L. Vardouli, C. Tsatsanis, C. Stournaras, A.N. Margioris, and A. Gravanis*
7. Ανάρτηση poster στο συνέδριο Bioscience 2005 "From genes to systems", 17-21 Ιουλίου 2005, Γλασκώβη, Σκωτία με θέμα: “Rho/ROCK/LIMK2 link TGF-β signalling to the actin cytoskeleton and control cell motility in Swiss3T3 fibroblasts.” *L. Vardouli, A. Moustakas, C. Stournaras*

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

I. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ.....	I
II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	II
III. SUMMARY.....	III
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1 Γενικά για τον κυτταροσκελετό.....	1
1.2 Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης.....	1
1.2.1. Το μόριο της ακτίνης.....	2
1.2.2. Πολυμερισμός της ακτίνης: μηχανισμός και αρχιτεκτονική.....	4
1.2.3. Πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την ακτίνη (Actin-Binding proteins).....	7
1.3. Ο λειτουργικός ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η σημασία του στην ενδοκυττάρια μετάδοση μηνύματος.....	10
1.4. Ο ρόλος των μικρών Rho GTPασών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.....	15
1.4.1. Rho GTPάσες.....	18
1.5. Ο Μετασχηματίζων Αυξητικός Παράγοντας-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β).....	25
1.5.1. Η υπεροικογένεια του TGF-β.....	25
1.5.2. Δομικά χαρακτηριστικά του TGF-β.....	26
1.6. Μεταγωγή του μηνύματος του TGF-β.....	27
1.6.1. Οι μεμβρανικοί υποδοχείς.....	27
1.6.2. Μετάδοση του μηνύματος μέσω των Smad πρωτεϊνών: από την μεμβράνη στον πυρήνα.....	31
1.6.3. Μεταφορά των Smad πρωτεϊνών στον πυρήνα και μεταγραφική ενεργοποίηση.....	34
1.7. Σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών και ο ρόλος τους στη ρύθμιση των βιολογικών δράσεων του παράγοντα TGF-β.....	36
1.8. Ερευνητικός στόχος.....	42

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	45
Υλικά.....	46
Μέθοδοι.....	48
2.1. Καλλιέργεια κυττάρων.....	48
2.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης εξ' αιτίας της παρουσίας SDS (SDS-PAGE).....	49
2.3. Ανοσοαποτύπωση – Western Blot.....	51
2.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος.....	52
2.5. Καλλιέργεια βακτηρίων Escherichia coli (E. Coli).....	53
2.6. Μετασηματισμός βακτηρίων E. coli HB5a (transformation).....	53
2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale plasmid DNA preparation).....	54
2.8. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA.....	55
2.9. Προσδιορισμός των επιπέδων μονομερούς (G-) και ολικής ακτίνης.....	55
2.10. Κλασματοποίηση των πρωτεϊνών με εκχύλιση των κυττάρων με Triton-X-100: απομόνωση των διαλυτού και αδιάλυτου σε Triton-X-100 κλασμάτων.....	56
2.11. Ανοσοφθορισμός – Παρατήρηση με μικροσκοπία συμβατική ή συνεστίασης.....	57
2.11.1. Άμεσος ανοσοφθορισμός.....	57
2.11.2. Έμμεσος ανοσοφθορισμός.....	58
2.12. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων ολικών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.....	59
2.13. Προσδιορισμός της ενεργοποίησης των μικρών Rho GTPασών RhoA και RhoB.....	60
2.13.1 Παρασκευή και απομόνωση GST-RBD σε σφαιρίδια γλουταθειόνης.....	60
2.13.2 Κατακρήμιση της ενεργής Rho-GTP πρωτεΐνης από κυτταρικό εκχύλισμα με σφαιρίδια GST-RBD.....	61
2.14. Παροδική επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA.....	62

2.15. Γονιδιακή αποσιώπηση της πρωτεΐνης LIMK2 με τη χρήση μικρών κατασταλτικών RNA (siRNAs).....	62
2.16. Αναπαραγωγή ανασυνδυσασμένων αδενοϊών και επιμόλυνση των κυττάρων με αυτούς.....	63
2.17. Ανοσοκατακρήμνιση και δοκιμή κινάσης (in vitro kinase assay) για τις πρωτεΐνες LIMK1 και LIMK2.	64
2.18. Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal και μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (luciferase assay).....	65
2.19. Δοκιμασία τραυματισμού μονοστοιβάδας (wounding assay).....	66
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	67
3.1. Ο Μετασχηματίζων Αυξητικός Παράγοντας-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β) οδηγεί σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε ινοβλάστες.....	68
3.1.1. Μορφολογική ανάλυση της επίδρασης του παράγοντα TGF-β στον κυτταροσκελετό της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες – Αποτελέσματα άμεσου ανοσοφθορισμού.....	68
3.1.2. Ποσοτική ανάλυση της μεταβολής του λόγου μονομερούς (G) προς ολική ακτίνη από τον TGF-β στους Swiss3T3 ινοβλάστες.....	69
3.1.3. Μορφολογική ανάλυση της επίδρασης του παράγοντα TGF-β στον κυτταροσκελετό της ακτίνης και σε ινοβλάστες εμβρύου ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) – Αποτελέσματα άμεσου ανοσοφθορισμού....	71
3.2. Οι μικρές Rho GTPases RhoA και RhoB ενεργοποιούνται από τον TGF-β και μεσολαβούν για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον παράγοντα.....	72
3.2.1. Απομόνωση και καθαρισμός του πεπτιδίου GST-RBD σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, για τον προσδιορισμό των ενεργών RhoA και RhoB σε κυτταρικά εκχυλίσματα.....	72
3.2.2. Οι μικρές Rho GTPases RhoA και RhoB ενεργοποιούνται από τον παράγοντα TGF-β στους Swiss3T3 ινοβλάστες.....	74
3.2.3. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RhoA και RhoB από τον παράγοντα TGF-β1 είναι απαραίτητη για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες.....	76
3.3. Η πρωτεΐνη LIMK2 ενεργοποιείται από τον παράγοντα TGF-β και φωσφορυλιώνοντας την κοφιλίνη οδηγεί στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.....	78

3.3.1. Επίδραση με TGF-β1 οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης LIMK2 και του φυσιολογικού της υποστρώματος της κοφιλίνης...	78
3.3.2. Ενεργοποίηση των Swiss3T3 ινοβλαστών με τον παράγοντα TGF-β1 μεταβάλλει τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της LIMK2 αλλά όχι και της LIMK1.....	80
3.3.3. Η γονιδιακή αποσιώπηση της LIMK2 με τη χρήση μικρών κατασταλτικών RNA (siRNA) παρεμποδίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1.....	82
3.4. Ο ειδικός αναστολέας της πρωτεΐνης ROCK (Rho associated Coiled-coil Kinase) αναστέλει την επαγόμενη από τον TGF-β1 ενεργοποίηση της LIMK2 και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες.....	84
3.5. Ο παράγοντας TGF-β1 επάγει αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα στους Swiss3T3 ινοβλάστες, η οποία αναστέλεται από τον αναστολέα Y27632 της πρωτεΐνης ROCK1.....	87
3.6. Επικοινωνία μεταξύ του σηματοδοτικού μονοπατιού του παράγοντα TGF-β1 και του κυτταροσκελετού της ακτίνης.....	89
3.6.1. Υπερέκφραση του μόνιμω ενεργού τύπου I υποδοχέα του TGF-β (TβRI) είναι ικανή να επάγει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1.....	89
3.6.2. Η πρωτεΐνη Smad7 αναστέλει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και την ενεργοποίηση της RhoA από τον παράγοντα TGF-β1.....	92
3.6.3. Υπερέκφραση των R-Smad, Smad2 και Smad3, οδηγεί σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και ενεργοποίηση της RhoA από τον παράγοντα TGF-β1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες.....	95
3.7. Ο παράγοντας TGF-β1 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της α-λείας μυϊκής ακτίνης (α-Smooth Muscle actin, α-SMA).....	100
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	104
5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	121

I. ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ

- α-SMA:** α-smooth muscle actin (α-λεία μυϊκή ακτίνη)
- Ad:** Adenovirus (αδενοϊός)
- ADF:** Actin depolymerizing factor (παράγοντας αποπολυμερισμού της ακτίνης)
- ADP:** Adenosine diphosphate (Διφωσφορική αδενοσίνη)
- ALK:** Activin Like Kinase (κινάση παρόμοια με αυτή της ακτιβίνης)
- ARP:** Actin related proteins (πρωτεΐνες σχετικές με την ακτίνη)
- ATP:** Adenosine triphosphate (Τριφωσφορική αδενοσίνη)
- BMP:** Bone morphogenetic proteins (μορφογενετικές πρωτεΐνες των οστών)
- BMPR-I:** BMP receptor type I (τύπου I υποδοχέας του BMP)
- BMPR-II:** BMP receptor type II (τύπου II υποδοχέας του BMP)
- BSA:** Bovine Serum Albumin (Αλβουμίνη εμβρύου βοός)
- caALK-5:** constitutively activated ALK-5 (μονίμως ενεργός ALK-5)
- caALK-5mL45:** caALK-5 mutated at the L45 loop (caALK-5 μεταλλαγμένος στη θηλιά L45)
- co-Smad:** co-mediator Smad (βοηθητική Smad)
- DMEM:** Dulbecco's modified eagle medium
- DMSO:** Dimethylsulfoxide (Διμέθυλοσουλφοξείδιο)
- ECL:** Enhanced Chemmiluminescence (Ενισχυμένη χημειοφωταύγεια)
- ECM:** Extracellular Matrix (Εξωκυττάρια ουσία)
- EMT:** epithelial to mesenchymal transition (επιθηλιακή - μεσενχυματική διαφοροποίηση)
- F-actin:** Filamentous actin (Ινιδιακή ή πολυμερής ακτίνη)
- FAK:** Focal adhesion kinase (κινάση των εστιών πρόσφυσης)
- FBS:** Fetal bovine serum (ορός εμβρύου βοός)
- FITC:** fluorescein Isothiocyanate (ισοθειοκυανική φλουορεσκίνη)
- G-actin:** Globular actin (σφαιρική ή μονομερής ακτίνη)
- GAP:** GTPase activating protein (πρωτεΐνη ενεργοποίησης της δράσης GTPσης)
- GDI:** Guanine nucleotide dissociation inhibitor (αναστολέας αποδέσμευσης της γουανίνης)
- GDP:** Guanosine diphosphate (διφωσφορική γουανοσίνη)
- GEF:** Guanine exchange factor (παράγοντας ανταλλαγής της γουανοσίνης)
- GFP:** Green fluorescent protein (πράσινη φθορίζουσα πρωτεΐνη)
- GS region :** Glycine-serine rich region (περιοχή πλούσια σε γλυκίνες και σερίνες)
- GST:** Glutathione-S-Transferase (τρανσφεράση της γλουταθειόνης)
- GTP:** Guanosine triphosphate (τριφωσφορική γουανοσίνη)
- HRP:** Horseradish peroxidase (ραφανιδική υπεροξειδάση)

- I-Smads:** Inhibitory Smads (ανασταλτικές Smad)
- MEF's:** mouse embryonic fibroblasts (εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού)
- MH domain:** Mad homology (περιοχή ομολογίας των mad)
- MLC:** Myosin light chain (ελαφριά αλυσίδα της μυοσίνης)
- MOI:** Multiplicity of infection (πολλαπλότητα μόλυνσης)
- NES:** Nuclear Export Signal (σήμα εξόδου από τον πυρήνα)
- NLS:** Nuclear localization signal (σήμα πυρηνικού εντοπισμού)
- PBS:** Phosphate buffer saline (διάλυμα φωσφορικών-φυσιολογικού ορού)
- PMSF:** Phenylmethylsulphonyl fluoride (φαίνυλο-μεθυλ-σουλφόνυλο φθορίδιο)
- PSA:** Prostate specific antigen (εξειδικευμένο αντίσωμα του προστάτη)
- RBD:** Rho binding domain (περιοχή σύνδεσης με τη Rho)
- ROCK:** Rho associated coiled-coil kinase
- R-Smads:** Receptor activated Smads (Smads που ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα)
- RTK:** Receptor tyrosine kinases (υποδοχείς κινασών τυροσίνης)
- SARA:** Smad Anchor for Receptor Activation
- SBE:** Smad binding element (στοιχείο πρόσδεσης των Smad)
- SDS:** Sodium dodecyl sulfate (Μετά νατρίου άλας του θειϊκού δωδεκυλίου)
- siRNA:** small interfering RNA (μικρά κατασταλτικά RNA)
- SRF:** Serum response element (στοιχείο απόκρισης στον ορό)
- TβR-I:** TGF-β type I receptor (τύπου I υποδοχέας του TGF-β)
- TβR-II :** TGF-β type II receptor (τύπου II υποδοχέας του TGF-β)
- TGF-β:** Transforming growth factor – β (Μετασχηματίζων αυξητικός παράγοντας- β)

II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης αποτελεί έναν κεντρικό κρίκο στην αλυσίδα ανίχνευσης και μετάδοσης κυτταρικών μηνυμάτων. Η ταχεία μεταβολή της κατάστασης πολυμερισμού του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά αυστηρά ρυθμιζόμενο και ελεγχόμενο τρόπο, τον καθιστά ένα γρήγορο και ευαίσθητο ανταποκρινόμενο αισθητήριο όργανο, το οποίο ελέγχει πλήθος κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι η κίνηση του κυττάρου, η διατήρηση του όγκου, του σχήματος και της πολικότητας του, η πρόσφυση στην εξωκυττάρια ουσία και η ανάπτυξη δύναμης σύσπασης ή κινητήριας δύναμης.

Ο παράγοντας TGF- β 1 ανήκει σε μια υπερ-οικογένεια εκκρινόμενων κυτοκινών, οι οποίες επηρεάζουν πλήθος κυτταρικών διεργασιών και αποκρίσεων όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση. Η βασική μηχανή μεταγωγής μηνύματος του TGF- β 1 ενεργοποιείται όταν ο παράγοντας συνδέεται με δύο μεμβρανικούς υποδοχείς τύπου I και II με δράση κινάσης σερίνης- θρεονίνης. Τότε το σύμπλοκο των υποδοχέων ενεργοποιείται και μέσω των Smad πρωτεϊνών επάγεται η έκφραση πλήθους γονιδίων. Εκτός όμως από τη βασική σηματοδοτική μηχανή του TGF- β , πλήθος άλλων πρωτεϊνών έχουν ταυτοποιηθεί να δρουν καθοδικά από τους υποδοχείς του, η ύπαρξη των οποίων εγείρει πλήθος σημαντικών ερωτημάτων με κυριότερο το αν είναι πράγματι ανεξάρτητα του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών.

Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε απόκριση αυξητικών παραγόντων, όπως είναι ο παράγοντας TGF- β , ελέγχει την πρόσφυση των κυττάρων, την κίνηση και την ανάπτυξη σε διάφορους κυτταρικούς τύπους. Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η κυτταροσκελετική απόκριση ινοβλαστών στον TGF- β . Ακολούθησε διερεύνηση και ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων που μεσολαβούν για την μετάδοση του μηνύματος από τον παράγοντα προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Ο παράγοντας TGF- β 1 επάγει άμεσα έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε Swiss3T3 και εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (MEF's), η οποία είναι εμφανής πολύ νωρίς. Στους Swiss3T3 ινοβλάστες, ο παράγοντας TGF- β 1 ενεργοποιεί δύο μέλη των Rho GTPασών, τη RhoA και τη RhoB. Η ενεργοποίηση και των δύο πρωτεϊνών αποδείχθηκε απαραίτητη για την επαγόμενη από τον TGF- β 1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, αφού υπερέκφραση της μονίμου ανενεργής μορφής είτε της RhoA είτε της RhoB παρεμποδίζει τον πολυμερισμό της ακτίνης.

Οι LIM κινάσες είναι γνωστό ότι ενεργοποιούνται καθοδικά των Rho GTPασών, ως εκ τούτου ελέγχθηκε η συμμετοχή τους στο μονοπάτι. Ο TGF-β1 επάγει άμεσα την ενεργοποίηση της LIMK2, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη φωσφορυλίωση της ενδογενούς κοφιλίνης που συγκατακρημνίζεται μαζί της. Παράλληλα, η ενεργοποίηση των κυττάρων από τον TGF-β1 έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του συνεντοπισμού της LIMK2 με ινιδιακές δομές. Επιπλέον, η γονιδιακή αποσιώπηση της LIMK2 με τη χρήση μικρών κατασταλτικών RNA (siRNA), ανέστειλε δραματικά τον επαγόμενο από τον TGF-β1 πολυμερισμό της ακτίνης. Η LIMK1 δεν συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1, αφού δεν παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης ούτε και μεταβολή του κυτταροπλασματικού της εντοπισμού μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με τον παράγοντα.

Η πρωτεΐνη που συνδέει λειτουργικά τις Rho GTPάσες με τη LIMK2 είναι η πρωτεϊνική κινάση ROCK1, αφού επώαση των κυττάρων με έναν εξειδικευμένο αναστολέα της παρεμποδίζει τόσο την επαγόμενη από τον TGF-β1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όσο και την ενεργοποίηση της LIMK2 και την φωσφορυλίωση της κοφιλίνης.

Παράλληλα πειράματα δοκιμής επούλωσης πληγής έδειξαν ότι η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες συνοδεύεται και από αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων. Αναστολή του μονοπατιού με τον αναστολέα της ROCK1 (Y27632) παρεμβαίνει στην επαγόμενη αυξημένη κινητικότητα των Swiss3T3 ινοβλαστών από τον TGF-β.

Ο ρόλος του τύπου I υποδοχέα του TGF-β (TβRI) αποδείχθηκε όταν υπερεκφράστηκε στους Swiss3T3 ινοβλάστες μια μεταλλαγμένη μορφή του TβRI (caALK-5), που τον καθιστά μονίμως ενεργό ως προς τη δράση κινάσης. Τα κύτταρα στα οποία εκφράστηκε ο caALK-5 εμφάνισαν έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και ενεργοποίηση της RhoA, απουσία ενεργοποίησης των κυττάρων με τον παράγοντα TGF-β1. Αντίθετα, υπερέκφραση του caALK-5mL45, ο οποίος εκτός από τη μετάλλαξη που τον καθιστά μονίμως ενεργό έχει μια επιπλέον μετάλλαξη που καθιστά αδύνατη την πρόσδεση και ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, ήταν αναποτελεσματική ως προς την ενεργοποίηση τόσο της κυτταροσκελετικής απόκρισης των κυττάρων, όσο και της ενεργοποίησης της RhoA. Σε συμφωνία με αυτά τα αποτελέσματα, υπερέκφραση της Smad7 σε Swiss3T3 ινοβλάστες παρεμποδίζει την ικανότητα του TGF-β1 να επάγει πολυμερισμό της ακτίνης, ενώ

παράλληλα παρεμποδίζει την ενεργοποίηση της RhoA. Επιπλέον, η υπερέκφραση είτε της Smad2 είτε της Smad3 οδηγεί σε έντονο πολυμερισμό της ακτίνης και ενεργοποίηση της RhoA απουσία του παράγοντα.

Ενεργοποίηση των κυττάρων με TGF-β1 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα α-SMA στα κύτταρα, η οποία εντοπίζεται κυρίως στο αδιάλυτο κυτταροσκελετικό κλάσμα. Αναστολή της πρωτεΐνης ROCK1, με τον εξειδικευμένο αναστολέα της Y27632, δεν παρεμποδίζει την αυξημένη έκφραση της α-SMA. Υπερέκφραση της Smad3 (και σε μικρότερο βαθμό της Smad2) οδήγησε σε αύξηση της έκφρασης της α-SMA απουσία ενεργοποίησης με TGF-β1.

Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή ταυτοποιήθηκε για πρώτη φορά, ένα νέο μη-γενωμικό μονοπάτι που σηματοδοτεί την άμεση απόκριση των κυττάρων στον TGF-β. Το μονοπάτι αυτό ξεκινά από τον τύπου I υποδοχέα του TGF-β και μέσω των Rho GTPασών RhoA και RhoB, ROCK1, LIMK2 και κοφιλίνης καταλήγει στον πολυμερισμό της ακτίνης. Καταδεικνύεται για πρώτη φορά η ύπαρξη δομικών στοιχείων στον τύπου I υποδοχέα τα οποία είναι υπεύθυνα για την κυτταροσκελετική απόκριση, καθώς και η συμμετοχή της α-λείας μυϊκής ακτίνης στην μακροπρόθεσμη απόκριση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στον TGF-β. Τέλος, παρουσιάζονται πειραματικά δεδομένα που δείχνουν την πιθανή ύπαρξη επικοινωνίας του μονοπατιού των Rho GTPασών με τις Smad πρωτεΐνες μια και η έκφραση των Smad2 και Smad3 επηρεάζει την ενεργοποίησή του.

III. SUMMARY

Regulation of actin reorganization and contractility allows cells to control their shape, movement, division and secretion, vital processes known to be coordinated by the action of several signal transduction pathways. Rapid reorganization of the actin cytoskeleton is one of the earliest cellular responses to many extracellular signals.

Transforming growth factor β (TGF- β) regulates cell growth and differentiation and induces motility of various cell types. The basic TGF- β signaling apparatus consists of a plasma membrane complex of type I and type II receptors and downstream Smad signaling effectors that regulate expression of target genes. Other signaling pathways are also activated by TGF- β . The existence of such pathways raises several important questions, such as if they are truly independent of Smads.

Reorganization of the actin cytoskeleton in response to growth factor signaling, such as transforming growth factor β (TGF- β), controls cell adhesion, motility and growth of diverse cell types. In Swiss3T3 and mouse embryonic fibroblasts (MEF's), treatment with TGF- β 1 resulted in cell flattening, which was supported by changes in the organization of the actin cytoskeleton. Newly formed stress fibers were prominent in the treated cells and their abundance and length clearly increased with prolonged TGF- β 1 treatment. Concomitantly, TGF- β 1 induced activation of RhoA and RhoB small GTPases. Cells expressing dominant-negative RhoA or dominant-negative RhoB could not form new actin stress fibers in response to TGF- β 1 whereas the surrounding non-transfected cells showed robust actin reorganization.

As Rho GTPases are known to regulate the activity of LIM-kinases (LIMK), we found that TGF- β 1 induced LIMK2 phosphorylation with similar kinetics to Rho activation. Cofilin and LIMK2 co-precipitated and cofilin became phosphorylated in response to TGF- β 1, while RNA interference against LIMK2 blocked formation of new stress fibers by TGF- β 1. No significant phosphorylation of LIMK1 was detected after short or long term incubation of Swiss3T3 cells with TGF- β 1.

Since the kinase ROCK1 links Rho GTPases to LIMK2, we found that inhibiting ROCK1 activity blocked completely TGF- β 1-induced LIMK2/cofilin phosphorylation and downstream stress fiber formation.

A wounding assay revealed that TGF- β 1 induces increased cell motility of Swiss3T3 fibroblasts, which is blocked by the ROCK1 specific inhibitor Y27632.

We then tested whether the canonical TGF- β receptor/Smad pathway mediates regulation of the above effectors and actin reorganization. Adenoviruses expressing

constitutively activated TGF- β type I receptor, led to robust actin reorganization and RhoA activation, while the constitutively activated TGF- β type I receptor with mutated Smad docking sites (L45 loop) did not affect neither actin organization nor Rho activity. In line with this, ectopic expression of the inhibitory Smad7 inhibited TGF- β 1-induced Rho activation and cytoskeletal reorganization. Adenoviral expression of the cytoplasmic Smads, Smad2 and Smad3 induced actin reorganization and RhoA activation in the absence of TGF- β 1.

Finally, TGF- β 1 induces α -smooth muscle actin expression, which is not blocked by the ROCK1 inhibitor Y27632. Ectopic expression of Smad3 (and to a lesser degree of Smad2), induced α -SMA expression in the absence of TGF- β 1.

In conclusion, our study reveals a new non-genomic signaling cascade downstream of the TGF- β type I receptor that involves well-known effectors such as Rho GTPases and downstream kinases ROCK1 and LIMK2, transmitting a signal to cofilin and modulating its ability to shift the actin polymerization equilibrium in a positive manner. Furthermore, we have identified novel structural determinants of the type I receptor that may link to the activators of the Rho GTPases and a possible point of convergence of the non-genomic Rho pathway with the cytoplasmic Smads. Thus, our study offers a deeper insight into the alternative signaling pathways initiated by the multifunctional polypeptide factor TGF- β aiming at the regulation of critical physiological responses such as actin cytoskeleton polymerization.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.2 Γενικά για τον κυτταροσκελετό.

Τα ευκαρυωτικά κύτταρα διακρίνονται για το σχήμα τους, την εσωτερική οργάνωση του κυτταροπλάσματος και την κίνηση τους. Οι ιδιότητες αυτές εξαρτώνται από ένα πολύπλοκο και καλά οργανωμένο δίκτυο πρωτεϊνικών μορίων το οποίο σχηματίζει ένα τρισδιάστατο πλέγμα και το οποίο από το 1936 ονομάστηκε κυτταροσκελετός (Needham, 1936). Τα κύρια δομικά συστατικά του κυτταροσκελετού είναι οι μικροσωληνίσκοι, τα ενδιάμεσα ινίδια και τα μικροϊνίδια. Όλες αυτές οι δομές δημιουργούνται όταν τα μονομερή πρωτεϊνικά μόρια που αποτελούν τα συστατικά τους πολυμερίζονται ταχύτατα σε ινδιακές δομές μέσα στο κύτταρο. Πολύπλοκοι και ιδιαίτερα εκλεπτυσμένοι μηχανισμοί ελέγχουν τον πολυμερισμό ή αποπολυμερισμό αυτών των ινιδίων καθώς και τη διαθεσιμότητα των ελεύθερων μονομερών υπομονάδων στο κυτταρόπλασμα.

Οι μικροσωληνίσκοι είναι το ινδιακό σύστημα του κυτταροσκελετού με τη μεγαλύτερη διάμετρο (24 nm). Έχουν δομή κενού κυλίνδρου και σχηματίζονται από διμερή α- και β- τουμπουλίνης. Τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούν μια ομάδα ινιδίων με διάμετρο 7-11 nm και βρίσκονται στα σημεία του κυττάρου που ασκείται έντονη μηχανική πίεση μια και αποτελούν τα πιο σταθερά στοιχεία του κυτταροσκελετού. Τα ενδιάμεσα ινίδια αποτελούνται από διαφορετικές, αλλά δομικά συγγενείς πρωτεΐνες με αξιοσημείωτη κυτταρική εξειδίκευση, με χαρακτηριστικές εκπροσώπους τους τις κυττοκερατίνες, τη βιμεντίνη και τη δεσμίνη. Τέλος τα μικροϊνίδια, τα οποία θα περιγραφούν αναλυτικότερα στις παραγράφους που ακολουθούν, έχουν διάμετρο περίπου 6 nm και σχηματίζονται από μόρια μονομερούς G-ακτίνης (G: Globular) τα οποία κάτω από ειδικές συνθήκες πολυμερίζονται σε ινίδια F-ακτίνης (F: Filamentous).

1.2 Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης.

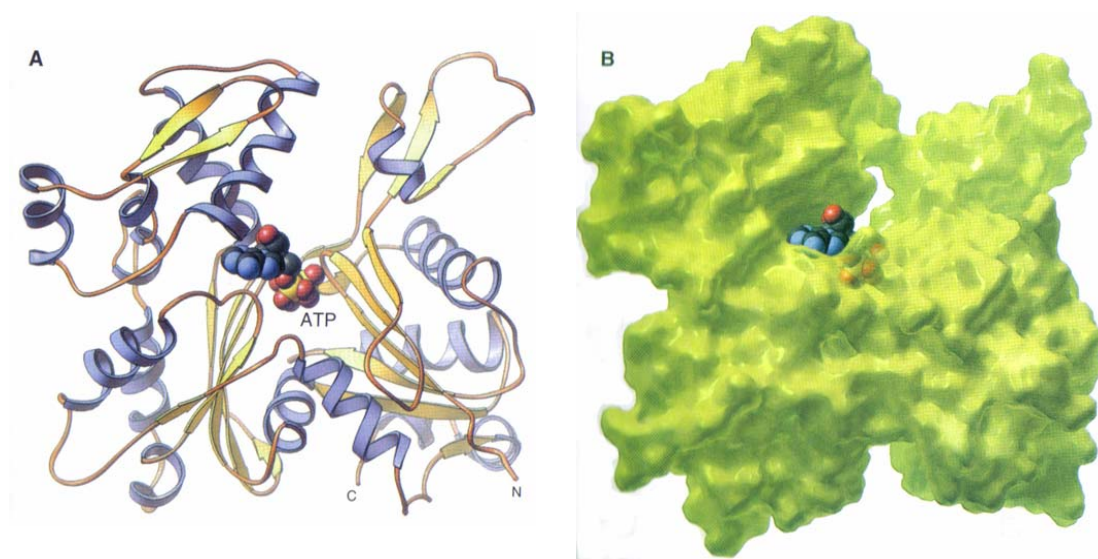
Η ακτίνη μαζί με τη μυοσίνη αποτελούν τα κύρια δομικά συστατικά του κυτταροσκελετού της ακτίνης και βρίσκονται ανάμεσα στις πέντε πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες στα ευκαρυωτικά κύτταρα. Η ακτίνη ανακαλύφθηκε στα μυϊκά κύτταρα μόλις την δεκαετία του 1940 και στα μη μυϊκά κύτταρα στα μέσα της δεκαετίας του 1960. Από το 1970 και μετά, κάθε χρόνο ανακαλύπτονται δύο ή περισσότερες

κατηγορίες πρωτεϊνών συνδεδεμένων με την ακτίνη (Actin Binding Proteins). Παρ'όλα αυτά ο κατάλογος ακόμα δεν πρέπει να θεωρηθεί ολοκληρωμένος.

Στα μυϊκά κύτταρα, η ακτίνη και η μυοσίνη αποτελούν το 60% της συνολικής πρωτεΐνης, ενώ ακόμα και στα μη μυϊκά κύτταρα η ακτίνη είναι μία από τις πιο διαδεδομένες πρωτεΐνες με ποσοστό που μπορεί να ανέρχεται στο 15% της συνολικής πρωτεΐνης στο κύτταρο.

1.2.1. Το μόριο της ακτίνης.

Η ακτίνη είναι μια πρωτεΐνη μικρού σχετικά μοριακού βάρους (42 kDa) και ο προσδιορισμός της τριτοταγούς της δομής επιτεύχθηκε μόλις την περασμένη δεκαετία (Kabsch et al., 1990; Mc Laughlin et al., 1993; Robinson et al., 1999). Το μόριο της ακτίνης έχει δισκοειδές σχήμα και αποτελείται από δύο τομείς (domains) που για ιστορικούς λόγους ονομάζονται «μικρός» και «μεγάλος», αν και ουσιαστικά έχουν περίπου το ίδιο μέγεθος. Οι δύο τομείς διασταρώνονται δύο φορές με αποτέλεσμα το N- και το C- τελικό τους άκρο να βρίσκονται κοντά (εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1.: Τριτοταγής δομή του μορίου της ακτίνης. (A) Μοντέλο της τριτοταγούς αναδίπλωσης της πολυπεπτιδικής αλυσίδας του μορίου της ακτίνης. Φαίνεται ακόμα η θέση του Mg-ATP. (B) Το ATP είναι σχεδόν κρυμμένο στη σχισμή που σχηματίζουν οι δύο λοβοί της πρωτεΐνης. Το ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο του μορίου βρίσκεται στη βάση αυτού του προσανατολισμού. (Kabsch et al., 1990)

Κάθε μόριο ακτίνης έχει τουλάχιστον έξι με δέκα θέσεις πρόσδεσης για κατιόντα, από τις οποίες μία είναι υψηλής συγγένειας για Mg^{2+} ή Ca^{2+} (Pollard 1990). Ενώ η συγγένεια για ασβέστιο είναι πολύ μεγαλύτερη από ότι για μαγνήσιο, η θέση υψηλής συγγένειας *in vivo* είναι σχεδόν αποκλειστικά κατειλημμένη από Mg^{2+} λόγω της πολύ μεγαλύτερης συγκέντρωσης του μαγνησίου στο κυτταρόπλασμα (Estes et al., 1992). Επιπλέον, κάθε μόριο ακτίνης συνδέει με μεγάλη συγγένεια ένα μόριο νουκλεοτιδίου (ATP ή ADP) (Frieden and Patane, 1988), το οποίο κάτω από φυσιολογικές συνθήκες στο κύτταρο είναι σχεδόν αποκλειστικά ATP. Οι δύο αυτοί συμπαράγοντες είναι απαραίτητοι για τη σταθερότητα του μορίου καθώς η *in vitro* απομάκρυνση τους οδηγεί σε πλήρη μετουσίωση της ακτίνης (Korn, 1982)

Στα θηλαστικά υπάρχουν τουλάχιστον έξι διαφορετικές ισομορφές της ακτίνης (Vandekerchove and Weber, 1978 ; Herman I, 1993) οι οποίες αποτελούν προϊόντα έξι διαφορετικών γονιδίων και εκφράζονται με πολύπλοκο αναπτυξιακό και ιστοειδικό τρόπο (Ponte et al., 1983). Τα γονίδια αυτά προέκυψαν πιθανόν κατά την εξέλιξη, από ένα κοινό αρχέγονο γονίδιο (Hightower et al., 1986) και διαφέρουν μεταξύ τους σε πολύ λίγα αμινοξέα, τα οποία μάλιστα εντοπίζονται στο N-τελικό τους άκρο. (Vandekerchove and Weber, 1978 ; Vandekerchore and Weber, 1979). Με βάση το ισοηλεκτρικό τους σημείο διακρίνονται σε τρεις μορφές: α-, β- και γ-ακτίνη και με βάση την ιστοειδικότητα τους κατατάσσονται σε μυϊκές και κυτταροπλασματικές. Οι μυϊκές περιλαμβάνουν (α) δύο ισομορφές των λείων μυών, α-λεία μυϊκή (α-smooth muscle) ή α-αγγειακή (α-vascular), που εκφράζεται στα τοιχώματα των αγγείων και γ-λεία μυϊκή ή γ-εντερική που εκφράζεται στα τοιχώματα του παρεγχυματικού και κυρίως του γαστρεντερολογικού και (β) δύο ισομορφές που εκφράζονται στους γραμμωτούς μύες της καρδιάς και του μυοσκελετικού, α-καρδιακή και α-σκελετική αντίστοιχα. Οι κυτταροπλασματικές περιλαμβάνουν δύο ισομορφές, β- και γ-κυτταροπλασματική και εκφράζονται σε όλα τα κύτταρα σε διαφορετικά όμως επίπεδα ανάλογα με τον τύπο του κυττάρου. Οι ισομορφές ακτίνης παρουσιάζουν μεγάλη ομολογία (93-99%) σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας, με τις μυϊκές ισομορφές να εμφανίζουν μεγαλύτερη ομοιότητα μεταξύ τους (Vandekerchove and Weber, 1978 ; Herman I, 1993). Τέλος η ακτίνη παρουσιάζει μεγάλη φυλογενετική συντήρηση, με πρωτεΐνες από είδη που απέχουν πολύ εξελικτικά να παρουσιάζουν την ίδια ή ορισμένες φορές και μεγαλύτερη ομολογία με αυτή που εμφανίζουν μεταξύ τους διαφορετικές ισομορφές από το ίδιο είδος (Hennessey et al., 1993).

Εκτός από τις παραπάνω κατηγορίες των ισομορφών της ακτίνης, έχει περιγραφεί και μια κατηγορία η οποία περιλαμβάνει τις πρωτεΐνες που σχετίζονται με την ακτίνη (Actin-related proteins, Arps) (Schwob and Martin 1992 ; Lees-Miller et al., 1992), ορισμένες από τις οποίες απαντούν σε κύτταρα σπονδυλωτών. Οι Arps αποτελούν μέλη της οικογένειας των ΑΤΡασών της ακτίνης. Η υδρόλυση του ΑΤΡ έχει σαν αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης των πρωτεϊνών αυτών και τη ρύθμιση της λειτουργίας τους. Οι πλέον χαρακτηριστικές εκπρόσωποι τους είναι οι πρωτεΐνες Arp1, Arp2 και Arp3 οι οποίες είναι κυτταροπλασματικές και συμμετέχουν σε κυτταροσκελετικές λειτουργίες. Η Arp1 εμφανίζει την μεγαλύτερη ομοιότητα με την ακτίνη (45%), έχει διατηρήσει την ικανότητα πολυμερισμού σε ινίδια, αν και μικρότερου μήκους, και αποτελεί μέρος του συμπλόκου της δυνακτίνης. Το σύμπλοκο Arp2-Arp3 φαίνεται να παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του πολυμερισμού της ακτίνης σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα, μέσω της ικανότητας του να επάγει συγκρότηση των ινιδίων ακτίνης, να καλύπτει τα βραδέως αναπτυσσόμενα άκρα των ινιδίων και να διασυνδέει τα ινίδια σε μορφή δικτύου.

1.2.2. Πολυμερισμός της ακτίνης: μηχανισμός και αρχιτεκτονική.

Η μονομερής ακτίνη *in vitro* και σε συγκεκριμένες συνθήκες ιονικής ισχύος πολυμερίζεται μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών σε συνθετικά ινίδια διαμέτρου 5-7 nm και μήκους αρκετών μm (F-ακτίνη). Το ινίδιο της ακτίνης μπορεί να περιγραφεί είτε ως δύο δεξιόστροφες έλικες μεγάλου βήματος είτε ως μία αριστερόστροφη έλικα μικρού βήματος. (Egelman, 1985 ; Carlier, 1991). Τα μονομερή της G-ακτίνης τοποθετούνται στα μικροινίδια καταλαμβάνοντας συγκεκριμένη θέση, με αποτέλεσμα να δημιουργείται πολικότητα στα ινίδια της ακτίνης.

Το κλασικό μοντέλο πολυμερισμού της ακτίνης περιλαμβάνει τρεις φάσεις: (α) την ενεργοποίηση (activation) του μονομερούς και το σχηματισμό πυρήνων (nucleation), (β) την επιμήκυνση (elongation) του ινιδίου και (γ) την επίτευξη της σταθερής δυναμικής κατάστασης (steady state). Αύξηση της ιονικής ισχύος και σύνδεση της G-ακτίνης με δισθενή ιόντα όπως Mg^{2+} , Ca^{2+} , ή K^+ οδηγεί σε αλλαγή της διαμόρφωσης του μονομερούς και μετατροπή του μορίου σε ικανό να πολυμεριστεί (Carlier et al., 1986 ; Zimmerle and Frieden 1986). Ο σχηματισμός των πυρήνων δεν ευνοείται θερμοδυναμικά και είναι το πιο αργό στάδιο του πολυμερισμού. Οι πιθανότεροι πυρήνες είναι τριμερή με δομή όμοια με τη διαμόρφωση τριών υπομονάδων του ινιδίου, δύο διαδοχικών στην ίδια έλικα και ενός στην απέναντι (Korn, 1982 ; Pollard

and Cooper, 1986). Μετά τον σχηματισμό ικανού αριθμού πυρήνων ακολουθεί η ταχεία προσθήκη μονομερών και η επιμήκυνση των σχηματιζόμενων ινιδίων. Συγκεκριμένα, πραγματοποιείται προσθήκη ATP-ακτίνης που μετά την ενσωμάτωση της μετατρέπεται σε ADP-Pi-ακτίνη και τελικά σε ADP-ακτίνη (Korn et al., 1987). Η μη άμεση αποδέσμευση του Pi από το σύμπλοκο ADP-Pi-ακτίνη έχει σταθεροποιητική σημασία επειδή η κρίσιμη συγκέντρωση της ADP-Pi-ακτίνης είναι πολύ μικρότερη από αυτήν της ADP-ακτίνης. Η λειτουργική σημασία της υδρόλυσης του ATP μετά την ενσωμάτωση μορίων στο ολιγομερές είναι ότι διευκολύνεται αργότερα ο αποπολυμερισμός τους αφού τα ινίδια ADP-ακτίνης αποπολυμερίζονται ευκολότερα από της ATP-ακτίνης λόγω διαφορετικής κρίσιμης συγκέντρωσης (Carlier, 1989). Η πολωμένη κατεύθυνση που παρουσιάζουν τα ινίδια της ακτίνης σχετίζεται με την κινητική πολυμερισμού / αποπολυμερισμού σε κάθε άκρο τους. Το "ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο" (barbed end ή αμβλύ άκρο) του ινιδίου παρουσιάζει μεγαλύτερη συγγένεια για την ATP-ακτίνη από το "βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο" (pointed end ή αιχμηρό άκρο), ενώ στην κατάσταση όπου το μήκος του ινιδίου παραμένει σταθερό (treadmill) για κάθε μόριο ακτίνης που προστίθεται στο αμβλύ άκρο, ένα μόριο ακτίνης απομακρύνεται από το αιχμηρό άκρο (Bonder et al., 1983). Ο μηχανισμός πολυμερισμού της ακτίνης δεν είναι ενεργειακά εξαρτώμενος από την υδρόλυση του ATP, δεδομένου ότι η G-ακτίνη μπορεί να πολυμερίζεται ακόμα και όταν είναι συνδεδεμένη μόνο με μόρια ADP ή με μη υδρολυόμενα ανάλογα του ATP (Stourmaras et al., 1988). Αντίθετα, η υδρόλυση του ATP λειτουργεί σαν ένα εσωτερικό ρολόι που υποδεικνύει την ηλικία του ινιδίου και σηματοδοτεί διαδικασίες για την αποδόμηση του ινιδίου της ακτίνης (Pollard and Borisy, 2003).

Το κλάσμα της μονομερούς ακτίνης στο κύτταρο αποτελεί το 30-50% της συνολικής ακτίνης. Η ισορροπία μεταξύ G- και F-ακτίνης επιτυγχάνεται διότι η συγκέντρωση της διαθέσιμης για πολυμερισμό μονομερούς ακτίνης είναι πολύ μικρότερη από την συγκέντρωση της ολικής μονομερούς ακτίνης, καθώς τα περισσότερα μόρια δεν υφίστανται σαν ελεύθερα μονομερή αλλά σχηματίζουν σύμπλοκα με τις συνδεδεμένες με τη μονομερή ακτίνη πρωτεΐνες (monomer actin-binding proteins). Η συγκέντρωση της μονομερούς ακτίνης στο κύτταρο είναι κοντά στην κρίσιμη συγκέντρωση και επομένως τα ινίδια βρίσκονται συνεχώς σε δυναμική ισορροπία ή κοντά σε αυτήν. Οποιαδήποτε μεταβολή είτε στη συγκέντρωση των διαθέσιμων μονομερών είτε των διαθέσιμων για πολυμερισμό άκρων οδηγεί σε μετατόπιση του συστήματος προς μια νέα σταθερή κατάσταση μέσω πολυμερισμού ή αποπολυμερισμού. Η σύσταση και

επομένως η κρίσιμη συγκέντρωση των δύο άκρων των ινιδίων διαφέρει, με συνέπεια τα ινίδια να παρουσιάζουν δυναμική συμπεριφορά με συνεχή ροή υπομονάδων από το "ταχέως αναπτυσσόμενο άκρο" προς το "βραδέως αναπτυσσόμενο άκρο". Η κατάσταση αυτή, λόγω της συνεχούς κατανάλωσης ATP, είναι ενεργειακά πολύ δαπανηρή για το κύτταρο και όταν δεν είναι απαραίτητη, τα άκρα χαμηλής κρίσιμης συγκέντρωσης είναι προστατευμένα από πρωτεΐνες κάλυψης (capping proteins). Επιπλέον, η διαφορά στην κρίσιμη συγκέντρωση των δύο άκρων σε συνδυασμό με την ύπαρξη πληθώρας πρωτεϊνών που συνδέονται με την ακτίνη (actin binding proteins) επιτρέπει στο κύτταρο να δημιουργήσει έναν ευέλικτο και γρήγορο μηχανισμό ρύθμισης της συγκέντρωσης των μικροινιδίων. Έτσι η μεταβολή είτε (α) της κρίσιμης συγκέντρωσης μέσω της αποκάλυψης / απόκρυψης των άκρων χαμηλής κρίσιμης συγκέντρωσης, (β) της συγκέντρωσης των μονομερών μέσω της απελευθέρωσης / δέσμευσης τους από πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τη μονομερή ακτίνη και (γ) του αριθμού των άκρων μέσω κατάτμησης ινιδίων, οδηγεί σε μεταβολή της υπάρχουσας σταθερής κατάστασης και αποκατάσταση μιας νέας δυναμικής ισορροπίας ενώ ταυτόχρονα διατηρείται η συνολική συγκέντρωση της ακτίνης. Ο μηχανισμός αυτός ρύθμισης του πολυμερισμού της ακτίνης εξασφαλίζει την άμεση απόκριση του κυττάρου σε καταστάσεις που απαιτούν την ταχεία αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Η πολυμερής ακτίνη αποτελείται από ινίδια που οργανώνονται σε χαρακτηριστικές δομές σε διάφορες περιοχές του κυττάρου και εξυπηρετούν διαφορετικές ανάγκες του (Small et al., 1998). Τα ινίδια κάτω από την πλασματική μεμβράνη εμφανίζουν ταυτόσημο προσανατολισμό με το αμβλύ (ταχέως αναπτυσσόμενο) άκρο τους να βρίσκεται προς την πλευρά της μεμβράνης (Small et al., 1978). Στην λάμελλα (lamella) την περιοχή δηλαδή του κυτταροπλάσματος ακριβώς κάτω από την πλασματική μεμβράνη, υπάρχει ένα πυκνό πλέγμα περιφεριακής ακτίνης (cortical actin). Το πλέγμα αυτό προσδίδει πλαστικότητα στη μεμβράνη και ταυτόχρονα αποτελεί φραγμό για διάφορα οργανίδια, όπως είναι για παράδειγμα τα εκκριτικά κοκκία, παρεμποδίζοντας την προσέγγισή τους στην πλασματική μεμβράνη. Στο προπορευόμενο άκρο (leading edge) των κυτάρων που μετακινούνται, είναι χαρακτηριστικός ο σχηματισμός διαφόρων προεξοχών (protrusions) με διαφορετικό σχήμα και μέγεθος, που αποτελούνται από δέσμες ινιδίων ακτίνης. Οι δέσμες αυτές σχηματίζονται με τη βοήθεια πρωτεϊνών διασύνδεσης και δεσματοποίησης. Τα λαμμελλιπόδια είναι χαρακτηριστικές δομές που μοιάζουν με πέπλα και περιέχουν

ένα πυκνό πλέγμα ινιδίων. Οι μεμβρανικές αναδιπλώσεις (membrane ruffles) δημιουργούνται όταν τα λαμελλιπόδια ανασηκώνονται από το υπόστρωμα και διπλώνουν προς τα πίσω και πάνω από το σώμα του κυττάρου. Τα φιλοπόδια (filopodia) είναι δομές που προκύπτουν από τη συνένωση ινιδίων του πλέγματος σε δέσμες από παράλληλα ινίδια με τη συνδρομή πρωτεϊνών δεσματοποίησης. Έμφανίζονται σαν επιφανειακές μεμβρανικές προεξοχές μεγάλου μήκους και κυλινδρικού σχήματος. Τα ινίδια του στρες (stress fibers) διατρέχουν το σώμα του κυττάρου, κυρίως στην κάτω πλευρά (ventral) που εφάπτεται με το υπόστρωμα. Οι δέσμες αυτές είναι παράλληλες και αποτελούνται από ινίδια διαφορετικού μήκους και τυχαίου προσανατολισμού (Sanger et al., 1983). Τα άκρα των ινιδίων του στρες που διατρέχουν την κάτω πλευρά του κυττάρου, καταλήγουν και “αγκυροβολούν” στις εστίες πρόσφυσης (focal adhesions) και στο σημείο αυτό όλα τα ινίδια έχουν τον ίδιο προσανατολισμό με το αμβλύ άκρο τους να καταλήγει στη μεμβράνη (Sanger and Sanger, 1980). Τέλος οι μικρολάχνες (microvilli) αποτελούν χαρακτηριστική δομή της αυλικής (apical) μεμβράνης των επιθηλιακών κυττάρων με καλά διαμορφωμένη ψηκτροειδή παρυφή.

1.2.3. Πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την ακτίνη (Actin-Binding proteins)

Ο όρος κυτταροσκελετός της ακτίνης δεν περιλαμβάνει μόνο την ακτίνη, αλλά και σημαντικό αριθμό άλλων πρωτεϊνών, οι οποίες δεσμευόμενες στην μονομερή ή στην πολυμερή μορφή της ακτίνης, ρυθμίζουν την οργάνωση και τη δυναμική ισορροπία του κυτταροσκελετού. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται “πρωτεΐνες συνδεδεμένες με την ακτίνη” (actin-binding proteins) και κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη λειτουργία τους. Οι κατηγορίες αυτές συνοπτικά είναι:

(α) πρωτεΐνες συνδεδεμένες με τη μονομερή ακτίνη (actin monomer-binding proteins).

Οι πρωτεΐνες αυτές συνδέονται με μονομερή ακτίνης ρυθμίζοντας έτσι τη συγκέντρωση της διαθέσιμης για πολυμερισμό ακτίνης. Επιπλέον ελέγχουν την ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου ATP. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν οι:

- β-θυμοσίνες, μικρές πρωτεΐνες που αποτελούνται από 43 αμινοξέα, δεσμεύονται με την ATP ακτίνη με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι με την ADP-ακτίνη και παρεμποδίζουν έτσι την προσθήκη υπομονάδων στα άκρα των ινιδίων. Ταυτόχρονα παρεμποδίζουν και την ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου (Nachmias, 1993 ; Sun et al., 1995).

- Μέλη της οικογένειας ADF (Actin Depolymerizing Factor) / κοφιλίνης που δεσμεύονται κατά προτίμηση σε μονομερή ADP-ακτίνης. Παρεμποδίζουν την ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου και ταυτόχρονα προσδένονται και αποσταθεροποιούν ινίδια ADP-ακτίνης, καθώς συνδέονται στο αιχμηρό άκρο και αυξάνουν την ταχύτητα αποπολυμερισμού τους (Maciver, 1988 ; Carlier, 1999). Η δράση των πρωτεϊνών ADF/κοφιλίνη, ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης της συντηρημένης σερίνης – 3, οπότε αναστέλεται η δράση τους οδηγώντας έτσι σε αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης (Bamburg et al., 1999).
- Οι προφιλίνες δεσμεύονται σε μονομερή ακτίνης και επιταχύνουν την επιμήκυνση των μικροϊνιδίων μειώνοντας δραματικά την κρίσιμη συγκέντρωση στο αμβλύ άκρο (Sun et al., 1995 ; Schluter et al., 1997). Αυτό συμβαίνει γιατί το σύμπλοκο ακτίνης-προφιλίνης συνδέεται με το αμβλύ άκρο με μεγαλύτερη συγγένεια από ότι το μονομερές της ακτίνης. Στη συνέχεια η προφιλίνη απομακρύνεται από το άκρο του ινιδίου με αποτέλεσμα να εξασφαλίζεται ανεμπόδιστα η περαιτέρω προσθήκη μονομερών. Επιπλέον η προφιλίνη αυξάνει την ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου ADP στην G-ακτίνη, με αποτέλεσμα στις περιπτώσεις που υπάρχει αυξημένη παραγωγή ADP-ακτίνης, λόγω αυξημένου αποπολυμερισμού των μικροϊνιδίων, να επάγει την ταχεία μετατροπή της σε ATP-ακτίνη. Η δράση της προφιλίνης ρυθμίζεται και από τη δέσμευση της με φωσφοϊνοσιτίδια της πλασματικής μεμβράνης, σε θέση που επικαλύπτεται με τη θέση σύνδεσης της ακτίνης.

(β) Πρωτεΐνες κάλυψης των άκρων των μικροϊνιδίων (capping proteins) : οι πρωτεΐνες κάλυψης συνδέονται είτε με το αμβλύ είτε με το αιχμηρό άκρο των ινιδίων και παρεμποδίζουν την προσθήκη ή την απομάκρυνση υπομονάδων ακτίνης. Κάποιες από αυτές τις πρωτεΐνες ενεργοποιούν τη δημιουργία νέων ινιδίων που αναπτύσσονται μόνο από το ένα ελεύθερο άκρο. Τέλος κάποιες από τις πρωτεΐνες κάλυψης συνδέονται πλευρικά με τα μικροϊνίδια και εισχωρώντας ανάμεσα σε δύο γειτονικά μόρια ακτίνης διασπών τα ινίδια. Οι πρωτεΐνες αυτές ονομάζονται πρωτεΐνες κατάτμησης (actin severing proteins). Στην κατηγορία αυτή ανήκουν:

- η γκελσολίνη η οποία δεσμεύεται στο αμβλύ άκρο των ινιδίων παρεμποδίζοντας την προσθήκη ή την απομάκρυνση υπομονάδων ακτίνης, αλλά και κατά μήκος των ινιδίων προκαλώντας κατάτμηση. Η γκελσολίνη

επίσης δεσμεύεται σε διμερή ακτίνης διευκολύνοντας τη δημιουργία πυρήνων που θα μεγαλώσουν προς το αιχμηρό τους άκρο (Sun et al., 1999 ; Weeds and Maciver 1993).

- Οι πρωτεΐνες φραγμίνη και σεβερίνη με δράση τόσο κάλυψης όσο και κατάτμησης ινιδίων.
- Το σύμπλοκο Atp2/3 το οποίο έχει την ιδιότητα της δημιουργίας πυρήνων (nucleation), αλλά και κάλυψης των ινιδίων της ακτίνης στο αιχμηρό τους άκρο. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση της ταχύτητας επιμήκυνσης των ινιδίων, αφού ο πολυμερισμός συμβαίνει από το ταχέως αυξανόμενο άκρο. Επιπλέον, το σύμπλοκο Atp2/3 έχει την ικανότητα να προσδένεται στο πλάι των ινιδίων επάγοντας το σχηματισμό ενός νέου ινιδίου από το σημείο που προσδέθηκε, δημιουργώντας έτσι διακλαδώσεις και συμβάλλοντας στο σχηματισμό του πλέγματος της ακτίνης.
- Η βιλλίνη είναι μια από τις πρωτεΐνες με δράση κατάτμησης, ευνοεί όμως και το σχηματισμό δέσμης ινιδίων ακτίνης λειτουργώντας και σαν πρωτεΐνη δεσματοποίησης ανάλογα με τα επίπεδα του ενδοκυττάριου ασβεστίου (Bonder and Mooseker, 1983 ; Walsh et al., 1984).

(γ) Πρωτεΐνες διασύνδεσης και δεσματοποίησης των μικροϊνιδίων (cross-linking and bundling proteins): είναι υπεύθυνες για την οργάνωση των μεμονωμένων ινιδίων σε δέσμες και πλέγματα (Otto, 1994). Η διασύνδεση των μικροϊνιδίων επιτυγχάνεται με την ταυτόχρονη σύνδεση δύο διαφορετικών ινιδίων με ένα μόριο σε περίπτωση που η πρωτεΐνη έχει δύο θέσεις πρόσδεσης για την F-ακτίνη (στην κατηγορία αυτή ανήκουν η φιμπρίνη και η βιλλίνη) είτε ενός ομοδιμερούς στην περίπτωση που η πρωτεΐνη έχει μόνο μια θέση πρόσδεσης (α-ακτινίνη, φιλαμίνη). Η ρύθμιση της ενεργότητας αυτών των πρωτεϊνών διαφέρει. Για παράδειγμα, η φιμπρίνη ενεργοποιείται με φωσφορυλίωση, η δράση της βιλλίνης εξαρτάται όπως αναφέρθηκε και παραπάνω από τη συγκέντρωση των ιόντων Ca^{2+} , η α-ακτινίνη ενεργοποιείται από φωσφοϊνοσιτίδια και απενεργοποιείται από αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυττάριου Ca^{2+} και τέλος η φιλαμίνη απενεργοποιείται από τα φωσφοϊνοσιτίδια.

(δ) οι πρωτεΐνες σύνδεσης της ακτίνης με την κυτταρική μεμβράνη (membrane attachment proteins). Οι πρωτεΐνες αυτές παίζουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία των εστιών πρόσφυσης και στη σύνδεση του περιφερειακού πλέγματος με την πλασματική μεμβράνη. Στις εστίες πρόσφυσης, η α-ακτινίνη και η ταλίνη συνδέουν

τα μικροϊνίδια με το κυτταροπλασματικό τμήμα των ιντεγκρινών (Luna and Hitt, 1992 ; Burridge and Chrzanowska-Wodnicka, 1996). Στη δεύτερη περίπτωση η σύνδεση με το μικροϊνίδια επιτυγχάνεται είτε με την απευθείας σύνδεση της ταλίνης στο πλάι του ινιδίου, είτε με την αλληλεπίδραση με τη βινκουλίνη η οποία επίσης προσδένεται στο πλάι των ινιδίων. Και οι τρεις αυτές πρωτεΐνες αλληλεπιδρούν με πλήθος άλλων πρωτεϊνών που εντοπίζονται στις εστίες πρόσφυσης όπως είναι η παξιλλίνη, η ζυξίνη και η VASP.

1.3. Ο λειτουργικός ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η σημασία του στην ενδοκυττάρια μετάδοση μηνύματος.

Η ταχεία μεταβολή της κατάστασης πολυμερισμού του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά αυστηρά ρυθμιζόμενο και ελεγχόμενο τρόπο, τον καθιστά ένα γρήγορο και ευαίσθητο ανταποκρινόμενο αισθητήριο όργανο, το οποίο ελέγχει πλήθος κυτταρικών λειτουργιών όπως είναι η κίνηση του κυττάρου, η διατήρηση του όγκου, του σχήματος και της πολικότητας του, η πρόσφυση στην εξωκυττάρια ουσία (ECM, Extracellular Matrix), η ανάπτυξη δύναμης σύσπασης ή κινητήριας δύναμης, η κυττοκίνηση (cytokinesis), η ενδοκύττωση και η εξωκύττωση.

Η κατευθυνόμενη κίνηση αποτελεί μια θεμελιώδη κυτταρική διαδικασία, ουσιώδη για την εμβρυϊκή ανάπτυξη και την ανάπτυξη των ιστών, την επούλωση των πληγών και την ανοσολογική απόκριση. Η κίνηση των κυττάρων θα μπορούσε να περιγραφεί ότι συντελείται σε τέσσερα βασικά βήματα: την επέκταση του προπορευόμενου άκρου, την πρόσφυση στο υπόστρωμα, την υποχώρηση του οπίσθιου μέρους του κυττάρου και την αποκόλληση του από το υπόστρωμα (Pollard & Borisy, 2003). Τα ινίδια της ακτίνης και οι πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτά είναι τα κύρια δομικά συστατικά που ελέγχουν και τα τέσσερα αυτά βήματα. Στην προπορευόμενη λάμελλα τα ταχέως αυξανόμενα άκρα των ινιδίων έχουν προσανατολισμό προς την πλασματική μεμβράνη (Small et al., 1978 ; Pollard & Borisy, 2003). Επιπλέον, η συνεχής αναπροσαρμογή των συμπλόκων που συγκροτούν τις εστίες πρόσφυσης είναι απαραίτητη για να μπορέσει το κύτταρο να μεταναστεύσει (Wozniak et al., 2004). Συγκεκριμένα οι ιντεγκρίνες και η πρωτεϊνική κινάση των εστιών πρόσφυσης (FAK, Focal Adhesion Kinase), στρατολογούνται στις εστίες πρόσφυσης σχηματίζοντας σύμπλοκα με πλήθος άλλων πρωτεϊνών, σταθεροποιώντας έτσι την πρόσφυση του κυττάρου. Μια από τις πρωτεΐνες που στρατολογούνται, η πρωτεΐνη Src,

φωσφορυλιώνοντας την FAK, στην τυροσίνη Y925, προκαλεί την απομάκρυνση της από τα σύμπλοκα πρόσφυσης και τελικά την αποδόμηση τους (Katz et al., 2003 ; Arias-Salgado et al., 2003 ; Sakai et al., 2001).

Σημαντικός είναι επίσης ο ρόλος του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά την κυττοκίνηση και το σχηματισμό του συσταλού δακτυλίου (contraction ring) που δημιουργείται κατά το διαχωρισμό της πλασματικής μεμβράνης (Kaibuchi et al., 1999). Ο δακτύλιος αυτός αποτελείται κυρίως από ακτίνη και μυοσίνη, ενώ η σύσπαση αυτής της δομής προσδίδει τη δύναμη που απαιτείται για τη τελική διαίρεση του κυττάρου στα δύο θυγατρικά, τραβώντας τη πλασματική μεμβράνη και διαχωρίζοντας το κυτταρόπλασμα (Theriot & Satterwhite, 1997 ; Fishkind & Wang, 1995). Το μονοπάτι Rho/ROCK μέσω φωσφορυλίωσης της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης, MLC, επάγει τη συστολή του δακτυλίου και ελέγχει με αυτόν τον τρόπο τη διαίρεση των κυττάρων (Kaibuchi et al., 1999).

Η ενδοκύττωση, ο μηχανισμός δηλαδή της εισόδου μακρομορίων στο κύτταρο και στη συνέχεια η απελευθέρωση τους στα λυσοσωμάτια, καθώς και η ανακύκλωση υποδοχέων ελέγχεται από τον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Durrbach et al., 1996). Κατά την τύπου I φαγοκύτωση, οι ενεργοποιημένοι Fc υποδοχείς στρατολογούν στο σημείο τις μικρές GTPάσες Rac και Cdc42 (Caron & Hall, 1998). Η ενεργοποίηση της Cdc42 ευθύνεται για την προβολή της πλασματικής μεμβράνης και την προέκταση των φιλοποδίων έτσι ώστε να περιβάλλουν το φορτίο, ενώ η Rac ευθύνεται για την ενσωμάτωση του (Massol et al., 1998). Αντίθετα, κατά την τύπου II φαγοκύτωση δεν συμβαίνει προβολή της πλασματικής μεμβράνης, αλλά το φορτίο κατά μία έννοια «βυθίζεται» σε αυτή (Caron & Hall, 1998). Σε αυτήν την περίπτωση το μονοπάτι Rho/ROCK ελέγχοντας το σύμπλοκο της ακτο-μυοσίνης ρυθμίζει την ανάπτυξη δύναμης σύσπασης (contractile force) και από μηχανικής άποψης συμβάλει στην εγκόλπωση του φορτίου.

Εκτός από την ενδοκύττωση, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης παίζει σημαντικό ρόλο και στην ρυθμιζόμενη έκκριση. Το πλέγμα της ακτίνης κάτω από την πλασματική μεμβράνη δρα σαν φραγμός για τα εκκριτικά κυστίδια εμποδίζοντας την κίνησή τους προς την πλασματική μεμβράνη και την ενσωμάτωση τους σε αυτήν (Burgoyne & Cheek, 1987 ; Bretscher, 1991 ; Mualien et al., 1995). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η τροποποίηση της περιφερειακής ακτίνης στην έκλυση των κατεχολαμινών από χρωμιόφιλα κύτταρα και συγκεκριμένα την χαρακτηριστική κυτταρική σειρά φαιοχρωκυττοχρώματος PC12, μετά από επίδραση νευροστεροϊδών

(Charalampopoulos et al., 2005). Επιπλέον η ενεργοποίηση των μεμβρανικών ορμονικών υποδοχέων στην καρκινική κυτταρική σειρά από προστάτη LNCaP, προκαλεί σαν άμεση απόκριση την αύξηση έκκρισης του ειδικού αντιγόνου του προστάτη, PSA (Prostate Specific Antigen). Η αυξημένη έκκριση του PSA σχετίζεται άμεσα με την επαγόμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Kampa et al., 2002 ; Parakonstanti et al., 2003). Συγκεκριμένα έκθεση των LNCaP σε τεστοστερόνη-BSA, οδηγεί σε φωσφορυλίωση της FAK, και σύνδεση της με την PI-3 κινάση, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της και τελική ενεργοποίηση των μικρών GTPασών Cdc42/Rac1 (Parakonstanti et al., 2003)

Από την πρόσφατη βιβλιογραφία προκύπτει, ότι ο βαθμός πολυμερισμού της ακτίνης εμπλέται σε μηχανισμούς μεταγραφικής ενεργοποίησης και ελέγχου της εξέλιξης του κυτταρικού κύκλου. Σε όλα τα φυσιολογικά κύτταρα για να προχωρήσουν στον κυτταρικό κύκλο, απαιτείται ενεργοποίηση από αυξητικούς παράγοντες, πρόσφυση στην εξωκυττάρια ουσία (ECM) και καλή οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Walker et al., 2005). Πολλές μελέτες καταδεικνύουν το σημαντικό ρόλο της ορθής οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της εξάπλωσης του κυττάρου στην εξωκυττάρια ουσία (cell spreading) για την επαγόμενη από υποδοχείς με δράση κινάσης τυροσίνης (Receptor tyrosine kinases, RTK's) εξέλιξη της G(1) φάσης του κυτταρικού κύκλου (Bohmer et al., 1996). Επιπλέον, αναστολή είτε του πολυμερισμού της ακτίνης, είτε της δράσης της πρωτεϊνικής κινάσης ROCK, είτε της επαγωγής δύναμης σύσπασης μέσω φωσφορυλίωσης της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC), παρεμποδίζει την επαγόμενη από αυξητικούς παράγοντες σύνθεση της κυκλίνης D1 (cyclin D1) σε ινοβλάστες και ηπατοκύτταρα (Roovers & Assoian, 2003 ; Hansen & Albrecht, 2003 ; Bhadriradju & Hansen, 2002 ; Bohmer et al., 1996). Παρομοίως, η απουσία οργανωμένου πλέγματος ακτίνης και η παρεμπόδιση της σύσπασης του συμπλόκου ακτίνης – μυοσίνης παρεμποδίζει την επαγόμενη από αυξητικούς παράγοντες ενεργοποίηση του μονοπατιού Ras-Raf-MEK-ERK (Roovers et al., 2003). Η επαγόμενη από ιντεγκρίνες ενεργοποίηση του ERK μονοπατιού, απουσία αυξητικών παραγόντων, αναστέλεται από τον αποπολυμερισμό της ακτίνης (Chen et al., 1994; Zhu & Assoian, 1995; Morino et al., 1995).

Η μεταβολή του βαθμού πολυμερισμού της ακτίνης επηρεάζει ακόμα και τη μεταγραφική ενεργοποίηση. Συγκεκριμένα, ο μεταγραφικός συν-ενεργοποιητής MAL, παραμένει στο κυτταρόπλασμα εξαιτίας της προσδεσής του με μονομερή ακτίνης. Μείωση των επιπέδων της G-ακτίνης εξαιτίας πολυμερισμού, έχει σαν

αποτέλεσμα τη συσσώρευση του παράγοντα MAL στον πυρήνα, όπου συμβάλλει πια στην μεταγραφή γονιδίων που περιέχουν στον υποκινητή τους στοιχεία πρόσδεσης του παράγοντα απόκρισης στον ορό (SRF, Serum Response Element) (Miralles et al., 2003). Τα γονίδια αυτά ενεργοποιούνται πρώιμα κατά την εξέλιξη της G(1) φάσης του κυτταρικού κύκλου και ο συν-ενεργοποιητής MAL επάγει την έκφραση αρκετών από αυτά, όπως για παράδειγμα του ίδιου του γονιδίου SRF, της βινκουλίνης και της πρωτεΐνης Cyr61 (Walker et al., 2005). Επιπλέον η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι απαραίτητη για τις αντι-αποπτωτικές ιδιότητες του TNF-α σε επιθηλιακά κύτταρα OK, καθώς και για την μετακίνηση του μεταγραφικού παράγοντα NF-κB στον πυρήνα (Papakonstanti & Stournaras, 2004). Η αντι-αποπτωτική δράση του TNF-α μέσω αναστολής της δράσης της κασπάσης – 3 συμβαίνει μέσω του μονοπατιού PI-3 κινάση → Cdc42 → PLC-γ1 → αναδιοργάνωση της ακτίνης → μετακίνηση του NF-κB στον πυρήνα (Papakonstanti & Stournaras, 2004).

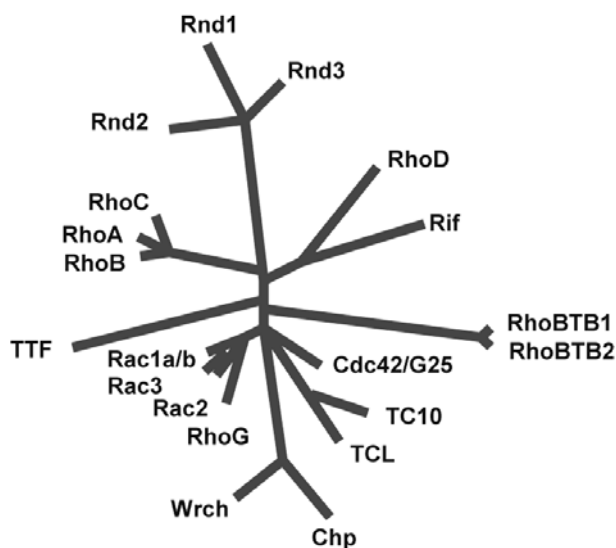
Τέλος από την πρόσφατη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η μη ελεγχόμενη ανάπτυξη των νεοπλασματικών κυττάρων καθώς και η διεισδυτικότητα και η ικανότητα μετάστασης σχετίζονται με μεταβολές του κυτταροσκελετού τους, με κυριότερη την έντονη αναδιοργάνωση των μικροϊνιδίων της ακτίνης. Κατά τη διάρκεια της κακοήθους εξαλλαγής του κυττάρου η δυναμική ισορροπία του λόγου της μονομερούς προς την πολυμερή ακτίνη αλλάζει δραματικά (Moustakas & Stournaras, 1999; Stournaras et al., 1996). Η μεταβολή του λόγου μονομερούς/πολυμερούς (G/F) ακτίνης σχετίζεται με το βαθμό διαφοροποίησης των νεοπλασματικών κυττάρων σε διάφορες μορφές νεοπλασιών (λευχαιμίες, καρκίνους ενδομητρίου, μαστού, δέρματος), καθιστώντας τον λόγο G/ολική ακτίνη έναν νέο δείκτη νεοπλασίας (Katsadonis et al. 1994, Stournaras et al. 1996, Stiakaki et al. 1997, Moustakas and Stournaras 1999). Η σημασία του έχει πλέον αναγνωρισθεί από τη διεθνή επιστημονική κοινότητα (Jordan and Wilson 1998). Επιπλέον υπάρχουν σαφής πειραματικές ενδείξεις ότι ο αποδιοργανωμένος κυτταροσκελετός των νεοπλασματικών κυττάρων εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία στη δράση αποσταθεροποιητικών παραγόντων που αλληλεπιδρούν με την ακτίνη, όπως είναι οι κυττοχλασίνες, με αποτέλεσμα την μειωμένη βιωσιμότητα (λεμφοκύτταρα από χρόνιας ή οξείας λευχαιμίες) ή την αναστολή του κυτταρικού πολλαπλασιασμού (καρκινικές σειρές από αδενοκαρκινώματα ενδομητρίου) (Stournaras et al. 1996; Stiakaki et al., 1997).

Τέλος πρόσφατες μελέτες υποστηρίζουν ότι διάφορα δραστικά βιομόρια (όπως είναι κυττοκίνες, αυξητικοί παράγοντες, οπιοειδή) επαναφέρουν την ισορροπία G/F-ακτίνης καθώς και την αρχιτεκτονική των μικροϊνιδίων των νεοπλασματικών κυττάρων στο φυσιολογικό φαινότυπο περιορίζοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη μεταστατικότητα τους (Moustakas and Stoumnaras 1999, Koukouritaki et al. 1999, Parakonstanti et al. 1998 & 2000). Η επίδραση του TGF- β 1 σε ινοβλάστες μετασχηματισμένους από το ογκογονίδιο H-ras οδηγεί σε μείωση του λόγου G/ολική ακτίνη στην τιμή των φυσιολογικών μη-μετασχηματισμένων κυττάρων ενώ παράλληλα παρατηρείται επαναδιοργάνωση της ακτίνης σε εκτετάμενα ινίδια του στρές (Moustakas and Stoumnaras 1999). Επιπλέον η επίδραση οπιοειδών στα MCF7, κύτταρική σειρά από καρκίνο μαστού, επαναφέρει το λόγο G/ολική ακτίνη και τα επίπεδα της πολυμερούς ακτίνης κοντά στις αντίστοιχες τιμές των MCF12A, των ομόλογων φυσιολογικών κυττάρων μαστού, ενώ ταυτόχρονα μειώνει το ρυθμό ανάπτυξης των νεοπλασματικών κυττάρων (Panagiotou et al., 1999 ; Kallergi et al., 2003). Φαίνεται μάλιστα ότι η μεταγωγή του μηνύματος δράσης των οπιοειδών στον κυτταροσκελετό των καρκινικών κυττάρων διαφέρει από το μονοπάτι δράσης στα φυσιολογικά κύτταρα και περιλαμβάνει την αυξημένη φωσφορυλίωση πρωτεϊνών των εστιών πρόσφυσης, FAK και βινκουλίνης, αλλά και την ενεργοποίηση των πρωτεϊνών PI-3K και Rac-1 (Kallergi et al., 2003).

Τα νεοπλασματικά κύτταρα εμφανίζουν ελαττωμένα επίπεδα έκφρασης πρωτεϊνών που συνδέονται με τον κυτταροσκελετό (Vanderkerckhove et al., 1990; Chaponnier et al., 1989), ενώ σε κάποιες περιπτώσεις ο φαινότυπος αυτός αντιστρέφεται κατά την επιστροφή του κυττάρου στο μη μετασχηματισμένο φαινότυπο (Mullauer et al., 1990). Κύτταρα που εμφανίζουν εξασθενημένο το δίκτυο της ακτίνης με κοντά και πολύ λεπτά μικροϊνίδια έχουν έναν πιο «πλαστικό» χαρακτήρα με μεγαλύτερη δυνατότητα να κινηθούν επομένως να δημιουργήσουν μετάσταση (Pokorna et al., 1994). Η σχέση μεταξύ της οργάνωσης της ακτίνης και της ικανότητας του κυττάρου να μεταναστεύει ποικίλει στους διάφορους κυτταρικούς τύπους. Έτσι μελέτες σε κύτταρα BW5147 (από T-λέμφωμα) με μικρή μεταστατική ικανότητα έδειξαν ότι αυξημένα ποσοστά πολυμερισμού της ακτίνης είναι απαραίτητα για τη δημιουργία ψευδοποδίων και τη διείσδυση αυτών των κυττάρων στο γειτονικό ιστό (Vershueren et al., 1994). Αντίθετα επιμόλυνση της κυτταρικής σειράς B16-B16, με cDNA που εκφράζει την β m-ακτίνη έδωσε κύτταρα χαμηλότερης μεταστατικής ικανότητας και αύξηση του ποσοστού των ινιδίων του στρές (Shimokawa-Kuroki et al., 1994).

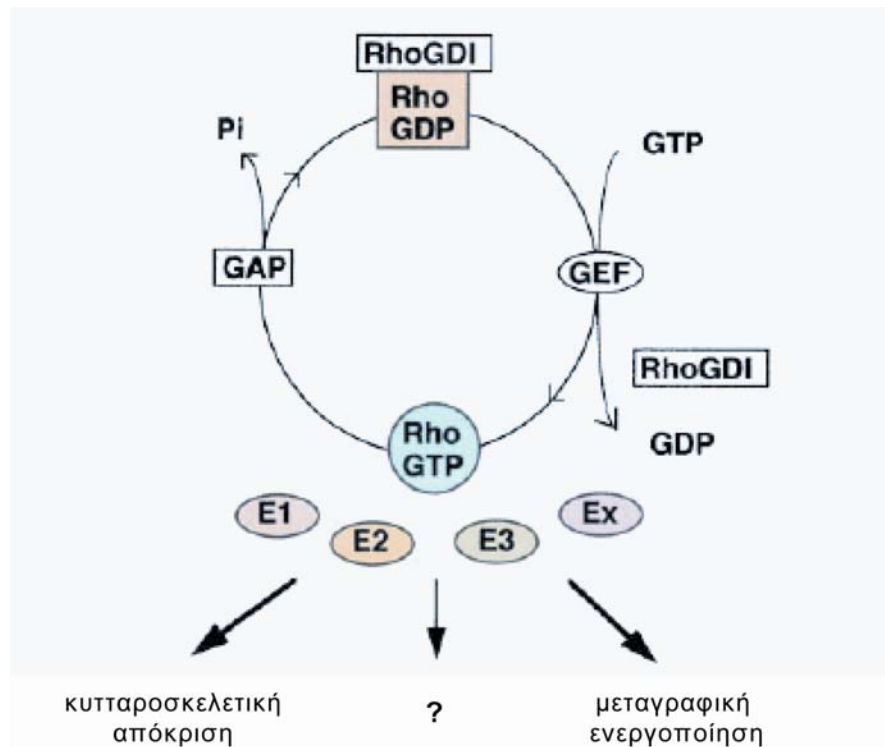
1.4. Ο ρόλος των μικρών Rho GTPασών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Μέλη της ευρύτερης οικογένειας των Rho GTPασών ρυθμίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια που συνδέουν εξωκυττάρια και ενδοκυττάρια σήματα με τον πολυμερισμό και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, ελέγχοντας πλήθος κυτταρικών αποκρίσεων (Raftoroulou & Hall, 2004 ; Ridley, 2001 ; Hall, 1998 ; Mackay & Hall, 1998 ; Tapon & Hall 1997). Η οικογένεια των Rho GTPασών στον άνθρωπο αποτελείται τουλάχιστον από 23 διαφορετικές πρωτεΐνες, εκ των οποίων οι πλέον χαρακτηριστικές εκπρόσωποι και καλύτερα μελετημένες είναι οι πρωτεΐνες Rho, Rac1 και Cdc42 (Bishop & Hall, 2000 ; Qualman & Mellor, 2003) (εικόνα 1.2). Οι Rho GTPάσες απαντώνται ακόμα και σε απλούστερους οργανισμούς, από τη ζύμη (yeast, *Saccharomyces cerevisiae*) και την αμοιβάδα (*Dictyostelium*) μέχρι τα φυτά και τη δροσόφιλλα. (Wherlok & Mellor, 2002 ; Gulli & Peter, 2001 ; Wilkins & Insall, 2001; Settleman, 2001 ; Valster et al., 2000).



Εικόνα 1.2: Δενδρόγραμμα για τα 23 μέλη της οικογένειας των μικρών Rho GTPασών του ανθρώπου.

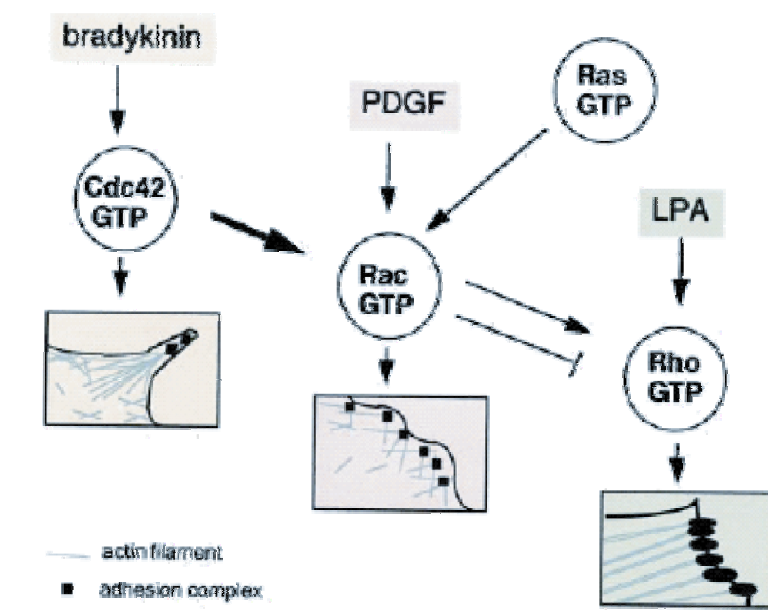
Όπως όλες οι πρωτεΐνες με δράση GTPάσης, οι Rho πρωτεΐνες λειτουργούν σαν μοριακοί διακόπτες που ανακυκλώνονται μεταξύ της Rho-GDP ανενεργής και της Rho-GTP ενεργής μορφής (Bishop & Hall, 2000 ; Mackay & Hall, 1998). Η μετάβαση από την ενεργή στην ανενεργή κατάσταση και αντίστροφα επηρεάζεται από ένα πλήθος ρυθμιστικών παραγόντων (Lamarche & Hall, 1994 ; Van Aelst & D'Souza-Schorey, 1997 ; Olofsson, 1999) (εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Οι Rho GTPάσες βρίσκονται στην ανενεργή τους Rho-GDP μορφή συνδεδεμένες με κάποια Rho-GDI (Guanine nucleotide Dissociation Inhibitor). Σε απόκριση κάποιου μηνύματος η Rho-GDI αποδεσμεύεται επιτρέποντας στην κατάλληλη GEF (Guanine Exchange Factor) να καταλύσει την ανταλλαγή του GDP από GTP και την ενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Στην ενεργή τους μορφή οι Rho GTPάσες αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins) (E 1-γ) προκαλώντας διάφορες κυτταρικές αποκρίσεις. Ο κύκλος κλείνει όταν η κατάλληλη GAP (GTPase activating protein) αλληλεπιδρά με την Rho-GTP και καταλύει την υδρόλυση του GTP. Η Rho-GDP απομακρύνεται από την περιοχή της πλασματικής μεμβράνης αφού προσδεθεί σε ένα μόριο Rho-GDI και ο κύκλος ξαναρχίζει (Mackay & Hall, 1998)

Για την πρόσδεση των Rho πρωτεϊνών στην πλασματική μεμβράνη ευθύνεται μια μετα-μεταγραφική τροποποίηση του μορίου τους. Συγκεκριμένα, ένα λιπίδιο γεράνυλο-γερανύλιο προσδένεται ομοιοπολικά με την κυστεΐνη του συντηρημένου μοτίβου CAAX του C-τελικού άκρου τους, αυξάνοντας έτσι την ικανότητα πρόσδεσης της πρωτεΐνης στην πλασματική μεμβράνη (Desrosiers et al., 2000 ; Seabra, 1998 ; Zhang & Casey, 1996).

Οι Rho πρωτεΐνες ελέγχουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Ενεργοποίηση των Rho σε ινοβλάστες είναι υπεύθυνη για τη δεσματοποίηση ινιδίων ακτίνης σε ινίδια του στρες αλλά και για τη στρατολόγηση των ιντεγκρινών στα σύμπλοκα των εστιών πρόσφυσης. Η ενεργοποίηση της Rac προκαλεί τον εκ νέου (*de novo*) πολυμερισμό της ακτίνης στην περιφέρεια του κυττάρου και τη δημιουργία λαμελλιποδίων και μεμβρανικών αναδιπλώσεων, ενώ ενεργοποίηση της Cdc42 ενεργοποιεί τη δημιουργία φιλοποδίων και μικρολαχνών (Mackay & Hall, 1998 ; Hall, 1998 ; Mackesky & Hall, 1997 ; Nobes & Hall, 1995 ; Ridley & Hall, 1992 ; Ridley et al., 1992) (εικόνα 1.4).



Εικόνα 1.4: Επίδραση των Rho GTPασών στις δομές οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Μέχρι σήμερα στα θηλαστικά έχουν ταυτοποιηθεί πάνω από 80 GEF's (Guanine nucleotide Exchange Factors). Όλες χαρακτηρίζονται δομικά από μια περιοχή υψηλής ομολογίας με την πρωτεΐνη Dbl (Dbl homology domain, DH). Η περιοχή DH είναι υπεύθυνη για την κατάλυση της ανταλλαγής του νουκλεοτιδίου της γουανίνης. Η πρωτεΐνη Dbl χαρακτηρίστηκε αρχικά σαν πρώτο-ογκογονίδιο και το 1991 δείχθηκε ότι επάγει την ανταλλαγή GDP σε GTP για την πρωτεΐνη Cdc42 (Hart et al., 1991). Μέχρι σήμερα, έχουν χαρακτηριστεί πολλές ακόμα GEF's, από τις οποίες άλλες φαίνονται να παρουσιάζουν εξειδίκευση για μία μόνο GTPάση, όπως η p115Rho GEF για την Rho (Hart et al., 1996), οι Tiam και Pix για την Rac (Haberts et al., 1994 ; Manser et al., 1998), η Fgd1 για την Cdc42 (Zheng et al., 1996), ενώ άλλες ενεργοποιούν περισσότερες από μία όπως η Vav για τις Cdc42, Rac και Rho (Hart et al., 1994), η Dbl για τις Rho και Cdc42 (Hart et al., 1994 ; Olson et al., 1996) και η Trio για τις Rac και Rho (Depant et al., 1996). Την περιοχή DH των GEF ακολουθεί μια περιοχή με ομολογία στην πλεκστρίνη (pleckstrin homology domain, PH). Και οι δύο περιοχές DH και PH είναι απαραίτητες για την δράση των GEF (Cerione & Zheng, 1996 ; Kaibuchi et al., 1991).

Οι πρωτεΐνες GAP's (GTPase activating proteins) είναι μόρια που ενεργοποιούν την ενδογενή δράση υδρόλυσης του νουκλεοτιδίου GTP των GTPασών, οδηγώντας έτσι στην απενεργοποίηση των μορίων. Μεταξύ αυτών είναι η πρωτεΐνη p122Rho GAP και p190Rho GAP για τη Rho (Homma & Emori, 1995 ; Settleman et al., 1992), οι Bcr και η β-chimerin για την Rac (Diekmann et al., 1991 ; Leung et al., 1993) και η p50Rho GAP κυρίως για την Cdc42 (Lancaster et al., 1994).

Τέλος οι πρωτεΐνες GDI's (Guanine nucleotide dissociation inhibitors) συγκρατούν τις Rho πρωτεΐνες μακριά από την πλασματική μεμβράνη δεσμευόμενες στην πρενυλο-ομάδα του C-τελικού άκρου των GTPασών εμποδίζοντας έτσι την αλληλεπίδραση τους με την μεμβράνη. Παράλληλα παρεμποδίζουν την ανταλλαγή του GDP από GTP (Wheeler & Ridley, 2004). Έχουν ταυτοποιηθεί τρεις GDI's, η Rho-GDI και τουλάχιστον δύο ισομορφές της: η D4-GDI και η Rho-GDI3 (Lelias et al., 1993 ; Zalzman et al., 1996).

1.4.1. Rho GTPάσες.

Στους ανώτερους σπονδυλωτούς οργανισμούς εκφράζονται τρεις Rho GTPάσες, η RhoA, η RhoB και η RhoC, οι οποίες εμφανίζουν μεταξύ τους περίπου 85% αμινοξική αλληλουχία (Wheeler & Ridley, 2004). Στον άνθρωπο, τον ποντικό και τον αρουραίο τα τρία γονίδια των Rho πρωτεϊνών βρίσκονται σε διαφορετικά

χρωμοσώματα (Cannizzaro et al., 1990). Και οι τρεις πρωτεΐνες εκφράζονται σε όλους τους ιστούς αν και όχι στον ίδιο βαθμό (Wheeler & Ridley, 2004). Σε κύτταρα που βρίσκονται σε καλλιέργεια η έκφραση του γονιδίου της RhoB, αλλά όχι της RhoA ή της RhoC, επάγεται από πλήθος παραγόντων όπως ακτινοβολία UV, κυτοκίνες ή αυξητικοί παράγοντες, εξαιτίας ενεργοποίησης του υποκινητή του γονιδίου (Pendergast, 2001). Επιπλέον το μεταγράφημα του rhoB γονιδίου έχει ημιπερίοδο ζωής τα 30 λεπτά, χρόνος πολύ μικρότερος από αυτόν της RhoA ή της RhoC. Καταδεικνύεται έτσι ότι η λειτουργία της RhoB απαιτεί υψηλό βαθμό ελέγχου της έκφρασης της πρωτεΐνης (Zalcman et al., 1995).

Η πρενυλίωση των Rho πρωτεϊνών είναι πολύ σημαντική για τη σταθερότητα του μορίου τους. Οι πρωτεΐνες RhoA και RhoC γερανυλο-γερανυλιώνονται και εντοπίζονται στην πλασματική μεμβράνη. Αντίθετα, η RhoB είτε φαρνεσυλιώνεται οπότε οδηγείται στην πλασματική μεμβράνη, είτε γερανυλο-γερανυλιώνεται οδηγούμενη στα ώριμα ενδοσωμάτια και τα λυσοσωμάτια. Αναστολή της φαρνεσυλίωσης, οδηγεί σε αύξηση της γερανυλο-γερανυλίωσης της RhoB, οπότε αυξάνεται ο εντοπισμός της στα ενδοσωμάτια (Wherlock et al., 2004).

Οι Rho GTPάσες διαμέσω της δράσης τους στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατέχουν κεντρικό ρόλο στη ρύθμιση κυτταρικών λειτουργιών και ιδιοτήτων όπως είναι η κίνηση, ο όγκος και η πολικότητα των κυττάρων, η πρόσφυση στην εξωκυττάρια μάζα, η συσταλτικότητα του συμπλόκου της ακτο-μυοσίνης, η κυτοκίνηση (cytokinesis) και η μεταγραφική ενεργοποίηση (Wheeler & Ridley, 2004). Μετά την ενεργοποίηση τους οι Rho GTPάσες αλληλεπιδρούν με πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins) και μεταδίδουν το μήνυμά τους. Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί 11 πρωτεΐνες τελεστές για τις Rho GTPάσες. Παρουσιάζονται αναλυτικά στον πίνακα 1 καθώς και ο βαθμός αλληλεπίδρασης με κάθε μια από τις τρεις ισομορφές.

Η πρωτεϊνική κινάση ROCK (Rho-associated coiled-coil kinase) αποτελεί μια από τις κύριες εκπροσώπους των πρωτεϊνικών στόχων των Rho GTPασών, μεσολαβώντας στη μετάδοση πλήθους μηνυμάτων που με αφετηρία τις Rho ρυθμίζουν δυναμικά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης ελέγχοντας τη δημιουργία των ινιδίων του στρες και των εστιών πρόσφυσης στο υπόστρωμα (Amano et al., 2000 ; Bishop & Hall, 2000 ; Aspenstrom, 1999). Η ROCK είναι μια κινάση σερίνης/θρεονίνης, η οποία ταυτοποιήθηκε αρχικά σαν πρωτεΐνη δεσμευόμενη στη

Πίνακας 1.

Πρωτεΐνες τελεστές (effector proteins) των Rho GTPασών.

Πρωτεΐνες τελεστές	RhoA	RhoB	RhoC
ROCK 1 + 2	++	+	+++
mDia	++	+	++
PRK ½ PKN	++	++	++
Rhotekin	+++	+	+++
Rhophilin	+++	+	++
Kinectin	+++	?	?
Citron kinase	++	+	+++
MBS	+++	?	?
P76RBE	+	++	?
PKC epsilon	++	++	+++
DBI transcription factor	+	++	?

+ = ασθενής αλληλεπίδραση

++ = μέση αλληλεπίδραση

+++ = ισχυρή αλληλεπίδραση

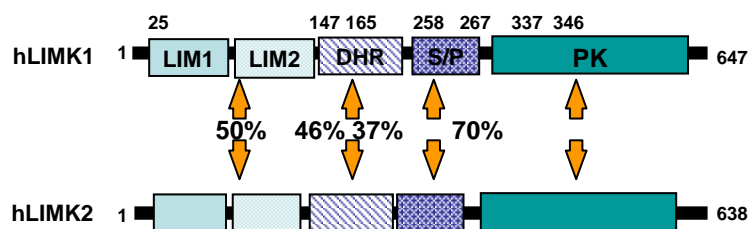
? = άγνωστο

Rho-GTP (Matsui et al., 1996). Συναντάται σε δύο ισομορφές : την ROKα ή ROCK2 και την ROKβ ή ROCK1 με 64% ομολογία στην πρωτοταγή αμινοξική αλληλουχία (Ishizaki et al., 1996 ; Nakagawa et al., 1996). Η περιοχή με δράση κινάσης είναι υψηλά διατηρημένη εμφανίζοντας ομολογία μεταξύ των δύο ισομορφών που φτάνει το 90% και βρίσκεται στο N-τελικό της άκρο. Στο μέσο της πρωτεϊνικής αλυσίδας βρίσκεται μια περιοχή σπειραμένου σπειράματος (coiled-coil domain) ενώ στο C-τελικό άκρο μια περιοχή ομολογίας με την πλεκστρίνη (PH, Pleckstrin homology domain). Η Rho-GTP αλληλεπιδρά με το C-τελικό άκρο της ROCK και συγκεκριμένα με την περιοχή του σπειραμένου σπειράματος ενεργοποιώντας έτσι τη δράση κινάσης της πρωτεΐνης (Matsui et al., 1996). Απώλεια του C-τελικού άκρου της ROCK καθιστά την πρωτεΐνη μονίμως ενεργή, καταδεικνύοντας το ρυθμιστικό ρόλο αυτής της περιοχής. Συγκεκριμένα, η περιοχή αυτή, στην οποία βρίσκεται και η περιοχή αλληλεπίδρασης με την Rho, αλληλεπιδρά με την καταλυτική περιοχή της ROCK καταστέλοντας έτσι την καταλυτική της δράση. Η δέσμευση της Rho προκαλεί αλλαγή στη διαμόρφωση της ROCK απελευθερώνοντας την καταλυτική της περιοχή και ενεργοποιώντας έτσι τη δράση της (Mutsuki et al., 2000). Έχουν βρεθεί διάφορες χημικές ενώσεις, όπως οι Y-27632, Y-32885 και HA1077 που αναστέλουν εξειδικευμένα τη δράση της πρωτεΐνης ROCK. Οι χημικές αυτές ενώσεις περιέχουν στη δομή τους μια περιοχή πυριδίνης μέσω της οποίας δεσμεύονται με την καταλυτική περιοχή της ROCK και συγκεκριμένα την περιοχή πρόσδεσης του ATP.

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί διάφορα πρωτεϊνικά υποστρώματα για τη δράση κινάσης της ROCK. Η υπομονάδα δέσμευσης της μυοσίνης (MBS, myosin binding subunit) της φωσφατάσης της MLC (myosin light chain) (Kawano et al., 1999) και η ελαφρά αλυσίδα της μυοσίνης (MLC) (Amano et al., 1996) φωσφορυλιώνονται άμεσα από την ROCK . Με αυτόν τον τρόπο η δράση της φωσφατάσης της MLC αναστέλεται οδηγώντας έτσι έμμεσα σε αύξηση της φωσφορυλίωσης της MLC. Επιπλέον, η MLC φωσφορυλιώνεται άμεσα στην σερίνη-19. Έτσι είτε έμμεσα είτε άμεσα, η αύξηση της φωσφορυλίωσης της ελαφράς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC), οδηγεί σε αύξηση της δράσης της ATPάσης της μυοσίνης και επαγωγή δημιουργίας ινιδίων ακτο-μυοσίνης (Bresnick, 1999). Η ROCK έχει δειχθεί ακόμα ότι φωσφορυλιώνει μέλη της οικογένειας των πρωτεϊνών ERM (Ezrin/Radixin/Moesin) *in vitro* (Matsui et al., 1998), ή πρωτεΐνες των ενδιάμεσων ινιδίων όπως είναι η βιμεντίνη επάγωντας τον αποπολυμερισμό τους (Goto et al., 1998). Η

φωσφορυλίωση της βιμεντίνης λαμβάνει χώρα συγκεκριμένα κατά τη διάρκεια της κυτοκίνησης.

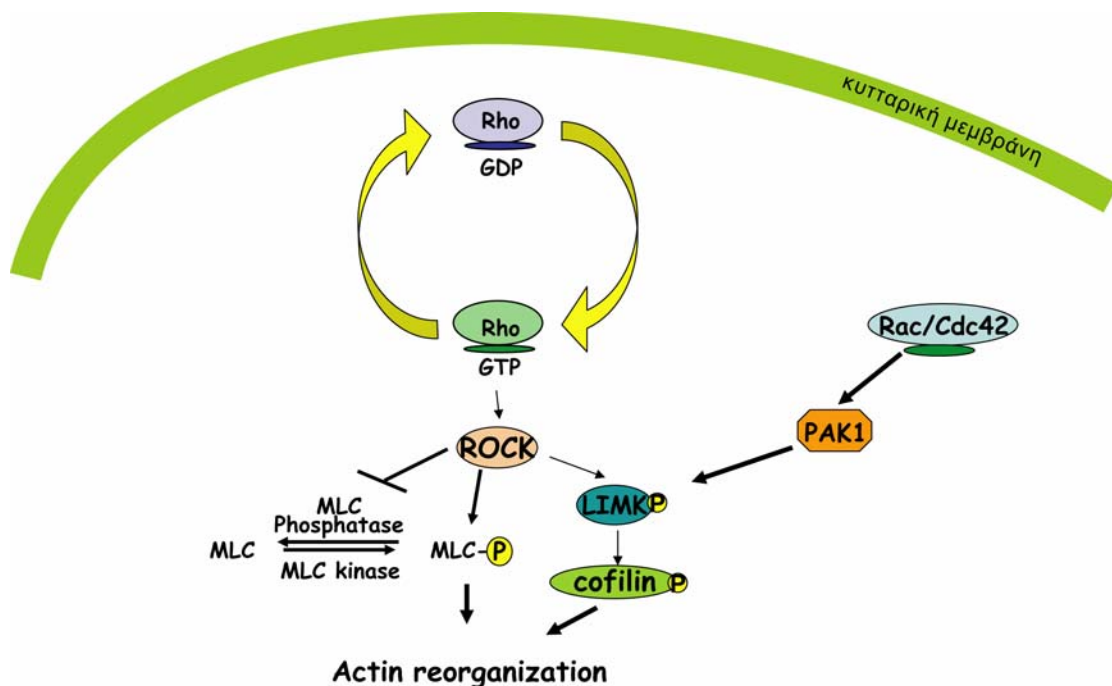
Δύο ακόμα πρωτεϊνικές κινάσες που αποτελούν υπόστρωμα της ROCK είναι οι πρωτεΐνες LIMK1 και LIMK2, οι οποίες εντοπίζονται στα χρωμοσώματα 7q11.23 και 22q12 αντίστοιχα (Bishop & Hall, 2000 ; Amano et al., 2000 ; Schmitz et al., 2000 ; Okano et al., 1995). Οι δύο αυτές πρωτεΐνες εμφανίζουν ομολογία 50% στην αμινοξική τους αλληλουχία, ενώ η περιοχή με δράση κινάσης βρίσκεται στο C-τελικό τους άκρο και εμπεριέχει μια μοναδική και ασυνήθιστη αλληλουχία Asp-Leu-Asn-Ser-His-Asn. Εμφανίζει πολύ μικρή ομολογία, μόλις 32%, με τις καταλυτικές περιοχές άλλων κινασών, κάνοντας έτσι αδύνατη την κατηγοριοποίηση τους σε κάποια ήδη γνωστή οικογένεια κινασών (Okano et al., 1995). Το N-τελικό άκρο πρωτεϊνών, χαρακτηρίζεται από την παρουσία δύο Lim μοτίβων (Mizuno et al., 1994; Okano et al., 1995 ; Bach, 2000) (εικόνα 1.5). Τα μοτίβα αυτά έχουν δομή διπλού δακτύλου ψευδαργύρου, αποτελούνται από 50-60 αμινοξέα, είναι πλούσια σε κυστεΐνη και ιστιδίνη και εμφανίζουν το απαναλαμβανόμενο μοτίβο (CX₂CX₁₆₋₁₉HX₂C)X₂(CX₂CX₁₆₋₂₀CX₂(C/H/D)) (Dawid et al., 1998 ; Freyd et al., 1990). LIM μοτίβα έχουν ταυτοποιηθεί σε πλήθος πρωτεϊνών με διαφορετικές λειτουργικές ιδιότητες. Αν και τα δάκτυλα ψευδαργύρου λειτουργούν σαν σημεία πρόσδεσης στο DNA, φαίνεται ότι εμπλέκονται και σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών. Η LIMK1 εντοπίζεται κυρίως στον αναπτυσσόμενο νευρικό ιστό ενώ η LIMK2 εκφράζεται ευρέως σε αναπτυσσόμενους ιστούς και ιστούς ενηλίκων (Mizuno et al., 1994; Okano et al., 1995).



Εικόνα 1.5.: Σχηματική παράσταση της δομής των πρωτεϊνών LIMK1 και LIMK2. LIM1/LIM2: τα μοτίβα LIM, DHR: περιοχή ομολογίας Dlg (Dlg homology region), S/P: περιοχή πλούσια σε σερίνη και προλίνη, PK: περιοχή με δράση κινάσης.

Οι LIMK1 και LIMK2 είναι κινάσες σερίνης / θρεονίνης και φυσιολογικό τους υπόστρωμα αποτελεί η κοφιλίνη, την οποία και φωσφορυλιώνουν στη σερίνη-3 αναστέλοντας την δράση της και επάγοντας έτσι πολυμερισμό της ακτίνης (Amano et al., 2001 ; Arber et al., 1998 ; Yang et al., 1998).

Οι LIMK1 και LIMK2 ενεργοποιούνται όταν φωσφορυλιώνονται στη θρεονίνη-508 ή τη θρεονίνη-505 αντίστοιχα (Ohashi et al., 2000 ; Amano et al., 2001 ; Sumi et al., 2001). Μετά από πειράματα ταυτόχρονης έκφρασης των δύο πρωτεϊνών σε κύτταρα HeLa, αναφέρεται ότι η LIMK1 ενεργοποιείται από τη Rac αλλά όχι από τις Rho και Cdc42, ενώ η LIMK2 ενεργοποιείται από τις Rho και Cdc42 και όχι από την Rac. Επιπλέον η επαγόμενη από την Rac δημιουργία λαμελλιποδίων αναστέλεται από μια ανενεργή μορφή της LIMK1 και όχι της LIMK2, ενώ αντίθετα η επαγόμενη από την Rho δημιουργία ινιδίων του στρες αναστέλεται από μια ανενεργή μορφή της LIMK2 και όχι της LIMK1 (Sumi et al., 1999). Στην εικόνα 1.6 εμφανίζεται σχηματικά η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών τελεστών ROCK και LIMK καθοδικά των Rho GTPασών.



Εικόνα 1.6.: Ενεργοποίηση των πρωτεϊνικών κινασών σερίνης-θρεονίνης ROCK και LIMK καθοδικά των Rho GTPασών.

Ο βιολογικός ρόλος των LIM κινασών είναι πολύ σημαντικός μια και μέσω της δράσης του, ελέγχουν την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Εκτός από την άμεση επίδραση τους στον βαθμό πολυμερισμού της ακτίνης, η ενεργοποίηση του παράγοντα SRF (Serum Response Element) από την RhoA σε κύτταρα PC12 μεσολαβείται από την LIMK1 (Geneste et al., 2002). Επιπλέον, φωσφορυλίωση της LIMK1 σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού (MEFs) έχει σαν αποτέλεσμα την αναστολή της επαγόμενης από τις Rac/Cdc42 έκφρασης της κυκλίνης D1. Η δράση αυτή της LIMK1 δεν εξαρτάται από την ικανότητα της να φωσφορυλιώνει την κοφιλίνη ή να επάγει πολυμερισμό της ακτίνης, αλλά από την ικανότητα της πρωτεΐνης να μετατίθεται στον πυρήνα (Roovers et al., 2003). Αντίθετα, η δράση της είναι απαραίτητη για την, επαγόμενη από το μονοπάτι ERK, έκφραση της κυκλίνης D1 και εξαρτάται από την ικανότητα της να φωσφορυλιώνει την κοφιλίνη και να επάγει αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (Roovers et al., 2003).

Η LIMK1 λειτουργεί σαν αρνητικός ρυθμιστής του πολλαπλασιασμού σε NIH3T3 και H-ras μετασχηματισμένους FYJ10 ινοβλάστες (Higuchi et al., 1996), και επιπλέον αναστέλει τον Ras-επαγόμενο μετασχηματισμό κυττάρων PC12 (Higuchi et al., 1997). Υπερέκφραση της LIMK2 σε αυτές τις περιπτώσεις, οδηγεί σε αύξηση του πολυμερισμού ινιδίων του στρες και αναστέλει την κινητικότητα Ras-μετασχηματισμένων ινοβλαστών. Αντίθετα, γονιδιακή αποσιώπηση της LIMK2 στην ανθρώπινη κυτταρική σειρά ινοσαρκώματος (fibrosarcoma) HT1080 είχε σαν αποτέλεσμα τον περιορισμό της μεταναστευτικής ικανότητας των κυττάρων και της ιδιότητας τους να δημιουργούν αποικίες (Suyama et al., 2004). Επιπλέον, υπερέκφραση της LIMK1 σε κύτταρα MCF7 και MDA-MB-231 οδηγεί σε κύτταρα με αυξημένη κινητικότητα, ενώ υπερέκφραση μιας μονίμως ανενεργής μορφής της πρωτεΐνης μειώνει την ικανότητα των MDA-MB-231 κυττάρων να διηθούνται στα κόκκαλα (Yoshioka et al., 2003).

1.5. Ο Μετασχηματίζων Αυξητικός Παράγοντας-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β).

1.5.1. Η υπεροικογένεια του TGF-β.

Ο παράγοντας TGF-β1 ανήκει σε μια υπεριοικογένεια εκκρινόμενων κυτοκινών, οι οποίες επηρεάζουν πλήθος κυτταρικών διεργασιών και αποκρίσεων όπως ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η διαφοροποίηση, η μετανάστευση και η απόπτωση (Lutz & Knaus, 2002). Η υπεροικογένεια του TGF-β αριθμεί περισσότερα από 30 μέλη και διακρίνεται σε δύο υπο-οικογένειες: την υπο-οικογένεια του TGF-β / ακτιβίνης / Nodal και την υπο-οικογένεια του BMP (Bone Morphogenetic Protein) / GDF (Growth and Differentiation Factor) / MIS (Muellerian Inhibiting Substance), οι οποίες καθορίζονται βάση ομοιοτήτων στη δομή και την αμινοξική τους αλληλουχία, αλλά και της εξειδίκευσης που παρουσιάζουν ως προς τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούν (Shi & Massagué, 2003). Στον πίνακα 2, παρουσιάζονται οι τρεις κύριοι εκπρόσωποι της υπεροικογένειας του TGF-β και τα μόρια της βασικής σηματοδοτικής τους μηχανής.

Πίνακας 2. : οι τρεις χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της υπεριοικογένειας του TGF-β, και οι αντίστοιχες πρωτεΐνες τελεστές που μεσολαβούν στην κυτταρική απόκριση (Heldin et al., 1997).

υπο-οικογένεια	TGF-β	ακτιβίνη	BMP
ισομορφές	TGF-β1 TGF-β2 TGF-β3	Ακτιβίνη A	BMP-2, BMP-4 BMP-7/OP-1
τύπου II υποδοχείς	TβRII	ActR-II, ActR-IIB	BMPRII, ActR-II, ActR-IIB
τύπου I υποδοχείς	TβRI	ActR-I, ActR-IB	BMPRI, BMPRI- IB, ActR-I
διαμεσολαβητές	Smad2 Smad3	Smad2 Smad3	Smad1, Smad5, Smad8
βοηθητικές Smad	Smad4	Smad4	Smad4
ανασταλτικές Smad	Smad7	Smad7	Smad6, Smad7

Ο παράγοντας TGF-β οφείλει την ονομασία του στην ικανότητα του να επάγει την ανάπτυξη φυσιολογικών κυττάρων από νεφρό αρουραίου (De Lacro & Todaro, 1978). Η εργαστηριακή έρευνα κατέδειξε τελικά ότι αποτελεί μία πολυ-λειτουργική πρωτεΐνη, που μπορεί να αναστέλει την κυτταρική ανάπτυξη ή να επάγει απόπτωση, να ενεργοποιεί την παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας, να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό

και την μετανάστευση ενδοθηλιακών η αγγειακών λείων μυϊκών κυττάρων και τέλος να ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση ή την ενεργοποίηση κυττάρων του ανοσοποιητικού συστήματος. Η απορύθμιση του σηματοδοτικού του μονοπατιού εμπλέκεται σε διάφορες ασθένειες όπως είναι ο καρκίνος, η ινωμάτωση (fibrosis), αγγειακές ανωμαλίες και αυτοάνοσες ασθένειες (Dennier et al., 2002). Ο παράγοντας TGF- β παράγεται και/ή ευαισθητοποιεί πλήθος κυττάρων όπως ανώριμα κύτταρα του αιματοποιητικού, ενεργοποιημένα T και B λεμφοκύτταρα, μακροφάγα, ουδετερόφιλα και δενδρίτες (Letterio & Roberts, 1998; Cerwenka & Swain, 1999; Lebman & Edmiston, 1999).

Η ακτιβίνη χαρακτηρίστηκε αρχικά για την ικανότητα της να ενεργοποιεί την έκκριση της θυλακιοτρόπου ορμόνης (follicle-stimulating hormone, FSH) (Mason et al., 1985), ενώ ο παράγοντας BMP για την ικανότητα του να επάγει τη δημιουργία των οστών κατά την εμβρυογένεση (Wozney et al., 1988). Μέχρι σήμερα πλήθος εργαστηριακών ερευνών δείχνουν ότι και η ακτιβίνη και ο παράγοντας BMP ρυθμίζουν μεγάλο εύρος κυτταρικών λειτουργιών τόσο κατά την εμβρυογένεση όσο και στον ενήλικα οργανισμό (Dennier et al., 2002).

1.5.2. Δομικά χαρακτηριστικά του TGF- β .

Οι πολλές και διαφορετικές δράσεις του TGF- β στα κύτταρα προϋποθέτουν την ύπαρξη περίτεχνων ρυθμιστικών μηχανισμών που ελέγχουν τον πολυ-λειτουργικό του ρόλο. Ο έλεγχος της δράσης του αρχίζει πριν ακόμα αλληλεπιδράσει με τους μεμβρανικούς υποδοχείς του κυττάρου στόχου, αφού και οι τρεις ισομορφές του TGF- β (TGF- β 1, TGF- β 2, και TGF- β 3) συνθέτονται και εκκρίνονται σαν μεγάλες πρόδρομες αδρανείς προ-πρωτεΐνες, οι οποίες στη συνέχεια με πρωτεόλυση του N-τελικού τους άκρου απελευθερώνουν το ώριμο μόριο του TGF- β , το οποίο είναι ικανό να προσδεθεί με τους μεμβρανικούς υποδοχείς και να ενεργοποιήσει το σηματοδοτικό του μονοπάτι. Το ώριμο μόριο του TGF- β απελευθερώνεται με τη δράση πρωτεασών όπως είναι η πλασμίνη (plasmin), ή πρωτεϊνών που συνδέονται με την πρόδρομη πρωτεΐνη όπως η θρομβοσπονδίνη (thrombospondin) (Pircher et al., 1986; Lawrence, 2001). Στην ενεργή του μορφή, ο TGF- β αποτελεί ένα διμερές το οποίο σταθεροποιείται από υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, ενώ ισχυροποιείται από ένα δισουλφιδικό δεσμό μεταξύ της ίδιας συντηρημένης κυστεΐνης δύο υπομονάδων. Το κάθε μονομερές αποτελείται από διαδοχικά β -ελάσματα τα οποία συγκρατούνται από 6 δισουλφιδικούς δεσμούς (Caestecker, 2004; Shi & Massagué, 2003; Sun & Davis,

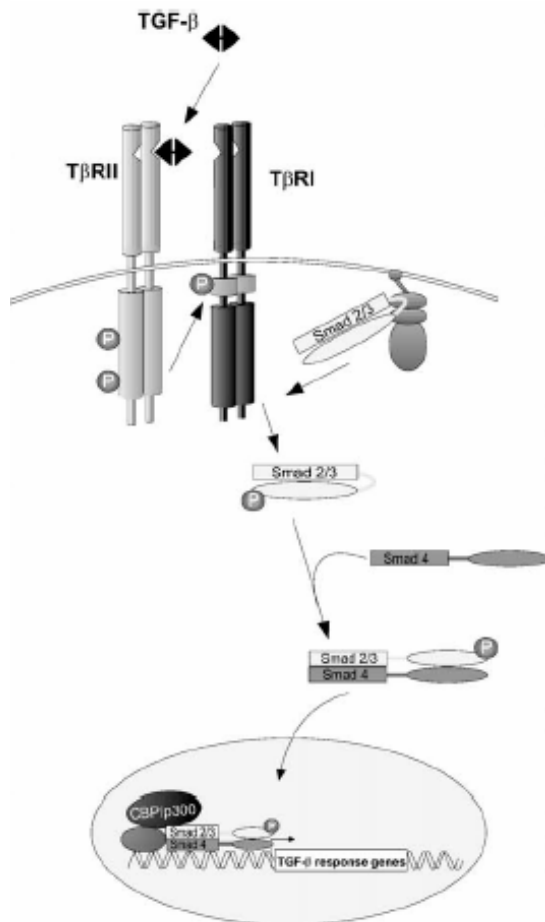
1995), σχηματίζοντας μια δομή αναδίπλωσης που ονομάζεται «κόμβος κυστεΐνης» (cysteine knot).

1.6. Μεταγωγή του μηνύματος του TGF-β.

Η βασική μηχανή μεταγωγής μηνύματος του TGF-β1 ενεργοποιείται όταν ο παράγοντας συνδέεται με δύο μεμβρανικούς υποδοχείς τύπου I και II με δράση κινάσης σερίνης- θρεονίνης. Κατά την πρόσδεση του παράγοντα στον υποδοχέα, αυτός ενεργοποιείται και το σήμα μεταδίδεται από τη μεμβράνη στον πυρήνα μέσω ειδικών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών που ονομάζονται Smad. Οι Smad πρωτεΐνες που βρίσκονται στην εσω-πλευρά της πλασματικής μεμβράνης (Smad2 και Smad3) ενεργοποιούνται με φωσφορυλίωση και συνδεόμενες με την πρωτεΐνη Smad4 μεταφέρονται στον πυρήνα και ενεργοποιούν τη μεταγραφή πλήθους γονιδίων (Shi & Massagué, 2003; Lutz & Knaus, 2002; Moustakas et al., 2001; Wrana et al., 2000). Το μονοπάτι περιγράφεται συνοπτικά στην εικόνα 1.7.

1.6.1. Οι μεμβρανικοί υποδοχείς.

Στο ανθρώπινο γένωμα, η οικογένεια των υποδοχέων με δράση κινάσης σερίνης / θρεονίνης αριθμεί 12 μέλη – 7 για τους τύπου I υποδοχείς και 5 για τους τύπου II υποδοχείς – και όλοι μετέχουν στην μετάδοση μηνύματος της υπεροικογένειας του TGF-β (Manning et al., 2002). Και οι δύο τύποι υποδοχέων αποτελούνται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα, περίπου 500 αμινοξέων, που οργανώνεται στην N-τελική εξωκυττάρια περιοχή, η οποία είναι πλούσια σε κυστεΐνες και γλυκοσυλιωμένα (Denpner et al., 2002), μία διαμεμβρανική περιοχή, και το C-τελικό άκρο με τη δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης (Shi & Massagué, 2003). Εξαίρεση αποτελεί ο τύπου II υποδοχέας του παράγοντα BMP, BMPR-II, ο οποίος έχει μια μεγάλη κυτταροπλασματική ουρά 600 περίπου αμινοξέων, η οποία δεν απαιτείται για τη σηματοδότηση μέσω του Smad μονοπατιού. Μεταλλάξεις όμως σε αυτήν την περιοχή εμπλέκονται σε αυτοάνοσες ασθένειες στον άνθρωπο όπως η πρωτοπαθής



Εικόνα 1.7: Συνοπτική αποϊκόνιση του σηματοδοτικού μονοπατιού του παράγοντα TGF-β μέσω των μεμβρανικών υποδοχέων του. (Lutz & Knaus, 2002)

πνευμονική υπέρταση (primary pulmonary hypertension, PPH) (Foletta et al., 2003). Οι χαρακτηριστικοί υποδοχείς για τον παράγοντα TGF-β είναι ο τύπου II υποδοχέας, TβR-II (TGF-β type II receptor), και ο τύπου I υποδοχέας TβR-I ή ALK-5 (Activin-Like kinase). Για τα υπόλοιπα μέλη της υπερικογένειας οι χαρακτηριστικοί τύπου I υποδοχείς είναι ο ALK-4 ή ActR-IB για την Ακτιβίνη και οι ALK-3 ή BMPR-I και ALK-6 ή BMPR-IB για τους BMPs. Οι χαρακτηριστικοί τύπου II υποδοχείς είναι ο ActR-II για την Ακτιβίνη και ο BMPR-II για τους BMPs.

Ο TβR-II υποδοχέας είναι μονίμως ενεργός ενώ ο TβR-I πρέπει να φωσφορυλιωθεί για να ενεργοποιηθεί. Η δέσμευση του TGF-β στην εξωκυττάρια προχή του τύπου II υποδοχέα σηματοδοτεί τη στρατολόγηση του τύπου I υποδοχέα και το σχηματισμό ενός ετερο-τετραμερούς συμπλόκου. Τότε ο TβR-II φωσφορυλιώνει τον TβR-I σε μια περιοχή πλούσια σε γλυκίνη / σερίνη και τον ενεργοποιεί. Η περιοχή αυτή περιέχει το χαρακτηριστικό μοτίβο SGSGSG και εντοπίζεται μεταξύ της διαμεμβρανικής περιοχής και της περιοχής με δράση κινάσης του τύπου I υποδοχέα (Wrana et al., 1994). Η φωσφορυλίωση του τύπου I υποδοχέα δεν οδηγεί σε αύξηση

της δράσης κινάσης του, αλλά αλλάζει την τριτοταγή του διαμόρφωση με τέτοιο τρόπο, ώστε να είναι προσβάσιμη η περιοχή πρόσδεσης των Smad πρωτεϊνών (Dennier et al., 2002; Huse et al., 2001). Για την πρόσδεση και ενεργοποίηση των Smad, είναι αποφασιστικής σημασίας μια αλληλουχία μέσα στην περιοχή με δράση κινάσης του TβR-I, η θηλιά-L45 (L45 loop). Στην θηλιά L45, τέσσερα αμινοξέα που διαφέρουν ανάμεσα στους τύπου I υποδοχείς του TGF-β και των BMPs προσδίδουν την εξειδίκευση ως προς το ποιές Smad θα προσδεθούν και θα ενεργοποιηθούν από τον υποδοχέα, διαχωρίζοντας έτσι τα σηματοδοτικά μονοπάτια ανάμεσα στα μέλη της υπεροικογένειας των TGF-β κυτοκινών (Feng & Derynck, 1997 ; Chen et al., 1998 ; Persson et al., 1998).

Σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της ενεργοποίησης της κυτταρικής απόκρισης μέσω των υποδοχέων του TGF-β, παίζει η επικοινωνία του με το ενδοκυτταρικό μονοπάτι. Η πρωτεΐνη SARA επάγει την ενσωμάτωση του συμπλόκου SARA/Smad2/ενεργοποιημένος υποδοχέας, στα πρώιμα ενδοσωμάτια, επάγωντας την εξαρτώμενη από την κλαθρίνη ενδοκύττωση (Di Guglielmo et al., 2003 ; Panopoulou et al., 2002; Penheiter et al., 2002). Η αναστολή της ενδοκύττωσης δεν επηρεάζει το βαθμό φωσφορυλίωσης των Smad ή την σύνδεση τους με την Smad4, αλλά φαίνεται να παρεμποδίζει την αποσύνδεση του συμπλόκου SARA / Smad με αποτέλεσμα την αναστολής εισόδου των Smad στον πυρήνα και την περαιτέρω μεταγραφική ενεργοποίηση (Runyan et al., 2004). Αντίθετα, μέσω της εξαρτώμενης από την καβεολίνη ενδοκύττωσης, ο ενεργοποιημένος υποδοχέας εισέρχεται στο κύτταρο και οδηγείται για αποικοδόμηση στο πρωτεόσωμα. Συγκεκριμένα, η λιγάση Smurf-2 ή Smurf-1 στρατολογείται από την Smad7 στο ενεργοποιημένο σύμπλοκο του υποδοχέα, και το σύνολο Smurf/Smad7/υποδοχέας ενσωματώνονται σε ενδοσωμάτια καβεολίνης. Η Smurf επάγει την ουβικιτυλίωση του υποδοχέα και την αποικοδόμηση του από το πρωτεόσωμα (Di Guglielmo et al., 2003 ; Razani et al., 2001 ; Kavsak et al., 2000).

Εκτός από τις πρωτεΐνες Smad, έχουν ταυτοποιηθεί και πλήθος άλλων πρωτεϊνών που αλληλεπιδρούν με τους μεμβρανικούς υποδοχείς και ρυθμίζουν τη δράση του TGF-β με διαφορετικούς μηχανισμούς η κάθε μια.

Η πρωτεΐνη FKBP12 ελέγχει την ενεργοποίηση του συμπλόκου των υποδοχέων απουσία εξωτερικού ερεθίσματος. Οι υποδοχείς TβRI και TβRII έχουν την τάση να σχηματίζουν σύμπλοκο ακόμα και απουσία προσδέματος. Πρόσδεση της FKBP12 στην μη φωσφορυλιωμένη αλληλουχία γλυκίνης / σερίνης (GS box) (Huse et al.,

1999; Okadome et al., 1996), σταθεροποιεί τη διαμόρφωση του TβRI ώστε να μην είναι δυνατή η αλληλεπίδραση του με τον τύπου II υποδοχέα (Chen et al., 1997; Wang et al., 1996). Επιπλέον, η δέσμευση του τύπου I υποδοχέα από την πρωτεΐνη FKBP12 προστατεύει τον υποδοχέα από την αναγνώριση του από το ενδοκυτταρικό μονοπάτι και την εσωτερίκευση του στο κυτταρόπλασμα (Yao et al., 2000).

Άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς, είναι αυτές που παίζουν βοηθητικό ρόλο στον υποκυτταρικό εντοπισμό των Smad και στη συγκρότηση των συμπλόκων στην εσωτερική πλευρά της πλασματικής μεμβράνης. Τέτοιες πρωτεΐνες είναι η SARA (Smad anchor for receptor activation) (Tsukazaki et al., 1998), η disabled-2 (Dab2) (Hoccevar et al., 2001) και η TRAP-1 (TβRI-associated protein-1) (Charng et al., 1998).

Η δράση του συμπλόκου των υποδοχέων ρυθμίζεται αρνητικά από τις πρωτεΐνες Smad7 και STRAP (serine/threonine kinase receptor-associated protein). Η Smad7 αλληλεπιδρά σταθερά με τον τύπου I υποδοχέα και ανταγωνίζεται την σύνδεση των R-Smad, παρεμποδίζοντας έτσι την φωσφορυλίωση τους. Η έκφραση του γονιδίου της Smad7 επάγεται από τον TGF-β, προσφέροντας έτσι έναν αρνητικό μηχανισμό ελέγχου του μονοπατιού (Afrakhte et al., 1998; Nagarajan et al., 1999). Επιπλέον όπως έχει ήδη αναφερθεί, η Smad7 στρατολογεί τις E3 λιγάσες ουβικιτίνης, Smurfs, κοντά στο σύμπλοκο των υποδοχέων ενεργοποιώντας την αποικοδόμηση του. Τέλος, η πρωτεΐνη STRAP αλληλεπιδρά και με τον TβRI και τον TβRII και συμβάλλει σαν βοηθητική πρωτεΐνη στη στρατολόγηση της Smad7 από το σύμπλοκο των υποδοχέων (Datta & Moses, 2000). Με το σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF-β συνδέονται πρωτεΐνες, οι οποίες αποτελούν σημεία επικοινωνίας μεταξύ των Smad και άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών. Οι πρωτεΐνες TAK1 (TGF-β-activated kinase-1) και TAB1 (TGF-β-activated kinase-binding protein 1) ενεργοποιούν διάφορα μονοπάτια όπως αυτά των JNK και MAP κινασών (Hanafusa et al., 1999; Sakurai et al., 2000). Ο παράγοντας που μεσολαβεί την σύνδεση της TAB1 με το σύμπλοκο των υποδοχέων είναι ο αναστολέας της απόπτωσης XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis), ο οποίος μέσω του N-τελικού του άκρου συνδέεται με τον TβRI (Yamaguchi et al., 1999). Η πρωτεΐνη TRIP-1 (TGF-β receptor-interacting protein) αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνεται από τον TβRII, αναστέλλοντας έτσι την έκφραση διαφόρων γονιδίων, χωρίς όμως να καταστέλλει την επαγόμενη από τον TGF-β κυτταρική ανάπτυξη (Choy & Derynck 1998).

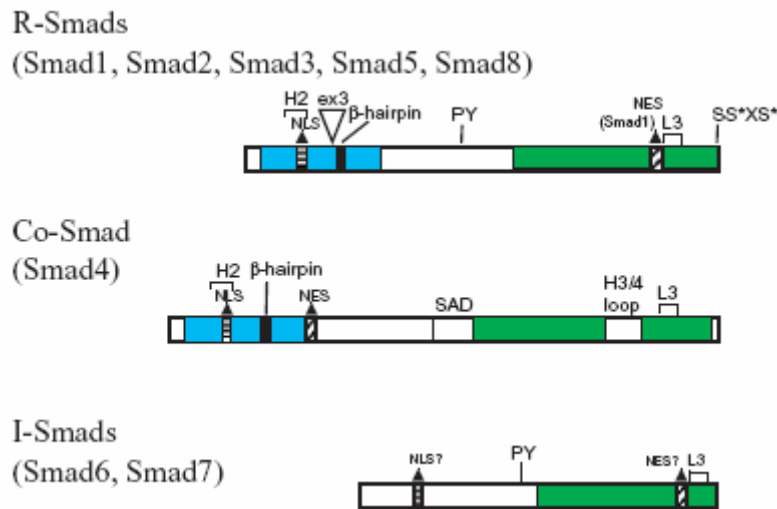
Πρόσφατα έχουν ταυτοποιηθεί και άλλες πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τους υποδοχείς του TGF-β, ενεργοποιώντας διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια. Αναφορά σε αυτές τις πρωτεΐνες γίνεται σε επόμενο κεφάλαιο.

1.6.2. Μετάδοση του μηνύματος μέσω των Smad πρωτεϊνών: από την μεμβράνη στον πυρήνα.

Οι πρωτεΐνες Smad είναι τα μόνα γνωστά υποστρώματα της δράσης κινάσης των τύπου I υποδοχέων της οικογένειας του TGF-β. Ταυτοποιήθηκαν αρχικά στη Δροσόφιλα, σαν προϊόντα των γονιδίων *Mad*, και στο *C. elegans* σαν προϊόντα των γονιδίων *sma* (Moustakas et al., 2001). Στο ανθρώπινο γονιδίωμα υπάρχουν 8 μέλη της οικογένειας των Smad. Οι πρωτεΐνες αυτές διακρίνονται σε τρεις υποοικογένειες: (α) τις Smad που ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα (receptor-activated Smads, R-Smads), οι οποίες είναι οι Smad2 και Smad3 για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον TGF-β και την Ακτιβίνη και οι Smad1, Smad5, και Smad8 για τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ενεργοποιούνται από τον παράγοντα BMP. Οι R-Smads φωσφορυλιώνονται από τον τύπου I υποδοχέα και ενεργοποιούνται. (β) η βοηθητική Smad4 (co-mediator Smad4, co-Smad4) η οποία είναι κοινή για όλα τα μέλη της υπεροικογένειας του TGF-β, και η οποία δημιουργεί ολιγομερή με τις ενεργοποιημένες R-Smads οπότε και μεταφέρονται στον πυρήνα για να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή, και (γ) οι ανασταλτικές Smads (inhibitory Smads, I-Smads) Smad6 και Smad7 που αναστέλουν τη δράση των R-Smads κυρίως παρεμποδίζοντας την αλληλεπίδραση τους με τον υποδοχέα. (Shi & Massagué, 2003 ; Lutz & Knaus, 2002 ; Moustakas et al., 2001).

Οι R-Smads και η co-Smad μοιάζουν δομικά και αποτελούνται από την N-τελική MH1 περιοχή (Mad homology domain 1) και την C-τελική MH2 (Mad homology 2) περιοχή. Μεταξύ τους συνδέονται από την περιοχή σύνδεσης (linker domain) η οποία είναι πλούσια σε προλίνες και διαφέρει αρκετά ως προς την αμινοξική της αλληλουχία μεταξύ των διαφόρων Smad (εικόνα 1.8.).

Η περιοχή MH1 χαρακτηρίστηκε αρχικά για την ικανότητα της να αναστέλει τη δράση των R-Smad μέσω αλληλεπίδρασης με την περιοχή MH2 (Perlman et al., 2001). Επιπλέον, η περιοχή MH1 είναι υπεύθυνη για τη σύνδεση των R-Smad με το DNA και για την αλληλεπίδραση τους με μεταγραφικούς παράγοντες. Τέλος στην περιοχή αυτή βρίσκεται η αλληλουχία που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των πρωτεϊνών στον πυρήνα, NLS (Lutz & Knaus, 2002).



Εικόνα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση της δομής των τριών χαρακτηριστικών υποοικογενειών των Smad πρωτεϊνών (Moustakas et al., 2001)

Η περιοχή MH2 είναι υψηλά συντηρημένη ανάμεσα στις Smad πρωτεΐνες και είναι υπεύθυνη για την αλληλεπίδραση με τον υποδοχέα, τη δημιουργία ομο-διμερών ή ετερο-τριμερών μεταξύ των Smad, αλληλεπιδράσεις με άλλες πρωτεΐνες και επιπλέον περιέχει την περιοχή στην οποία φωσφορυλιώνονται οι R-Smads από τον τύπου I υποδοχέα. Τέλος, στην περιοχή MH2 εμπεριέχεται μια αλληλουχία σηματοδότησης εξόδου από τον πυρήνα (NES, Nuclear Export Signal), ρυθμίζοντας έτσι τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό των πρωτεϊνών (Lutz & Knaus, 2002 ; Moustakas et al, 2001).

Η περιοχή που συνδέει τις MH1 και MH2 (linker domain), εμπεριέχει πολλαπλές θέσεις φωσφορυλίωσης από τις πρωτεϊνικές κινάσες MAPK (Kretzchmar M et al., 1999). Όταν οι Smad φωσφορυλιωθούν σε αυτήν την περιοχή, παρεμποδίζεται η είσοδος τους στον πυρήνα. Επιπλέον, μια αλληλουχία πλούσια σε προλίνη και τυροσίνη (PY motif), η οποία απαντάται στις R-Smads και στις I-Smads, διευκολύνει την αναγνώριση τους από τις λιγάσες ουβικιτίνης Smurfs (Kavsak et al., 2000 ; Edisawa et al., 2001). Ειδικά για την Smad4 στην περιοχή του συνδέτη βρίσκεται η αλληλουχία NES και η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την ενεργοποίηση της

μεταγραφικής ικανότητας των Smad (SAD: Smad activation domain) (de Caestecker et al., 2000).

Η σύνδεση των R-Smad με τον τύπου I υποδοχέα γίνεται μέσω της θηλιάς L45 του υποδοχέα και μιας επιφάνειας των R-Smad, θετικά φορτισμένης, η οποία εντοπίζεται στην περιοχή MH2 (Wu et al., 2000).

Η αναγνώριση των R-Smad από τον υποδοχέα διευκολύνεται από βοηθητικές πρωτεΐνες, οι οποίες οργανώνουν και συγκρατούν τις Smad κοντά στην πλασματική μεμβράνη και κοντά στους τύπου I και II υποδοχείς (Moustakas et al., 2001). Συγκεκριμένα οι πρωτεΐνες Smad2 και Smad3 παραμένουν κοντά στην πλασματική μεμβράνη μέσω πρόσδεσης με την πρωτεΐνη SARA (Smad anchor for receptor activation) (Tsukazaki et al., 1998). Η πρωτοταγής δομή της SARA περιλαμβάνει την αλληλουχία FYVE, μέσω της οποίας συνδέεται με φωσφολιπίδια που κατευθύνουν το μόριο στα πρώιμα ενδοσωμάτια. Όταν τα κύτταρα βρίσκονται σε κατάσταση ηρεμίας, η SARA δεσμεύει την Smad2 στα πρώιμα ενδοσωμάτια και παρεμποδίζει την εισοδό της στον πυρήνα (Di Guglielmo et al., 2003). Φωσφορυλίωση της Smad αποδυναμώνει την αλληλεπίδραση της με την SARA, επιτρέποντας την αποδέσμευση της από αυτήν, την δέσμευση της με την Smad4 και τη μεταφορά του συμπλόκου στον πυρήνα (Xu et al., 2000). Έχει δειχθεί ακόμα ότι οι Smads στην ανενεργή τους κατάσταση αλληλεπιδρούν στο κυτταρόπλασμα με τους μικροσωληνίσκους. Ενεργοποίηση από τον παράγοντα TGF- β έχει σαν αποτέλεσμα την αποδέσμευση τους από το δίκτυο των μικροσωληνίσκων (Dong et al., 2000). Τέλος η φιλαμίνη, μια πρωτεΐνη δεσματοποίησης της ακτίνης, δεσμεύεται με τις Smad και ρυθμίζει θετικά την σηματοδότηση μέσω του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών (Sasaki et al., 2001).

Οι R-Smads φωσφορυλιώνονται στις δύο τελευταίες σερίνες του C-τελικού τους άκρου και συγκεκριμένα στην αλληλουχία SSXS (Abfollah et al., 1997; Souchelnyskiy et al., 1997). Η αλληλεπίδραση μεταξύ των R-Smads/Smad4 για τη δημιουργία του συμπλόκου, γίνεται μέσω της C-τελικής αλληλουχίας pSer-X-pSer των R-Smad και μιας βασικής επιφάνειας στην MH2 περιοχή της Smad4 (Wu et al., 2001).

Εκτός από την αλληλουχία SSXS, στις R-Smads υπάρχουν και άλλες θέσεις φωσφορυλίωσης. Έτσι, διάφορες πρωτεΐνες όπως η Erk, η CamKII (Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II) ή η πρωτεϊνική κινάση PKC φωσφορυλιώνουν μέλη των R-Smad (Smad1, ή Smad2, ή Smad3) σε διάφορες σερίνες στην περιοχή του συνδέτη (linker), αναστέλοντας την μετατόπιση τους στον

πυρήνα και την μεταγραφική ενεργοποίηση (Kretzschmar et al., 1997 ; Kretzschmar et al., 1999; Moustakas et al., 2001; Yakymovych et al., 2001).

Είναι λοιπόν φανερό ότι η φωσφορυλίωση των Smad όχι μόνο ενεργοποιεί αλλά και ρυθμίζει την σηματοδοτική απόκριση. Επιπλέον, προσφέρει ένα μηχανισμό ενσωμάτωσης του σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια που ρυθμίζουν την κυτταρική απόκριση στην υπεροικογένεια των TGF- β κυτοκινών.

1.6.3. Μεταφορά των Smad πρωτεϊνών στον πυρήνα και μεταγραφική ενεργοποίηση.

Απουσία ενεργοποίησης των κυττάρων από κάποιο μέλος της οικογένειας του TGF- β , οι R-Smads και η co-Smad βρίσκονται κυρίως στο κυτταρόπλασμα. Για τη μεταφορά των R-Smad στον πυρήνα δεν είναι απαραίτητη η σύνδεση τους με την Smad4, ενώ η είσοδος της Smad4 προϋποθέτει τη σύνδεση της με τις R-Smad (Moustakas et al., 2001 ; Itoh et al., 2000 ; Liu et al., 1997). Μια αλληλουχία πλούσια σε λυσίνες στο N-τελικό άκρο της Smad3 (Lys-Lys-Leu-Lys, NLS-like motif), είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον TGF- β είσοδο της στον πυρήνα (Xiao et al., 2000a). Φωσφορυλίωση της Smad3 στο C-τελικό της άκρο έχει σαν αποτέλεσμα αλλαγή στη διαμόρφωση του μορίου της και έκθεση της αλληλουχίας NLS, ώστε να είναι δυνατή η αναγνώριση της από την ιμφορτίνη- β (importin- β), με την οποία δεσμεύεται, διευκολύνοντας έτσι τη μεταφορά της στον πυρήνα (Xiao et al., 2000b).

Αντίθετα με την Smad3, η περιοχή που είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά της Smad2 στον πυρήνα εντοπίζεται στην περιοχή MH2, στην οποία δεν υπάρχουν αλληλουχίες NLS. Η περιοχή MH2 της Smad2 προσδέεται στις πρωτεΐνες CAN/Nup214 και Nup153, οι οποίες αποτελούν συστατικά των πυρηνικών πόρων (Xu et al., 2002). Η περιοχή αλληλεπίδρασης της Smad2 με τις πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων επικαλύπτεται από την περιοχή σύνδεσης με τη πρωτεΐνη SARA. Έτσι, απουσία ερεθίσματος η Smad2 βρίσκεται στο κυτταρόπλασμα συνδεδεμένη με την SARA, οπότε παρεμποδίζεται η αναγνώριση της από τις πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων, επομένως και η είσοδος της στον πυρήνα. Η επαγόμενη φωσφορυλίωση της Smad2 στο C-τελικό της άκρο από τον τύπου I υποδοχέα, μειώνει τη συγγένεια της για την SARA, αλλά όχι και για τις πρωτεΐνες CAN/Nup214 και Nup153. Η Smad2 αποδεσμεύεται τότε από την SARA και ταυτόχρονα η αλληλουχία NLS γίνεται

προσβάσιμη από τις πρωτεΐνες των πυρηνικών πόρων, με αποτέλεσμα την είσοδο της στον πυρήνα (Tsukazaki et al., 1998 ; Xu et al., 2000, 2002).

Σημαντική για τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της Smad4 απουσία ερεθίσματος είναι μια αλληλουχία εξόδου από τον πυρήνα (Nuclear Export Sequence, NES), η οποία εντοπίζεται στη περιοχή του συνδέτη (linker) της πρωτεΐνης (Watanabe et al., 2000). Ο σχηματισμός του ετεροτριμερούς συμπλόκου με τις R-Smads επικαλύπτει αυτήν την αλληλουχία, με αποτέλεσμα να επιτρέπεται η είσοδος και παραμονή της Smad4 στον πυρήνα (Watanabe et al., 2000). Ταυτόχρονα, ευνοεί την αποκάλυψη των αλληλουχιών NLS στην επιφάνεια του συμπλόκου.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, η μεταφορά των Smad από και προς τον πυρήνα ρυθμίζεται αρνητικά από την φωσφορυλίωση των Smad στην περιοχή του συνδέτη (linker) μέσω άλλων σηματοδοτικών μονοπατιών, όπως αυτό των MAP κινασών (Kretzschmar et al., 1997; Kretzschmar et al., 1999; Moustakas et al., 2001). Όλες οι Smad (εκτός της Smad2) συνδέονται με μια συγκεκριμένη αλληλουχία του DNA μέσω της MH1 περιοχής. Το μικρότερο στοιχείο στο οποίο μπορούν να συνδεθούν οι Smad (SBE, Smad Binding Element), είναι μια αλληλουχία που αποτελείται από τέσσερις βάσεις, 5'-AGAC-3' (Dennler et al., 1998; Yingling et al., 1997; Zawel et al., 1998), αν και συνήθως οι αλληλουχίες του DNA με τις οποίες συνδέονται οι Smads περιέχουν ακόμα μία βάση C προς το 5' άκρο. Η πρωτεΐνη Smad2 έχει χάσει την ικανότητα σύνδεσης στο DNA λόγω της ύπαρξης μιας επιπρόσθετης περιοχής 20 αμινοξέων στην περιοχή MH1 (Chai et al., 2003; Shi et al., 1998). Οι πρωτεΐνες Smad1, Smad3 και Smad4 έχουν την ικανότητα να προσδένονται στο DNA και σε αλληλουχίες πλούσιες σε G/C (Ishiba et al., 2000; Kim et al., 1997).

Η ενεργοποίηση των κυττάρων με TGF- β οδηγεί σε άμεση απόκριση της μεταγραφικής μηχανής, ενεργοποιώντας ή αναστέλοντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Τόσο η ενεργοποίηση όσο και η καταστολή της έκφρασης των διαφόρων γονιδίων επάγεται από την ενεργοποίηση των ίδιων Smad πρωτεϊνών. Ο έλεγχος και ο συγχρονισμός των αποκρίσεων των κυττάρων επιτυγχάνεται με την ενεργοποίηση της βασικής σηματοδοτικής μηχανής των Smad πρωτεϊνών και τη στρατολόγηση στη συνέχεια από τη μεριά τους διαφορετικών μεταγραφικών συν-ενεργοποιητών ή συν-καταστολέων ή διαφορετικών μεταγραφικών παραγόντων ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο (Shi & Massagué, 2003; Massagué, 2000).

Οι Smad πρωτεΐνες προσδένονται με τους συν-ενεργοποιητές p300/CBP ή P/CAF μέσω της MH2 περιοχής. Οι συν-ενεργοποιητές διευκολύνουν την αλληλεπίδραση των Smad με τη βασική μεταγραφική μηχανή, ή συμβάλλουν στη μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω της δράσης τους ως ακετυλο-τρανσφεράσες των ιστονών (HAT) (Jankechit et al., 1998; Rouponnot et al., 1998; Shen et al., 1998; Topper et al., 1998). Επιπλέον οι Smad αλληλεπιδρούν με μεταγραφικούς συν-καταστολείς οι οποίοι στρατολογούν απο-ακετυλάσες των ιστονών (HDAC) στα σύμπλοκα των Smad. Τέτοιοι παράγοντες είναι οι πρωτεΐνες TGIF, Ski και SnoN (Wotton et al., 2001; Liu et al., 2001; Wu et al., 2002). Τέλος, ένας ακόμη τρόπος με τον οποίο επιτυγχάνεται μεταγραφική εξειδίκευση είναι η στρατολόγηση διαφόρων μεταγραφικών παραγόντων από τις Smads. Θετικός ή αρνητικός έλεγχος στη ρύθμιση και ενεργοποίηση της μεταγραφής επιτυγχάνεται και μέσω της σύνδεσης με μεταγραφικούς παράγοντες όπως ο AP-1 (Liberati et al., 1999; Wong et al., 1999), η οικογένεια των SP1 (Moustakas & Kardassis, 1998; Lai et al., 2000; Pardali et al., 2000) ή η οικογένεια AML (Pardali et al., 2000; Zhang et al., 2000), οι c-Fos και c-Jun (Zhang et al., 1998; Wong et al., 1999), ο Evi1 (Kurokawa et al., 1998), ή ο E1A (Nishihara et al., 1999).

1.7. Σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών και ο ρόλος τους στη ρύθμιση των βιολογικών δράσεων του παράγοντα TGF-β.

Το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών αντιπροσωπεύει έναν, αυστηρά συντηρημένο κατά τη διάρκεια της εξέλιξης, σηματοδοτικό μηχανισμό, με τη βοήθεια του οποίου εξωκυττάρια μηνύματα μεταφέρονται στον πυρήνα ώστε το κύτταρο να εκτελέσει με ακρίβεια συγκεκριμένες λειτουργίες, πολύ σημαντικές για την ανάπτυξη του οργανισμού (Moustakas & Heldin, 2005).

Εκτός όμως από τη βασική σηματοδοτική μηχανή του TGF-β, πλήθος άλλων πρωτεϊνών έχουν ταυτοποιηθεί να δρουν καθοδικά από τους υποδοχείς του, σηματοδοτώντας πλήθος κυτταρικών αποκρίσεων. Οι μηχανισμοί δράσης αυτών των μονοπατιών μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις μηχανισμούς: (α) σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών που τροποποιούν τη δράση των Smad (β) πρωτεΐνες των οποίων η δράση τροποποιείται από τις Smad και στη συνέχεια μεταδίδουν το μήνυμά τους σε άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια και (γ) πρωτεΐνες που

αλληλεπιδρούν απευθείας με το σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF- β και δεν τροποποιούν απαραίτητα τη δράση των Smad (Moustakas & Heldin, 2005).

Οι μηχανισμοί αυτοί παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόκριση του κυττάρου στον TGF- β , ρυθμίζοντας λειτουργίες όπως είναι η απόπτωση, ο μετασχηματισμός των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Epithelial-mesenchymal transition, EMT), η μετανάστευση, ο πολλαπλασιασμός, η παραγωγή εξωκυττάριας ουσίας και η διαφοροποίηση.

Ο παράγοντας TGF- β ενεργοποιεί την έκφραση διαφόρων προ-αποπτωτικών γονιδίων μέσω ενεργοποίησης των Smad πρωτεϊνών, όπως αυτά που κωδικοποιούν για την φωσφατάση των φωσφολιπιδίων SHIP, την πρωτεϊνική κινάση που συνδέεται με τον κυτταρικό θάνατο DAPK (death-associated protein kinase) και την πρωτεΐνη TIEG1 (TGF- β -inducible early response gene 1) (ten Dijke et al., 2002; Siegel & Massagué, 2003). Επιπλέον, η Smad3 επάγει την έκφραση και ενεργοποίηση του υποδοχέα Fas, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης - 8 και την απόπτωση σε καρκινικά κύτταρα του γαστρικού συστήματος (Kim et al., 2004). Ωστόσο, η ενεργοποίηση αποπτωτικών μηχανισμών καθοδικά (downstream) του TGF- β , συμπεριλαμβάνει κυρίως τα μονοπάτια MAP κινασών, όπως της p38 και της JNK. Ο τύπου II υποδοχέας του TGF- β αλληλεπιδρά με την προ-αποπτωτική βοηθητική πρωτεΐνη Daxx, η οποία οδηγεί σε ενεργοποίηση της JNK και επαγωγή απόπτωσης σε επιθηλιακά κύτταρα και ηπατοκύτταρα (Perlman et al., 2001). Στο μονοπάτι Daxx-JNK συμμετέχει και η πρωτεΐνη HIPK2 (homeodomain-interacting protein kinase-2), η οποία αλληλεπιδρά και φωσφορυλιώνει την Daxx ενεργοποιώντας έτσι τις MAP κινάσες MKK4 και MKK7, οι οποίες με τη σειρά τους ενεργοποιούν την JNK και επάγουν απόπτωση (Hofmann et al., 2003). Επιπλέον, υπερέκφραση ενός μεταλλαγμένου τύπου I υποδοχέα στην περιοχή L45, ο οποίος δεν μπορεί να δεσμεύσει και να ενεργοποιήσει τις R-Smads, μεσολαβεί για την ενεργοποίηση των μονοπατιών p38 και JNK και την επαγόμενη απόπτωση σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού, ανεξάρτητα από παράγοντες που δεσμεύονται στην περιοχή L45 (συμπεριλαμβανομένων και των Smad) (Yu et al., 2002; Itoh et al., 2003).

Σημαντικό ρόλο στην επαγωγή αποπτωτικών μηνυμάτων παίζει και ο αναστολέας των αποπτωτικών κινασών XIAP, με δράση E3 λιγάσης ουβικιτίνης. Ο παράγοντας TGF- β προκαλεί την έξοδο ενός μέλους της οικογένειας των μιτοχονδριακών πρωτεϊνών ARTS (apoptosis-related protein in the TGF- β signaling pathway), της σεπτίνης (septin) στο κυτταρόπλασμα και τη σύνδεση της με την XIAP. Η σύνδεση

αυτή οδηγεί σε απενεργοποίηση της XIAP με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της κασπάσης -3 και την επαγωγή της απόπτωσης (Larisch et al., 2000; Gottfried et al., 2004).

Εναλλακτικά, ο παράγοντας TGF- β επάγει απόπτωση μέσω συνεργασίας της συνδεδεμένης με τον TGF- β κινάσης TAK1 (TGF- β -associated kinase 1) και των ανασταλτικών Smad. Ο παράγοντας TGF- β επάγει απόπτωση στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη PC-3U, μέσω συνεργασίας της Smad7 και του σηματοδοτικού μονοπατιού TAK1-p38 (Edlund et al., 2003). Ο ρόλος αυτός των ανασταλτικών Smad, φαίνεται να βασίζεται στην ικανότητα τους να δρουν σαν βοηθητικές (adaptor) πρωτεΐνες, αφού συνδεδεμένες με τον υποδοχέα δεν παρεμποδίζουν μόνο τη σύνδεση και ενεργοποίηση των R-Smad αλλά διευκολύνει και την πρόσδεση άλλων πρωτεϊνών όπως φωσφατασών ή λιγασών ουβικιτίνης (Shi & Massagué, 2003).

Ο παράγοντας TGF- β φαίνεται ακόμα ότι ανταγωνίζεται αντι-αποπτωτικά σήματα, αφού τα σχετικά επίπεδα της Smad3 και της αντι-αποπτωτικής κινάσης Akt καθορίζουν το αν το κύτταρο θα εκτελέσει μηχανισμό απόπτωσης ή όχι (Conery et al., 2004; Remy et al., 2004). Το μοντέλο αυτό βασίζεται στη φυσική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα, όταν ο λόγος Smad3:Akt είναι αυξημένος το κύτταρο είναι ευαίσθητο στην επαγόμενη από τον TGF- β απόπτωση, ενώ μείωση του λόγου Smad3:Akt έχει σαν αποτέλεσμα την προστασία του από την απόπτωση. Αυτή η προστατευτική δράση εμφανίζεται εξειδικευμένα για τον TGF- β και όχι για την επαγόμενη από τον TNF- α απόπτωση (Conery et al., 2004). Επιπλέον, η βοηθητική πρωτεΐνη CD2AP (CD2-associated protein) ενεργοποιεί το μονοπάτι PI3K/Akt οδηγώντας σε επιβίωση των κυττάρων και προστατεύοντας από την -επαγόμενη από τον TGF- β - απόπτωση σε νεφρικά ποδοκύτταρα (Schiffer et al., 2004). Πρόσφατα δείχθηκε ότι η ρυθμιστική υπομονάδα, p85, της PI3K, συνδέεται έμμεσα με τον υποδοχέα του TGF- β (και τις δύο υπομονάδες) και ενεργοποιείται από αυτόν κατά την σύνδεση του προσδέματος (Yi et al., 2005). Στην εργασία αυτή δεν δείχθηκε αν η πρωτεΐνη που μεσολαβεί για την σύνδεση της p85 είναι η CD2AP ή κάποια άλλη πρωτεΐνη.

Ο παράγοντας TGF- β αναστέλλει την ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό μη μετασχηματισμένων επιθηλιακών, ενδοθηλιακών ή αιματοποιητικών κυττάρων (ten Dijke et al., 2002). Αντιθέτως, έχει μιτογόνο δράση σε μετασχηματισμένα κύτταρα και αθανатоποιημένους ινοβλάστες (Alexandrow & Moses, 1995). Η αναστολή του πολλαπλασιασμού των κυττάρων από τον TGF- β μεσολαβείται από τις Smads και την

επαγωγή γονιδίων, που ρυθμίζουν την φάση G1 του κυτταρικού κύκλου (Massagué, 2004). Η έκφραση του γονιδίου του αναστολέα του κυτταρικού κύκλου p21 επάγεται από τον υποδοχέα του TGF-β, διαμέσου των Smad και μεταγραφικών παραγόντων όπως οι Sp1 και p53 (Moustakas & Kardassis, 1998; Pardali et al., 2000; Cordenonsi et al., 2003). Ωστόσο, το γονίδιο της p21 επάγεται από τον TGF-β και μέσω άλλων μηχανισμών που περιλαμβάνουν την πρωτεΐνη Ras, και τις MEKK1 και ERK (Hu et al., 1999; Kivinen & Laiho, 1999). Επιπλέον, η έκφραση της p21 επάγεται σε καρκινικά κύτταρα τα οποία δεν εκφράζουν τη Smad4 (Ijichi et al., 2004). Σε ανθρώπινα κερατινοκύτταρα και κύτταρα από ηπάτωμα ο TGF-β ενεργοποιεί την πρωτεϊνική κινάση Ca (PKCa), η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει τη ρυθμιστική πρωτεΐνη S100/A11 που μετατοπίζεται στον πυρήνα και συνδεδεμένη με τον μεταγραφικό παράγοντα Sp1 ρυθμίζει την έκφραση των γονιδίων p15 και p21 (Miyazaki et al., 2004; Sakaguchi et al., 2004). Ταυτόχρονα η PKCa φωσφορυλιώνει την Smad3 κοντά στην περιοχή δέσμευσης με το DNA αναστέλλοντας έτσι τη μεταγραφική της δραστηριότητα (Yakymovych et al., 2001). Και οι δύο μηχανισμοί αποτελούν ένα ολοκληρωμένο δίκτυο ποσοτικής ρύθμισης της έκφρασης του γονιδίου της p21 (Moustakas & Heldin, 2005).

Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν έναν ακόμα μηχανισμό μέσω του οποίου οι Smad ενεργοποιούν άμεσα ανεξάρτητα μονοπάτια. Η Smad2 ενεργοποιεί την κινάση ERK, ενώ η Smad3 δεσμεύεται με την ρυθμιστική υπομονάδα της πρωτεϊνικής κινάσης A (PKA) και ενεργοποιεί την ενζυμική της δράση ανεξάρτητα από τα επίπεδα του κυκλικού AMP. Και τα δύο αυτά γεγονότα συνδέονται με μεταγραφική ενεργοποίηση της p21 και αναστολή της κυτταρικής ανάπτυξης (Lee et al., 2004; Zhang et al., 2004).

Εναλλακτικά, μονοπάτια αναστολής της κυτταρικής ανάπτυξης από τον TGF-β περιλαμβάνουν αναστολή της κινάσης σερίνης/θρεονίνης p70 S6, η οποία είναι απαραίτητη για την εξέλιξη της G1/S φάσης. Το σύμπλοκο των υποδοχέων δεσμεύεται άμεσα με τη ρυθμιστική υπομονάδα PP2A-Bα της πρωτεϊνικής φωσφατάσης PP2A, γεγονός που ενεργοποιεί την σύνδεση της με την κινάση p70 S6 και τη αποφωσφορυλίωση της με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της (Petritsch et al., 2000; Griswold-Prenner et al., 1998). Επιπλέον, ο TGF-β μέσω του μονοπατιού RhoA/ROCK1 οδηγεί σε φωσφορυλίωση και αναστολή της φωσφατάσης Cdc25A σε επιθηλιακά κύτταρα (Bhowmick et al., 2003). Η πρωτεΐνη Cdc25A αποφωσφορυλιώνει τις εξαρτώμενες από κυκλίνες κινάσες (cyclin dependent kinases)

επάγωντας έτσι εξέλιξη του κυτταρικού κύκλου. Απενεργοποίηση της Cdc25A σταματά τον κυτταρικό κύκλο στη G1 φάση.

Αντίθετα η μιτογόνος απόκριση των AKR-2B ινοβλαστών στον TGF- β περιλαμβάνει ενεργοποίηση της κυτταροπλασματικής κινάσης PAK2 (Wilkes et al., 2003). Οι μικρές GTPάσες Rac1 και Cdc42 μεσολαβούν για αυτήν την απόκριση, ενώ το μονοπάτι φαίνεται να λειτουργεί σε ινοβλάστες αλλά όχι και σε επιθηλιακά κύτταρα.

Μέλη της υπερικογένειας του TGF- β μεταβάλλουν την μορφολογία των κυττάρων ελέγχοντας τη μεταναστευτική τους ικανότητα και το μετασχηματισμό των επιθηλιακών ή ενδοθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT), διεργασίες που είναι κρίσιμης σημασίας κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, και της εξάπλωσης προχωρημένων καρκινομάτων (Tosh & Slack, 2002; Condeelis & Segall, 2003; Gotzmann et al., 2004). Κατά τον μετασχηματισμό των επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, EMT, τα χαρακτηριστικά πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα χάνουν τους μεταξύ τους συνδέσμους καθώς και τις προσφύσεις με την εξωκυττάρια ουσία, η οποία παράλληλα υφίσταται αποικοδόμηση, ενώ ο κυτταρικός φαινότυπος μεταβάλλεται καθώς αναδιοργανώνεται ο κυτταροσκελετός της ακτίνης, με αποτέλεσμα τα κύτταρα να γίνονται πιο κινητικά και διηθητικά. Το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών αποτελεί σημαντικό διαμεσολαβητή αυτής της διαδικασίας ρυθμίζοντας την έκφραση διαφόρων γονιδίων. Ωστόσο, στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η οποία αποτελεί μια άμεση και γρήγορη απόκριση του κυττάρου σημαντικό ρόλο παίζουν σηματοδοτικά μονοπάτια ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών (Moustakas & Heldin, 2005).

Οι πρωτεΐνες Smad3 και Smad4 παίζουν σημαντικό ρόλο στην EMT απόκριση. Ο μεταλλαγμένος τύπου I υποδοχέας, ο οποίος δεν μπορεί να δεσμεύσει τις Smad, αδυνατεί να επάγει EMT ενώ ενεργοποιεί την ενδογενή p38 ή την JNK (Yu et al., 2002; Itoh et al., 2003). Ο ίδιος μεταλλαγμένος υποδοχέας αναστέλει και την ενδογενή-αυτοκρινή σηματοδότηση από τον TGF- β , επάγωντας έτσι ισχυρότερο επιθηλιακό φαινότυπο και καταστέλλοντας την μετάσταση καρκίνου του μαστού στον πνεύμονα (Tian et al., 2004).

Κατά την EMT απόκριση σημαντικό ρόλο κατέχει η μικρή GTPάση RhoA, ενώ πολύ πρόσφατα περιγράφηκε για πρώτη φορά ένας μηχανισμός που την συνδέει άμεσα με τον υποδοχέα του TGF- β (Barrios-Rodiles et al., 2005; Ozdamar et al., 2005). Στα πολωμένα επιθηλιακά κύτταρα, το σύμπλοκο του υποδοχέα του TGF- β στρατολογείται κοντά στους σφιχτούς συνδέσμους (tight junctions), μέσω της

δομικής πρωτεΐνης occludin, η οποία αλληλεπιδρά με την πρωτεΐνη Par6 (μια πρωτεΐνη που απαντάται σε σύμπλοκα υπεύθυνα για τη διατήρηση της πολικότητας των κυττάρων). Ενεργοποίηση του υποδοχέα με τον παράγοντα TGF- β , έχει σαν αποτέλεσμα ο τύπου II υποδοχέας να φωσφορυλιώνει άμεσα και την πρωτεΐνη Par6, εκτός από τον τύπου I υποδοχέα. Η φωσφορυλιωμένη Par6 σηματοδοτεί τη στρατολόγηση της λιγάσης ουβικήτης Smurf, την ουβικιτυνίωση της RhoA και την σταδιακή της αποικοδόμηση. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την τοπική αποδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και την αποδιάταξη των σφιχτών συνδέσμων, διαδικασία που αποτελεί ένα από τα γεγονότα κλειδιά της απόκρισης EMT (Thiery, 2003). Η έμμεση καταστολή της έκφρασης της E-κατχερίνης (E-cadherin) από τις Smad (μέσω ενεργοποίησης της έκφρασης του μεταγραφικού παράγοντα Snail, ο οποίος δρα σαν μεταγραφικός καταστολέας της E-κατχερίνης), σηματοδοτεί την αποδιάταξη των συνδέσμων πρόσφυσης (adherens junctions) των επιθηλιακών κυττάρων, μια ακόμα διαδικασία κλειδί της EMT απόκρισης (Peinado et al., 2003; Nieto et al., 2002).

Η πρωτεΐνη LIMK1 συνδέεται άμεσα με την κυτταροπλασματική ουρά του τύπου II υποδοχέα του BMP και μεσολαβεί στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά τη διάρκεια της μορφογένεσης νευρικών δενδριτών (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004). Η μικρή GTPάση Cdc42 είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση της LIMK1 από τον παράγοντα BMP, ενώ απορύθμιση του μονοπατιού συμβάλλει στην εξέλιξη της πρωτοπαθούς πνευμονικής υπέρτασης (primary pulmonary hypertension).

Αντίθετα με τον τύπου II υποδοχέα του BMP, στην πρωτοταγή αμινοξική αλληλουχία του T β RII δεν απαντώνται οι αλληλουχίες που μεσολαβούν για την αλληλεπίδραση με την LIMK1.

Η Smad3 και Smad4 συνεργάζονται με την p38 MAP κινάση ενεργοποιώντας την έκφραση της τροπομοσίνης, ενώ η Smad3 είναι απαραίτητη για την επαγωγή της έκφρασης του παράγοντα GEF, NET1, συμβάλλοντας έτσι στην μακροπρόθεσμη (long-term) σταθεροποίηση των ινιδίων του στρες (Bakin et al., 2004; Shen et al., 2001). Σε καρκινικά κύτταρα του προστάτη, ο παράγοντας TGF- β ενεργοποιεί τις μικρές GTPάσες RhoA και Cdc42, καθώς και την κινάση p38 για να επάγει τη δημιουργία μεμβρανικών αναδιπλώσεων (Edlund et al., 2002). Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι σε αυτά τα κύτταρα η πρωτεΐνη Smad7 μεσολαβεί για την ενεργοποίηση της Cdc42 (Edlund et al., 2004).

Σε συστήματα στα οποία η κυτταρική μετανάστευση είναι η μοναδική απόκριση των κυττάρων, δεν είναι ξεκάθαρος ο ρόλος των Smad πρωτεϊνών. Μεταστατικά κύτταρα από καρκίνο του μαστού τα οποία εμφανίζουν υψηλή μεταναστευτική ικανότητα και παράγουν μεγάλες ποσότητες αυτοκρινούς TGF-β, ενεργοποιούν τα PI3K/Akt και ERK μονοπάτια για να ελέγξουν την κινητικότητα τους (Dumont et al., 2003). Παραπλήσιος μηχανισμός, ο οποίος περιλαμβάνει και την Rac1, ενεργοποιείται από τον TGF-β σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού μετασχηματισμένα με υπερέκφραση του παράγοντα HER2 (epidermal growth factor receptor 2) (Ueda et al., 2004). Τέλος, η επαγόμενη από την Ακτιβίνη μετανάστευση κερατινοκυττάρων, ελέγχεται από το μονοπάτι RhoA/ROCK/MEKK1/JNK/p38 (Zhang et al., 2005).

Είναι λοιπόν σαφές ότι, από τις πρόσφατες μελέτες της διεθνούς βιβλιογραφίας καταδεικνύεται όλο και περισσότερο η σημασία σηματοδοτικών μηχανισμών “ανεξάρτητων” των Smad πρωτεϊνών, η ύπαρξη των οποίων εγείρει πλήθος σημαντικών ερωτημάτων με κυριότερο το αν είναι πράγματι ανεξάρτητα των Smad, αν συμβάλλουν στην εξειδίκευση της απόκρισης στο εξωτερικό ερέθισμα ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και αν αποτελούν τους κόμβους επικοινωνίας του σηματοδοτικού μηχανισμού του TGF-β με άλλους παράγοντες (Moustakas & Heldin, 2005).

1.8. Ερευνητικός στόχος.

Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης αποτελεί έναν κεντρικό κρίκο στην αλυσίδα ανίχνευσης και μετάδοσης κυτταρικών μηνυμάτων. Η αναδεικνυόμενη σπουδαιότητα του ρόλου του, έγκειται στο γεγονός ότι ο βαθμός πολυμερισμού της ακτίνης δεν αποτελεί απλώς το τελικό αποτέλεσμα μιας σηματοδοτικής αλληλουχίας, αλλά μέρος του σηματοδοτικού μονοπατιού απαραίτητο για την τελική φυσιολογική λειτουργία που το κύτταρο καλείται να εκτελέσει (Miralles et al., 2003 ; Papakonstanti & Stournaras, 2004 ; Papakonstanti et al., 2003 ; Kampa et al., 2002 ;).

Η ικανότητα του TGF-β1 να μεταβάλλει την μορφολογία των κυττάρων και την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι πλέον δεδομένη και έχει μελετηθεί εκτεταμένα. Προηγούμενες μελέτες του εργαστηρίου μας σε μετασχηματισμένους H-Ras NIH3T3 ινοβλάστες έδειξαν ότι επίδραση με TGF-β1 οδηγεί σε σχηματισμό ενός πλήρως οργανωμένου δικτύου ινιδίων του στρες όπως και στα φυσιολογικά κύτταρα, υποστρέφοντας έτσι τον καρκινικό φαινότυπο (Moustakas A. & Stournaras C., 1999). Αντίθετα κατά τον μετασχηματισμό επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχοματικά, EMT,

τα κύτταρα σταδιακά χάνουν την απόκριση αναστολής της ανάπτυξης στον TGF- β , και χρησιμοποιούν την σηματοδοτική μηχανή του TGF- β για τον μετασχηματισμό τους. Τα κύτταρα τότε αποκτούν μορφολογία ινοβλαστών, με εκτεταμένο χαρακτηριστικό δίκτυο παράλληλων ινιδίων του στρες, αυξημένη κινητικότητα και ικανότητα διήθησης και μετάστασης. Οι μεταβολές αυτές, αφορούν άμεσα τον κυτταροσκελετό της ακτίνης και κάνουν τα κύτταρα πιο επιθετικά ως προς τον καρκινικό τους φαινότυπο.

Ο διττός αυτός ρόλος του TGF- β στην απόκριση νεοπλασματικών κυττάρων ως προς τον καρκινικό και κυτταροσκελετικό τους φαινότυπο, καθιστά επιτακτική την ανάγκη διερεύνησης των μοριακών μηχανισμών που ελέγχουν την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον παράγοντα. Επιπλέον, οι μεταβολές που παρατηρούνται στην κατάσταση πολυμερισμού της ακτίνης είναι ταχείες, υποδηλώνοντας ότι πιθανόν συμβαίνουν μέσω ενός μονοπατιού “ανεξάρτητου” των γενωμικών δράσεων του Smad μονοπατιού. Η διερεύνηση των ερωτημάτων αυτών αποτελεί τον βασικό πυρήνα της παρούσας διατριβής.

Ως κυτταρικό μοντέλο επιλέχθηκε η φυσιολογική σειρά των Swiss3T3 ινοβλαστών. Τα κύτταρα αυτά αποτελούν ένα χρήσιμο μοντέλο για τη μελέτη μας, μια και ανταποκρίνονται άμεσα και δυναμικά στον TGF- β και εκφράζουν όλα τα μόρια της βασικής σηματοδοτικής μηχανής του παράγοντα. Επιπλέον, είναι το κυτταρικό μοντέλο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί διεξοδικά για την διερεύνηση του ρόλου των μικρών Rho GTPασών στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Hall, 1998).

Τα βασικά ερωτήματα και οι στόχοι της παρούσας διατριβής συνοψίζονται στα παρακάτω:

- Μορφολογική και βιοχημική ανάλυση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης που παρατηρείται από την επίδραση του TGF- β 1 σε Swiss3T3 ινοβλάστες.
- Ταυτοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού που ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.
- Διερεύνηση του ρόλου των μικρών GTPασών στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF- β .
- Ταυτοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων που ενεργοποιούνται από τις Rho GTPάσες και μεταδίδουν το μήνυμά τους προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

- Διερεύνηση της πιθανής εμπλοκής των Smad πρωτεϊνών στην επαγόμενη από τον TGF-β αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, καθώς και η πιθανή επικοινωνία του κλασικού μονοπατιού σηματοδότησης των Smad με το μονοπάτι σηματοδότησης των Rho GTPασών.
- Διερεύνηση της μακροπρόθεσμης επίδρασης του παράγοντα στην εδραίωση των επαγόμενων από τον TGF-β κυτταροσκελετικών αλλαγών.
- Διερεύνηση του βιολογικού ρόλου της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β και ο ρόλος του σηματοδοτικού μηχανισμού στην κυτταρική απόκριση.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά.

Οι κυτταρικές σειρές Swiss3T3 και 293 προέρχονται από την ATCC (American Type Culture Collection). Οι αθανοτοποιημένοι φυσιολογικοί ινοβλάστες εμβρύου ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEF's) ήταν ευγενική χορηγία του R. Heuchel από την Ουψάλα της Σουηδίας.

Για τις παροδικές επιμολύνσεις κυττάρων με πλασμίδια χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι κατασκευές: (α) η μονίμως ανενεργή RhoA σημασμένη στο N-τελικό της άκρο με τον επίτοπο myc, pEXV-mycRhoAN19, ήταν δώρο από τον κ. T. Τσακίριδη από το Τορόντο του Καναδά με την άδεια του κ. M. Symons, Onyx Pharmaceuticals, Richmond, CA (Qiu et al., 1995). (β) η μονίμως ανενεργή RhoB σημασμένη με τον επίτοπο HA στο N-τελικό της άκρο, pcDNA3-HARhoBN19, ήταν δώρο από τον G. Prendergast, Philadelphia, PA (Lebowitz et al., 1995). (γ) η φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP, pEGFP-C1 προέρχεται από την εταιρεία BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA. (δ) Τέλος χρησιμοποιήθηκε και ένας φορέας βακτηριακής έκφρασης (bacterial expression vector), ο οποίος κωδικοποιεί για την glutathione S-transferase (GST) προσδεμένη με το τομέα δέσμευσης της Rho (Rho-binding domain, RBD) της πρωτεΐνης rhotekin, pGEX-2T-TRBD, και ήταν δώρο από τον M. Schwartz, La Jolla, CA (Ren & Schwartz, 2000)

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν οι κάτωθι ανασυνδυσασμένοι αδενοϊοί έκφρασης: (α) για LacZ (αδενοϊός ελέγχου), (β) για τις πρωτεΐνες Smad2, Smad3 και Smad7 σημασμένες στο N-τελικό τους άκρο με τον επίτοπο Flag, (γ) για τον υποδοχέα ALK-5 με μια σημειακή μετάλλαξη (T204D) που τον καθιστά μονίμως ενεργό, σημασμένο στο N-τελικό του άκρο με τον επίτοπο HA, (T204D) ALK-5 ή caALK-5, (δ) για τον caALK-5 με μία επιπλέον μετάλλαξη στην περιοχή L45 που καθιστά αδύνατη την προσδεση των Smad πρωτεϊνών, σημασμένο στο C-τελικό του άκρο με τον επίτοπο Flag, caALK-5mL45, (ε) για την λουσιφεράση σε σύζευξη με τον υποκινητή CAGA₉, CAGA₉-MLP-luciferase. Οι ανασυνδυσασμένοι αδενοϊοί (α), (β) και (γ) ήταν δώρο από τον K. Miyazono, Tokyo (Fujii et al., 1999), (δ) από τον V. Kaartinen, Los Angeles, CA (Dudas et al., 2004) και (ε) από τον S. Dooley, Aachen (Dooley et al., 2001). Όλοι οι ανασυνδυσασμένοι αδενοϊοί πολλαπλασιάστηκαν σε κύτταρα 293 όπως έχει ήδη περιγραφεί (Piek et al., 1999).

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανοσοαποτύπωσης, ανοσοφθορισμού και ανοσοκατακρήμνισης είναι: (α) το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά

της RhoA (mouse monoclonal anti-RhoA, 26C4), το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά των Smad 1/2/3 (mouse monoclonal anti-Smad1/2/3, H-2), το πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της RhoB (rabbit polyclonal anti-RhoB, 119), το πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της LIMK2 (rabbit polyclonal anti-LIMK2, H-78) και το πολυκλωνικό αντίσωμα κατά της κοφιλίνης (rabbit polyclonal anti-cofilin, N-19) τα οποία προέρχονται από την εταιρεία Santa Cruz Biotechnology, Inc. (β) το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της LIMK1 (rat monoclonal anti-LIMK1) το οποίο ήταν δώρο από την O. Bernard, Melbourne (Foletta et al., 2004). (γ) το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά του επιτόπου Flag (mouse monoclonal anti-Flag-M5) και το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της α-Smooth Muscle Actin (mouse monoclonal anti-α-SMA) τα οποία προέρχονται από την Sigma-Aldrich. (δ) το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της β-τουμπουλίνης (mouse monoclonal anti-β-tubulin) και το μονοκλωνικό αντίσωμα κατά της ακτίνης (mouse monoclonal anti-actin) τα οποία προέρχονται από την Chemicon, Temecula, CA. (ε) το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της β-γαλακτοσιδάσης (rabbit polyclonal anti-β-galactosidase, A-11132) και η ροδαμίνη φαλλοϊδίνη τα οποία προέρχονται από την Molecular Probes Inc., Eugene, OR. (ζ) το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι του υποδοχέα ALK-5 (rabbit polyclonal anti-ALK-5) και το πολυκλωνικό αντίσωμα έναντι της φωσφο-Smad2 (rabbit polyclonal anti-p-Smad2) τα οποία ήταν δώρο του Α. Μουστάκα, Ουψάλα, Σουηδία.

Στην ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιήθηκαν σαν δεύτερα αντισώματα: (α) IgG κατά αντιορού ποντικού, ή κουνελιού, (ανάλογα με το πρώτο αντίσωμα που έχει χρησιμοποιηθεί) σημασμένη με υπεροξειδάση (Horseradish Peroxidase, HRP) (Chemicon, Temecula, CA,USA). (β) IgG κατά αντιορού κατσίκας σημασμένη με υπεροξειδάση (anti-goat-HRP) (SantaCruz Biotechnology Inc). (γ) IgG κατά αντιορού αρουραίου σημασμένη με υπεροξειδάση (anti-rat-HRP) (Amersham Biosciences). Για την ανίχνευση των πρωτεϊνών σε φιλμ, χρησιμοποιήθηκε ECL (Western Blotting detection kit), φιλμ υψηλής ευαισθησίας Hyperfilm ECL και κασέτα εμφάνισης φιλμ της εταιρείας Amersham Biosciences.

Στους ανοσοφθορισμούς σαν δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν: (α) IgG κατά αντιορού ποντικού ή κουνελιού σημασμένη με φλουορεσκίνη (FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG και FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG) από την Chemicon, Temecula, CA,USA. (β) IgG κατά αντιορού αρουραίου σημασμένη με φλουορεσκίνη (FITC-conjugated goat anti-rat IgG) από την Sigma-Aldrich. (γ) IgG κατά αντιορού κουνελιού σημασμένη με Alexa-fluor-488 (Alexa-fluor-488-conjugated goat anti-

rabbit IgG) από την Molecular Probes Inc. Για την σταθεροποίηση των καλυπτρίδων στις αντικειμενοφόρους και τη σταθεροποίηση του φθορισμού κατά την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο χρησιμοποιήθηκε το Slow fade antifade reagent από την Molecular Probes Inc.

Για την καλλιέργεια των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε σαν θρεπτικό μέσο καλλιέργειας το DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), ορός εμβρύου βοός (FBS) και πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη από την Gibco-BRL Co, MD, USA, ενώ η τρυψίνη ήταν από την εταιρεία Biochrom KG, Berlin, Germany. Ο παράγοντας TGF-β1 προέρχεται από την εταιρεία R&D Systems Inc. ή την εταιρεία PeproTechEC Ltd. Όλα τα κοινά αντιδραστήρια τα οποία δεν αναφέρονται συγκεκριμένα παρακάτω ήταν αναλυτικής καθαρότητας από τις εταιρείες Merck (Darmstadt, Germany), Sigma (St. Louis, USA), Biorad (Palo Alto, CA, USA), USB και ROTH.

Μέθοδοι.

2.1. Καλλιέργεια κυττάρων.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες κυτταρικές σειρές:

1. Για τα πειράματα διερεύνησης του σηματοδοτικού μονοπατιού του Μετασχηματίζοντα Παράγοντα-β (TGF-β), η κυτταρική σειρά ινοβλαστών Swiss3T3 που καθιερώθηκε το 1962 από τους Todaro G. και Green H. από έμβρυο ποντικού
2. Οι αθανатоποιημένοι φυσιολογικοί εμβρυονικοί ινοβλάστες ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) ήταν δώρο από τον R. Heuchel, Uppsala.
3. για την αναπαραγωγή των ανασυνδυασμένων αδενοϊών, η κυτταρική επιθηλιακή σειρά 293 από ανθρώπινο νεφρό

Όλες οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε μονοστοιβάδες μέσα σε πλαστικές φλάσκες, επιφάνειας 75 cm², σε επωαστήρα (Forma Scientific, Ohio, USA) με υγρή ατμόσφαιρα συστάσεως 5% CO₂-95% αέρας και θερμοκρασία 37°C. Το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 48 ή 72 ώρες. Ως βασικό μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιείται DMEM εμπλουτισμένο με 10% αδρανισμένο (μέσω θέρμανσης στους 56°C για 30 λεπτά) ορό εμβρύου βοός (FBS), 50 IU/ml πενικιλίνη και 50mg/ml στρεπτομυκίνη. Για την ανακαλλιέργεια, όταν οι καλλιέργειες φτάνουν σε πλήρη ανάπτυξη (100% πληρότητα στην επιφάνεια καλλιέργειας), εκτίθενται σε διάλυμα τρυψίνης (0,25% τρυψίνη, 5mM EDTA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών

(Phosphate Buffer Saline, PBS) για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια τα κύτταρα παραλαμβάνονται με θρεπτικό υλικό καλλιέργειας και μοιράζονται σε νέες φλάσκες στην επιθυμητή αραιώση και σύμφωνα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. Πριν από την επίδραση των διαφόρων ουσιών τα κύτταρα καλλιεργούνται για 24 ώρες σε θρεπτικό υλικό απουσία ορού. Για μορφολογικές παρατηρήσεις τα κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν ενώ τα κύτταρα ήταν σε γενιές μεταξύ 10-30.

Η διατήρηση των κυττάρων στο εύρος αυτό των γενεών έγινε με κατάψυξη τους σε τακτά χρονικά διαστήματα. Συγκεκριμένα, κυτταρικό αιώρημα (περίπου $1 \cdot 10^6$ κύτταρα/ml σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας) συμπληρώνεται με 5% DMSO και κλάσματα του 1 ml τοποθετούνται αμέσως σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσονται στους -85°C . Για την απόψυξη των κυττάρων, ένα από τα κατεψυγμένα κλάσματα θερμαίνονται στους 37°C και αμέσως μετά φυγοκεντρούνται σε 1500 rpm για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκείμενου διαλύματος, τα κύτταρα επανασκορπίζονται σε θρεπτικό υλικό καλλιέργειας και ακολουθεί η καλλιέργεια τους όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.2. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης εξ' αιτίας της παρουσίας SDS (SDS-PAGE).

Προετοιμασία δειγμάτων.

Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται ίσος όγκος αποδιατακτικού διαλύματος 2X (sample buffer: Tris-HCL 0.125 M, pH:6.8, SDS 4% w/v, β-μερκαπτοαιθανόλη 0.57 M, Γλυκερόλη 1% v/v, Bromophenol blue 0.02% w/v, πριν το χρησιμοποιήσουμε προσθέτουμε DTT σε τελική συγκέντρωση 100mM) και ακολούθως θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών και η κάλυψη τους από μόρια SDS έχει σαν συνέπεια η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα μέσα στο πήκτωμα της πολυακρυλαμιδίου να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους κατά μήκος του πηκτώματος.

Προετοιμασία πηκτώματος.

Για την προετοιμασία των πηκτωμάτων αναμιγνύονται όλα τα συστατικά του διαλύματος εκτός του APS και του TEMED τα οποία λειτουργούν σαν καταλύτες για την έναρξη και την διατήρηση του πολυμερισμού αντίστοιχα και προστίθενται λίγο

πριν την έκχυση. Το πήκτωμα εκχύνεται στον κενό χώρο που δημιουργείται μεταξύ δύο γυάλινων πλακών που διαχωρίζονται με κομμάτια πλαστικού (spacers) πάχους 1.5 mm. Αρχικά εκχύνεται το πήκτωμα διαχωρισμού (running gel: όγκος διαλύματος πολυακρυλαμιδίου ανάλογα με την επιθυμητή πυκνότητα (π.χ. 10% w/v), Tris-HCL 0.375 M pH:8.8, SDS 0.1% w/v, APS 0.1% w/v, TEMED 0.03% v/v) και αφού πολυμεριστεί προστίθεται το πήκτωμα επιστοίβαξης (stacking gel: Διάλυμα πολυακρυλαμιδίου 4.5% w/v, Tris-HCL 0.125 M pH:6.8, SDS 0.1% w/v, APS 0.1% w/v, TEMED 0.05% v/v) μέσα στο οποίο τοποθετείται το «χτένι» για το σχηματισμό θέσεων (πηγάδια). Αφού πολυμερισθεί και το πήκτωμα επιστοίβαξης το «χτένι» αφαιρείται και τα δείγματα τοποθετούνται με σύριγγα Hamilton στις θέσεις που έχουν δημιουργηθεί.

Ηλεκτροφόρηση.

Μετά την τοποθέτηση των δειγμάτων, τοποθετείται στα δοχεία των ηλεκτροδίων της συσκευής (Amersham Pharmacia Biotech ή BioRad) διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1X (διάλυμα ηλεκτροφόρησης (Electrophoresis buffer) 10X: Γλυκίνη 1.92 M, TRIZMA-base 0.25M, SDS 1% w/v, το pH δεν ρυθμίζεται αλλά πρέπει να είναι περίπου 8.3). Για την περίπτωση των μεσαίου μεγέθους πηκτωμάτων (midi gels) εφαρμόζεται σταθερή τάση 150 V έως ότου τα δείγματα να εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού, οπότε η τάση αυξάνεται στα 250 V και παραμένει σταθερή μέχρι το τέλος της ηλεκτροφόρησης, ενώ στην περίπτωση των μικρού μεγέθους πηκτωμάτων (mini gels) εφαρμόζεται αρχικά τάση 100 V και στη συνέχεια αυξάνεται στα 150 V. Στη συνέχεια και αφού απομακρυνθεί το πήκτωμα επιστοίβαξης, το πήκτωμα υφίσταται χρώση ή ανοσοαποτύπωση (Western Blot).

Χρώση – Απόχρωση.

Το πήκτωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα χρώσης (μεθανόλη 50% v/v, CH₃COOH 10% v/v, Coomassie Brilliant Blue R-250 0.2% w/v) για 15-30 λεπτά. Ακολούθως φέρεται σε διάλυμα απόχρωσης (μεθανόλη 20% v/v, CH₃COOH 10% v/v) όπου παραμένει υπό συνεχή ανάδευση έως ότου γίνουν ορατές οι πρωτεϊνικές ζώνες. Στην συνέχεια το πήκτωμα τοποθετείται σε απορροφητικό χαρτί (Whatman 3MM) και ξηραίνεται με θέρμανση υπό κενό σε ειδική συσκευή (Slab Gel Dryer)

2.3. Ανοσοαποτύπωση – Western Blot.

Μεταφορά πρωτεϊνών από πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης (Western Blot) κατά Towbin et al., 1979.

Για τη μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης συναρμολογείται το «σάντουιτς» μεταφοράς ως εξής: μεταξύ δύο σφουγγαριών της συσκευής τοποθετούνται κατά σειρά ένα χαρτί Whatman, το πήκτωμα, η μεμβράνη και το άλλο χαρτί Whatman, όλα εμβαπτισμένα σε διάλυμα μεταφοράς και με προσοχή ώστε να μη δημιουργηθούν φυσαλίδες μεταξύ τους. Το «σάντουιτς» τοποθετείται στην ειδική συσκευή μεταφοράς των πρωτεϊνών (Amersham Pharmacia Biotech ή BioRad), στην οποία έχει ήδη τοποθετηθεί το διάλυμα μεταφοράς (transfer buffer: μεθανόλη 20% v/v, διάλυμα ηλεκτροφόρησης 10X 10% v/v), με το πήκτωμα προς την κάθοδο. Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο (περίπου 800 mA) για 1 ½ ώρα. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς το διάλυμα διατηρείται στους 4⁰C.

Διαδικασία ανοσοανίχνευσης.

Η μέθοδος ανοσοανίχνευσης στηρίζεται στη σύνδεση του αντισώματος κατά της συγκεκριμένης πρωτεΐνης που επιθυμούμε να ανιχνεύσουμε, με το συγκεκριμένο αντιγόνο που βρίσκεται ακινητοποιημένο στη μεμβράνη. Στη συνέχεια χρησιμοποιείται ανοσοσφαιρίνη κατά αντιορού του ζώου-ξενιστή που έχει χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του πρώτου αντισώματος, η οποία αναγνωρίζει την ανοσοσφαιρίνη του πρώτου ειδικού αντισώματος και συνδέεται με αυτό. Στη δεύτερη αυτή ανοσοσφαιρίνη έχει συνδεθεί μέσω χημικού δεσμού το ένζυμο της υπεροξειδάσης (Horseradish Peroxidase, HRP). Για την ανίχνευση της υπεροξειδάσης και κατά συνέπεια της πρωτεΐνης που ανιχνεύεται χρησιμοποιείται το αντιδραστήριο ECL (Western Blotting detection kit). Τελική συνέπεια της αντίδρασης του υποστρώματος με την υπεροξειδάση είναι η παραγωγή χημιοφωταύγειας (chemiluminescence) η οποία ανιχνεύεται με τη χρήση του ειδικού φιλμ Hyperfilm ECL.

Συγκεκριμένα και σε περίπτωση που δεν αναφέρεται διαφορετικά όλες οι διεργασίες γίνονται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και όλες οι εκπλύσεις με TBS-T (Tris-HCl 20mM, pH:7.6, NaCl 137 mM, Tween-20 0.05% v/v). Αρχικά η μεμβράνη αναδεύεται σε διάλυμα 5% w/v αφυδατωμένου αποβουτυρωμένου γάλατος σε TBS-T (blocking buffer) είτε για 1 ώρα σε θερμοκρασία περιβάλλοντος είτε για 14-16 ώρες στους 4⁰C. Έπειτα από 3 εκπλύσεις, μία των 15 λεπτών και 2 των 5 λεπτών, η μεμβράνη επωάζεται για 1 ώρα ή 14-16 ώρες, ανάλογα με το τι προτείνει η

βιβλιογραφία ή η κατασκευάστρια εταιρεία για το αντίσωμα, με την κατάλληλη αραίωση του πρώτου αντισώματος. Συγκεκριμένα για τις ανάγκες των πειραμάτων που πρόκειται να περιγραφούν χρησιμοποιήθηκαν τα κάτωθι αντισώματα στις αντίστοιχες αραιώσεις:

- *anti-RhoA* 1:100 σε TBS-T, 14-16 ώρες, 4⁰C
- *anti-RhoB, anti-LIMK2, anti-cofilin,* 1:100 σε blocking buffer, 14-16 ώρες, 4⁰C
- *anti-Smad1/2/3, anti-Flag-M5,*
anti-ALK-5 1:1,000 σε TBS-T, 14-16 ώρες, 4⁰C
- *anti-actin, anti-β-tubulin, anti-α-SMA* 1:1,000 σε TBS-T, 1 ώρα, Θ/Π
- *anti-β-galactosidase,* 1:5,000 σε TBS-T, 14-16 ώρες, 4⁰C
- *anti-p-Smad2* 1:500 σε TBS-T, 14-16 ώρες, 4⁰C

Ακολουθώς η μεμβράνη εκπλένεται όπως αναφέρεται παραπάνω και επωάζεται για 1 ώρα με το δεύτερο αντίσωμα στην κατάλληλη αραίωση και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος:

- *anti-mouse-HRP* 1:1,000 σε TBS-T
- *anti-rabbit-HRP* 1:5,000 σε blocking buffer
- *anti-goat-HRP* 1:8,000 σε blocking buffer
- *anti-rat-HRP* 1:10,000 σε blocking buffer

Στη συνέχεια η μεμβράνη εκπλένεται όπως περιγράφεται παραπάνω και επωάζεται για ένα λεπτό με το αντιδραστήριο εμφάνισης ECL. Τέλος η μεμβράνη εκτίθεται σε ακτινογραφικό φιλμ Hyperfilm ECL για χρόνο που εξαρτάται από την ένταση του σήματος της χημειοφωταύγειας. Η ποσοτικοποίηση των ζωνών έγινε με το Molecular Analyst Software (BioRad, Palo Alto, CA, USA).

Απομάκρυνση αντισωμάτων για την επανάληψη της ανοσοανίχνευσης (stripping).

Η μεμβράνη εμβαπτίζεται σε διάλυμα απομάκρυνσης (stripping buffer: Tris-HCl 62.5mM, pH:6.7, SDS 2% w/v, β-μερκαπτοαιθανόλη 100mM) και θερμαίνεται για 30 λεπτά στους 50⁰C. Ακολουθούν 2 εκπλύσεις των 10 λεπτών με TBS-T και επανάληψη της διαδικασίας ανοσοανίχνευσης όπως περιγράφεται παραπάνω.

2.4. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος.

Για τη μέτρηση της συγκέντρωσης πρωτεΐνης σε κυτταρικό εκχύλισμα που περιέχει απορρυπαντικά χρησιμοποιείται το σύστημα DC Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Palo Alto, CA, USA), το οποίο βασίζεται σε τροποποίηση της μεθόδου

Lowry et al., 1951, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Συγκεκριμένα η κατάλληλη ποσότητα από κάθε δείγμα συμπληρώνεται με απεσταγμένο νερό ώστε ο τελικός όγκος του δείγματος να είναι 200 μl. Στο κάθε δείγμα προστίθεται 100μl διαλύματος A' (A': 20 μl αντιδραστήριο S σε 1 ml αντιδραστήριο A). Αφού προστεθούν και 800 μl αντιδραστηρίου B (αντιδραστήριο folin) ακολουθεί ισχυρή ανάδευση και τα δείγματα παραμένουν σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά. Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετράται στα 750 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα, χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη η οποία δημιουργείται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας δειγμάτων γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin) τα οποία έχουν ετοιμαστεί όπως περιγράφηκε παραπάνω.

2.5. Καλλιέργεια βακτηρίων *Escherichia coli* (E. Coli)

Τα βακτήρια καλλιεργούνται στους 37⁰C υπό μορφή αιωρήματος μέσα σε δοχείο (κωνική φλάσκα ή δοκιμαστικό σωλήνα). Ο όγκος του δοχείου καλλιέργειας πρέπει να είναι τουλάχιστον τετραπλάσιος από τον όγκο της καλλιέργειας και να βρίσκεται σε συνεχή και έντονη ανάδευση ώστε να επιτυγχάνονται καλές αερόβιες συνθήκες. Το θρεπτικό υγρό καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε είναι το LB (1% w/v tryptone, 0.5% w/v yeast extract, 1% w/v NaCl, 50μg/ml αμπικιλίνη). Για την καλλιέργεια σε στερεό μέσο χρησιμοποιούνται τα τριβλία Petri με LB-άγαρ (LB-agar plates), παρουσία αμπικιλίνης 50μg/ml. Για την ανάπτυξη των βακτηριακών αποικιών, μικρή ποσότητα από καλλιέργεια περιορισμένης κλίμακας απλώνεται στο τριβλίο με τη βοήθεια γυάλινης ράβδου και κατόπιν το τριβλίο επωάζεται στους 37⁰C για 14-16 ώρες. Για τη δημιουργία αποθεμάτων γλυκερόλης (glycerol stocks) αναμιγνύονται ίσοι όγκοι βακτηριακής καλλιέργειας και γλυκερόλης. Μετά την ανάμιξη τα αποθέματα φυλάσσονται κατευθείαν στους -80⁰C

2.6. Μετασχηματισμός βακτηρίων *E. coli* HB5α (transformation).

Για το μετασχηματισμό συμβατών (competent) βακτηρίων *E. Coli* HB5α από ανασυνδιασμένο πλασμιδίο, σε σωληνάριο όγκου 15 ml αναμιγνύονται 100μl βακτηρίων με 0.5-1 μg του πλασμιδίου. Μετά από επώαση μισής ώρας στον πάγο, τα βακτήρια υφίστανται θερμικό σοκ με επώαση στους 42⁰C για 45 δευτερόλεπτα. Στη συνέχεια προστίθεται στα βακτήρια 900μl θρεπτικού μέσου SOC (tryptone 2% w/v, yeast extract 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM,

γλυκόζη 20 mM), καλλιεργούνται για 1 ώρα στους 37⁰C. Στη συνέχεια μέρος της καλλιέργειας (συνήθως 50-100μl) απλώνεται σε τριβλίο LB-άγαρ, με 50μg/ml αμπικιλίνη, για την ανάπτυξη αποικιών.

2.7. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA από βακτηριακές καλλιέργειες μεγάλης κλίμακας (large scale plasmid DNA preparation).

Η απομόνωση έγινε με χρωματογραφία σε στήλη Qiagen-tip 500 χρησιμοποιώντας το σύστημα Qiagen Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Germany) με βάση τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρείας. Συγκεκριμένα τα βακτήρια αναπτύσσονται σε καλλιέργεια των 250 ml για 14-16 ώρες. Κατόπιν συλλέγονται με φυγοκέντρηση 15 λεπτών στις 5000 rpm στους 4⁰C. Τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε 10 ml διαλύματος P1 (resuspension buffer: Tris-HCl 50 mM, pH:8.0, EDTA 10 mM, RNase 100 μg/ml), λύνονται με προσθήκη 10 ml διαλύματος P2 (lysis buffer: NaOH 0.2 M, SDS 1%w/v) και επώαση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 5 λεπτά και τέλος οι πρωτεΐνες και το χρωμοσωμικό DNA κατακρημνίζονται με προσθήκη 10 ml κρούου διαλύματος P3 (neutralization buffer: CH₃COOK 3 M, pH: 5.5) και επώαση 15-20 λεπτά στον πάγο. Με φυγοκέντρηση 30 λεπτών στις 10,000 rpm, στους 4⁰C, απομακρύνονται πρωτεΐνες, χρωμοσωμικό DNA και κυτταρικά υπολείματα. Το υπερκείμενο το οποίο περιέχει το πλασμιδιακό DNA διηθείται από υαλοβάμβακα. Παράλληλα η στήλη Qiagen-tip 500 εξισορροπείται με 10 ml διαλύματος QBT (equilibration buffer: MOPS 50 mM, pH: 7.0, NaCl 0.75 M, Triton-X-100 0.15% v/v, αιθανόλη 15% v/v). Στη συνέχεια το υπερκείμενο εφαρμόζεται στη στήλη, ακολουθεί έκπλυση της στήλης 2 φορές με 30 ml διαλύματος QC κάθε φορά (wash buffer: MOPS 50 mM, pH: 7.0, NaCl 1 M, αιθανόλη 15% v/v) και τέλος έκλουση του πλασμιδιακού DNA με 15 ml διαλύματος QF (elution buffer: Tris-HCl 10 mM, pH: 8.5, NaCl 1.25 M, αιθανόλη 15% v/v). Το DNA κατακρημνίζεται από το διάλυμα έκλουσης με προσθήκη 10.5 ml ισοπροπανόλης (0.7 του όγκου) και συλλέγεται με φυγοκέντρηση 30 λεπτών στις 10,000 rpm στους 4⁰C. Το προκύπτον ίζημα συλλέγεται με 400 μl απεσταγμένου νερού και στη συνέχεια το DNA συγκεντρώνεται με προσθήκη 2.5 όγκων απόλυτης αιθανόλης (1 ml) και φυγοκέντρηση 15 λεπτών στα 13,000xg, εκπλένεται με διάλυμα 70% αιθανόλης, ξηραίνεται υπό κενό (speed-vac), επαναδιαλύεται στην κατάλληλη ποσότητα απεσταγμένου νερού και φυλάσσεται στους -20⁰C.

2.8. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος μονόκλωνου ή δίκλωνου DNA.

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης διαλύματος DNA στηρίζεται στην ιδιότητα των βάσεων των νουκλεοτιδίων να απορροφούν στο υπεριώδες φως. Το διάλυμα DNA (πλασμίδιο ή ολιγονουκλεοτίδιο) του οποίου τη συγκέντρωση θέλουμε να προσδιορίσουμε αραιώνεται σε τελικό όγκο 1 ml και η απορρόφηση του αραιωμένου δείγματος μετράται σε φασματοφωτόμετρο (χρησιμοποιήθηκε το Lamda 15, Perkin-Elmer) σε μήκος κύματος 260 nm. Για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αρχικού διαλύματος (C) χρησιμοποιείται ο τύπος: $C = (c * A_{260} * d) / 1000$, όπου C η συγκέντρωση του αρχικού διαλύματος σε $\mu\text{g}/\text{ml}$, A_{260} η απορρόφηση που μετρήθηκε, d η αραιώση του δείγματος και c ένας συντελεστής ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα του DNA σε μg που είναι διαλυμένη σε 1000 μl και δίνει απορρόφηση 1, η τιμή του είναι 30 για μονόκλωνο και 50 για δίκλωνο DNA.

2.9. Προσδιορισμός των επιπέδων μονομερούς (G) και ολικής (T) ακτίνης.

Η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού της μονομερούς G- (Globular) και της ολικής T- (Total) ακτίνης βασίζεται στην αναστολή της ενεργότητας του ενζύμου DNase I από τη μονομερή ακτίνη (Blikstad et al., 1978). Έτσι όταν ένα κυτταρικό εκχύλισμα περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα μονομερούς ακτίνης από ένα άλλο, τότε η αναστολή της ενεργότητας της DNase I θα είναι μεγαλύτερη άρα στο διάλυμα υπάρχει λιγότερο τεμαχισμένο DNA και λιγότερες ελεύθερες βάσεις, με αποτέλεσμα η οπτική πυκνότητα του δείγματος αυτού να είναι μικρότερη και αντίστροφα. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής: τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τριβλία διαμέτρου 60 mm και επωάζονται με διάφορους παράγοντες. Τα κύτταρα πλένονται 2 φορές με PBS και στη συνέχεια λύνονται με 300 μl ρυθμιστικό διάλυμα λύσης (K_2HPO_4 10 mM, NaF 100 mM, KCl 50 mM, MgCl_2 2 mM, EGTA 1 mM, DTT 0.2 mM, Triton-X-100 0.5%, σουκρόζη 1M, το pH ρυθμίζεται σε 7.0). 10 μl του κυτταρικού εκχυλίσματος (αραιωμένο 2-3 φορές) προστίθεται ταχύτατα σε μείγμα που περιέχει 10 μl διαλύματος DNase I (DNase I 0.1 mg/ml, Tris-HCl 50 mM, CaCl_2 0.5 mM, PMSF 10 μM , pH: 7.5) και 1 ml διαλύματος DNA (DNA 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Tris-HCl 100 mM, MgSO_4 4 mM, CaCl_2 1.8 mM, pH: 7.5). Η ενεργότητα του ενζύμου καταγράφεται συνεχώς στα 260 nm (μήκος κύματος που απορροφούν οι ελεύθερες βάσεις του DNA) έως ότου η ελευθέρωση των βάσεων να είναι σταθερή στο χρόνο. Η αναστολή της ενεργότητας της DNase I του κυτταρικού δείγματος υπολογίζεται ως προς ένα

δείγμα μάρτυρα (το οποίο μετράται με τον ίδιο τρόπο σε τακτά χρονικά διαστήματα) που δεν περιέχει κυτταρικό εκχύλισμα και έτσι θεωρείται ότι η ενεργότητα του ενζύμου σε αυτό είναι 100%. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της μονομερούς ακτίνης κάθε δείγματος γίνεται με τη χρήση πρότυπης καμπύλης η οποία λαμβάνεται από τη μέτρηση δειγμάτων γνωστών ποσοτήτων ακτίνης. Οι τιμές των δειγμάτων μας βρίσκονται κάθε φορά στο τμήμα της καμπύλης από 30%-60%, όπου η σχέση συγκέντρωσης της ακτίνης και αναστολής της ενεργότητας της DNase I είναι γραμμική.

Για τον προσδιορισμό της ολικής ακτίνης δείγμα κυτταρικού εκχυλίσματος (στην αραιώση που έχει χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της μονομερούς ακτίνης) επωάζεται για 10 λεπτά με ίσο όγκο διαλύματος υδροχλωρικής γουανιδίνης (υδροχλωρική γουανιδίνη 1.5 M, CH₃COONa 1 M, CaCl₂ 1 mM, ATP 1 mM, Tris-HCl 20 mM, pH: 7.5, το διάλυμα προετοιμάζεται για κάθε πείραμα), ώστε να προκληθεί αποπολυμερισμός της πολυμερούς F- (Filamentous) ακτίνης σε μονομερή ακτίνη. Η ολική ακτίνη προσδιορίζεται όπως περιγράφεται παραπάνω, ενώ η ενδοκυττάρια ποσότητα της πολυμερούς ακτίνης υπολογίζεται από τη διαφορά μεταξύ ολικής και μονομερούς ακτίνης. Τόσο το ποσό της μονομερούς όσο και της πολυμερούς ακτίνης συσχετίζεται με το ποσό των ολικών κυτταρικών πρωτεϊνών και εκφράζεται τελικά σε μg ακτίνης / mg ολικής πρωτεΐνης. Για τις μετρήσεις στα 260 nm χρησιμοποιήθηκε φασματοφωτόμετρο Lamda 15 της Perkin Elmer.

2.10. Κλασματοποίηση πρωτεϊνών με εκχύλιση των κυττάρων με Triton-X-100: απομόνωση των διαλυτού και αδιάλυτου σε Triton-X-100 κλασμάτων.

Η απομόνωση των δύο κλασμάτων, του διαλυτού (που περιλαμβάνει τη μονομερή ακτίνη) και του αδιάλυτου (που περιλαμβάνει την πολυμερή) σε Triton-X-100 γίνεται σύμφωνα με τη μέθοδο των Golenhofen et al., 1995. Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε πλάκες 6 οπών ή σε τριβλία διαμέτρου 35 mm. Μετά τις κατάλληλες επώσεις με τους παράγοντες που μελετώνται, απομακρύνεται το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας και τα κύτταρα πλένονται 2 φορές με PBS. Ακολουθεί εκχύλιση των κυττάρων στον πάγο με 500 μl διαλύματος εκχύλισης (Triton-X-100 0.3%, Tris-HCl 5 mM, pH: 7.4, EGTA 2 mM, σουκρόζη 300 μM, φαλλοϊδίνη 2 μM, PMSF 400 μM, λευπεπτίνη 10 μM) για 5 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα εκχύλισης, το οποίο αποτελεί το διαλυτό σε Triton-X-100 πρωτεϊνικό κλάσμα (Triton soluble fraction, TS), μεταφέρεται σε καθαρό σωληνάριο όγκου 1.5 ml και οι πρωτεΐνες κατακρημνίζονται με την

προσθήκη ίσου όγκου διαλύματος υπερχλωρικού οξέως 6% (perchloric acid, PCA,). Το αδιάλυτο σε Triton-X-100 πρωτεϊνικό κλάσμα (Triton insoluble fraction, TI) το οποίο παραμένει στο τρυβλίο μετά την απομάκρυνση του διαλύματος εκχύλισης, λαμβάνεται με απόξεση με τη βοήθεια πλαστικού ξέστρου μέσα σε 1 ml διαλύματος PCA 3%. Τα ιζήματα που προκύπτουν μετά από φυγοκέντρηση σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο στις 13,000 rpm για 10 λεπτά, επαναδιαλύονται σε 100 ή 200 μl διαλύματος NaOH 0.1 N. Ίσοι όγκοι από το κάθε κλάσμα χρησιμοποιούνται για ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση.

2.11. Ανοσοφθορισμός – Παρατήρηση με μικροσκοπία συμβατική ή συνεστίασης.

2.11.1. Άμεσος ανοσοφθορισμός.

Ο άμεσος ανοσοφθορισμός εφαρμόστηκε για την παρατήρηση της πολυμερούς ακτίνης με τη χρήση ροδαμίνης-φαλλοιδίνης. Βασίζεται στην ειδική σύνδεση της φαλλοιδίνης με τα μικροινίδια της ακτίνης (Faulstich et al., 1983) με ταυτόχρονο φθορισμό της ροδαμίνης η οποία καθιστά δυνατή στη συνέχεια την παρατήρηση του δείγματος σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η διαδικασία που ακολουθείται για τους Swiss3T3 ινοβλάστες είναι η εξής:

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε καλυπτρίδες διαστάσεων 22x22 mm. Όλη η διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και όλες οι εκπλύσεις υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, τα κύτταρα εκπλένονται μία φορά με PBS (Phosphate Buffer Saline: KH_2PO_4 1.8 mM, Na_2HPO_4 8 mM, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, pH: 7.2) και μονιμοποιούνται με διάλυμα 3% π-φορμαλδεΰδης σε PBS για 30 λεπτά. Μετά από 2 πλύσεις των 3 λεπτών, οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται διαπερατές με επώαση του δείγματος με διάλυμα 0.5% Triton-X-100 σε PBS για 10 λεπτά. Μετά από 4 εκπλύσεις των 3 λεπτών με PBS / + 1.5% FBS τα κύτταρα επώάζονται με διάλυμα ροδαμίνης-φαλλοιδίνης σε αραιώση 1:100 σε PBS/1.5% FBS, για 40 λεπτά σε περιβάλλον υγρό και σκοτεινό. Στη συνέχεια τα κύτταρα εκπλένονται 3 φορές με PBS για 3 λεπτά κάθε φορά και τέλος τοποθετούνται ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες στις οποίες έχει τοποθετηθεί μία σταγόνα διαλύματος slow fade antifade reagent για να αποφευχθεί η ταχεία απώλεια του φθορισμού κατά την παρατήρηση των δειγμάτων στο μικροσκόπιο.

2.11.2. Έμμεσος ανοσοφθορισμός.

Οι βασικές αρχές της τεχνικής του έμμεσου ανοσοφθορισμού είναι παρόμοιες με αυτές του Western Blot (παράγραφος 2.3.): οι πρωτείνες αναγνωρίζονται στα κύτταρα από τα αντίστοιχα αντισώματα, τα οποία στη συνέχεια αναγνωρίζονται από τις αντίστοιχες ανοσοσφαιρίνες προσημασμένες με κάποια φθορίζουσα ουσία, όπως είναι η φλουορεσκήνη (FITC). Το σύμπλοκο πρωτεΐνη-αντίσωμα-ανοσοσφαιρίνη-φθορίζουσα μετά από έκθεση σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, εκπέμπει μέσω της φθορίζουσας ουσίας σε άλλο μήκος κύματος. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής:

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε καλυπτρίδες διαστάσεων 22x22 mm. Όλη η διαδικασία γίνεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) και όλες οι εκπλύσεις υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου, τα κύτταρα εκπλένονται μία φορά για 5 λεπτά με PBS^{+/+} (PBS, pH:7.0 – 7.2 συμπληρωμένο με ιόντα Ca⁺⁺ και Mg⁺⁺ : CaCl₂ 0.9 mM, MgCl₂ 0.5 mM) και μονιμοποιούνται με διάλυμα 3% π-φορμαλδεΰδης σε PBS^{+/+} για 30 λεπτά. Ακολουθούν 2 πλύσεις των 5 λεπτών και οι κυτταρικές μεμβράνες γίνονται διαπερατές με επώαση του δείγματος με διάλυμα 0.5% Triton-X-100 σε PBS^{+/+} για 10 λεπτά. Μετά από 2 εκπλύσεις των 5 λεπτών με PBS^{+/+} τα κύτταρα επωάζονται με διάλυμα PBS^{+/+} / 5% FBS / 0.1 M γλυκίνη για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια για 14-16 ώρες στους 4⁰C. Την επόμενη μέρα τα κύτταρα εκπλένονται 2 φορές από 5 λεπτά με PBS^{+/+} / 5% FBS και στη συνέχεια επωάζονται με το κατάλληλο πρώτο αντίσωμα σε αραιώση 1:100 (εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά) σε PBS^{+/+} / 5% FBS για 2 ώρες. Τα κύτταρα εκπλένονται και πάλι 4 φορές από 5 λεπτά με PBS^{+/+} / 5% FBS και στη συνέχεια επωάζονται με το κατάλληλο αντίσωμα κατά ανοσοσφαιρινών σημασμένο με φθορίζουσα ουσία, σε αραιώση 1:100 σε PBS^{+/+} / 5% FBS για 1 ώρα. Στην περίπτωση που είναι επιθυμητή η παρατήρηση και των μικροϊνιδίων της ακτίνης στο ίδιο δείγμα ακολουθεί έκπλυση των κυττάρων 4 φορές για 5 λεπτά κάθε φορά με PBS^{+/+} / 5% FBS και χρώση με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη όπως αναφέρεται παραπάνω στον άμεσο ανοσοφθορισμό. Τέλος τα κύτταρα εκπλένονται 4 φορές από 5 λεπτά κάθε φορά με PBS^{+/+} και τοποθετούνται ανάστροφα σε αντικειμενοφόρες πλάκες στις οποίες έχει τοποθετηθεί μία σταγόνα διαλύματος slow fade antifade reagent.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα πειράματα ανοσοφθορισμού περιγράφονται παρακάτω όπως και οι αραιώσεις στις οποίες χρησιμοποιήθηκαν: η

ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη, το αντίσωμα κατά του επιτόπου flag (anti-flag-M5) και τα αντισώματα κατά των πρωτεϊνών RhoA, RhoB και LIMK2 χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:100. Το αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης LIMK1 χρησιμοποιήθηκε σε αραίωση 1:150. Σαν δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν η IgG κατά αντιορού ποντικού, ή κουνελιού, ή αρουραίου σημασμένες με φλουορεσκίνη (FITC-conjugated anti-mouse IgG, FITC-conjugated anti-rabbit IgG και FITC-conjugated anti-rat IgG αντίστοιχα) ή IgG κατά αντιορού κουνελιού σημασμένη με τη χρωμοφόρο ουσία Alexa-Fluor-488. Όλα τα δεύτερα αντισώματα χρησιμοποιήθηκαν σε αραίωση 1:100. Τα παρασκευάσματα παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο Olympus BH- 2 εφοδιασμένο με συσκευή παραγωγής υπεριώδους ακτινοβολίας κατάλληλου μήκους κύματος και φωτογραφήθηκαν με ελαιοκαταδυτικό φακό 40X και με φωτογραφική μηχανή 35 mm Olympus (c-35 AD-4) σε ασπρόμαυρο φιλμ KODAK P3200 ή σε slides Fujichrome P400. Εναλλακτικά, τα δείγματα παρατηρήθηκαν σε ανάστροφο μικροσκόπιο Zeiss IM35 (Zeiss, Oberkochen, Germany) εφοδιασμένο με confocal laser scanning module (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany). Για την απόκτηση των εικόνων συνεστίασης χρησιμοποιήθηκε ελαιοκαταδυτικός φακός 63/1.25 και το λογισμικό CLSM (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany). Η επεξεργασία των δεδομένων – ρύθμιση φωτεινότητας και κοντράστ – έγινε με το λογισμικό Photoshop 6.0 για Windows XP.

2.12. Απομόνωση κυτταρικών εκχυλισμάτων ολικών κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 35 mm ή 60 mm ή 100 mm. Μετά την απομάκρυνση του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας και την εκπλυση των κυττάρων 2 φορές με PBS, ακολουθεί απόξεση των κυττάρων μέσα σε 100 μl ή 300 μl ή 1000 μl (αντίστοιχα και ανάλογα με το μέγεθος του τρυβλίου που χρησιμοποιήθηκε) διαλύματος λύσης (Tris-HCl 50 mM, pH: 7.5, Triton-X-100 1%, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, 10% γλυκερίνη, aprotinin/leupeptin 10μg/ml, PMSF 1mM). Το κυτταρικό εκχύλισμα αναδεύεται για περίπου 30 λεπτά στους 4⁰C, για να επιτευχθεί η καλύτερη λύση των πλασματικών μεμβρανών, και στη συνέχεια φυγοκεντρείται σε επιτραπέζια μικροφυγόκεντρο για 5 λεπτά στις 13,000 rpm στους 4⁰C. Στο υπερκείμενο, το οποίο περιέχει τις ολικές κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες, αφού γίνει ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.4.,

χρησιμοποιείται άμεσα για την προετοιμασία των δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και Western Blot ή φυλάσσεται στους -80°C για μετέπειτα χρήση.

2.13. Προσδιορισμός της ενεργοποίησης των μικρών Rho GTPασών RhoA και RhoB.

Η μέθοδος προσδιορισμού των επιπέδων της ενεργής RhoA ή RhoB σε κυτταρικά εκχυλίσματα βασίζεται στο γεγονός ότι οι πρωτεΐνες που αλληλεπιδρούν με τις ενεργοποιημένες Rho GTPάσες (Rho effectors) αναγνωρίζουν την πρωτεΐνη μόνο όταν αυτή είναι συνδεδεμένη με GTP (Guanine Tri-Phosphate: τριφωσφορική γουανίνη). Επιπλέον, η δέσμευση της Rho με το ολιγοπεπτίδιο που αντιστοιχεί στην περιοχή δέσμευσης της Rho της πρωτεΐνης Rhotekin, RBD (Rho Binding Domain), παρεμποδίζει την ενδογενή και την επαγόμενη από τις πρωτεΐνες GAP (GTPase Activating Protein) δράση της ως GTPάση (Ren et al., 1999, Reid et al., 1996). Έτσι η περιοχή RBD της πρωτεΐνης Rhotekin χρησιμοποιείται για κατακρήμνιση συγγένειας της ενεργής Rho-GTP.

2.13.1 Παρασκευή και απομόνωση GST-RBD σε σφαιρίδια γλουταθειόνης.

Συμβατά βακτήρια (competent) E. coli DH5α μετασχηματίζονται με το πλασμίδιο PGEX-2T-TRBD. Μικρή καλλιέργεια 200 ml LB + αμπικιλίνη (50μg/ml) εμβολιάζεται από στοκ γλυκερόλης και επωάζεται στους 37°C για 14-16 ώρες υπό συνεχή ανάδευση. Την επόμενη μέρα, η καλλιέργεια αραιώνεται (1:10) με LB + αμπικιλίνη σε τελικό όγκο 2 λίτρα. Τα βακτήρια αφήνονται να μεγαλώσουν έως ότου η οπτική πυκνότητα της καλλιέργειας στα 600 nm να φτάσει περίπου την τιμή 0.8 ($\text{OD}_{600} = 0.8$). Τότε επάγεται η έκφραση του πεπτιδίου με την προσθήκη στο μέσο καλλιέργειας 0.5 mM IPTG. Τα βακτήρια επωάζονται για 2 ακόμα ώρες στους 37°C υπό συνεχή ανάδευση. Συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 4,500 rpm για 15 λεπτά, επαναιωρούνται σε 20 ml διαλύματος λύσης (Tris-HCl 50 mM, pH: 7.5, Triton-X-100 1%, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1mM, aprotinin/leupeptin 10μg/ml, PMSF 1mM) και τα συσσωματώματα των βακτηρίων διαλύονται με τη βοήθεια πλαστικής πιπέτας όγκου 10 ml. Τα βακτήρια λύνονται με τη χρήση υπερήχων για 6-8 φορές από 15 δευτερόλεπτα κάθε φορά στους 4°C (το αιώρημα των βακτηρίων αφήνεται να κρυώσει στον πάγο για 1-2 λεπτά ενδιάμεσα της εφαρμογής των υπερήχων) και στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται στις 14,000 rpm για 30 λεπτά στους 4°C για την απομάκρυνση των αδιάλυτων κυτταρικών υπολοίπων από το

βακτηριακό εκχύλισμα. Στο υπερκείμενο προστίθενται 0.6 ml σφαιριδίων γλουταθειόνης (GST- sepharose beads) 50% v/v και αναδεύονται για 60 λεπτά στους 4⁰C για να προσδεθεί πάνω στα σφαιρίδια της γλουταθειόνης το πεπτίδιο GST-RBD. Τα σφαιρίδια συλλέγονται με φυγοκέντρηση στις 2000 rpm για 1 λεπτό στους 4⁰C και εκπλένονται 6 φορές με 6 ml διαλύματος έκπλυσης (wash buffer: Tris-HCl 50 mM, pH: 7.5, Triton-X-100 0.5%, NaCl 150 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1mM, aprotinin/leupeptin 10μg/ml, PMSF 0.1mM) και μία έβδομη φορά με διάλυμα έκπλυσης συμπληρωμένο με 10% v/v γλυκερόλη. Μετά την τελευταία έκπλυση τα σφαιρίδια GST-RBD επαναιωρούνται σε 4 ml διαλύματος έκπλυσης συμπληρωμένο με 10% γλυκερόλη και φυλάσσονται στους - 80⁰C σε μερίδια (aliquots) των 250 μl. Η εκτίμηση της καθαρότητας και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που απομονώθηκε γίνεται με ηλεκτροφόρηση δείγματος της πρωτεΐνης σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% σε συνθήκες αποδιάταξης μαζί με δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων πρωτεΐνης BSA.

2.13.2 Κατακρήμνιση της ενεργής Rho-GTP πρωτεΐνης από κυτταρικό εκχύλισμα με σφαιρίδια GST-RBD.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τριβλία διαμέτρου 100 mm. Αφού εκπλυθούν 2 φορές με παγωμένο διάλυμα TBS (Tris-HCl 50mM, pH:7.6NaCl 137 mM), λύνονται με 1000 μl διαλύματος λύσης (lysis buffer: Tris-HCl 50 mM, pH: 7.2, Triton-X-100 1% v/v, sodium deoxycholate 0.5% w/v, SDS 0,1% w/v, NaCl 500 mM, MgCl₂ 10 mM, aprotinin/leupeptin 10μg/ml, PMSF 1 mM) και παραλαμβάνονται με απόξεση. Το κυτταρικό εκχύλισμα φυγοκεντρείται στις 14,000 rpm για 10 λεπτά στους 4⁰C και ίσοι όγκοι από κάθε δείγμα επωάζονται με 20-30μg σφαιριδίων GST-RBD για 45 λεπτά στους 4⁰C. Τα σφαιρίδια εκπλένονται 4 φορές με κρύο διάλυμα έκπλυσης (wash buffer: Tris-HCl 50 mM, pH: 7.2, Triton-X-100 1% v/v, NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, aprotinin/leupeptin 10μg/ml, PMSF 0.1 mM). Μετά την τελευταία πλύση, αφαιρείται κατά το δυνατό το υπερκείμενο διάλυμα, προστίθεται ίσος όγκος αποδιατακτικού διαλύματος (sample buffer) 2X και ακολούθως τα δείγματα θερμαίνονται στους 95⁰C για 5 λεπτά. Παράλληλα ετοιμάζεται ίσος όγκος ολικών πρωτεϊνών από το κάθε δείγμα όπου προστίθεται κατάλληλος όγκος αποδιατακτικού διαλύματος 4X και θερμαίνονται στους 95⁰C για 5 λεπτά. Ακολουθεί ηλεκτροφόρηση και Western Blot, προσδιορισμός της έντασης των ζωνών και

κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων με τις τιμές που προκύπτουν από τις ζώνες ολικών πρωτεϊνών

2.14. Παροδική επιμόλυνση κυττάρων με πλασμιδιακό DNA.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών σε συγκέντρωση 5 - 10*10⁴ κύτταρα/οπή, και για 14-16 ώρες πριν την επιμόλυνση, σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς αντιβιοτικό. Η επιμόλυνση των κυττάρων γίνεται με τη χρήση του εμπορικού αντιδραστηρίου Lipofectamine Reagent (Invitrogen life technologies) με τη βοήθεια του θρεπτικού μέσου Opti-MEM (Invitrogen). Σε αποστειρωμένο σωληνάριο αναμιγνύονται 2 µg DNA ανά οπή με 100 µl Opti-MEM. Σε ένα δεύτερο σωληνάριο αναμιγνύονται 100 µl Opti-MEM με 7,5 µl Lipofectamine Reagent. Τα περιεχόμενα των δύο σωληναρίων αναμειγνύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Στο μείγμα προστίθενται 800 µl Opti-MEM και μετά από ελαφρά ανάδευση προστίθεται στα κύτταρα με την βοήθεια της πιπέτας, αφού προηγουμένως αυτά έχουν εκπλυθεί με 2 ml Opti-MEM. Τα κύτταρα επωάζονται για 6 ώρες στους 37⁰C και στη συνέχεια προστίθεται 1 ml θρεπτικού μέσου καλλιέργειας συμπληρωμένο με 20% FBS χωρίς αντιβιοτικά, έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση του ορού να είναι 10%. Την επόμενη μέρα γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με DMEM χωρίς FBS και αντιβιοτικά και τα κύτταρα καλλιεργούνται για άλλες 24 ώρες. Την επόμενη μέρα ενεργοποιούνται με τον παράγοντα TGF-β1 για τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος.

2.15. Γονιδιακή αποσιώπηση της πρωτεΐνης LIMK2 με τη χρήση μικρών κατασταλτικών RNA (siRNAs).

Η γονιδιακή αποσιώπηση της πρωτεΐνης LIMK2 έγινε με τη χρήση μικρών κατασταλτικών RNA (siRNAs). Το ολιγονουκλεοτίδιο, το οποίο σχεδιάστηκε βάση του mRNA της LIMK2 του ποντικού, είναι το: 5'- ACGCACCTTACGCAAGAGT-3' (sense strand) που ανταποκρίνεται στις βάσεις 1475-1493 (αριθμός πρόσβασης AB008117), θεωρώντας σαν 1 τη βάση A του κωδικονίου έναρξης ATG και δεν έχει ομοιότητα με καμμία αλληλουχία του cDNA της ανθρώπινης LIMK2. siRNA έναντι της λουσιφεράσης (siRNA luciferase reporter vector pGL2, αριθμός πρόσβασης X65324) χρησιμοποιήθηκε σαν ολιγονουκλεοτίδιο ελέγχου. Τα siRNAs παρασκευάστηκαν από την Dharmacon Research Inc. Τα ολιγονουκλεοτίδια

εισήχθησαν στα κύτταρα με τη μέθοδο της παροδικής επιμόλυνσης με τη βοήθεια του αντιδραστηρίου Lipofectamine reagent (παράγραφος 2.14.), αφού προηγήθηκαν πειράματα βελτιστοποίησης των συνθηκών για την αποτελεσματικότερη γονιδιακή αποσιώπηση. Συγκεκριμένα, Swiss3T3 ινοβλάστες καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών, σε συγκέντρωση $5-10 \cdot 10^4$ κύτταρα / οπή, και ακολούθως ακολουθείται το πρωτόκολο παροδικής επιμόλυνσης όπου χρησιμοποιούνται X μg siRNA και Y μl lipofectamine reagent. Μετά από 48 ώρες ακολουθούν τα πειράματα ανοσοφθορισμού ή συλλέγονται τα κυτταρικά εκχυλίσματα για την προετοιμασία δειγμάτων για ηλεκτροφόρηση και ανοσοαποτύπωση ή ανοσοκατακρήμνιση.

2.16. Αναπαραγωγή ανασυνδυσμένων αδενοϊών και επιμόλυνση των κυττάρων.

Για την αναπαραγωγή των ανασυνδυσμένων αδενοϊών χρησιμοποιήθηκε η ανθρώπινη κυτταρική σειρά 293 (packaging line) η οποία επιτρέπει τον πολλαπλασιασμό των παραγόμενων αδενοϊών προμηθεύοντας τους με τα προϊόντα των γονιδίων που τους λείπουν E1 και E3.

Τα κύτταρα 293 καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm, σε συγκέντρωση $1 \cdot 10^6$ κύτταρα / τρυβλίο. 1.5-2 ώρες πριν την ιϊκή επιμόλυνση, γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με DMEM/ 3% FBS/ 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Στα κύτταρα προστίθενται 5-10 μl στοκ αδενοϊού και επωάζονται στους 37°C έως ότου αποκολληθούν όλα από τον πυθμένα του τρυβλίου. Τότε συλλέγεται το υπερκείμενο της κυτταρικής καλλιέργειας και τα κύτταρα λύνονται με 5 διαδοχικές ψύξεις / αποψύξεις (freeze & thaws). Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5,000 rpm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 15 λεπτά, για την απομάκρυνση των κυτταρικών υπολειμάτων. Το εναπομείναν υπερκείμενο περιέχει τον ανασυνδυσμένο αδενοϊό και αφού χωριστεί σε μερίδια (aliquots) φυλάσσεται στους -80°C .

Για την ιϊκή επιμόλυνση των κυττάρων Swiss3T3 τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία 6 οπών ή σε τρυβλία 100 mm, ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος. 1.5-2 ώρες πριν την ιϊκή επιμόλυνση, γίνεται αλλαγή του θρεπτικού μέσου καλλιέργειας με DMEM/ 3% FBS/ 1% πενικιλίνη/στρεπτομυκίνη. Χρησιμοποιήθηκε πολλαπλότητα επιμόλυνσης (multiplicity of infection) τέτοια ώστε να επιτευχθεί ο μέγιστος βαθμός επιμόλυνσης των κυττάρων και έκφρασης των πρωτεϊνών χωρίς εμφανή κυτταροπαθολογικά αποτελέσματα.

2.17. Ανοσοκατακρήμνιση και δοκιμή κινάσης (in vitro kinase assay) για τις πρωτεΐνες LIMK1 και LIMK2.

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 100 mm σε συγκέντρωση 500,000 κύτταρα ανά τρυβλίο, ενώ για κάθε δείγμα χρησιμοποιούνται κύτταρα από δύο τρυβλία. Τα κύτταρα προ-επωάζονται με ή χωρίς τον αναστολέα Y27632 για 45 λεπτά σε συγκέντρωση 10 μ M και στη συνέχεια επωάζονται με τον παράγοντα TGF- β 1, σε συγκέντρωση 5 ng/ml για τους χρόνους που αναφέρονται σε κάθε πείραμα. Τα κύτταρα αφού εκπλυθούν δύο φορές με κρύο TBS, λύνονται με 750 μ l διαλύματος λύσης ανά τρυβλίο (διάλυμα λύσης για την LIMK2: Tris-HCl 50 mM, pH: 7.5, Triton-X-100 1%, NaCl 500 mM, NaF 10 mM, γλυκερόλη 10%, β -glycerophosphate 25 mM, Na_3VO_4 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinin 2 μ g/ml, leupeptin 2 μ g/ml, διάλυμα λύσης για την LIMK1: Tris-HCl 50 mM, pH: 7.5, Nonidet-P-40 1%, NaCl 150 mM, NaF 10 mM, γλυκερόλη 10%, Na_3VO_4 1 mM, PMSF 1 mM, aprotinin 2 μ g/ml, leupeptin 2 μ g/ml), μεταφέρονται μετά από απόξεση σε σωληνάρια όγκου 1.5 ml και επωάζονται στον πάγο για 30 λεπτά. Στη συνέχεια φυγοκεντρώνονται για 10 λεπτά στις 14,000 rpm στους 4⁰C και το υπερκείμενο προ-επεξεργάζεται με σφαιρίδια αγαρόζης προσδεδεμένα με πρωτεΐνη-G (G-protein agarose beads) για 1 ώρα στους 4⁰C. Τα σφαιρίδια της αγαρόζης απομακρύνονται με σύντομη φυγοκέντρηση (spin down) και τα υπερκείμενα των δειγμάτων (ίση ποσότητα πρωτεΐνης για κάθε ένα) υποβάλλονται σε ανοσοκατακρήμνιση. Αρχικά επωάζονται με αντίσωμα έναντι της LIMK2 ή της LIMK1 (2 μ g αντισώματος ανά δείγμα) για 2 ώρες στους 4⁰C με συνεχή περιστροφή, και στη συνέχεια προστίθεται G-protein agarose beads (20 μ l ανά δείγμα) για ακόμη 2 ώρες στους 4⁰C με συνεχή περιστροφή. Η πρωτεΐνη LIMK2 ή LIMK1 που έχει ανοσοκατακρημνιστεί αφού εκπλυθεί 3 φορές με διάλυμα κινάσης (διάλυμα κινάσης για LIMK2: HEPES/NaOH 50 mM, pH:7.5, β -glycerophosphate 25 mM, MgCl_2 5mM, MnCl_2 5 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM, διάλυμα κινάσης για LIMK1: HEPES/NaOH 50 mM, pH:7.5, MgCl_2 5mM, MnCl_2 2 mM, NaF 10 mM, Na_3VO_4 1 mM), επωάζεται για 30 λεπτά στους 30⁰C σε 20 μ l διαλύματος κινάσης που περιέχει 15 μ M κρύο ATP και 5 μ Ci γ -ραδιενεργό ATP [γ -³²P]ATP. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες αναλύονται με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου 11%, μεταφορά των πρωτεϊνών σε νιτροκυτταρίνη και αυτοραδιογραφία, ενώ η ταυτοποίηση τους γίνεται μετά με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα αντισώματα.

2.18. Μέθοδος κανονικοποίησης β-gal και μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης (luciferase assay).

Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο της έκφρασης και λειτουργίας των Smad πρωτεϊνών που εισήχθησαν στα κύτταρα με τη βοήθεια ανασυνδιασμένων αδενοϊών.

Η μέθοδος κανονικοποίησης β-gal χρησιμοποιείται για την κανονικοποίηση της απόδοσης της επιμόλυνσης των κυττάρων, καθώς και για την εξάλειψη του σφάλματος λόγω του διαφορετικού αριθμού κυττάρων για κάθε τρυβλίο, σε πειράματα μέτρησης της αντίδρασης της λουσιφεράσης. Για το σκοπό αυτό τα κύτταρα επιμολύνθηκαν εκτός από τους αδενοϊούς που εκφράζουν τις πρωτεΐνες Smad και με αδενοϊό-φορέα του γονιδίου της β-γαλακτοσιδάσης (β-gal). Σε 20 μl κυτταρικού εκχυλίσματος προστίθενται 456 μl διαλύματος Na_3PO_4 (0.1 M pH:7.3), 132 μl ONPG (8mg/ml σε 0.1 M Na_3PO_4), και 6 μl 100X διαλύματος αλάτων (KCl 3M, MgCl_2 1M, β-μερκαπτοαιθανόλη, H_2O σε τελικό όγκο 1ml). Τα δείγματα επωάζονται σε υδατόλουτρο στους 37°C μέχρι να κιτρινίσουν. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 200μl διαλύματος Na_2CO_3 1M που προκαλεί μεταβολή του pH. Η μέτρηση της οπτικής πυκνότητας (OD) των δειγμάτων γίνεται σε φωτόμετρο (Lamda 15, Perkin-Elmer) στα 410 nm. Η μεγαλύτερη τιμή που λαμβάνεται ανά πείραμα διαιρείται με τις υπόλοιπες, οπότε προκύπτει για κάθε τρυβλίο ο παράγοντας κανονικοποίησης ο οποίος αντιστοιχεί στην ποσότητα δείγματος που θα χρησιμοποιηθεί στη μέτρηση της αντίδρασης της λουσιφεράσης.

Η μέθοδος αντίδρασης της λουσιφεράσης χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μεταγραφικής ενεργοποίησης από τον υποκινητή του πλασμιδίου αναφοράς, ως αποτέλεσμα της επιμόλυνσης με πλασμίδια έκφρασης. Η εκτίμηση αυτή γίνεται με χρήση ενζυμικής αντίδρασης, όπου μετράται η δραστηριότητα του ενζύμου της λουσιφεράσης, που προέρχεται από την πυγολαμπίδα (fire fly), και συγκεκριμένα στα κύτταρα που επιμολύνθηκαν, καθώς είναι σε συζευξη με τον υποκινητή (CAGA₉-MLP-Luciferase). Για κάθε αντίδραση χρησιμοποιείται ποσότητα κυτταρικού εκχυλίσματος που αντιστοιχεί στον παράγοντα κανονικοποίησης, και 100 μl υποστρώματος λουσιφεράσης. Η τιμή της μεταγραφικής ενεργοποίησης κάθε δείγματος δίνεται από το λουμινόμετρο.

2.19. Δοκιμασία τραυματισμού μονοστοιβάδας (wounding assay).

Τα κύτταρα καλλιεργούνται σε τρυβλία διαμέτρου 60 mm μέχρις ότου να καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Στη συνέχεια δημιουργείται μια εγκάρσια τομή (πληγή) στο τρυβλίο με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης αιχμηρής ακίδας, και η επούλωση της πληγής παρακολουθείται στη διάρκεια του χρόνου. Η παρακολούθηση γίνεται σε μικροσκόπιο LEICA DM IRBE και φωτογραφίζεται με κάμερα Visitron System RMBH. Για τον προσδιορισμό της διαμέτρου της τομής, φωτογραφήθηκε με τον ίδιο φακό πρότυπη κλίμακα 1 mm. Για κάθε χρονική στιγμή, τραβήχτηκαν πέντε φωτογραφίες από κάθε δείγμα και σε κάθε φωτογραφία μετρήθηκε η διάμετρος της πληγής σε πέντε σημεία. Τα αποτελέσματα επεξεργάστηκαν στατιστικά με τη βοήθεια του προγράμματος Microsoft Excel για τα Windows XP.

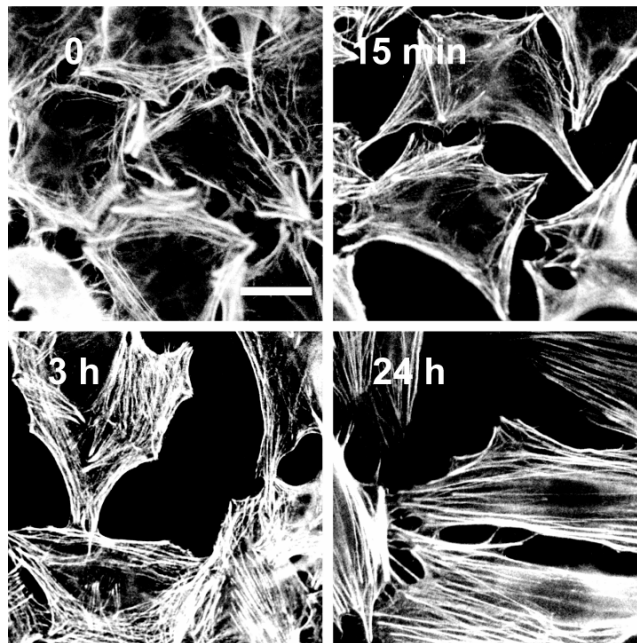
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Ο Μετασηματίζων Αυξητικός Παράγοντας-β (Transforming Growth Factor-β, TGF-β) οδηγεί σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε ινοβλάστες.

3.1.1. Μορφολογική ανάλυση της επίδρασης του παράγοντα TGF-β στον κυτταροσκελετό της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες – Αποτελέσματα άμεσου ανοσοφθορισμού.

Η επίδραση του παράγοντα TGF-β1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες, αναλύθηκε με μικροσκοπία άμεσου φθορισμού και τη χρήση ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού (FBS) για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με τον παράγοντα TGF-β1, σε συγκέντρωση 5ng/ml για 15 λεπτά, 3 και 24 ώρες (εικόνα 3.1.1).

Swiss3T3



Εικόνα 3.1.1.: Ο παράγοντας TGF-β1 επάγει άμεσα έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς ορό (FBS) και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TGF-β1 για 15 λεπτά, 3 και 24 ώρες αντίστοιχα. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η γραμμή αντιπροσωπεύει 10 μm.

Τα κύτταρα ελέγχου παρουσίασαν τυπική μορφολογία με την πολυμερισμένη ακτίνη να περιορίζεται στην περιφέρεια, ενώ στο κύριο σώμα του κυττάρου απουσιάζουν τα ινίδια του στρες. Επίδραση με τον παράγοντα TGF-β1 είχε σαν αποτέλεσμα την αλλαγή στην μορφολογία των κυττάρων, τα οποία εμφανίστηκαν πιο επίπεδα και πλατιά, ενώ παρατηρήθηκε και έντονη μεταβολή στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης (εικόνα 3.1.1). Η παρουσία νέων μικροινιδίων ακτίνης ήταν εμφανής στα κύτταρα από τα πρώτα 15 λεπτά επίδρασης με τον παράγοντα και έγινε πιο έντονη με την πάροδο του χρόνου, καθώς τα μικροινίδια εμφανίστηκαν πιο έντονα και αυξήθηκαν σε αριθμό και σε έκταση. Μετά από 24 ώρες η μεταβολή στο σχήμα των κυττάρων ήταν δραματική. Εμφανίστηκαν επιμήκη, με παράλληλη κατανομή των μικροινιδίων της ακτίνης, χαρακτηριστικό της εμφάνισης των ινιδίων του στρες.

3.1.2. Ποσοτική ανάλυση της μεταβολής του λόγου μονομερούς (G) προς ολική ακτίνη από τον TGF-β στους Swiss3T3 ινοβλάστες.

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι μορφολογικές παρατηρήσεις από τα πειράματα ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του λόγου μονομερούς προς ολική ακτίνη με τη δοκιμή ενεργότητας του ενζύμου DNase I. Τα κύτταρα, μετά από στέρηση ορού για 24 ώρες ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 15 και 30 λεπτά, 1, 3 και 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του λόγου μονομερούς προς ολική ακτίνη. Τα αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 3.1, έδειξαν μια σταδιακή μείωση του λόγου G/ολική ακτίνη, η οποία ανταποκρίνεται στην ελάτωση της παρουσίας της μονομερούς με παράλληλη αύξηση της πολυμερισμένης ακτίνης στα κύτταρα. Η σχετική μείωση του λόγου έφτασε μέχρι τις 1,47 φορές και αντικατοπτρίζει την μετατόπιση της δυναμικής ισοροπίας του λόγου G/ολική ακτίνη προς την πολυμερή μορφή.

Πίνακας 3.1.: Προσδιορισμός του λόγου μονομερούς G / ολική ακτίνη Swiss3T3 ινοβλαστών μετά από επίδραση με τον παράγοντα TGF-β1 με τη μέθοδο αναστολής της Dnase I.

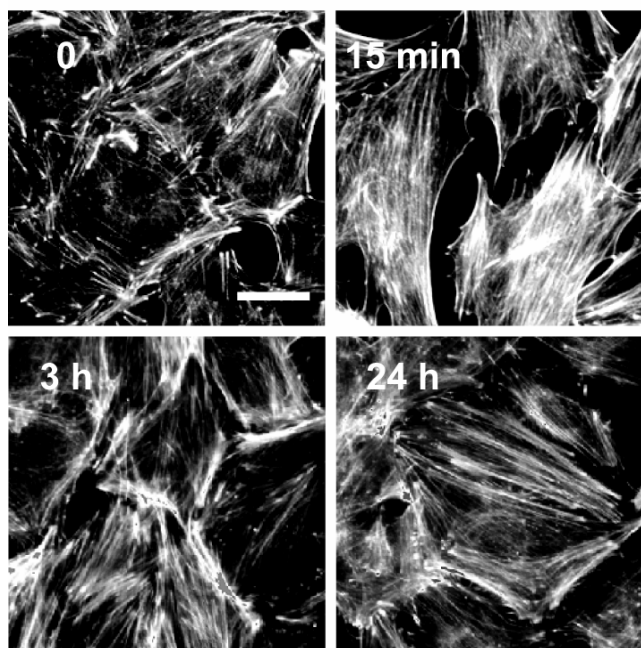
Χρόνος επώασης	μg ακτίνης / mg ολικών κυτ/κών πρωτεϊνών		G/Ολική ακτίνη	Σχετική μείωση
	Μονομερής ακτίνη	Ολική ακτίνη		
0	14,94 ± 1,6	33,63 ± 4,9	0,44 ± 0,017	-
15 λεπτά	16,88 ± 1,3	42,14 ± 4,3	0,40 ± 0,019	1,10
30 λεπτά	17,50 ± 3,8	46,76 ± 8,9	0,37 ± 0,011	1,19
1 ώρα	17,60 ± 2,9	50,23 ± 9,7	0,35 ± 0,010	1,26
3 ώρες	15,24 ± 0,7	46,87 ± 5,5	0,33 ± 0,023	1,33
24 ώρες	19,62 ± 0,1	64,33 ± 0,6	0,30 ± 0,002	1,47

Σε κυτταρικά εκχυλίσματα κυττάρων ελέγχου ή κυττάρων που έχουν επωαστεί με τον παράγοντα TGF-β1 (για τις ενδεικνυόμενες χρονικές στιγμές) Swiss3T3 ινοβλαστών, προσδιορίστηκε ποσοτικά η μονομερής (G-) και η ολική ακτίνη με τη βοήθεια της δοκιμής αναστολής της DNase I. Η ποσότητα της ακτίνης εκφράζεται σε μg ακτίνης ανά mg ολικής πρωτεΐνης για κάθε δείγμα (μέσες τιμές ± s.e.m.). Στην τελευταία στήλη αναγράφεται η σχετική μείωση του λόγου G/ολική ακτίνη ανάμεσα στα κύτταρα ελέγχου και τα κύτταρα που έχουν επωαστεί με TGF-β1. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από δύο ανεξάρτητα πειράματα.

3.1.3. Μορφολογική ανάλυση της επίδρασης του παράγοντα TGF-β στον κυτταροσκελετό της ακτίνης και σε ινοβλάστες εμβρύου ποντικού (Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs) – Αποτελέσματα άμεσου ανοσοφθορισμού.

Με σκοπό να διερευνηθεί αν η επίδραση του παράγοντα TGF-β στους Swiss3T3 ινοβλάστες είναι εξειδικευμένη για αυτά τα κύτταρα ή αν επεκτείνεται και σε άλλα κυτταρικά συστήματα ινοβλαστών, τα πειράματα άμεσου ανοσοφθορισμού επαναλήφθησαν, χρησιμοποιώντας αυτή τη φορά σαν κυτταρικό σύστημα τους αθανатоποιημένους ινοβλάστες εμβρύου ποντικού, MEFs. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια με αυτά των Swiss3T3 ινοβλαστών (εικόνα 3.1.3), αφού και σε αυτό το κυτταρικό σύστημα η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης ήταν άμεση ήδη από τα πρώτα 15 λεπτά επίδρασης με τον TGF-β1. Η μόνη διαφορά που παρατηρήθηκε μεταξύ των Swiss3T3 ινοβλαστών και των MEFs, είναι ότι στη δεύτερη περίπτωση η απόκριση του κυτταροσκελετού στον παράγοντα στα 15 λεπτά ήταν πιο έντονη και εμφανής (εικόνα 3.1.3.).

MEFs



Εικόνα 3.1.3.: Ο παράγοντας TGF-β1 επάγει άμεσα έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και σε Mouse Embryonic Fibroblasts, MEFs. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν για 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας χωρίς ορό (FBS) και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TGF-β1 για 15 λεπτά, 3 και 24 ώρες αντίστοιχα. Στη συνέχεια μονιμοποιήθηκαν, σημάνθηκαν με ροδαμίνη-φαλλοιδίνη και παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο φθορισμού. Η γραμμή αντιπροσωπεύει 10 μm.

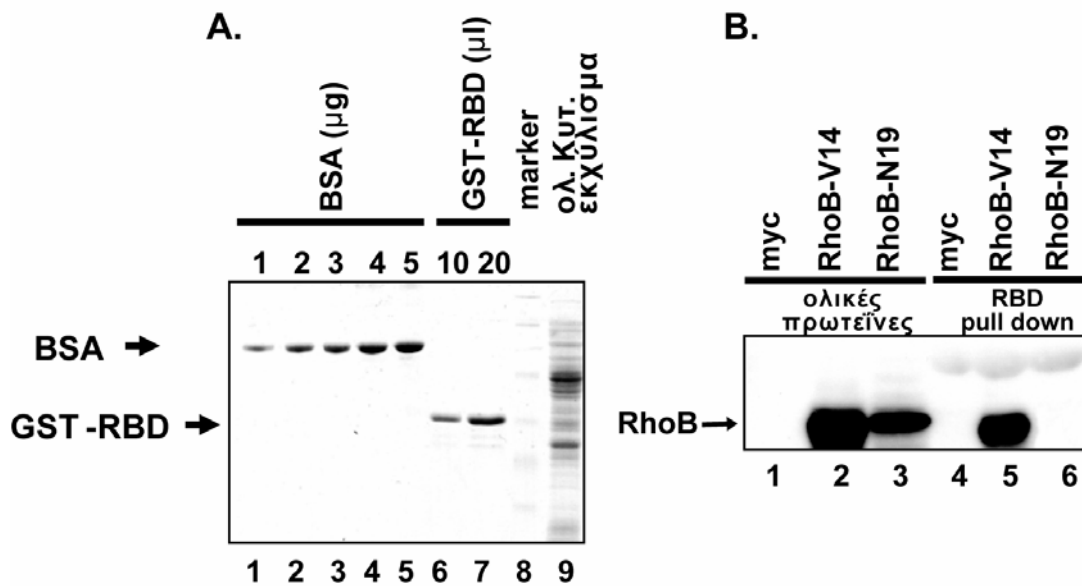
3.2. Οι μικρές Rho GTPases RhoA και RhoB ενεργοποιούνται από τον TGF-β και μεσολαβούν για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον παράγοντα.

3.2.1. Απομόνωση και καθαρισμός του πεπτιδίου GST-RBD σε σφαιρίδια γλουταθειόνης, για τον προσδιορισμό των ενεργών RhoA και RhoB σε κυτταρικά εκχυλίσματα.

Με σκοπό να προσδιοριστούν τα επίπεδα των ενεργών RhoA και RhoB, όταν δηλαδή οι πρωτεΐνες είναι προσδεμένες με GTP, απομονώθηκε και καθαρίστηκε το πεπτίδιο RBD (Rho Binding Domain) της πρωτεΐνης rhotekin, συνδεδεμένο με την πρωτεΐνη GST, και το σύνολο GST-RBD συνδέθηκε με σφαιρίδια γλουταθειόνης. Τα σφαιρίδια αυτά χρησιμοποιήθηκαν στη συνέχεια για κατακρήμιση συγγένειας των RhoA-GTP και RhoB-GTP από το κυτταρικό εκχύλισμα.

Τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-GST-RBD απομονώθηκαν από βακτήρια *E. coli* DH5α, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.13.1 του κεφαλαίου υλικά και μέθοδοι. Η εκτίμηση της καθαρότητας και ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης που απομονώθηκε κάθε φορά, έγινε με ηλεκτροφόρηση δείγματος της πρωτεΐνης σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% σε συνθήκες αποδιάταξης, μαζί με δείγματα γνωστών συγκεντρώσεων (1, 2, 3, 4, 5 μg) BSA. Στην εικόνα 3.2.1.A παρουσιάζεται ενδεικτικά ένα πήκτωμα ακρυλαμιδίου μετά από χρώση με Coomassie Blue. Η συγκέντρωση της πρωτεΐνης που απομονώθηκε κάθε φορά, όπως φαίνεται και στην εικόνα 3.2.1.A, ήταν μεταξύ 0,2 – 0,4 mg/ml.

Στη συνέχεια και με σκοπό να διερευνηθεί εάν τα σφαιρίδια που απομονώθηκαν κατακρημνίζουν μόνο τις Rho πρωτεΐνες στην ενεργή τους μορφή, καταφύγαμε σε παροδική επιμόλυνση των κυττάρων είτε με τον πλασμιδιακό φορέα ελέγχου pEXV-myc, είτε με πλασμιδιακούς φορείς που εκφράζουν την πρωτεΐνη RhoB στην μονίμως ενεργή ή στην μονίμως ανενεργή της μορφή (RhoB-V14 και RhoB-N19 αντίστοιχα). Μετά από 48 ώρες, έγινε συλλογή των κυτταρικών εκχυλισμάτων, τα οποία υποβλήθηκαν σε κατακρήμιση συγγένειας με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης- GST-RBD. Στην εικόνα 3.2.1.B φαίνεται ότι αν και η έκφραση των δύο μεταλλαγμένων μορφών της πρωτεΐνης RhoB είναι σε σχετικά παρόμοια επίπεδα, μόνο η μονίμως ενεργή της μορφή RhoB-V14 έχει κατακρημνιστεί μαζί με τα σφαιρίδια GST-RBD.



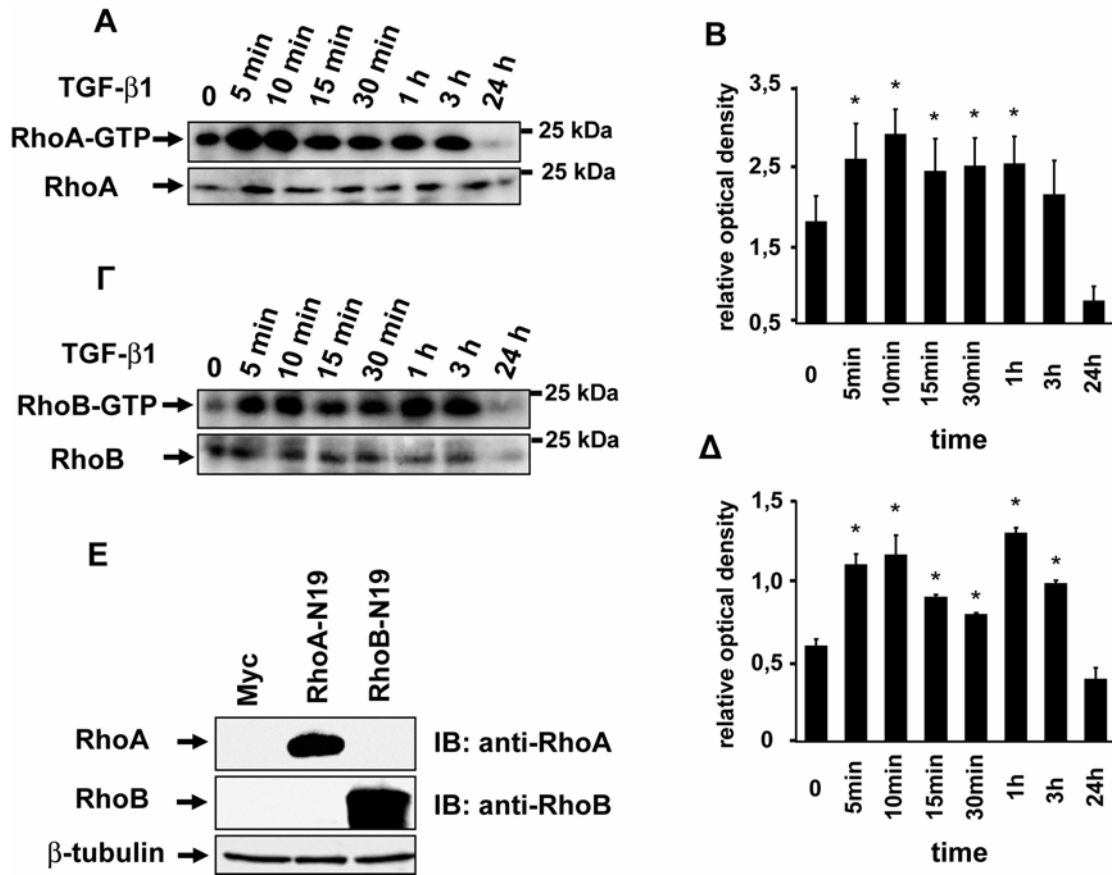
Εικόνα 3.2.1.: Καθαρισμός, απομόνωση και έλεγχος της δράσης των σφαιριδίων γλουταθειόνης-GST-RBD. (A) πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% μετά από χρώση με Coomassie Blue, διάδρομοι 1-5: πρότυπες συγκεντρώσεις της πρωτεΐνης BSA, διάδρομοι 6-7: δείγμα της πρωτεΐνης που καθαρίστηκε (10 και 20 μ l αντίστοιχα), διάδρομος 8: πρωτεϊνικός δείκτης, διάδρομος 9: ολικό κυτταρικό εκχύλισμα πριν την επεξεργασία του με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης. (B) Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με myc, RhoB-V14 και RhoB-N19. Στα κυτταρικά εκχυλίσματα έγινε κατακρήμνιση συγγένειας και στη συνέχεια οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε συνθήκες αποδιάταξης και ανιχνεύθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας εξειδικευμένο αντίσωμα έναντι της RhoB. Διάδρομοι 1-3: ολικές πρωτεΐνες των κυτταρικών εκχυλισμάτων του κάθε δείγματος, διάδρομοι 4-6: πρωτεΐνες που κατακρήμνιστηκαν μαζί με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης – GST-RBD.

3.2.2. Οι μικρές Rho GTPases RhoA και RhoB ενεργοποιούνται από τον παράγοντα TGF-β στους Swiss3T3 ινοβλάστες.

Από την πρόσφατη βιβλιογραφία προκύπτει ότι η οικογένεια των Rho GTPασών παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Επιπλέον οι πρωτεΐνες RhoA και RhoB είναι αυτές που εμπλέκονται κατά κύριο λόγο στη δημιουργία των ινιδίων του στρες. Με βάση τα παραπάνω δεδομένα και τις μορφολογικές παρατηρήσεις των προηγούμενων παραγράφων (εικόνες 3.1.1 και 3.1.3.), διερευνήθηκε η ενεργοποίηση των μικρών Rho GTPασών από τον παράγοντα TGF-β στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Το ερώτημα προσεγγίστηκε με πειράματα κατακρήμνισης συγγένειας, χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-GST-RBD που περιγράφηκαν στην προηγούμενη παράγραφο. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5ng/ml TGF-β1 για 5, 10, 15, 30 λεπτά, 1, 3 και 24 ώρες. Οι προσδεμένες με GTP RhoA και RhoB, κατακρημνίστηκαν από ίσο όγκο κυτταρικού εκχυλίσματος για το κάθε δείγμα, μαζί με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-GST-RBD. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 12% σε συνθήκες αποδιάταξης και ακολούθησε ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της RhoA ή της RhoB αντίστοιχα (εικόνα 3.2.2.A και Γ). Παράλληλα με τα δείγματα που προέκυψαν από την κατακρήμνιση συγγένειας, διαχωρίστηκαν στο ίδιο πήκτωμα ακρυλαμιδίου και δείγματα ίσου όγκου ολικών πρωτεϊνών. Οι ζώνες των πρωτεϊνών ποσοτικοποιήθηκαν με οπτική πυκνομετρία, και οι τιμές των ενεργών RhoA και RhoB κανονικοποιήθηκαν με βάση τις τιμές των ολικών πρωτεϊνών (εικόνα 3.2.2. B και Δ). Τα αποτελέσματα από τρία ανεξάρτητα πειράματα έδειξαν ότι τόσο η RhoA όσο και η RhoB ενεργοποιούνται από τον παράγοντα TGF-β1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες (αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα από ένα πείραμα στην εικόνα 3.2.2.A και Γ). Στα γραφήματα B και Δ της εικόνας 3.2.2. παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των τριών ανεξάρτητων πειραμάτων μετά από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η ποσότητα της ενεργής RhoA και RhoB αυξάνεται σημαντικά μόλις 5 λεπτά μετά την επίδραση με τον παράγοντα TGF-β1, φτάνει σε μέγιστο και επανέρχεται σε βασικά επίπεδα περίπου μετά από τρεις ώρες.

Δεδομένου ότι και οι δύο Rho GTPάσες μετρήθηκαν με την ίδια μέθοδο, και με σκοπό να διερευνηθεί κατά πόσο τα δύο αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν αναγνωρίζουν ειδικά τις πρωτεΐνες RhoA και RhoB αντίστοιχα, διερευνήθηκε η εξειδίκευση τους σε συνθήκες υπερέκφρασης των πρωτεϊνών μετά από παροδική

επιμόλυνση. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 3.2.2.E και επιβεβαιώνουν ότι τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση.

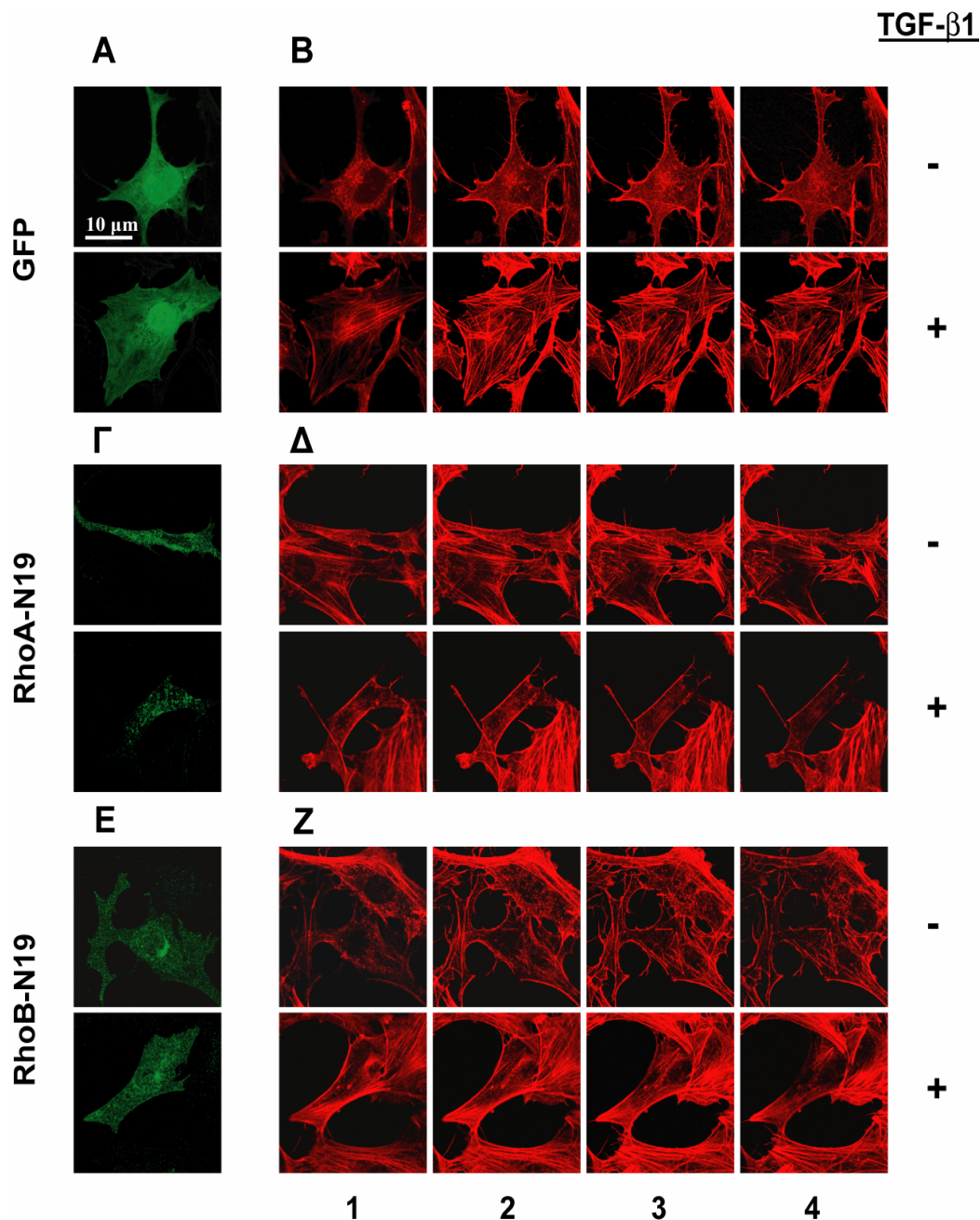


Εικόνα 3.2.2. Ο παράγοντας TGF-β1 επάγει την ενεργοποίηση της RhoA και της RhoB στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα τα οποία δείχνουν την αύξηση (A) της ενεργής RhoA-GTP και (B) της ενεργής RhoB-GTP οι οποίες προσδιορίστηκαν με κατακρήμνιση συγγένειας με σφαιρίδια γλουταθειόνης-GST-RBD από κύτταρα μάρτυρες ή ενεργοποιημένα από τον παράγοντα TGF-β1 (5ng/ml) για τις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. Οι πρωτεΐνες RhoA και RhoB εμφανίστηκαν με ανοσοαποτύπωση, χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα αντισώματα έναντι των αντίστοιχων GTPασών. Οι ζώνες των ενεργών (επάνω πάνελ) και των ολικών (κάτω πάνελ) πρωτεϊνών ποσοτικοποιήθηκαν με οπτική πυκνομετρία και η ένταση των ενεργών πρωτεϊνών κανονικοποιήθηκε με την ένταση της αντίστοιχης ζώνης των ολικών πρωτεϊνών. Στα γραφήματα (B) και (Δ) παρουσιάζονται οι μέσες τιμές ± S.E. των στατιστικά επεξεργασμένων αποτελεσμάτων τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, $p < 0,05$). (E) η εξειδίκευση των αντισωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την ανοσοαποτύπωση των πρωτεϊνών RhoA και RhoB, ταυτοποιήθηκε μετά από υπερέκφραση των RhoA-N19 και RhoB-N19 με παροδική επιμόλυνση των κυττάρων και ανοσοαποτύπωση. Στον πρώτο διάδρομο (myc) παρουσιάζονται κύτταρα μάρτυρες μετά από παροδική επιμόλυνση με τον πλασμιδιακό φορέα myc.

3.2.3. Η ενεργοποίηση των πρωτεϊνών RhoA και RhoB από τον παράγοντα TGF-β1 είναι απαραίτητη για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες.

Προκειμένου να διερευνηθεί αν η ενεργοποίηση των μικρών GTPασών RhoA και RhoB από τον παράγοντα TGF-β είναι κρίσιμης σημασίας για την επαγόμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού στους Swiss3T3 ινοβλάστες, μελετήθηκε η επίδραση της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών στη μονίμως ανενεργή τους μορφή. Ακολούθησε διπλή χρώση των κυττάρων και ανάλυση με μικροσκοπία συνεστίασης. Συγκεκριμένα, πλασμιδιακοί φορείς οι οποίοι εκφράζουν την RhoA-N19 ή την RhoB-N19 (Qiu et al., 1995; Lebowitz et al., 1995) ή την φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP σαν φορέα ελέγχου εισήχθησαν στα κύτταρα με τη μέθοδο της παροδικής επιμόλυνσης. Τα κύτταρα υποβλήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 3 ώρες. Ακολούθησε διπλή χρώση των κυττάρων, έμμεση, με αντισώματα έναντι της RhoA ή της RhoB αντίστοιχα και δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φλουορεσκίνη (FITC) και άμεση, με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη για την ανίχνευση της πολυμερισμένης ακτίνης (εικόνα 3.2.3.). Στα κύτταρα μάρτυρες όπου εκφράστηκε η φθορίζουσα πρωτεΐνη GFP και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με TGF-β1, παρατηρείται αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης η οποία δεν επηρεάστηκε από τη διαδικασία της παροδικής επιμόλυνσης (εικόνα 3.2.3.A και B). Αντίθετα, στα κύτταρα που εκφράστηκε η μονίμως ανενεργή RhoA (RhoA-N19), δεν παρατηρήθηκε η δημιουργία νέων μικροϊνιδίων ακτίνης σε απόκριση στον παράγοντα, σε αντίθεση με τα γειτονικά κύτταρα που δεν εκφράζουν την μεταλλαγμένη πρωτεΐνη (εικόνα 3.2.3.Γ και Δ). Παρομοίως, και στα κύτταρα που υπερεκφράστηκε η μονίμως ανενεργή RhoB (RhoB-N19) δεν παρατηρήθηκε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης ούτε η δημιουργία ινιδίων του στρές, και πάλι σε αντίθεση με τα γειτονικά κύτταρα (εικόνα 3.2.3.E και Z).

Από τα αποτελέσματα των παραγράφων 3.2.2. και 3.2.3 προκύπτει ότι ο παράγοντα TGF-β1 ενεργοποιεί τις Rho GTPάσες RhoA και RhoB, ενώ η ενεργοποίησή τους φαίνεται ότι είναι απαραίτητη για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες.



Εικόνα 3.2.3. Η ενεργοποίηση των Rho GTPασών RhoA και RhoB είναι απαραίτητη για την επαγόμενη από τον παράγοντα TGF-β1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Μικροσκοπία συνεστίασης για τον κυτταροσκελετό της ακτίνης σε Swiss3T3 ινοβλάστες οι οποίοι έχουν (+) ή όχι (-) ενεργοποιηθεί από 5 ng/ml TGF-β1 για 3 ώρες μετά από παροδική επιμόλυνση με πλασμιδιακούς φορείς έκφρασης της GFP (A, B), ή της RhoA-N19 (Γ, Δ), ή της RhoB-N19 (E, Z). (A) φθορισμός της αυτο-φθορίζουσας πρωτεΐνης GFP, (Γ και E) έμμεσος ανοσοφθορισμός των κυττάρων που εκφράζουν τις RhoA-N19 και τη RhoB-N19 με αντισώματα anti-RhoA και anti-RhoB αντίστοιχα και δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φλουορεσκίνη (FITC), (B, Δ και Z) άμεσος φθορισμός ροδαμίνης-φαλλοιδίνης για την πολυμερισμένη ακτίνη. Οι εικόνες 1-4 αντιπροσωπεύουν τομές σάρωσης από την επάνω πλευρά του κυττάρου (1) προς την κάτω (4).

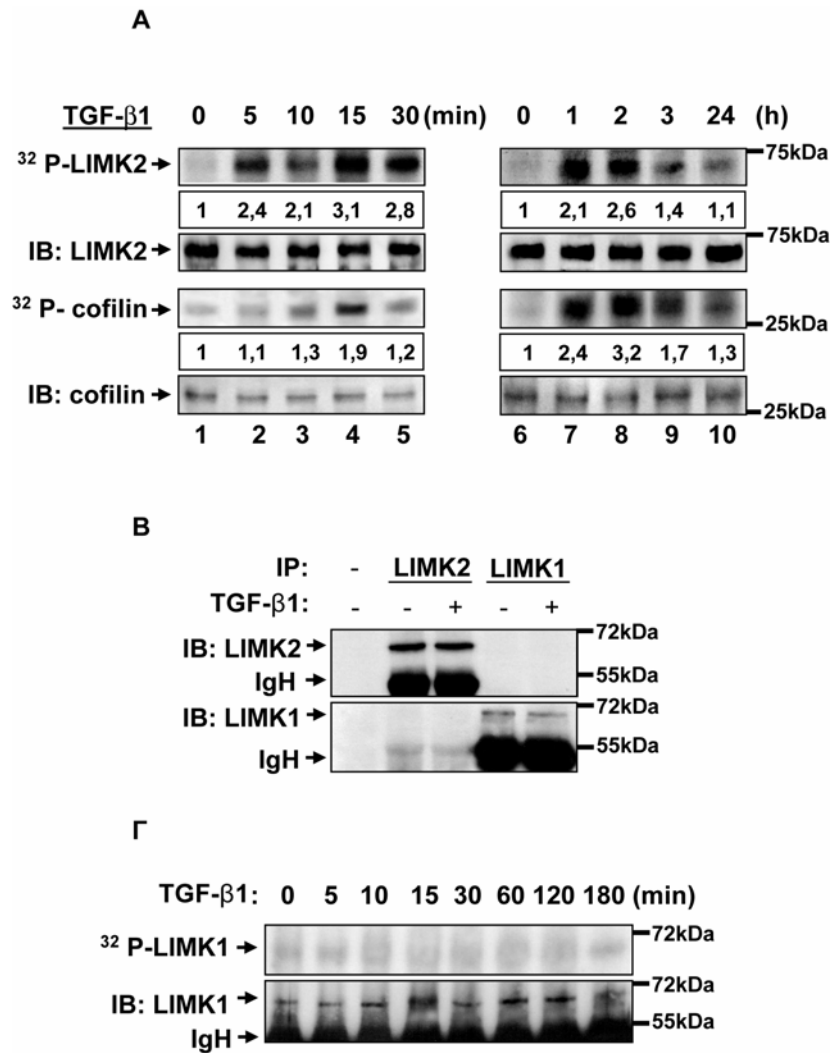
3.3. Η πρωτεΐνη LIMK2 ενεργοποιείται από τον παράγοντα TGF-β και φωσφορυλιώνοντας την κοφιλίνη οδηγεί στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

3.3.1. Επίδραση με TGF-β1 οδηγεί σε αύξηση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης LIMK2 και του φυσιολογικού της υποστρώματος της κοφιλίνης.

Οι πρωτεΐνες LIMK1 και LIMK2 είναι κινάσες σερίνης-θρεονίνης, που παρουσιάζουν υψηλή ομολογία σε σχέση με την πρωτοταγή τους δομή και επάγουν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω φωσφορυλίωσης του φυσιολογικού τους υποστρώματος, της κοφιλίνης. Επιπλέον οι πρωτεΐνες αυτές ενεργοποιούνται με έμμεσο τρόπο από τις Rho GTPάσες. Με στόχο την περαιτέρω διερεύνηση του μονοπατιού μέσω του οποίου ο παράγοντας TGF-β1 μεταδίδει το μήνυμα του στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, μελετήθηκε η συμμετοχή των LIM κινασών.

Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επώαστηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 5, 10, 15 και 30 λεπτά (πείραμα μικρής χρονικής διάρκειας) και για 1, 2, 3 και 24 ώρες (πείραμα μεγάλης χρονικής διάρκειας). Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμιση με αντίσωμα έναντι της πρωτεΐνης LIMK2, και in vitro δοκιμή κινάσης (in vitro kinase assay) μετά από επώαση με 5 μCi [γ -³²P]-ATP για 30 λεπτά στους 30 °C. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν σε πήκτωμα ακρυλαμιδίου 11% σε συνθήκες αποδιάταξης και οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες εμφανίστηκαν με αυτοραδιογραφία και ταυτοποιήθηκαν με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντισώματα. Η πρωτεΐνη κοφιλίνη συγκατακρημνίστηκε με τη LIMK2 είτε απουσία είτε παρουσία του TGF-β1, αποκαλύπτοντας τη φυσιολογική αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο πρωτεϊνών (εικόνα 3.3.1.A). Η LIMK2 φωσφορυλιώνεται πολύ γρήγορα, μόλις 5 λεπτά μετά την επίδραση με τον TGF-β1. Παράλληλα αυξήθηκαν και τα επίπεδα της φωσφορυλιωμένης κοφιλίνης στα κύτταρα, με τρόπο τέτοιο που να συμβαδίζει χρονικά με αυτό της LIMK2. Η αυξημένη φωσφορυλίωση των πρωτεϊνών διατηρείται μέχρι και τρεις ώρες μετά την επίδραση με τον παράγοντα.

Από τη βιβλιογραφία ήταν γνωστό ότι οι LIM κινάσες μπορεί να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους μέσω του N-τελικού LIM μοτίβου και του C-τελικού τμήματος με δράση κινάσης και να δημιουργούν σύμπλοκο των δύο πρωτεϊνών (Hiraoka et al., 1996). Με σκοπό να διερευνηθεί η πιθανότητα, η αύξηση της φωσφορυλίωσης της κοφιλίνης να οφείλεται στην παρουσία και LIMK1 στο ανοσο-σύμπλοκο που πιθανά είχε



Εικόνα 3.3.1.: Ο παράγοντας TGF-β1 επάγει φωσφορυλίωση της ενδογενούς κοφιλίνης μέσω ενεργοποίησης της LIMK2. (A) κύτταρα Swiss3T3 καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για τις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα anti-LIMK2 και τα ανοσο-σύμπλοκα μετρήθηκαν για δράση κινάσης *in vitro*. Οι πρωτεΐνες που συγκατακρημνίστηκαν με την LIMK2 διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα ακρυλαμίδιου 11% σε συνθήκες αποδιάταξης και οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες οπτικοποιήθηκαν με αυτοραδιογραφία (πρώτο και τρίτο πάνελ, έκθεση φιλμ: 24 ώρες περίπου). Η ταυτοποίηση των πρωτεϊνών έγινε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας εξειδικευμένα αντισώματα έναντι της LIMK2 και της κοφιλίνης αντίστοιχα (δεύτερο και τέταρτο πάνελ, IB). (B) Εξειδίκευση των δύο αντισωμάτων anti-LIMK1 και anti-LIMK2. Κυτταρικά εκχυλίσματα Swiss3T3 απουσία (-) ή παρουσία (+) TGF-β1 (5 ng/ml) υποβλήθηκαν σε ανοσοκατακρήμνιση με anti-LIMK1 ή με anti-LIMK2. Οι πρωτεΐνες διαχωρίστηκαν με ηλεκτροφόρηση και στη συνέχεια έγινε ανοσοαποτύπωση με anti-LIMK2, απομάκρυνση των αντισωμάτων από τη μεμβράνη (*stripping*) ανοσοαποτύπωση με anti-LIMK1. Στον πρώτο διαδρομο, σαν αρνητικός έλεγχος έγινε κατακρήμνιση μόνο με σφαιρίδια αгарόζης συνδεδεμένα με πρωτεΐνη-G (*protein-G-agarose beads*) (IP: -). (Γ) *in vitro* δοκιμή κινάσης για ανοσο-σύμπλοκα της LIMK1. Οι συνθήκες στον πειράματος είναι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν για το πάνελ (A). Η αυτοραδιογραφία παρουσιάζει τις φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες που συγκατακρημνίστηκαν με την LIMK1 (έκθεση φιλμ: 24 ώρες περίπου). Στη συνέχεια έγινε ανοσοαποτύπωση στη μεμβράνη με μονοκλωνικό αντίσωμα έναντι της LIMK1 (IB).

κατακρημνιστεί μαζί με τη LIMK2, χρησιμοποιήθηκαν δύο αντισώματα που αναγνωρίζουν ειδικά τη μία και όχι την άλλη πρωτεΐνη και αντίστροφα. Πειράματα ανοσοκατακρήμνισης έδειξαν ότι οι δύο πρωτεΐνες δεν συγκατακρημνίζονται στους Swiss3T3 ινοβλάστες, παρουσία ή απουσία TGF-β1 (εικόνα 3.3.1.B). Τέλος, ακολούθησαν πειράματα δοκιμής κινάσης in vitro, όπως περιγράφηκε παραπάνω, μόνο που αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοκατακρήμνιση εξειδικευμένο αντίσωμα έναντι της LIMK1. Δεν παρατηρήθηκε καμμία αξιοσημείωτη μεταβολή στην φωσφορυλίωση της LIMK1 (εικόνα 3.3.1.Γ).

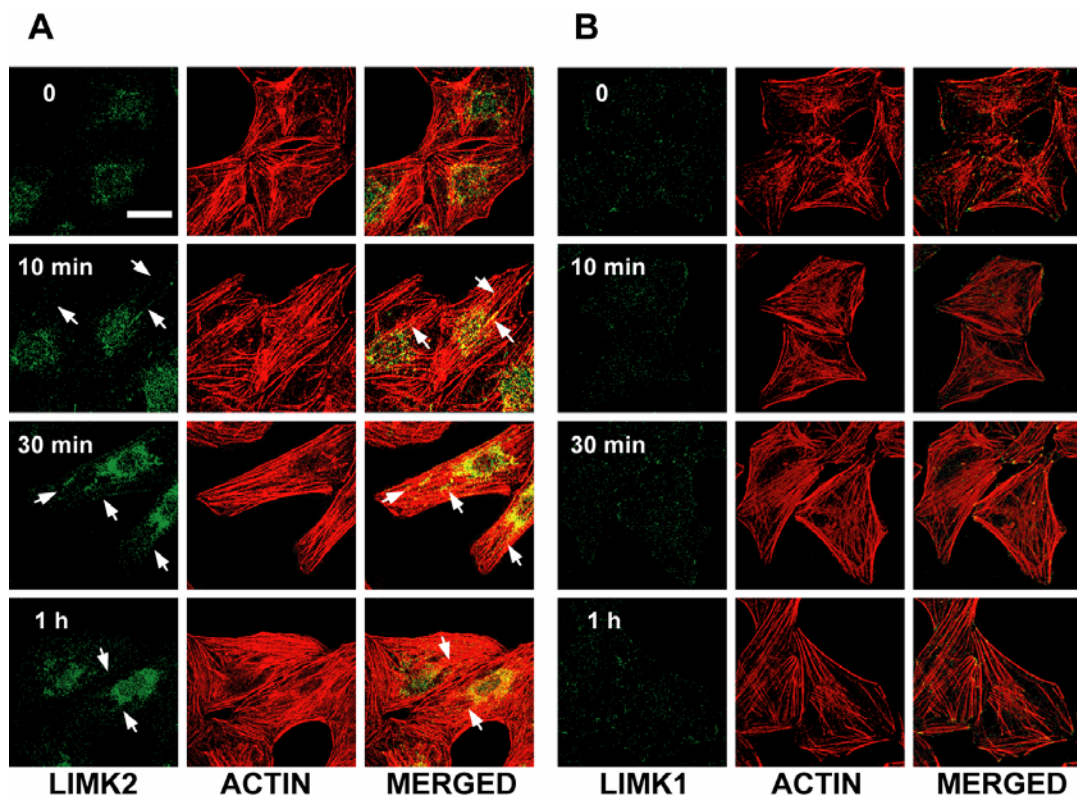
Τα αποτελέσματα αυτά μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η LIMK2 είναι μια σημαντική πρωτεΐνη τελεστής (effector protein) του σηματοδοτικού μονοπατιού του παράγοντα TGF-β1.

3.3.2. Ενεργοποίηση των Swiss3T3 ινοβλαστών με τον παράγοντα TGF-β1 μεταβάλλει τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της LIMK2 αλλά όχι και της LIMK1.

Με σκοπό να διερευνηθούν περαιτέρω τα αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου σχετικά με την ενεργοποίηση της LIMK2, αλλά όχι και της LIMK1 από τον παράγοντα TGF-β1, μελετήθηκε ο κυτταροπλασματικός εντοπισμός των δύο πρωτεϊνών με έμμεσο ανοσοφθορισμό και μικροσκοπία φθορισμού. Τα κύτταρα, αφού καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 10, 30 λεπτά και 1 ώρα. Μετά τη μονιμοποίηση τους ακολούθησε έμμεση χρώση με αντίσωμα anti-LIMK2 ή anti-LIMK1 αντίστοιχα και κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με Alexa-488 (πράσινο) ή φλουορεσκίνη (FITC) αντίστοιχα, και άμεση χρώση με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη για τα μικροϊνίδια της ακτίνης. Σε κύτταρα μάρτυρες, η LIMK2 εμφανίστηκε στο κυτταρόπλασμα, με έναν ασθενή εντοπισμό περιμετρικά του πυρήνα (εικόνα 3.3.2.A). Μετά την ενεργοποίηση με τον παράγοντα TGF-β1 η χρώση στο κυτταρόπλασμα έγινε πιο έντονη και αυξήθηκε ο συνεντοπισμός της με ινδιακές δομές (εικόνα 3.3.2.A). Αντίθετα, η χρώση της πρωτεΐνης LIMK1 εμφανίστηκε πολύ ασθενέστερη στο κυτταρόπλασμα, με έναν μόνο ασθενή εντοπισμό στις εστίες πρόσφυσης, και η κυτταροπλασματική κατανομή της δεν άλλαξε καθόλου μετά την ενεργοποίηση με TGF-β1.

Συνδυάζοντας τα βιοχημικά και μορφολογικά αποτελέσματα των δύο προηγούμενων παραγράφων, φαίνεται ότι ο παράγοντας TGF-β1 πολύ σύντομα και με ειδικό τρόπο, ενεργοποιεί την πρωτεΐνη LIMK2, η οποία με τη σειρά της φωσφορυλιώνοντας την

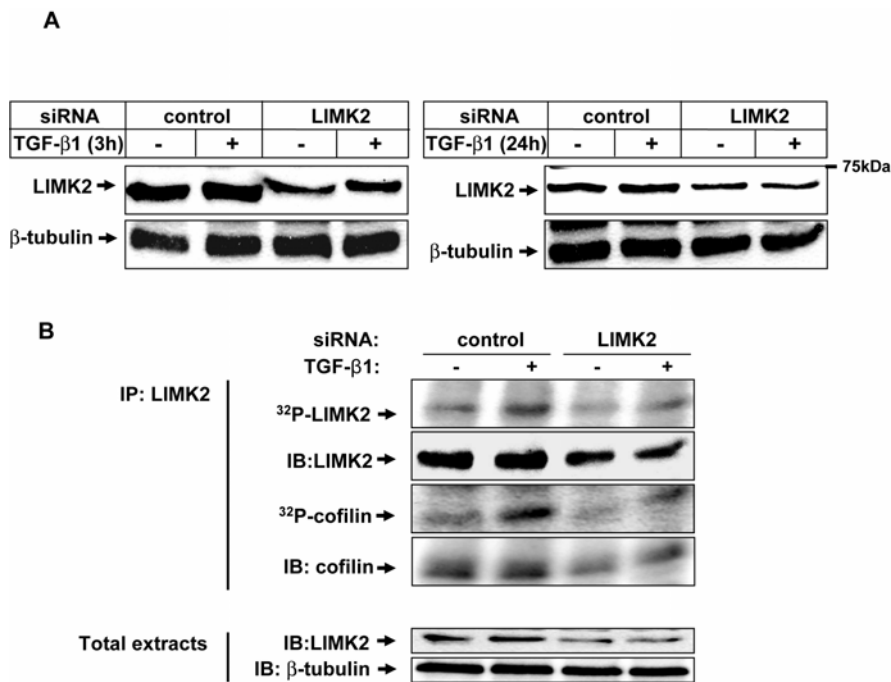
κοφιλίνη αναστέλει τη δράση της και οδηγεί με αυτόν τον τρόπο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού επάγοντας τον πολυμερισμό των μικροϊνιδίων της ακτίνης. Επιπλέον η φωσφορυλίωση της LIMK2, συνδέεται με την κυτταροπλασματική κατανομή της πρωτεΐνης και το περιστασιακό συνεντοπισμό της με ινιδιακές δομές. Αντίθετα όλα τα πειραματικά δεδομένα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η LIMK1 δεν συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF- β 1.



Εικόνα 3.3.2.: Ο παράγοντας TGF- β 1 επηρεάζει την υποκυτταρική κατανομή της LIMK2 στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF- β 1 για τις αναγραφόμενες χρονικές στιγμές. (A), (B) στο αριστερό πάνελ φαίνεται η υποκυτταρική κατανομή της LIMK2 και της LIMK1 αντίστοιχα, στο μεσαίο πάνελ άμεσος φθορισμός ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης για την ακτίνη και στο δεξιό πάνελ η συγχώνευση των δύο φωτογραφιών. Τα βέλη υποδεικνύουν τα σημεία συνεντοπισμού της LIMK2 με τις δομές της ακτίνης (κίτρινη χρώση). Η γραμμή αντιπροσωπεύει 10 μ m.

3.3.3. Η γονιδιακή αποσιώπηση της LIMK2 με τη χρήση μικρών κατασταλακτικών RNA (siRNA) παρεμποδίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1.

Με σκοπό να διερευνηθεί αν η ενεργοποίηση της πρωτεΐνης LIMK2 είναι κρίσιμης σημασίας για την - επαγόμενη από τον παράγοντα TGF-β1 - αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, έγινε γονιδιακή αποσιώπηση της πρωτεΐνης με τη χρήση μικρών κατασταλακτικών RNA (siRNAs). Το ολιγονουκλεοτίδιο, μεγέθους 21 βάσεων, σχεδιάστηκε με βάση το mRNA της LIMK2 του ποντικού. Η εισαγωγή του στα κύτταρα έγινε με παροδική επιμόλυνση, με τη χρήση του αντιδραστηρίου της λιποφεκταμίνης (Lipofectamine reagent) και οδήγησε σε μείωση των επιπέδων της ενδογενούς LIMK2 στους Swiss3T3 ινοβλάστες περίπου στο 30% (εικόνα 3.3.3.1.A)

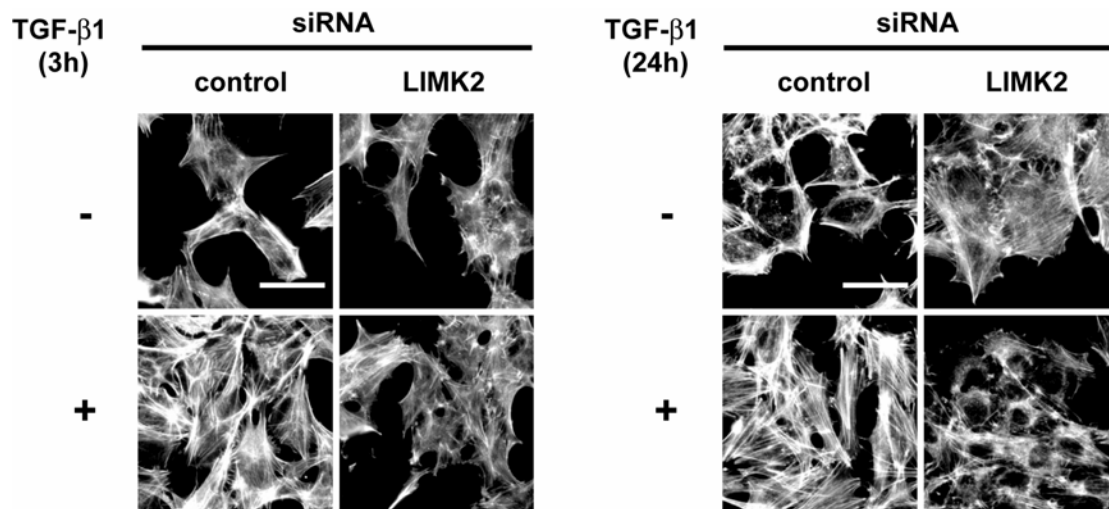


Εικόνα 3.3.3.1.: siRNA έναντι του γονιδίου της LIMK2 μειώνει τα επίπεδα της πρωτεΐνης καθώς και τη φωσφορυλίωση της μετά από ενεργοποίηση με TGF-β1. (A) Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση της LIMK2 ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων Swiss3T3 κυττάρων που έχουν υποστεί παροδική επιμόλυνση με siRNA έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης (κύτταρα μάρτυρες) ή του γονιδίου της LIMK2, και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 3 (αριστερό πάνελ) ή 24 ώρες (δεξιό πάνελ). (B) *in vitro* δοκιμή κίνησης μετά από ανοσοκατακρήμνιση με αντίσωμα anti-LIMK2 και ανίχνευση της LIMK2 και της κοφιλίνης που έχει συγκατακρημνιστεί μαζί της, μετά από παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με siRNA έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης (κύτταρα μάρτυρες) ή του γονιδίου της LIMK2. Παρουσιάζονται οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες με αυτοραδιογραφία (1^ο και 3^ο πάνελ), ενώ η ταυτοποίησή τους έγινε με ανοσοαποτύπωση (2^ο και 4^ο πάνελ, IB). Δίνεται επίσης και ανοσοαποτύπωση δειγμάτων των αντίστοιχων ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων για τη LIMK2 και την β-τουμουλίνη.

Η μείωση αυτή ήταν παρόμοια είτε απουσία είτε παρουσία TGF-β1 (3 και 24 ώρες) και φάνηκε να είναι ειδική, αφού παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με ένα μη ειδικό siRNA (εναντίον του γονιδίου της λουσιφεράσης), δεν είχε καμμία επίδραση στα πρωτεϊνικά επίπεδα της LIMK2 στο κυτταρικό εκχύλισμα (εικόνα 3.3.3.1.A). Για να επιβεβαιωθεί ότι το επίπεδο καταστολής της έκφρασης της LIMK2 ήταν ικανοποιητικό, μελετήθηκε η ενεργοποίηση της LIMK2 από τον TGF-β1 μετά από παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με το siRNA έναντι της πρωτεΐνης. Πράγματι, η σχετική μείωση της ενδογενούς πρωτεΐνης περιόρισε σημαντικά το ποσοστό ενεργοποίησης της από τον TGF-β1, καθώς και την ποσότητα της κοφιλίνης που συγκατακρημνίστηκε μαζί της και φωσφορυλιώθηκε (εικόνα 3.3.3.1.B).

Στη συνέχεια αναλύθηκε ο κυτταροσκελετός της ακτίνης με άμεσο ανοσοφθορισμό ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης και συμβατική μικροσκοπία. Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με siRNA έναντι του γονιδίου της LIMK2, καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 3 και 24 ώρες (εικόνα 3.3.3.2.A και B αντίστοιχα). Παρατηρήθηκε αδυναμία του παράγοντα να επάγει αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης και στις δύο χρονικές στιγμές. Αντίθετα, σε κύτταρα μάρτυρες στα οποία εισήχθη το siRNA έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης, δεν παρεμποδίστηκε η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Επιβεβαιώνεται λοιπόν ότι η πρωτεΐνη LIMK2 κατέχει σημαντικό ρόλο στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β1 που ρυθμίζει την απόκριση των ινοβλαστών ως προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.



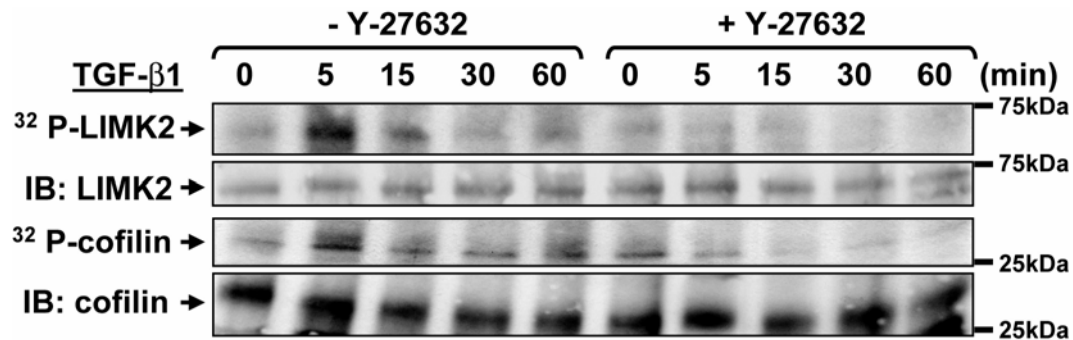
Εικόνα 3.3.3.2.: Η πρωτεΐνη LIMK2 είναι απαραίτητη για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1. Άμεσος ανοσοφθορισμός ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης και συμβατική μικροσκοπία, για Swiss3T3 ινοβλάστες μετά από παροδική επιμόλυνση με siRNA έναντι του γονιδίου της λουσιφεράσης (κύτταρα μάρτυρες) ή του γονιδίου της LIMK2. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν (+) ή όχι (-) με 5ng/ml TGF-β1 για 3 και 24 ώρες. Η γραμμή αντιπροσωπεύει 10 μm.

3.4. Ο ειδικός αναστολέας της πρωτεΐνης ROCK (Rho associated Coiled-coil Kinase) αναστέλει την επαγόμενη από τον TGF-β1 ενεργοποίηση της LIMK2 και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες.

Από τη βιβλιογραφία ήταν γνωστό ότι μία πρωτεΐνη τελεστής (effector protein) των Rho GTPασών είναι η ROCK1, η οποία εμπλέκεται και στην ενεργοποίηση της LIMK2 (Amano et al., 2000; Sumi et al., 2001). Επιπλέον, η ROCK1 ενεργοποιείται από τον TGF-β1 στα επιθηλιακά κύτταρα NMuMG κατά τον μετασχηματισμό τους σε μεσεγχυματικά (Bhowmick et al., 2001).

Με σκοπό να διερευνηθεί αν η πρωτεΐνη ROCK1 μεσολαβεί για την ενεργοποίηση της LIMK2 από τον TGF-β1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες, χρησιμοποιήθηκε ο ειδικός αναστολέας της Y27632. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν σε συνθήκες στέρησης ορού για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν ή όχι με 10 μm του αναστολέα Y27632 για 45 λεπτά και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 5, 15, 30 και 60 λεπτά.

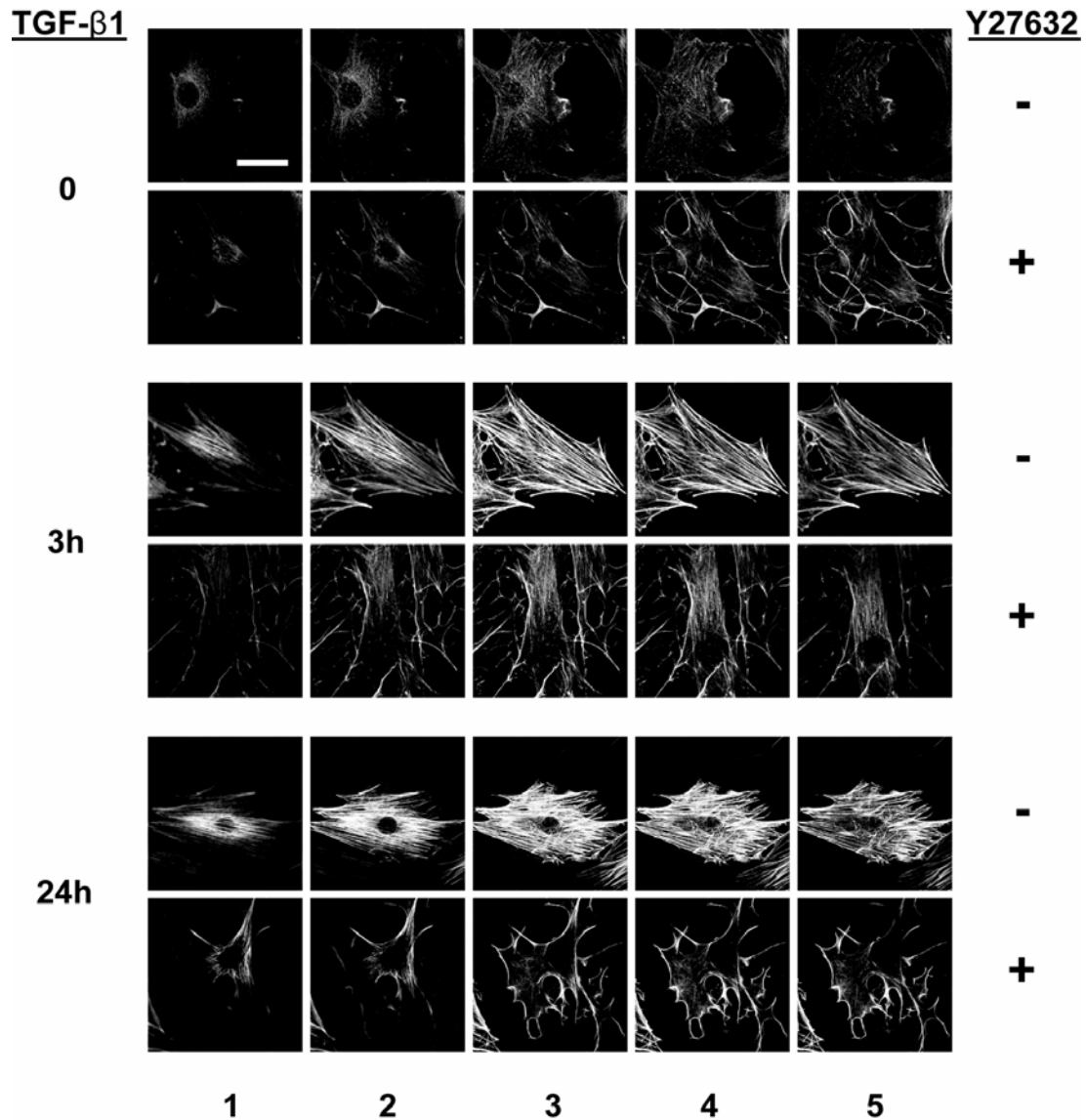
Ακολούθησε *in vitro* δοκιμή κινάσης για την LIMK2 όπως έχει περιγραφεί και σε προηγούμενες παραγράφους. Στα κύτταρα που προ-επωάστηκαν με τον αναστολέα Y27632 δεν παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης της LIMK2 ούτε και της κοφιλίνης, σε αντίθεση με τα κύτταρα τα οποία δεν είχαν προ-επωαστεί με τον αναστολέα της ROCK1 (εικόνα 3.4.1)



Εικόνα 3.4.1.: Ο αναστολέας Y27632 μπλοκάρει την επαγόμενη από τον TGF-β1 ενεργοποίηση της LIMK2 στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν (+Y27632) ή όχι (-Y27632) με 10 μM Y27632, και ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1. Τα ανοσο-σύμπλοκα της LIMK2 υποβλήθηκαν σε *in vitro* δοκιμή κινάσης. Οι φωσφορυλιωμένες πρωτεΐνες που συγκατακρημνίστηκαν με την LIMK2 φαίνονται με αυτοραδιογραφία (1^ο και 3^ο πάνελ), ενώ η ταυτοποίησή τους έγινε με ανοσοαποτύπωση χρησιμοποιώντας τα κατάλληλα αντισώματα (2^ο και 4^ο πάνελ, IB).

Επιπλέον, αναλύθηκε μορφολογικά η επίδραση της αναστολής της δράσης της ROCK1 πρωτεΐνης στον επαγόμενο από τον TGF-β1 πολυμερισμό της ακτίνης. Swiss3T3 ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν ή όχι με Y27632 και ενεργοποιήθηκαν με TGF-β1 για 3 και 24 ώρες. Ακολούθησε άμεση χρώση των μικροινιδίων της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη και παρατήρηση των δειγμάτων με μικροσκοπία συνεστίασης (εικόνα 3.4.2). Στα κύτταρα που προ-επωάστηκαν με τον αναστολέα δεν παρατηρήθηκε αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης ούτε στις 3 ούτε και στις 24 ώρες επώασης με τον παράγοντα.

Από τα προηγούμενα αποτελέσματα φαίνεται ότι η πρωτεΐνη ROCK1 μεσολαβεί στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β1, και είναι απαραίτητη η δράση της τόσο για την ενεργοποίηση της LIMK2 όσο και για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες.



Εικόνα 3.4.2.: Ο αναστολέας Y27632 μπλοκάρει την επαγόμενη από τον TGF-β1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Μικροσκοπία συνεστίασης μετά από άμεση χρώση ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης. Swiss3T3 ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν (+) ή όχι (-) με 10 μm Y27632 και ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 0, 3 και 24 ώρες. Οι εικόνες 1-5 αντιπροσωπεύουν τομές σάρωσης από την επάνω πλευρά του κυττάρου (1) προς την κάτω (5). Η γραμμή αντιπροσωπεύει 10 μm.

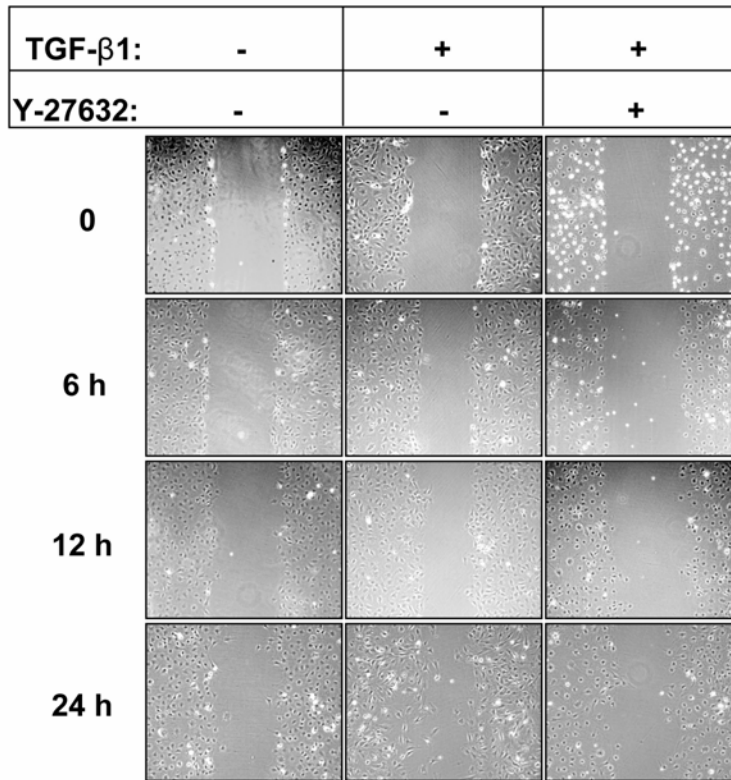
3.5. Ο παράγοντας TGF-β1 επάγει αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα στους Swiss3T3 ινοβλάστες, η οποία αναστέλεται από τον αναστολέα Y27632 της πρωτεΐνης ROCK1.

Κατά τον μετασχηματισμό ινοβλαστών σε μυοβλάστες από τον TGF-β1, τα κύτταρα αναπτύσσουν ένα συσταλτό φαινότυπο (contractile phenotype) ο οποίος εκφράζεται σε πλήθος παθολογικών καταστάσεων που εμπλέκονται σε διαδικασίες επούλωσης πληγών και ινωμάτωσης (fibrosis).

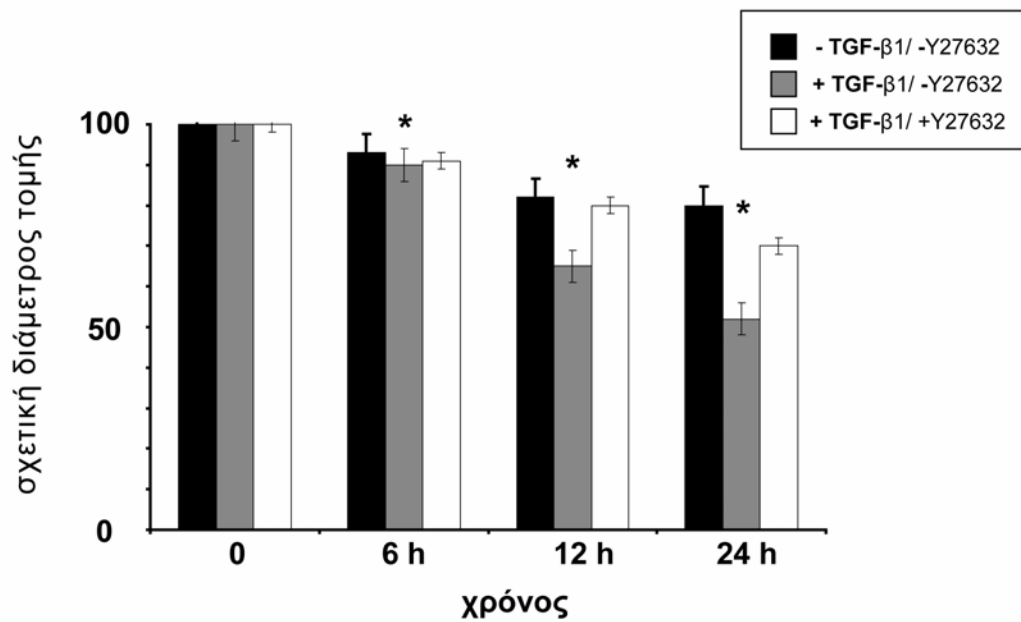
Προκειμένου να διερευνηθεί αν TGF-β1 επάγει αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα στους Swiss3T3 ινοβλάστες, έγιναν πειράματα δοκιμής τραυματισμού μονοστοιβάδας απουσία ή παρουσία του παράγοντα. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν μέχρις ότου καλύψουν όλη την επιφάνεια του τρυβλίου. Στη συνέχεια και αφού αφαιρέθηκε ο ορός από το θρεπτικό μέσο καλλιέργειας για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν με τον αναστολέα της πρωτεΐνης ROCK1, Y27632, και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με τον TGF-β1 (5 ng/ml). Δημιουργήθηκε εγκάρσια τομή (πληγή) στο τρυβλίο, με τη βοήθεια μιας αποστειρωμένης αιχμηρής ακίδας. Η τομή αυτή θεωρήθηκε η χρονική στιγμή 0, και το κλείσιμο της πληγής παρακολούθηθηκε και φωτογραφήθηκε στην διάρκεια του χρόνου (εικόνα 3.5.A). Η παρουσία του TGF-β1 στο κυτταρικό μέσο καλλιέργειας οδήγησε σε αυξημένη κινητικότητα των Swiss3T3 ινοβλαστών, η οποία παρεμποδίζεται όταν τα κύτταρα έχουν προ-επωαστεί με τον αναστολέα της ROCK1, Y27632 (εικόνα 3.5.A και B). Σε κάθε χρονική στιγμή προσδιορίστηκε η διάμετρος της τομής, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σχηματικά σε διάγραμμα (εικόνα 3.5.B). Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται είναι οι μέσες τιμές τριών ανεξάρτητων πειραμάτων, και είναι στατιστικά σημαντικά.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δείχνουν ότι ο παράγοντας TGF-β1 επάγει αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα στους Swiss3T3 ινοβλάστες, και ότι το φαινόμενο αυτό φαίνεται να ρυθμίζεται από τη λειτουργικότητα του μονοπατιού Rho-ROCK1.

A



B



Εικόνα 3.5.: Δοκιμή τραυματισμού μονοστοιβάδας στους Swiss3T3 ινοβλάστες. (A). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν (+) ή όχι (-) με 10 μM Y27632 και ενεργοποιήθηκαν (+) ή όχι (-) με 5 ng/ml TGF-β1. Η επούλωση της πληγής στην πορεία του χρόνου (μέχρι 24 ώρες) παρακολούθηθηκε με μικροσκοπία αντίθεσης φάσεων. Οι φωτογραφίες είναι ενδεικτικές από ένα πείραμα (B) Γράφημα στο οποίο παρουσιάζονται οι μέσες τιμές \pm S.E. των στατιστικά επεξεργασμένων αποτελεσμάτων τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (*, $p < 0,05$).

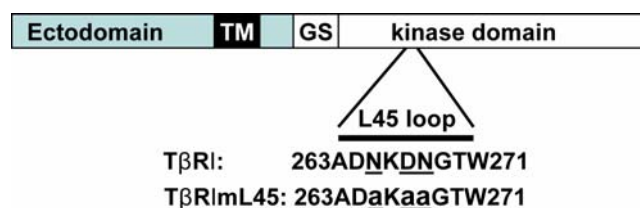
3.6. Επικοινωνία μεταξύ του σηματοδοτικού μονοπατιού του παράγοντα TGF-β1 και του κυτταροσκελετού της ακτίνης

3.6.1. Υπερέκφραση του μονίμως ενεργού τύπου I υποδοχέα του TGF-β (TβRI) είναι ικανή να επάγει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1.

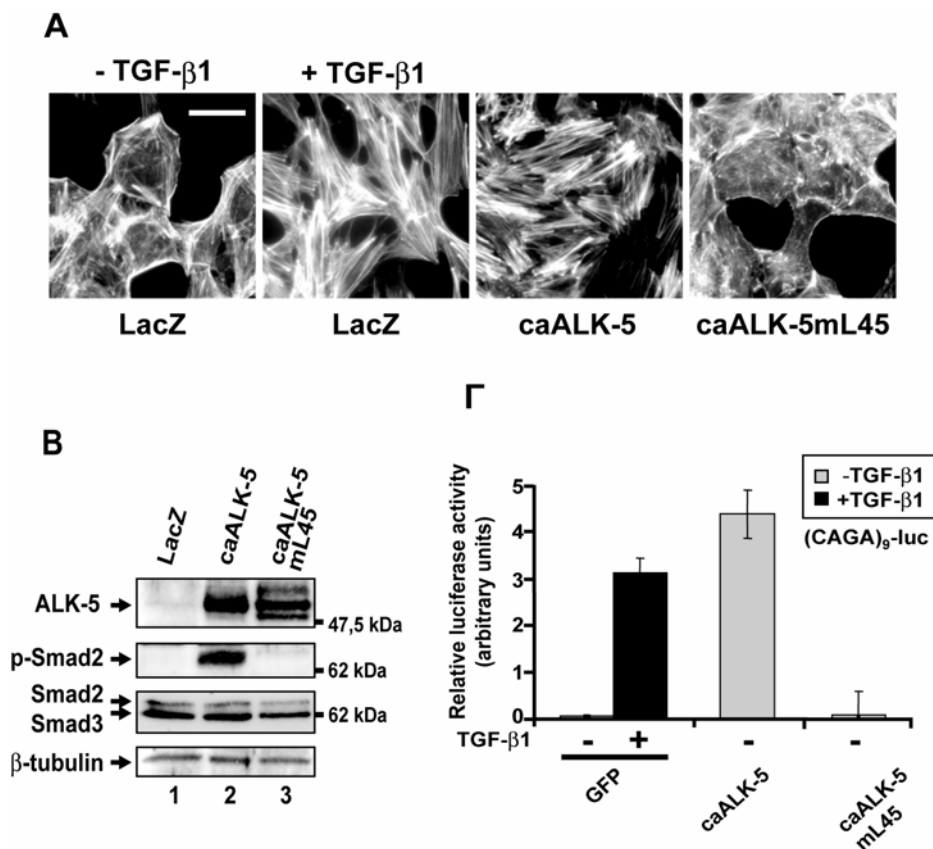
Σε όλα τα προηγούμενα πειράματα, η δράση του παράγοντα TGF-β1 προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης μελετήθηκε με προσθήκη της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης στο κυτταρικό μέσο καλλιέργειας. Προκειμένου να διαλευκανθεί ο ρόλος μορίων που μετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β1, όπως είναι ο υποδοχέας του ή οι Smad πρωτεΐνες, έγινε παροδική επιμόλυνση των Swiss3T3 με αδενοϊκούς φορείς που εκφράζουν αυτές τις πρωτεΐνες στην αγρίου τύπου μορφή (wild type) ή με κάποια μετάλλαξη και αναλύθηκαν οι κυτταρικές αποκρίσεις απουσία του παράγοντα TGF-β1.

Για την ανάλυση του ρόλου του υποδοχέα χρησιμοποιήθηκε αδενοϊκός φορέας για την έκφραση μεταλλαγμένων μορφών του τύπου I υποδοχέα του TGF-β1 (TβRI). Σημειακή μετάλλαξη του υποδοχέα TβRI και συγκεκριμένα αντικατάσταση της θρεονίνης-204 με ασπαραγινικό οξύ (T204D), τον καθιστά μονίμως ενεργό (caALK-5) (Wieser et al., 1995). Επιπλέον χρησιμοποιήθηκε και μία αδενοϊκή κατασκευή όπου προστέθηκε στον caALK-5 μία επιπλέον μετάλλαξη στην περιοχή L45, η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση και ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών στον υποδοχέα (caALK-5mL45). Η περιοχή L45 του TβRI, βρίσκεται μεταξύ των υπομονάδων IV και V της περιοχής με δράση κινάσης του υποδοχέα, και είναι αυτή που προσδίδει την εξειδίκευση ως προς τις Smad που αναγνωρίζονται από τους τύπου I υποδοχείς των κυτοκινών της υπερ-οικογένειας του TGF-β. Αλλαγή τριών αμινοξέων αυτής της περιοχής με αλανίνη, κάθιστά αδύνατη την πρόσδεση των Smad στον υποδοχέα παρόλο που ο τελευταίος κρατά μονίμως ενεργή τη δράση κινάσης (Itoh et al., 2003; Yu et al., 2002).

Τα παραπάνω συνοψίζονται στο γράφημα που ακολουθεί:



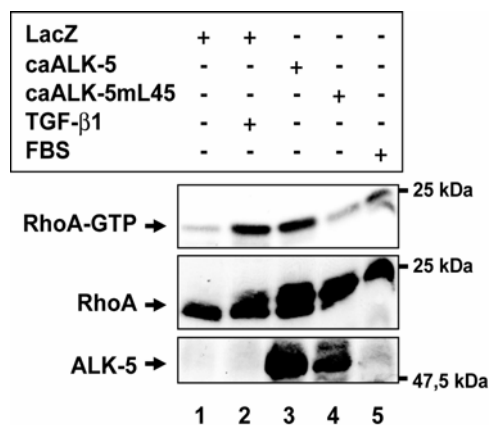
Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με αδενοϊκό φορέα έκφρασης του LacZ (κύτταρα μάρτυρες), του caALK-5 ή του caALK-5mL45. Χρησιμοποιήθηκε η κατάλληλη πολλαπλότητα επιμόλυνσης (multiplicity of infection, MOI) ώστε το 80% των κυττάρων να εκφράζει το γονίδιο το οποίο εισήχθη με τον αδενοϊό. Κύτταρα στα οποία εκφράστηκε το LacZ, και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 24 ώρες, εμφάνισαν τη χαρακτηριστική μεταβολή της μορφολογίας τους και αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σαν απόκριση στον παράγοντα (εικόνα 3.6.1.1.A).



Εικόνα 3.6.1.1: Σηματοδότηση μέσω του TβRI και ο ρόλος της περιοχής L45 για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. (A) Άμεσος φθορισμός ροδαμίνης-φαλλοιδίνης για την ακτίνη Swiss3T3 ινοβλαστών, επιμολυσμένων παροδικά με αδενοϊό για την έκφραση του LacZ (κύτταρα ελέγχου), του caALK-5 ή του caALK-5mL45. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια τα κύτταρα ελέγχου ενεργοποιήθηκαν για 24 ώρες με (+) ή χωρίς (-) 5 ng/ml TGF-β1. Η γραμμή υποδεικνύει 10 μm. (B) Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση κυτταρικών εκχυλισμάτων από παράλληλα πειράματα με αυτά του A, χρησιμοποιώντας αντίσωμα έναντι του ALK-5, φωσφο-Smad2 (p-Smad2), Smad2/Smad3 και β-τουμπουλίνης. (Γ) γράφημα κανονικοποιημένης ενεργότητας λουσιφεράσης από Swiss3T3 ινοβλάστες μετά από παροδική επιμόλυνση με τους αναγραφόμενους αδενοϊούς συν τον τεχνητό υποκινητή (CAGA)₉-luciferase και LacZ σαν γονίδιο αναφοράς. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στην συνέχεια ενεργοποιήθηκαν (+) ή όχι (-) με 5 ng/ml TGF-β1 για 3 ώρες. Στο γράφημα εμφανίζονται οι μέσες τιμές 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.

Τα κύτταρα επιμολύνθηκαν με αδενοϊό έκφρασης του caALK-5 και αφού καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες μελετήθηκαν μορφολογικά (48 ώρες μετά την επιμόλυνση) με άμεσο φθορισμό ροδαμίνης-φαλλοϊδίνης. Παρατηρήθηκε έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και μεταβολή του σχήματος των Swiss3T3 κυττάρων, όπως και σε αυτά τα οποία ενεργοποιήθηκαν για μεγάλο χρονικό διάστημα (24 ώρες) με TGF-β1 (εικόνα 3.6.1.1.A). Αντίθετα, η υπερέκφραση του caALK-5mL45 ήταν αναποτελεσματική ως προς την ενεργοποίηση της κυτταροσκελετικής απόκρισης των κυττάρων (εικόνα 3.6.1.1.A). Για να επιβεβαιωθεί ότι η αδυναμία του caALK-5mL45 δεν οφειλόταν σε αναποτελεσματική έκφραση του διπλά μεταλλαγμένου υποδοχέα, έγιναν παράλληλα πειράματα τιτλοδότησης και ανοσοαποτύπωσης των δύο υποδοχέων (εικόνα 3.6.1.1.B, 1^ο πάνελ). Παρατηρήθηκε ότι οι δύο υποδοχείς εκφράζονται σε παρόμοια επίπεδα. Με ανοσοαποτύπωση έναντι της φωσφορυλιωμένης Smad2 (p-Smad2) επιβεβαιώθηκε η αδυναμία του caALK-5mL45 να επάγει φωσφορυλίωση της πρωτεΐνης (εικόνα 3.6.1.1.B, 2^ο πάνελ), ενώ με πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης του τεχνητού υποκινητή (CAGA)₉-luciferase επιβεβαιώθηκε η αδυναμία του να επάγει μεταγραφική ενεργοποίηση μέσω του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών (εικόνα 3.6.1.1.Γ).

Επιπλέον διερευνήθηκε η επίδραση της έκφρασης των caALK-5 και caALK-5mL45 στην ενεργοποίηση της RhoA (εικόνα 3.6.1.2).



Εικόνα 3.6.1.2.: Πειράματα υπολογισμού της ενεργής RhoA-GTP σε Swiss3T3 ινοβλάστες μετά από παροδική επιμόλυνση με τους αναγραφόμενους αδενοϊούς. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 ή με FBS 10% για 10 λεπτά. Έγινε ανοσοαποτύπωση των RhoA-GTP, RhoA και ALK-5 (1^ο, 2^ο, και 3^ο πάνελ αντίστοιχα).

Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με LacZ (κύτταρα μάρτυρες), caALK-5 και caALK-5mL45, καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια τα κύτταρα μάρτυρες ενεργοποιήθηκαν ή όχι με 5 ng/ml TGF-β1 για 10

λεπτά. Ο προσδιορισμός της ενεργής RhoA-GTP έγινε με κατακρήμιση συγγένειας με τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-GST-RBD. Επιμόλυνση των κυττάρων με caALK-5 οδήγησε σε ενεργοποίηση της RhoA, όπως και στα κύτταρα μάρτυρες τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TGF-β1 (διάδρομοι 2 και 3). Αντίθετα, επιμόλυνση με caALK-5mL45 απέτυχε να ενεργοποιήσει την πρωτεΐνη RhoA (διάδρομοι 2 και 4).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η υπερέκφραση του υποδοχέα TβRI στη μονίμως ενεργή του μορφή είναι από μόνη της ικανή να επάγει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και την ενεργοποίηση της RhoA, ενώ η περιοχή L45 αυτού του υποδοχέα αποδείχθηκε σημαντική και για τις δύο περιπτώσεις.

3.6.2. Η πρωτεΐνη Smad7 αναστέλει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και την ενεργοποίηση της RhoA από τον παράγοντα TGF-β1.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν όταν χρησιμοποιήθηκε ο μεταλλαγμένος υποδοχέας caALK-5mL45 υποδεικνύουν πιθανή ανάμιξη του κλασικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στην επαγόμενη από τον TGF-β1 απόκριση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Με σκοπό να διερευνηθεί η υπόθεση ότι το Smad μονοπάτι εμπλέκεται στον πολυμερισμό της ακτίνης και στην ενεργοποίηση των Rho GTPασών, Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με αδενοϊό που εκφράζει την ανασταλτική πρωτεΐνη Smad7. Η Smad7 αναστέλει την φωσφορυλίωση, επομένως ενεργοποίηση, των R-Smad από τον υποδοχέα, και οδηγεί τον υποδοχέα στα λυσοσωμάτια για αποικοδόμηση, προσφέροντας έτσι το κλείσιμο του μονοπατιού (Di Guglielmo et al., 2003; Moustakas et al., 2001).

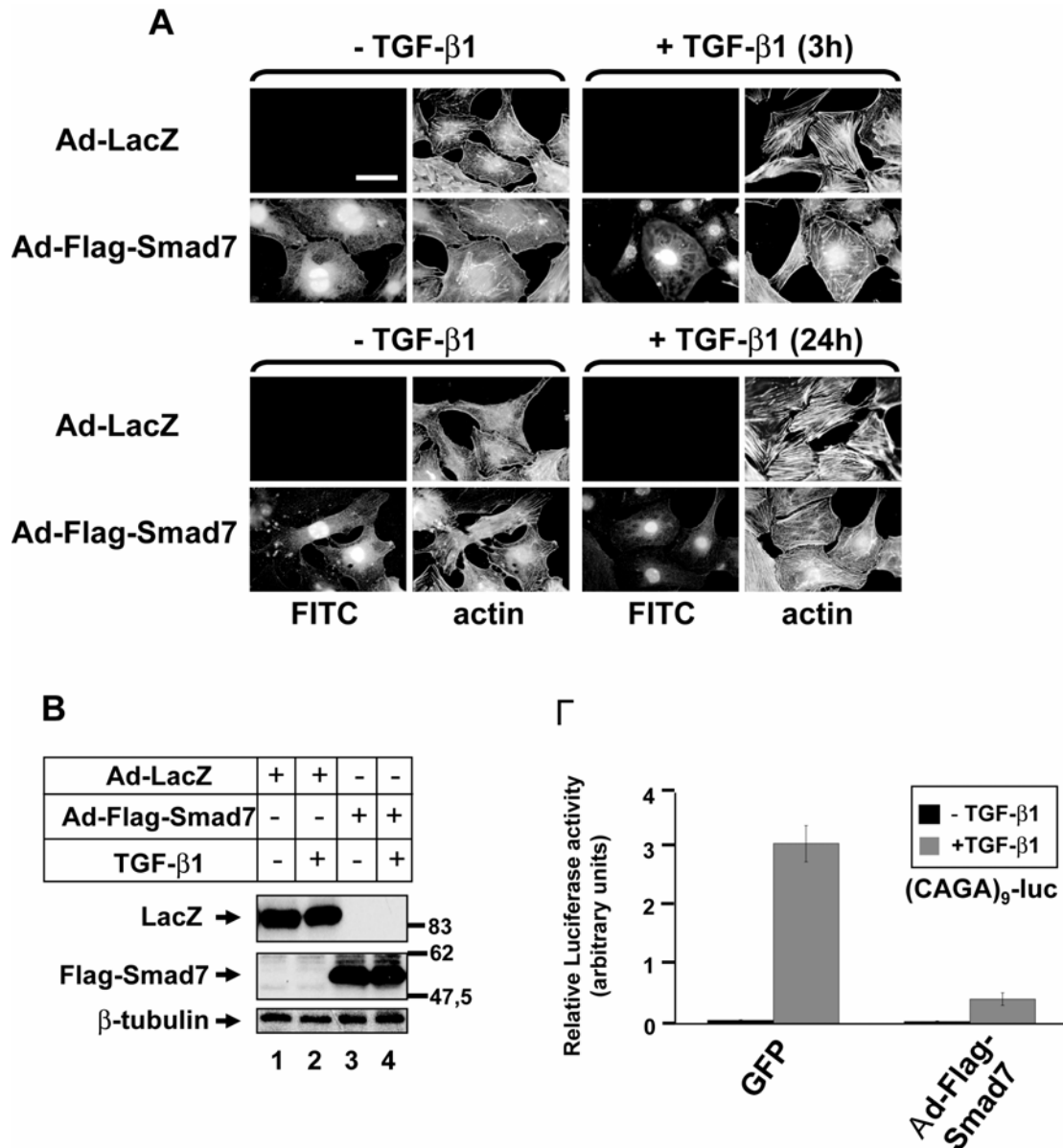
Αρχικά, τα κύτταρα μελετήθηκαν μορφολογικά με έμμεση διπλή χρώση ανοσοφθορισμού και συμβατική μικροσκοπία (εικόνα 3.6.2.1.A). Σε αντίθεση με τα κύτταρα ελέγχου, τα οποία είχαν επιμολυνθεί με τον αδενοϊό LacZ, υπερέκφραση της Smad7 παρεμποδίζει την ικανότητα του TGF-β1 να επάγει πολυμερισμό της ακτίνης τόσο στις 3 όσο και στις 24 ώρες επίδρασης με τον παράγοντα (εικόνα 3.6.2.1.A). Το αποτέλεσμα οφείλονταν στην υπερέκφραση της Smad7 και όχι σε κάποιο τεχνούργημα (artifact) εξαιτίας της παροδικής επιμόλυνσης των κυττάρων με τον αδενοϊό, ενώ οι δόσεις των αδενοϊών που χρησιμοποιήθηκαν δεν επηρέασαν την ζωτικότητα των κυττάρων. Επιπλέον τα επίπεδα έκφρασης του LacZ και της Smad7 ήταν παραπλήσια (εικόνα 3.6.2.1.B). Η ικανότητα της Smad7 να αναστέλει το Smad

μονοπάτι επιβεβαιώθηκε με πειράματα μεταγραφικής ενεργοποίησης του τεχνητού υποκινητή (CAGA)₉-luciferase (εικόνα 3.6.2.1.Γ).

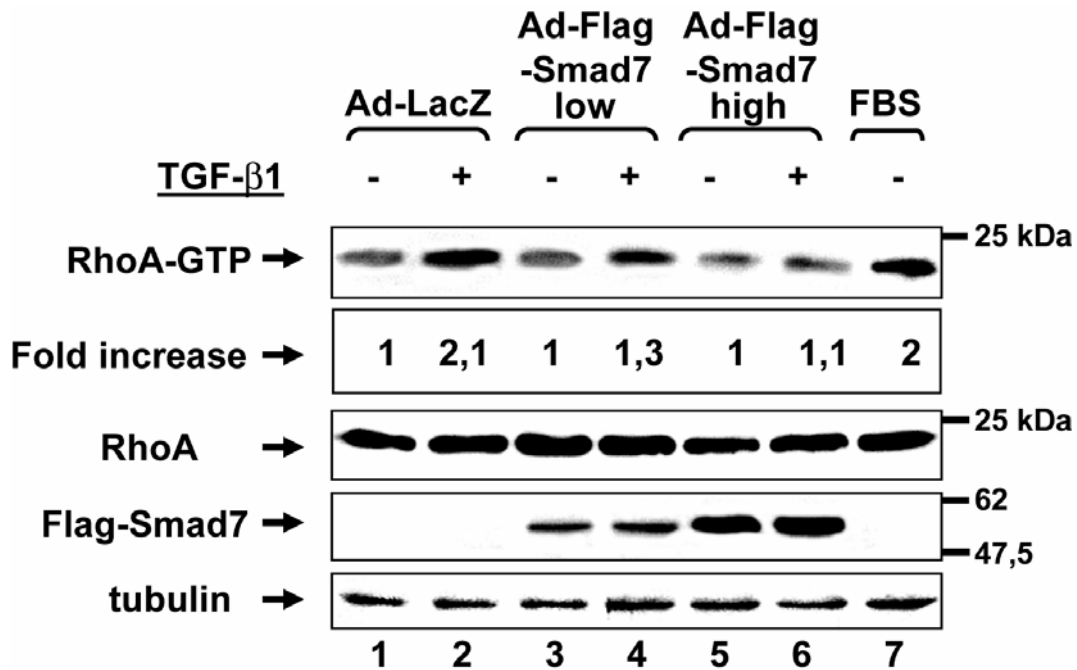
Τέλος, μελετήθηκε το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης της πρωτεΐνης Smad7 στην ενεργοποίηση της RhoA από τον TGF-β1 (εικόνα 3.6.2.2.). Τα κύτταρα επιμόλυνθηκαν παροδικά με αδενοϊό που εκφράζει το γονίδιο LacZ (κύτταρα ελέγχου), και Smad7 σε χαμηλή και υψηλή πολλαπλότητα επιμόλυνσης (MOI). Καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, και ενεργοποιήθηκαν με TGF-β1 για 10 λεπτά, γιατί σε αυτή τη χρονική στιγμή η ενεργοποίηση της RhoA παρουσιάζει μέγιστο (παράγραφος 3.2.2.). Η ενεργοποιημένη RhoA διαχωρίστηκε από το κυτταρικό εκχύλισμα με πειράματα κατακρήμνισης συγγένειας, χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-GST-RBD (εικόνα 3.6.2.2., 1^η γραμμή).

Επιμόλυνση με αδενοϊό που εκφράζει την Smad7 σε χαμηλή πολλαπλότητα επιμόλυνσης είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της ενεργοποίησης της RhoA στους Swiss3T3 ινοβλάστες, ενώ επιμόλυνση με τέσσερις φορές υψηλότερη πολλαπλότητα επιμόλυνσης, όπου πλέον όλα τα κύτταρα εκφράζουν την πρωτεΐνη Smad7, είχε σαν αποτέλεσμα την ολική παρεμπόδιση ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β1. Η υπερέκφραση της Smad7 δεν είχε καμμία επίπτωση στα επίπεδα της ενδογενούς RhoA στους Swiss3T3 ινοβλάστες (εικόνα 3.6.2.2., 3^η γραμμή).

Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η ανασταλτική Smad, Smad7, παρεμβαίνει και παρεμποδίζει την επαγόμενη από τον TGF-β1 ενεργοποίηση της RhoA, και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.



Εικόνα 3.6.2.1.: Η ανασταλτική πρωτεΐνη *Smad7* παρεμποδίζει την επαγόμενη από τον *TGF-β1* αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. (Α) συμβατική μικροσκοπία *Swiss3T3* ινοβλαστών μετά από παροδική επιμόλυνση με τους αναγραφόμενους αδενοϊκούς φορείς έκφρασης. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml *TGF-β1* για 3 και 24 ώρες. Ακολούθησε έμμεση διπλή χρώση ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-Flag-M5, που αναγνωρίζει την *Flag-Smad7* πρωτεΐνη και κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φλουορεσκίνη (FITC) και άμεση χρώση με ροδαμίνη-φαλλοιδίνη για τα μικροϊνίδια της ακτίνης. Η γραμμή αντιπροσωπεύει 10 μm. (Β) Ανάλυση με ανοσοαποτύπωση ολικών κυτταρικών εκχυλισμάτων από παράλληλα πειράματα με αυτά του Α, χρησιμοποιώντας τις ίδιες δόσεις αδενοϊών και ενεργοποίηση με 5 ng/ml *TGF-β1* για 3 ώρες. Χρησιμοποιήθηκαν αντισώματα έναντι της *LacZ*, του επιτόπου *Flag* της υπερεκφρασμένης *Smad7* και της *β-τουμπουλίνης*. (Γ) γράφημα κανονικοποιημένης ενεργότητας λουσιφεράσης από *Swiss3T3* ινοβλάστες μετά από παροδική επιμόλυνση με τους αναγραφόμενους αδενοϊούς συν τον τεχνητό υποκινητή (CAGA)₉-luciferase και *LacZ* σαν γονίδιο αναφοράς. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στην συνέχεια ενεργοποιήθηκαν (+) ή όχι (-) με 5 ng/ml *TGF-β1* για 3 ώρες. Στο γράφημα εμφανίζονται οι μέσες τιμές 3 ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 3.6.2.2.: Πειράματα υπολογισμού της ενεργής *RhoA-GTP* σε *Swiss3T3* ινοβλάστες μετά από παροδική επιμόλυνση με υψηλή δόση αδενοϊού *LacZ* (διάδρομοι 1 και 2), και με χαμηλή (διάδρομοι 3 και 4) και υψηλή δόση αδενοϊού *Smad7* (διάδρομοι 5 και 6). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml *TGF-β1* (διάδρομοι 2, 4 και 6) ή με *FBS* 10% (διάδρομος 7) για 10 λεπτά. Παρουσιάζεται ανοσοαποτύπωση των *RhoA-GTP*, *RhoA* ολική πρωτεΐνη, *Flag-M5* (*Smad7*) και β -τουμπουλίνη. Εγινε ανάλυση με οπτική πυκνομετρία και η ένταση των ζωνών της *RhoA-GTP* κανονικοποιήθηκε με την ένταση των αντίστοιχων ζωνών της ολικής *RhoA*. Η μέση αύξηση του λόγου *RhoA-GTP/RhoA* αναγράφεται στη δεύτερη γραμμή.

3.6.3. Υπερέκφραση των R-Smad, Smad2 και Smad3, οδηγεί σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και ενεργοποίηση της *RhoA* από τον παράγοντα *TGF-β1* στους *Swiss3T3* ινοβλάστες.

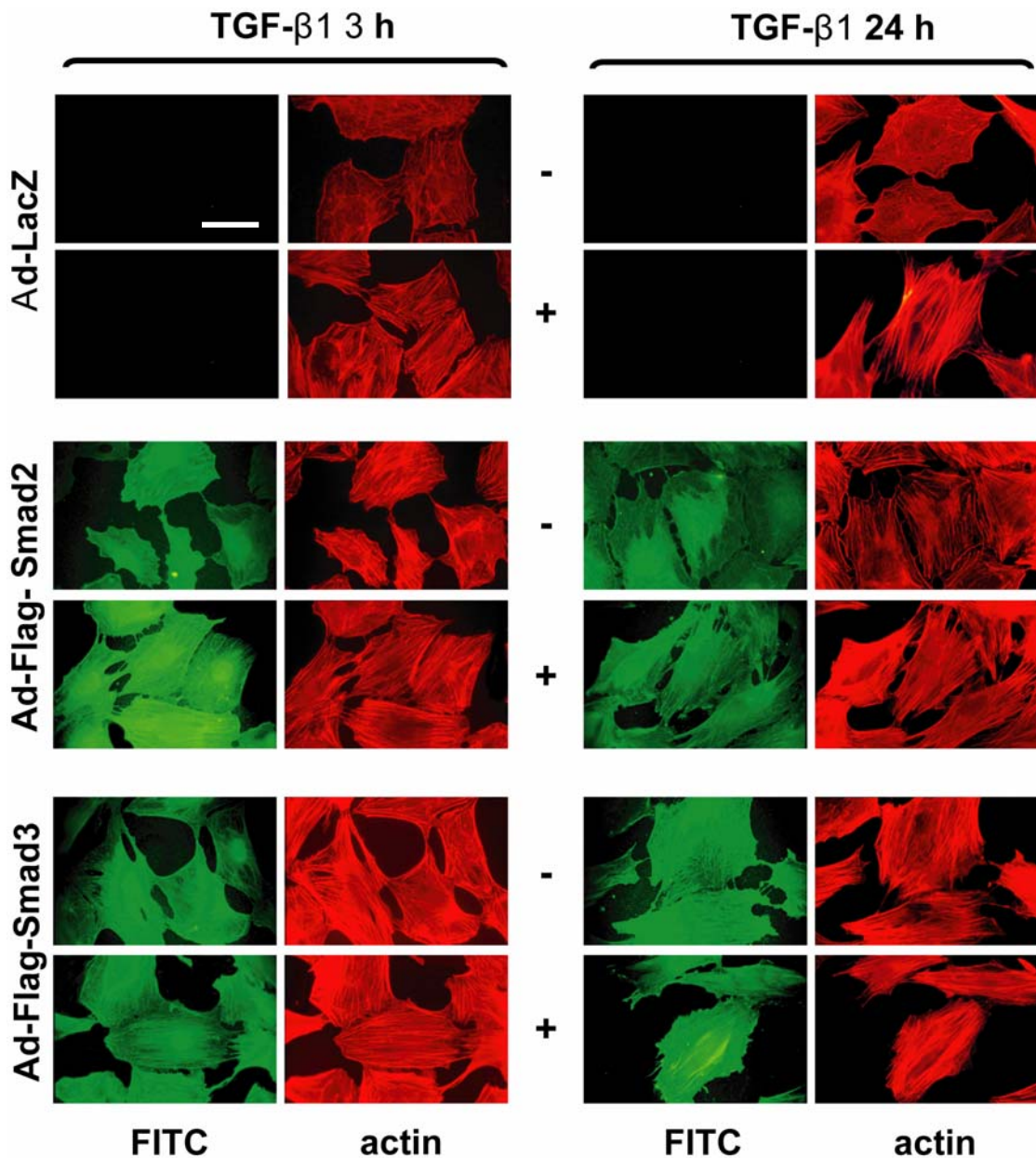
Τα αποτελέσματα των δύο προηγούμενων παραγράφων σχετικά με τον μεταλλαγμένο L45 υποδοχέα (caALK-5mL45) και την υπερέκφραση της *Smad7* στους *Swiss3T3* ινοβλάστες, έδειξαν πιθανή συμμετοχή του μονοπατιού των *Smad* πρωτεϊνών στη μετάδοση του μηνύματος από τον *TGF-β1* προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Με σκοπό να διερευνηθεί περαιτέρω ο ρόλος των κυτταροπλασματικών *Smad*, *Smad2* και *Smad3* στη μετάδοση του μηνύματος από τον *TGF-β1* προς την ακτίνη, οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν στους *Swiss3T3* ινοβλάστες μετά από παροδική επιμόλυνση

με αδενοϊκούς φορείς που εκφράζουν τις Smad2 και Smad3 αντίστοιχα στην αγρίου τύπου (wild type) μορφή.

Αρχικά, τα κύτταρα μελετήθηκαν μορφολογικά με έμμεση διπλή χρώση ανοσοφθορισμού και συμβατική μικροσκοπία (εικόνα 3.6.3.1). Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με αδενοϊό για την έκφραση των γονιδίων του LacZ (κύτταρα ελέγχου), της Smad2 και της Smad3. Καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 3 και 24 ώρες αντίστοιχα (εικόνα 3.6.3.1). Ακολούθησε έμμεση διπλή χρώση ανοσοφθορισμού με αντίσωμα έναντι του επιτόπου Flag των υπερεκφρασμένων πρωτεϊνών Smad2 και Smad3, κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φλουορεσκίνη (FITC), και άμεση χρώση του κυτταροσκελετού της ακτίνης με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη. Στα κύτταρα στα οποία υπερεκφράστηκε η Smad2 εμφανίστηκε αυξημένος αριθμός μικροϊνιδίων ακτίνης. Επιπλέον επίδραση με TGF-β1 οδήγησε στη χαρακτηριστική μεταβολή της μορφολογίας των κυττάρων. Υπερέκφραση της Smad2 για μία ακόμη μέρα (δεξιά στήλη, 3^η σειρά φωτογραφιών) οδήγησε σε μεταβολή της μορφολογίας των κυττάρων και εμφάνιση των παράλληλων ινιδίων του στρες ακόμη και απουσία TGF-β1.

Παρομοίως, στα κύτταρα στα οποία υπερεκφράστηκε η Smad3, παρατηρήθηκε ακόμη εντονότερα η αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης απουσία του παράγοντα, αλλά και η έντονη μεταβολή του σχήματος των κυττάρων. Επιπλέον επίδραση με τον παράγοντα σε Swiss3T3 ινοβλάστες στους οποίους υπερεκφράστηκε η Smad3, οδήγησε σε αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε μεγαλύτερο βαθμό από τα κύτταρα μάρτυρες (LacZ + TGF-β1) (εικόνα 3.6.3.1. 5^η και 6^η σειρά φωτογραφιών).

Προκειμένου να επιβεβαιωθούν οι μορφολογικές παρατηρήσεις από τα πειράματα ανοσοφθορισμού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού του λόγου μονομερούς προς ολική ακτίνη με κλασματοποίηση των πρωτεϊνών και απομόνωση των διαλυτού και αδιάλυτου σε Triton-X-100 κλασμάτων. Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με τους ίδιους αδενοϊούς όπως και στα πειράματα ανοσοφθορισμού που αναφέρονται παραπάνω, καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 3 και 24 ώρες. Τα κυτταρικά εκχυλίσματα από κάθε δείγμα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό του λόγου μονομερούς προς ολική ακτίνη.



Εικόνα 3.6.3.1.: Οι πρωτεΐνες *Smad2* και *Smad3* επάγουν έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε *Swiss3T3* ινοβλάστες. Συμβατική μικροσκοπία *Swiss3T3* ινοβλαστών μετά από παροδική επιμόλυνση με τους αναγραφόμενους αδενοϊικούς φορείς έκφρασης. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF- β 1 για 3 (αριστερή στήλη) και 24 (δεξιά στήλη) ώρες. Ακολούθησε έμμεση διπλή χρώση ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-Flag-M5, κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φλουορεσκίνη (FITC) και άμεση χρώση με ροδαμίνη-φαλλοϊδίνη για τα μικροινίδια της ακτίνης. Η γραμμή αντιπροσωπεύει 10 μ m.

Τα αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 3.6.3., επιβεβαίωσαν τις μορφολογικές παρατηρήσεις δείχνοντας ότι και μόνο η υπερέκφραση των Smad2 ή Smad3 οδήγησε σε μείωση του λόγου μονομερούς G / ολική ακτίνη από 0,42±0,02 σε 0,35±0,00, ενώ επιπλέον ενεργοποίηση με TGF-β1 οδήγησε σε ακόμα μεγαλύτερη μείωση του λόγου.

Πίνακας 3.6.3.: Παροδική επιμόλυνση Swiss3T3 ινοβλαστών με αδενοϊούς για την έκφραση των Smad2 και Smad3 και προσδιορισμός του λόγου μονομερούς G / ολική ακτίνη με τη μέθοδο της κλασματοποίησης των πρωτεϊνών και απομόνωση των διαλυτών και αδιάλυτων σε Triton-X-100 κλασμάτων.

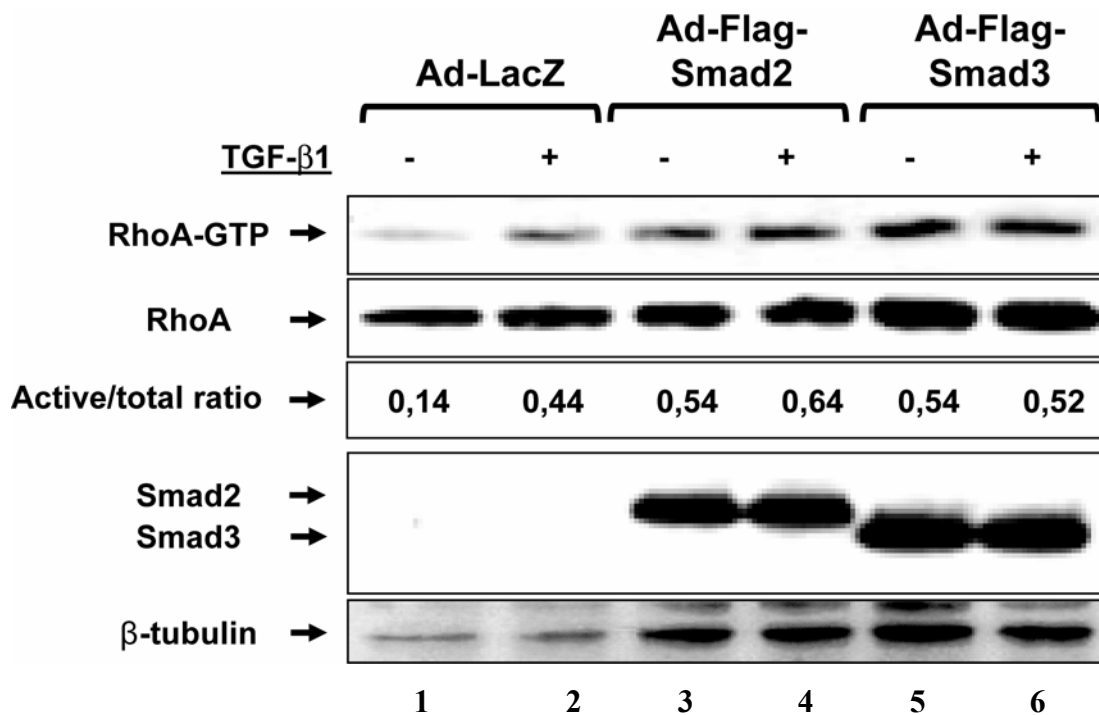
Δείγμα	G/ολική ακτίνη	± stErr
LacZ	0,42	0,01
LacZ / + TGF-β1	0,38*	0,01
Smad2	0,35*	0,00
Smad2 / + TGF-β1	0,34*	0,01
Smad3	0,35*	0,00
Smad3 / + TGF-β1	0,34*	0,02

Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με αδενοϊούς για την έκφραση των γονιδίων LacZ (κύτταρα ελέγχου), Smad2 και Smad3, καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν (+) ή όχι (-) με 5 ng/ml TGF-β1 για 24 ώρες. Ο λόγος G/ολική ακτίνη προσδιορίστηκε με κλασματοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε κλάσματα διαλυτά ή αδιάλυτα στο Triton-X-100. Ο λόγος παρουσιάζεται στην μεσαία στήλη (* $p < 0,05$), ενώ στην τελευταία στήλη αναγράφεται το σχετικό λάθος των μέσων τιμών. Τα αποτελέσματα είναι αντιπροσωπευτικά από τρία ανεξάρτητα πειράματα.

Τέλος, μελετήθηκε το αποτέλεσμα της υπερέκφρασης των πρωτεϊνών Smad2 και Smad3 στην ενεργοποίηση της RhoA (εικόνα 3.6.3.2.). Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με αδενοϊό που εκφράζει το γονίδιο LacZ (κύτταρα ελέγχου), Smad2 και Smad3 σε κατάλληλη πολλαπλότητα επιμόλυνσης (MOI) ώστε περισσότερο από το 80% των κυττάρων να εκφράζουν τις πρωτεΐνες. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, και ενεργοποιήθηκαν με TGF-β1 για 10

λεπτά. Η ενεργοποιημένη Rho διαχωρίστηκε από το κυτταρικό εκχύλισμα με πειράματα κατακρήμνισης συγγένειας, χρησιμοποιώντας τα σφαιρίδια γλουταθειόνης-GST-RBD (εικόνα 3.6.3.2., 1^η σειρά). Παρατηρήθηκε ότι επιμόλυνση των κυττάρων με αδενοϊό που εκφράζει την Smad2 ή την Smad3 είχε σαν αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της ενεργοποίησης της RhoA στους Swiss3T3 ινοβλάστες, ακόμα και απουσία TGF-β1 (σύγκριση διαδρόμων 2, 3, και 5), ενώ επιπλέον ενεργοποίηση με TGF-β1 είχε σαν αποτέλεσμα την ακόμα μεγαλύτερη αύξηση της παρουσίας της ενεργής RhoA-GTP στο κυτταρικό εκχύλισμα (σύγκριση διαδρόμων 2, 4 και 6).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φάνηκε ότι η υπερέκφραση των Smad2 και Smad3 είναι από μόνη της ικανή να επάγει πολυμερισμό της ακτίνης και ενεργοποίηση της RhoA σε Swiss3T3 ινοβλάστες.



Εικόνα 3.6.3.2.: Πειράματα υπολογισμού της ενεργής RhoA-GTP σε Swiss3T3 ινοβλάστες μετά από παροδική επιμόλυνση με αδενοϊούς για την έκφραση των LacZ (διάδρομοι 1 και 2), Smad2 (διάδρομοι 3 και 4) και Smad3 (διάδρομοι 5 και 6). Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 (διάδρομοι 2, 4 και 6) για 10 λεπτά. Παρουσιάζεται ανοσοαποτίπωση των RhoA-GTP, RhoA ολική πρωτεΐνη, Flag-M5 (Smad2 και Smad3) και β-τουμπουλίνη. Εγινε ανάλυση με οπτική πυκνομετρία και η ένταση των ζωνών της RhoA-GTP κανονικοποιήθηκε με την ένταση των αντίστοιχων ζωνών της ολικής RhoA. Ο λόγος RhoA-GTP/ ολική RhoA αναγράφεται.

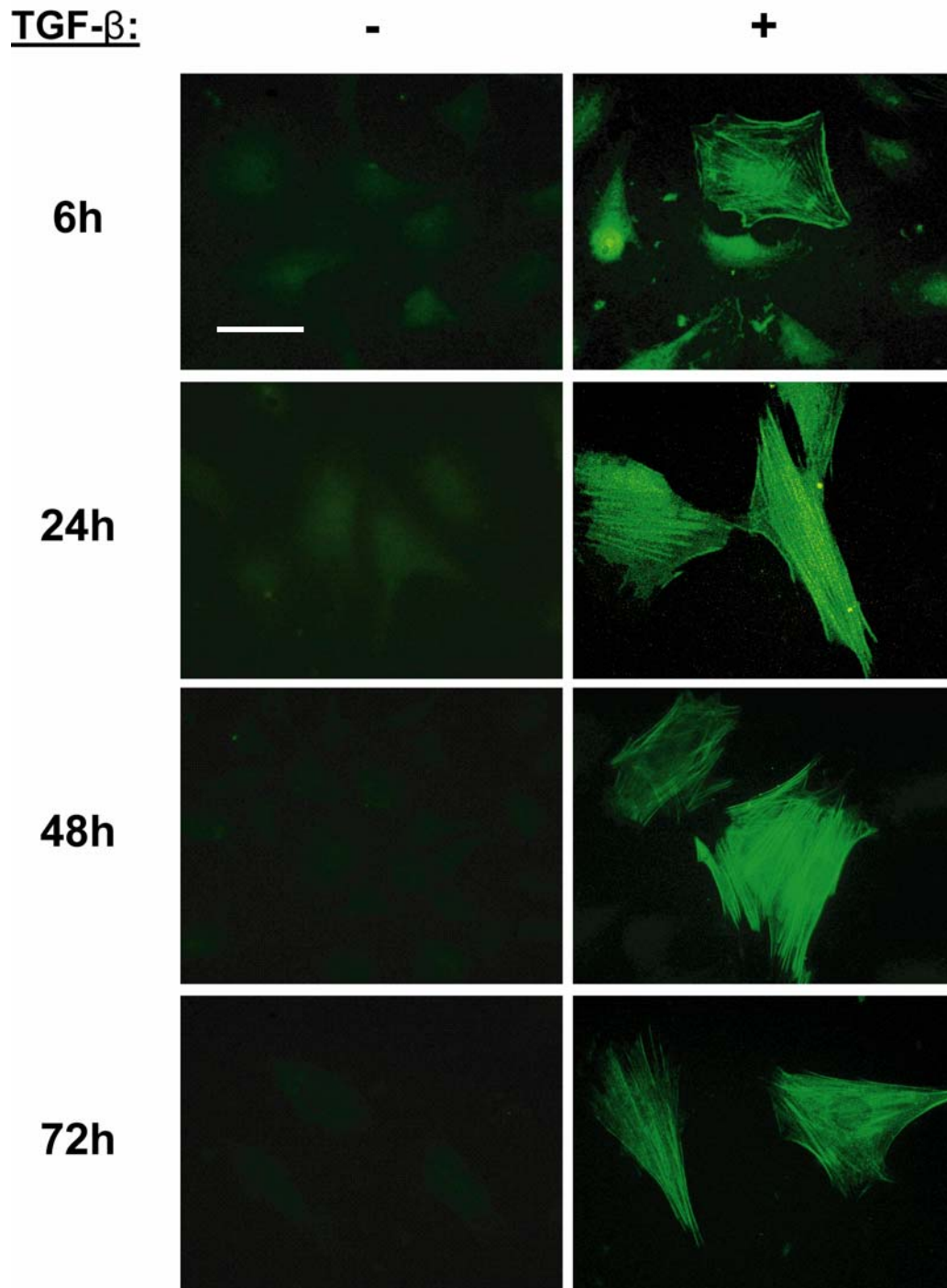
3.7. Ο παράγοντας TGF-β1 οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης της α-λείας μυϊκής ακτίνης (α-Smooth Muscle actin, α-SMA)

Οι ινοβλάστες υπό κανονικές συνθήκες εκφράζουν τις δύο μόνο ισομορφές της ακτίνης, τη β- και τη γ- . Επίδραση με τον παράγοντα TGF-β1 οδηγεί σε μετασχηματισμό των ινοβλαστών σε μυοβλάστες, επάγοντας έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Χαρακτηριστικά οι μυοβλάστες θεωρούνται μια ενδιάμεση μορφή κυττάρων μεταξύ των ινοβλαστών και των λείων μυϊκών κυττάρων, με κυριότερο δείκτη αναγνώρισής τους την έκφραση σε υψηλά επίπεδα της α-λείας-μυϊκής ακτίνης, α-SMA. Με σκοπό να διερευνηθεί αν στις συνθήκες των πειραμάτων που εκτελέστηκαν, ο παράγοντας TGF-β1 οδηγεί σε αύξηση της α-SMA στους Swiss3T3 ινοβλάστες, τα κύτταρα μελετήθηκαν μορφολογικά με συμβατική μικροσκοπία.

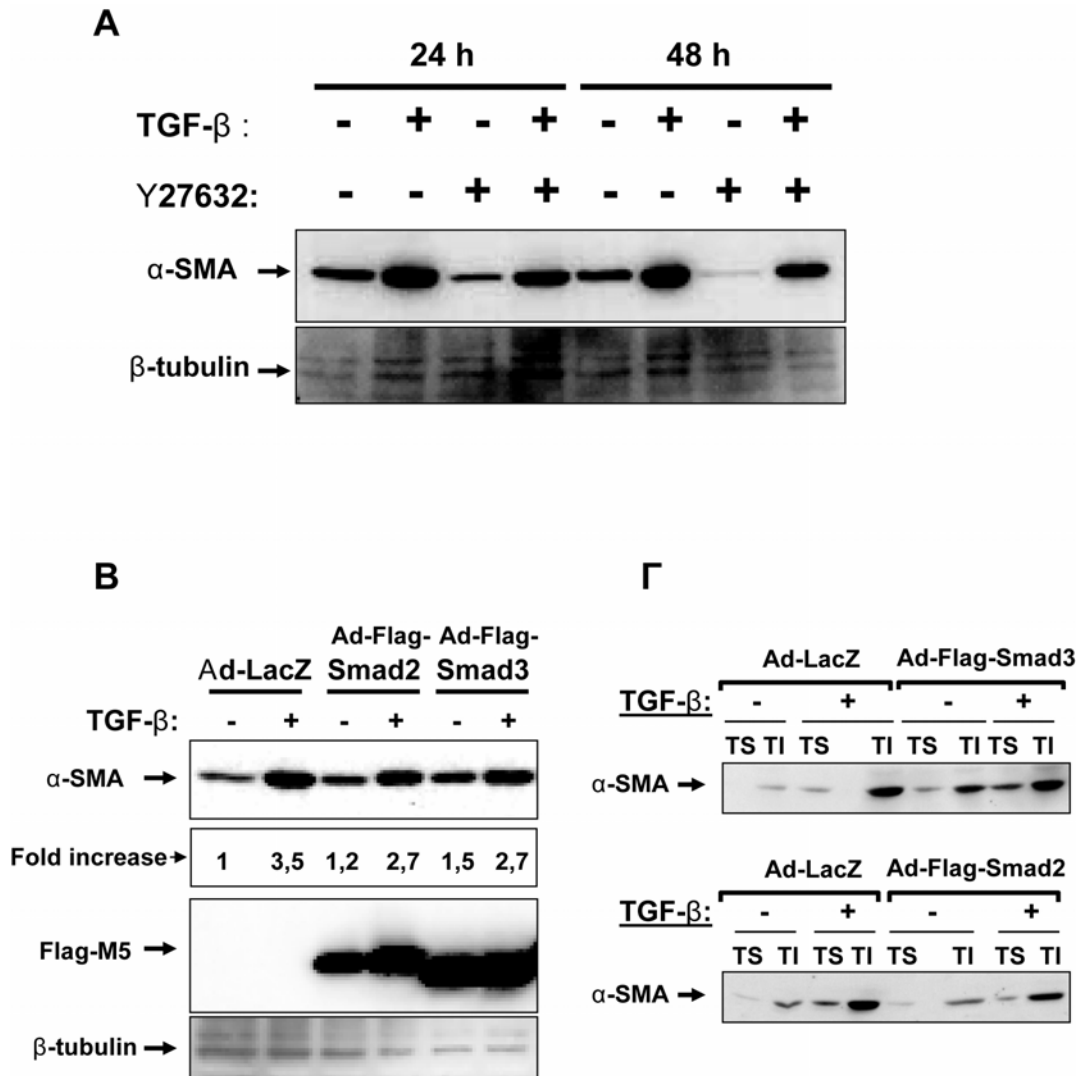
Swiss3T3 ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 6, 24, 48 και 72 ώρες. Ακολούθησε έμμεση χρώση των κυττάρων με εξειδικευμένο αντίσωμα έναντι της α-SMA και κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φλουορεσκίνη (FITC) (εικόνα 3.7.1). Τα κύτταρα μάρτυρες, τα οποία δεν είχαν ενεργοποιηθεί με τον παράγοντα, εμφάνισαν μια ασθενή και διάχυτη χρώση στο κυτταρόπλασμα, η οποία σε καμμία περίπτωση δεν ήταν οργανωμένη σε ινδιακές δομές (εικόνα 3.7.1. αριστερή περιοχή). Επώαση με τον παράγοντα TGF-β1, οδήγησε σε αύξηση της έντασης της χρώσης και οργάνωση της α-SMA σε ινδιακές δομές, σε όλο και μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων καθώς αυξάνονταν οι ώρες επώασης με τον παράγοντα.

Τα αποτελέσματα των μορφολογικών παρατηρήσεων επιβεβαιώθηκαν και με πειράματα ανοσοαποτύπωσης για την α-SMA (εικόνα 3.7.2.A). Τα κύτταρα αφού καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες , προ-επώαστηκαν με τον αναστολέα της ROCK1, Y27632, και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF-β1 για 24 και 48 ώρες. Από τα αποτελέσματα γίνεται εμφανής η παρουσία της α-SMA στα κύτταρα ακόμα και απουσία του παράγοντα. Επίδραση με TGF-β1 οδήγησε σε αύξηση της πρωτεΐνης στο κυτταρικό εκχύλισμα, αύξηση η οποία δεν φάνηκε να παρεμποδίζεται από την παρουσία του αναστολέα Y27632 στο κυτταρικό μέσο καλλιέργειας (εικόνες 3.7.2.A., διάδρομοι 3, 4 και 7, 8).

Τέλος διερευνήθηκε ο ρόλος των Smad2 και Smad3 στη έκφραση της α -SMA στους Swiss3T3 ινοβλάστες (εικόνα 3.7.2.B και Γ). Τα κύτταρα μετά από παροδική επιμόλυνση με τους αδενοϊκούς φορείς έκφρασης για την Smad2 ή την Smad3 αντίστοιχα, καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια ενεργοποιήθηκαν με 5 ng/ml TGF- β 1 για ακόμα 24 ώρες. Παρατηρήθηκε αύξηση της παρουσίας της α -SMA σε κύτταρα που υπερ-εκφράζουν την Smad3 αν και όχι στον ίδιο βαθμό με τα κύτταρα μάρτυρες τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TGF- β 1 για 24 ώρες (εικόνα 3.7.2.B., διάδρομοι 5, 6). Παρουσία της Smad2, παρατηρήθηκε πολύ μικρή αύξηση της α -SMA που θα μπορούσε να αγγίζει τα όρια του στατιστικού λάθους (εικόνα 3.7.2.B., διάδρομοι 3, 4). Τα αποτελέσματα αυτά επιβεβαιώθηκαν με ανοσοαποτύπωση της α -SMA σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης που είχαν αποτυπωθεί τα κλάσματα του διαχωρισμού του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε διαλυτά ή αδιάλυτα στο Triton-X-100 (βλέπε παράγραφο 3.6.3). Παρουσία της πρωτεΐνης Smad3 παρατηρήθηκε αύξηση της α -SMA στο αδιάλυτο στο Triton-X-100 κλάσμα ακόμα και απουσία TGF- β 1 (εικόνα 3.7.2.Γ., πάνω σειρά, σύγκριση διαδρόμων 1, 2 και 5, 6), αντίθετα με την Smad2 όπου δεν παρατηρήθηκε αυτή η αύξηση (εικόνα 3.7.2.Γ., κάτω σειρά, σύγκριση διαδρόμων 1, 2 και 5, 6).



Εικόνα 3.7.1.: Ο παράγοντας TGF-β1 οδηγεί σε αύξηση της α-SMA και ενσωμάτωση της σε μικροϊνίδια στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Συμβατική μικροσκοπία Swiss3T3 ινοβλαστών και έμμεσος ανοσοφθορισμός για την πρωτεΐνη α-SMA. Τα κύτταρα καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν(+) ή όχι (-) με 5 ng/ml TGF-β1 για 6, 24, 48 και 72 ώρες. Ακολούθησε έμμεση διπλή χρώση ανοσοφθορισμού με αντίσωμα anti-α-SMA και κατάλληλο δεύτερο αντίσωμα σημασμένο με φλουορεσκίνη (FITC). Η γραμμή αντιπροσωπεύει 10 μm.



Εικόνα 3.7.2.: Μελέτη της έκφρασης της α -SMA σε Swiss3T3 ινοβλάστες μετά από επίδραση του παράγοντα TGF- β 1 ή υπερέκφραση των Smad2 και Smad3. (A) Swiss3T3 ινοβλάστες καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν (+) ή όχι (-) με 10 μ m Y27632 και ενεργοποιήθηκαν (+) ή όχι (-) με 5 ng/ml TGF- β 1 για 24 και 48 ώρες. Έγινε ανοσοαποτύπωση έναντι της α -SMA, αφαίρεση των αντισωμάτων από τη νιτροκυτταρίνη (stripping) και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της β -τουμπουλίνης για κανονικοποίηση των αποτελεσμάτων. (B) Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με τους αναγραφόμενους αδενοϊικούς φορείς, καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν (+) ή όχι (-) με 5 ng/ml TGF- β 1 για 24 ώρες. Έγινε ανοσοαποτύπωση με τα αντισώματα anti- α -SMA, anti-flag-M5 (έναντι του επιτόπου flag των Smad πρωτεϊνών) και anti- β -τουμπουλίνης. (Γ) Swiss3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν παροδικά με τους αναγραφόμενους αδενοϊικούς φορείς, καλλιεργήθηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και ενεργοποιήθηκαν (+) ή όχι (-) με 5 ng/ml TGF- β 1 για 24 ώρες. Ακολούθησε κλασματοποίηση των κυτταρικών εκχυλισμάτων σε κλάσματα διαλυτά ή αδιάλυτα στο Triton-X-100 και ανοσοαποτύπωση με αντίσωμα έναντι της α -SMA.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Ο παράγοντας TGF- β μεταβάλλει την μορφολογία των κυττάρων ελέγχοντας τη μεταναστευτική τους ικανότητα, το μετασχηματισμό των επιθηλιακών ή ενδοθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT), ή τον μετασχηματισμό ινοβλαστών σε μυοβλάστες, διεργασίες που είναι κρίσιμης σημασίας κατά τη διάρκεια της εμβρυογένεσης, της εξέλιξης του καρκίνου ή της διαδικασίας επούλωσης πληγών (Condeelis & Segall, 2003; Gabbiani, 2003; Tosh & Slack, 2002; Gotzmann et al., 2004; Vaughan et al., 2000).

Η κίνηση των κυττάρων αποτελεί μια θεμελιώδη διαδικασία. Τα ινίδια της ακτίνης και οι πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτά είναι τα κύρια δομικά συστατικά που ελέγχουν όλα τα στάδια κατά τη διάρκεια της κίνησης του κυττάρου. Ωστόσο, οι μοριακοί μηχανισμοί που ελέγχουν την κινητικότητα των κυττάρων από τον παράγοντα TGF- β 1 έχουν ελάχιστα διερευνηθεί.

Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον παράγοντα TGF- β 1 μελετήθηκε σε δύο κυτταρικές σειρές ινοβλαστών, Swiss3T3 και MEF's. Οι μορφολογικές παρατηρήσεις από πειράματα ανοσοφθορισμού έδειξαν ότι ο TGF- β 1 επάγει άμεσα έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η οποία είναι εμφανής πολύ νωρίς, ήδη 15 λεπτά μετά την επίδραση με τον παράγοντα και γίνεται εντονότερη με την πάροδο του χρόνου συνοδευόμενη και από μεταβολή στο σχήμα των κυττάρων (εικόνες 3.1.1. και 3.1.3.). Τα αποτελέσματα των μορφολογικών παρατηρήσεων επιβεβαιώθηκαν ποσοτικά με προσδιορισμό του λόγου μονομερούς προς ολική ακτίνη (πίνακας 3.1.). Η σχετική μείωση του λόγου G/ολική ακτίνη αντικατοπτρίζει τη μετατόπιση της δυναμικής ισορροπίας προς την πολυμερή μορφή. Παράλληλα πειράματα δοκιμής επούλωσης πληγής έδειξαν ότι, η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF- β 1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες, συνοδεύεται και από αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων (εικόνα 3.5.).

Ο παράγοντας TGF- β 1 εκτός από τον μετασχηματισμό επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, εμπλέκεται και στη διαδικασία μετασχηματισμού ινοβλαστών σε μυοβλάστες. Η δράση του στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, έχει δείχθει και στο παρελθόν σε ινοβλάστες από πνεύμονα ανθρώπου και αρουραίου και σε πρωτογενείς καλλιέργειες ανθρώπινων μυοβλαστών από ασθενείς του συνδρόμου Dupuytren's (Evans et al., 2003; Roy et al., 2001; Vaughan et al., 2000). Ο μετασχηματισμός ινοβλαστών σε μυοβλάστες συμβαίνει φυσιολογικά κατά την επούλωση πληγών. Ο όρος μυοβλάστες χρησιμοποιείται για να περιγράψει ινοβλαστικά κύτταρα που βρίσκονται στον ανασχηματιζόμενο ιστό, και των οποίων

τα χαρακτηριστικά βρίσκονται ενδιάμεσα από αυτά των ινοβλαστών και των λείων μυϊκών κυττάρων (Gabbiani, 2003). Μετά το μηχανικό στρες κατά τη δημιουργία μιας πληγής, οι ινοβλάστες ενεργοποιούνται από τον TGF- β ή τον παράγοντα PDGF που εκκρίνονται τοπικά από μακροφάγα και διαφοροποιούνται αρχικά σε πρωτομυοβλάστες και στη συνέχεια σε μυοβλάστες. Ο ρόλος αυτών των κυττάρων στην επούλωση της πληγής είναι η ανασύσταση του συνδετικού ιστού. Αυτό επιτυγχάνεται με αύξηση της παραγωγής εξωκυττάριας ουσίας (κολλαγόνο, φιμπρονεκτίνη), και ανάπτυξη δύναμης σύσπασης που θα βοηθήσει το κλείσιμο των δύο άκρων της πληγής (Gabbiani, 2003; Tomasek et al., 2002). Δυσλειτουργίες στην αλληλουχία των γεγονότων, έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση παθολογικών φαινομένων που χαρακτηρίζονται από υπερβολική απόθεση εξωκυττάριας ουσίας κατά την ανασύσταση του συνδετικού ιστού.

Στους Swiss3T3 ινοβλάστες, ο παράγοντας TGF- β 1 ενεργοποιεί δύο μέλη των Rho GTPασών, τη RhoA και τη RhoB (εικόνα 3.2.2.). Η ενεργοποίηση και των δύο πρωτεϊνών αποδείχθηκε απαραίτητη για την επαγόμενη από τον TGF- β 1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, αφού υπερέκφραση της μόνιμου ανενεργής μορφής είτε της RhoA είτε της RhoB παρεμποδίζει τον πολυμερισμό της ακτίνης (εικόνα 3.2.3.). Τα αποτελέσματα αυτά έρχονται σε συμφωνία με προηγούμενα πειράματα που έγιναν στο εργαστήριο μας σε μετασχηματισμένους NIH3T3/Ras ινοβλάστες. Σε αυτό το κυτταρικό σύστημα δε δείχθηκε απευθείας η ενεργοποίηση των Rho GTPασών. Ωστόσο, η χρήση της τοξίνης εξωτρανσφεράση-C3 που αναστέλει εξειδικευμένα τη δράση των Rho πρωτεϊνών, υπέδειξε έμμεσα τη συμμετοχή των Rho πρωτεϊνών στο σηματοδοτικό μονοπάτι που μεταδίδει το μήνυμα από τον TGF- β 1 στον κυτταροσκελετό της ακτίνης (Moustakas & Stournaras, 1999). Οι πρωτεΐνες RhoA και RhoB αν και παρουσιάζουν υψηλή ομολογία και συχνά ο ρόλος τους θεωρείται ότι είναι λειτουργικά αλληλεπικαλυπτόμενος (functionally redundant), εμφανίζουν παράλληλα και εξειδίκευση ως προς τη δράση τους. Από τη βιβλιογραφία είναι γνωστό ότι η RhoB εντοπίζεται στα ώριμα ενδοσωμάτια και τα λυσοσωμάτια ελέγχοντας την ενδοκυττική κυκλοφορία υποδοχέων αυξητικών παραγόντων όπως του υποδοχέα του EGF (Wheeler & Ridley, 2004; Ellis & Mellor, 2000; Gampell et al., 1999). Ο υποδοχέας του EGF μετά την ενεργοποίηση του από τον παράγοντα, εισέρχεται στο κύτταρο μέσω της εξαρτώμενης – από την κλαθρίνη – ενδοκύττωσης, και μέσω των πρώιμων και ώριμων ενδοσωματίων καταλήγει στα λυσοσωμάτια για αποικοδόμηση (Wherlock et al., 2004). Αυξημένη παρουσία της

RhoB στα ώριμα ενδοσωμάτια έχει σαν αποτέλεσμα, την καθυστέρηση της εξόδου του υποδοχέα από τα ώριμα ενδοσωμάτια στα λυσοσωμάτια και την καθυστέρηση της αποικοδόμησης του (Wherlock et al., 2004). Η ενεργοποίηση τόσο της RhoA όσο και της RhoB από τον TGF-β1 είναι απαραίτητη για την επαγόμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και ο ρόλος τους δεν μπορεί να θεωρηθεί λειτουργικά αλληλεπικαλυπτόμενος αφού υπερέκφραση της μονίμως ανενεργής μορφής είτε της RhoA είτε της RhoB παρεμποδίζει τον επαγόμενο από τον TGF-β πολυμερισμό της ακτίνης. Εναλλακτικά, η ενεργοποίηση της RhoB θα μπορούσε να παίζει κάποιο ρόλο στην διαδικασία ενδοκύττωσης του υποδοχέα του TGF-β1, ερώτημα το οποίο αξίζει μελλοντικής διερεύνησης.

Από την πρόσφατη βιβλιογραφία είναι φανερό ότι διάφορα μέλη των μικρών GTPασών συμμετέχουν στο σηματοδοτικό μονοπάτι που οδηγεί από τον TGF-β1 στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε διάφορα κυτταρικά μοντέλα. Πράγματι, επίδραση με TGF-β1 σε NMuMG επιθηλιακά κύτταρα από μαστό ποντικού οδηγεί σε ενεργοποίηση της RhoA, η οποία μάλιστα είναι αναγκαία και απαραίτητη για τον μετασχηματισμό των κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Bhowmick et al., 2001). Επιπλέον, επίδραση του TGF-β1 στα καρκινικά κύτταρα από προστάτη PC-3U, οδηγεί σε άμεση αναδιοργάνωση της ακτίνης και δημιουργία λαμελιποδίων, ενώ μακρόχρονη επίδραση του παράγοντα έχει σαν αποτέλεσμα τον πολυμερισμό της ακτίνης και την εμφάνιση ινιδίων του στρες. Σε αυτά τα κύτταρα ο TGF-β1 ενεργοποιεί τόσο την RhoA όσο και την Cdc42 (Edlund et al., 2002). Φαίνεται λοιπόν ότι υπάρχει εξειδίκευση ως προς το ποιες GTPάσες ενεργοποιούνται κάθε φορά από τον παράγοντα ανάλογα με την κυτταροσκελετική απόκριση διαφορετικών κυτταρικών μοντέλων.

Η παρούσα μελέτη καταδεικνύει για πρώτη φορά τον κεντρικό ρόλο της κυτταροπλασματικής πρωτεΐνης LIMK2 σε μη γενωμικό σηματοδοτικό μονοπάτι του TGF-β1. Το εύρημα αυτό αποδεικνύεται ιδιαίτερα σημαντικό μια και η LIMK2 συνδέει την οικογένεια των Rho GTPασών ανοδικά (upstream) με την κοφιλίνη καθοδικά (downstream) και την μεταβολή της δυναμικής κατάστασης ισορροπίας του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Η κοφιλίνη δρα σαν αποπολυμεριστικός παράγοντας για την ακτίνη. Δεσμεύεται κατά προτίμηση σε μονομερή ADP-ακτίνης και παρεμποδίζει την ανταλλαγή του νουκλεοτιδίου ενώ ταυτόχρονα προσδένεται και αποσταθεροποιεί ινίδια ADP-ακτίνης, καθώς συνδέεται στο αιχμηρό άκρο και αυξάνει την ταχύτητα

αποπολυμερισμού τους (Maciver, 1988 ; Carlier, 1999). Η δράση της ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης της συντηρημένης σερίνης-3 από τις LIM κινάσες, οπότε αναστέλεται η δράση της οδηγώντας έτσι σε αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης (Bamburg et al., 1999).

Στους Swiss3T3 ινοβλάστες, ο TGF-β1 επάγει άμεσα ενεργοποίηση της LIMK2, η οποία συνοδεύεται από αυξημένη φωσφορυλίωση της ενδογενούς κοφιλίνης η οποία συγκατακρημνίζεται μαζί της (εικόνα 3.3.1.A.). Παράλληλα, ενεργοποίηση των κυττάρων από τον TGF-β1 μεταβάλλει τον κυτταροπλασματικό εντοπισμό της LIMK2. Συγκεκριμένα, απουσία ερεθίσματος η LIMK2 εμφανίζεται διάχυτη στο κυτταρόπλασμα με ελαφρώς εντονότερο εντοπισμό περιμετρικά του πυρήνα. Ενεργοποίηση των κυττάρων με TGF-β1 έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του συνεντοπισμού της LIMK2 με ινδιακές δομές (εικόνα 3.3.2.). Επιπλέον, η γονιδιακή αποσιώπηση της LIMK2 με τη χρήση μικρών κατασταλτικών RNA (siRNA), ανέστειλε δραματικά τον επαγόμενο από τον TGF-β1 πολυμερισμό της ακτίνης (εικόνα 3.3.3.2.). Η χρήση siRNA έναντι του γονιδίου της LIMK2, μείωσε περίπου στο 30% το επίπεδο έκφρασης της πρωτεΐνης στα κύτταρα, πιθανότατα λόγω μειωμένης αποτελεσματικότητας της παροδικής επιμόλυνσης στο συγκεκριμένο κυτταρικό μοντέλο. Ωστόσο, η μείωση αυτή των επιπέδων της ενδογενούς LIMK2 είχε άμεσο αντίκρυσμα τόσο στην επαγόμενη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης όσο και στην φωσφορυλίωση της κοφιλίνης (εικόνα 3.3.3.1.).

Αντίθετα, όλα τα πειραματικά δεδομένα στους Swiss3T3 ινοβλάστες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η LIMK1 δεν συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1, αφού δεν παρατηρήθηκε αύξηση της φωσφορυλίωσης της πρωτεΐνης ούτε και μεταβολή του κυτταροπλασματικού της εντοπισμού μετά από ενεργοποίηση των κυττάρων με τον παράγοντα.

Τα δεδομένα αυτά καταδεικνύουν έναν νέο διακριτό τρόπο ενεργοποίησης της LIMK2 μέσω των Rho GTPασών και της πρωτεΐνης ROCK1 από τον τύπου I υποδοχέα του TGF-β1, σε αντιδιαστολή με την ενεργοποίηση της LIMK1 από τον τύπου II υποδοχέα του παράγοντα BMP (BMPRII). Η LIMK1 συνδέεται άμεσα με την μακριά κυτταροπλασματική ουρά του BMPRII, και μεσολαβεί στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον παράγοντα BMP κατά τη διάρκεια της μορφογένεσης νευρικών δενδριτών (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004). Αντίθετα με τον τύπου II υποδοχέα του BMP, στην πρωτοταγή αμινοξική αλληλουχία

του τύπου I ή του τύπου II υποδοχέα του TGF- β δεν απαντώνται οι αλληλουχίες που μεσολαβούν για την αλληλεπίδραση με την LIMK1 και επιπλέον δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση της LIMK1 μετά την ενεργοποίηση των Swiss3T3 ινοβλαστών από τον παράγοντα. Οι πρωτεΐνες LIMK1 και LIMK2 φωσφορυλιώνονται από την πρωτεΐνη ROCK1 στη θρεονίνη-508 ή τη θρεονίνη-505 αντίστοιχα (Ohashi et al., 2000 ; Amano et al., 2001 ; Sumi et al., 2001). Εναλλακτικά, οι μικρές GTPάσες ενεργοποιούν την πρωτεΐνη PAK1 η οποία στη συνέχεια φωσφορυλιώνει την LIMK1 (Ohashi et al., 2000; Maekawa et al., 1999; Edwards et al., 1999). Μετά από πειράματα ταυτόχρονης έκφρασης των δύο πρωτεϊνών LIMK1 και LIMK2 σε κύτταρα HeLa, αναφέρεται ότι η LIMK1 ενεργοποιείται καθοδικά της Rac αλλά όχι της Rho ή της Cdc42, ενώ η LIMK2 ενεργοποιείται καθοδικά των Rho και Cdc42 και όχι της Rac (Sumi et al., 1999). Παρουσιάζει ενδιαφέρον το γεγονός ότι ο παράγοντας TGF- β 1 ενεργοποιεί τις Rho GTPάσες, επάγωντας αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, κινητοποιώντας καθοδικά των Rho πρωτεϊνών το μονοπάτι ROCK1 / LIMK2 / κοφιλίνη. Ο τρόπος της εξειδίκευσης των σηματοδοτικών μονοπατιών αξίζει περαιτέρω μελλοντικής ανάλυσης, μια και θα μπορούσε να διαφωτίσει τον τρόπο με τον οποίο οι μικρές Rho GTPάσες και οι πρωτεϊνικές κινάσες τελεστές τους οργανώνονται γύρω από τον υποδοχέα του TGF- β και κινητοποιούν τις διαφορετικές κυτταρικές αποκρίσεις.

Η πρωτεΐνη που συνδέει τις Rho GTPάσες με τη LIMK2 είναι η πρωτεϊνική κινάση ROCK1, αφού επώαση των κυττάρων με έναν εξειδικευμένο αναστολέα της παρεμποδίζει τόσο την επαγόμενη από τον TGF- β 1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όσο και την ενεργοποίηση της LIMK2 και την φωσφορυλίωση της κοφιλίνης. Η πρωτεΐνη ROCK1 ενεργοποιείται από τον TGF- β 1 και κατά τον μετασχηματισμό επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (Bhowmick et al., 2001; Edlund et al., 2002).

Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Rho / ROCK1 / LIMK2 / κοφιλίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγόμενη από τον TGF- β 1 μετανάστευση των Swiss3T3 ινοβλαστών αφού αναστολή του μονοπατιού με τον εξειδικευμένο αναστολέα της ROCK1 περιορίζει σημαντικά την αυξημένη μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων. Αξίζει μελλοντικής διερεύνησης η επίδραση του TGF- β στον πολλαπλασιασμό ή την απόπτωση των Swiss3T3 ινοβλαστών καθώς και ο ρόλος τόσο της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης όσο και του σηματοδοτικού μονοπατιού των Rho GTPασών σε αυτές τις κυτταρικές αποκρίσεις

Η ενεργοποίηση του μη γενωμικού μονοπατιού των Rho GTPασών από τον TGF-β1, είναι καθοριστικής σημασίας για την άμεση κυτταροσκελετική απόκριση στον παράγοντα. Ωστόσο, το φαινόμενο της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1 δεν είναι παροδικό. Αντίθετα διαρκεί και μάλιστα γίνεται εντονότερο μετά από μακρόχρονη ενεργοποίηση των κυττάρων με τον παράγοντα. Η μακροπρόθεσμη απόκριση των κυττάρων στον παράγοντα TGF-β, εξαρτάται από τη μεταγραφική ενεργοποίηση και επομένως από την ενεργοποίηση γενωμικών μονοπατιών (Moustakas & Heldin, 2005; Edlund et al, 2002). Μελλοντική διερεύνηση της πιθανής μεταγραφικής ρύθμισης μορίων του νέου μονοπατιού Rho / ROCK / LIMK2 / κοφιλίνη από τον TGF-β1, θα βοηθήσει στην κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν την μακροχρόνια επίδραση του παράγοντα στον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Τα τελευταία χρόνια έχει εδραιωθεί ο ρόλος των Smad πρωτεϊνών ως τα κεντρικά μόρια-κλειδιά της μετάδοσης του μηνύματος από το σύμπλοκο των υποδοχέων του TGF-β στον πυρήνα, ενεργοποιώντας τη μεταγραφή πλήθους γονιδίων και ελέγχοντας έτσι την κυτταρική απόκριση στον παράγοντα. Ωστόσο, και άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια ενεργοποιούνται από τον TGF-β, ελέγχοντας διάφορες βιολογικές λειτουργίες, όπως είναι η απόπτωση, ο πολλαπλασιασμός των κυττάρων, η διαφοροποίηση και ο μετασχηματισμός επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά (EMT) (Moustakas & Heldin, 2005). Τα σημαντικότερα-ανεξάρτητα των Smad πρωτεϊνών-μονοπάτια είναι αυτά των MAP κινασών, των Rho GTPασών και της κινάσης επιβίωσης Akt (Moustakas & Heldin, 2005; Shi & Massagué, 2003).

Τα δεδομένα που προκύπτουν από την πρόσφατη βιβλιογραφία θέτουν όλο και πιο ισχυρά το ερώτημα, κατά πόσο τα μονοπάτια αυτά λειτουργούν ανεξάρτητα από αυτό των Smad πρωτεϊνών. Επιπλέον, αναδεικνύουν ένα νέο κυτταροπλασματικό ρόλο των Smad, εκτός από την ικανότητα τους να μεταβαίνουν στον πυρήνα ελέγχοντας τη μεταγραφή γονιδίων (Lee et al., 2004; Zhang et al., 2004). Η πρωτεΐνη Smad2 ενεργοποιεί την ERK σε καρκινικά κύτταρα που μεγαλώνουν ανεξάρτητα από προσφύσεις, ενώ η Smad3 δεσμεύεται στη ρυθμιστική υπομονάδα της πρωτεϊνικής κινάσης A, PKA, ενεργοποιώντας την ενζυμική δράση της πρωτεΐνης.

Μετά την ταυτοποίηση του νέου μη γενωμικού μονοπατιού που ελέγχει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες, τέθηκε το ερώτημα της πιθανής επικοινωνίας του με την κλασσική σηματοδοτική μηχανή του TGF-β.

Η αλληλουχία των σηματοδοτικών γεγονότων όπως καθορίστηκε από την παρούσα μελέτη, δείχνει ότι ο τύπου I υποδοχέας του TGF- β είναι υπεύθυνος για την ενεργοποίηση του μονοπατιού των Rho GTPασών που οδηγεί τελικά στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Πράγματι, ο ρόλος του τύπου I υποδοχέα του TGF- β (T β RI) αποδείχθηκε όταν υπερεκφράστηκε στους Swiss3T3 ινοβλάστες μια μεταλλαγμένη μορφή του T β RI (caALK-5) - που τον καθιστά μονίμως ενεργό ως προς τη δράση κινάσης - και αναλύθηκε η κυτταρική απόκριση απουσία του παράγοντα TGF- β 1. Τα κύτταρα στα οποία εκφράστηκε ο caALK-5 εμφάνισαν έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και μεταβολή του σχήματος τους όπως ακριβώς και σε κύτταρα μάρτυρες τα οποία ενεργοποιήθηκαν με TGF- β 1 για 24 ώρες (εικόνα 3.6.1.1.). Επιπλέον, υπερέκφραση του caALK-5 οδήγησε σε ενεργοποίηση της RhoA απουσία ενεργοποίησης των κυττάρων με τον παράγοντα TGF- β 1 (εικόνα 3.6.1.2.). Από αυτά τα αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι για την επαγόμενη από τον TGF- β αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και την ενεργοποίηση των Rho GTPασών μεσολαβεί ο τύπου I υποδοχέας του, T β RI.

Για την πρόσδεση και ενεργοποίηση των Smad στον τύπου I υποδοχέα του TGF- β , είναι αποφασιστικής σημασίας μια αλληλουχία μέσα στην περιοχή με δράση κινάσης του T β R-I, η θηλιά-L45 (L45 loop). Η περιοχή αυτή αναγνωρίζεται από τις Smad πρωτεΐνες και προσδίδει την εξειδίκευση ως προς το ποιές Smad θα προσδεθούν και θα ενεργοποιηθούν από τον υποδοχέα (Feng & Derynck, 1997 ; Chen et al., 1998 ; Persson et al., 1998). Μεταλλάξεις σε αυτή την περιοχή του υποδοχέα παρεμποδίζουν την πρόσδεση των R-Smad και άλλων παραγόντων όπως είναι οι βοηθητικές πρωτεΐνες XIAP και Dab-2 (Disabled-2), όχι όμως και την πρόσδεση της ανασταλτικής Smad, Smad7 (Itoh et al., 2003; Yu et al., 2002).

Το ερώτημα σχετικά με την συμμετοχή των Smad πρωτεϊνών στην επαγόμενη από τον TGF- β 1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και ενεργοποίηση του μονοπατιού των Rho GTPασών προσεγγίστηκε αρχικά με παροδική επιμόλυνση των Swiss3T3 ινοβλαστών με έναν διπλά μεταλλαγμένο υποδοχέα. Ο caALK-5mL45 εκτός από τη σημειακή μετάλλαξη που τον καθιστά μονίμως ενεργό έχει μια επιπλέον μετάλλαξη στην θηλιά L45 που καθιστά αδύνατη την πρόσδεση και ενεργοποίηση των Smad (Itoh et al., 2003; Yu et al., 2002). Η υπερέκφραση του caALK-5mL45 στους Swiss3T3 ινοβλάστες ήταν αναποτελεσματική ως προς την ενεργοποίηση της κυτταροσκελετικής απόκρισης των κυττάρων, αν και εκφραζόταν στα κύτταρα σε

παρόμοια επίπεδα με τον caALK-5 (εικόνα 3.6.1.1.). Επιπλέον, ο caALK-5mL45 απέτυχε να ενεργοποιήσει την πρωτεΐνη RhoA (εικόνα 3.6.1.2.).

Εφόσον η θηλιά L45 είναι η περιοχή που είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση των R-Smad στον τύπου I υποδοχέα, τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν έναν πιθανό και άμεσο ρόλο των Smad πρωτεϊνών στην ενεργοποίηση των Rho GTPασών και στην επαγόμενη από τον TGF-β1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Εναλλακτικά, στην περιοχή αυτή θα μπορούσαν να συνδέονται και άλλοι παράγοντες, όπως πρωτεΐνες GEF's (Guanine exchange factors), οι οποίες θα μπορούσαν να εμπλέκονται στην ενεργοποίηση της κυτταροσκελετικής απόκρισης στον TGF-β μέσω ενεργοποίησης των Rho GTPασών.

Τις προηγούμενες παρατηρήσεις ενισχύουν τα αποτελέσματα που ελήφθησαν μετά από παροδική επιμόλυνση των κυττάρων με αδενοϊκό φορέα έκφρασης για την ανασταλτική πρωτεΐνη Smad7. Η πρωτεΐνη Smad7 αλληλεπιδρά σταθερά με τον τύπου I υποδοχέα και ανταγωνίζεται την σύνδεση των R-Smad παρεμποδίζοντας έτσι τη φωσφορυλίωση τους (de Caestecker, 2004; Shi & Massagué, 2003; Moustakas et al., 2002). Επιπλέον, η Smad7 στρατολογεί τις E3 λιγάσες ουβικιτίνης, Smurf's, στο σύμπλοκο των υποδοχέων ενεργοποιώντας την αποικοδόμηση του (Di Guglielmo et al., 2003; Razani et al., 2001; Kavsak et al., 2000). Η έκφραση του γονιδίου της Smad7 επάγεται από τον παράγοντα TGF-β1, προσφέροντας έτσι έναν αρνητικό μηχανισμό ελέγχου του μονοπατιού (Nagarajan et al., 1999; Afrakhte et al., 1998).

Υπερέκφραση της Smad7 σε Swiss3T3 ινοβλάστες παρεμποδίζει την ικανότητα του TGF-β1 να επάγει πολυμερισμό της ακτίνης τόσο στις 3 όσο και στις 24 ώρες επίδρασης με τον παράγοντα (εικόνα 3.6.2.1.). Επιπλέον, παροδική επιμόλυνση με αδενοϊκό φορέα έκφρασης της Smad7 με τέτοια πολλαπλότητα επιμόλυνσης ώστε όλα τα κύτταρα να εκφράζουν την πρωτεΐνη, είχε σαν αποτέλεσμα την ολική παρεμπόδιση ενεργοποίησης της RhoA από τον TGF-β1 (εικόνα 3.6.2.2.). Από τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύεται ότι παρεμπόδιση της ενεργοποίησης των R-Smad, παρεμβαίνει τόσο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης όσο και στην ενεργοποίηση του μονοπατιού των Rho GTPασών, που οδηγεί τελικά στην κυτταροσκελετική απόκριση των κυττάρων στον TGF-β1.

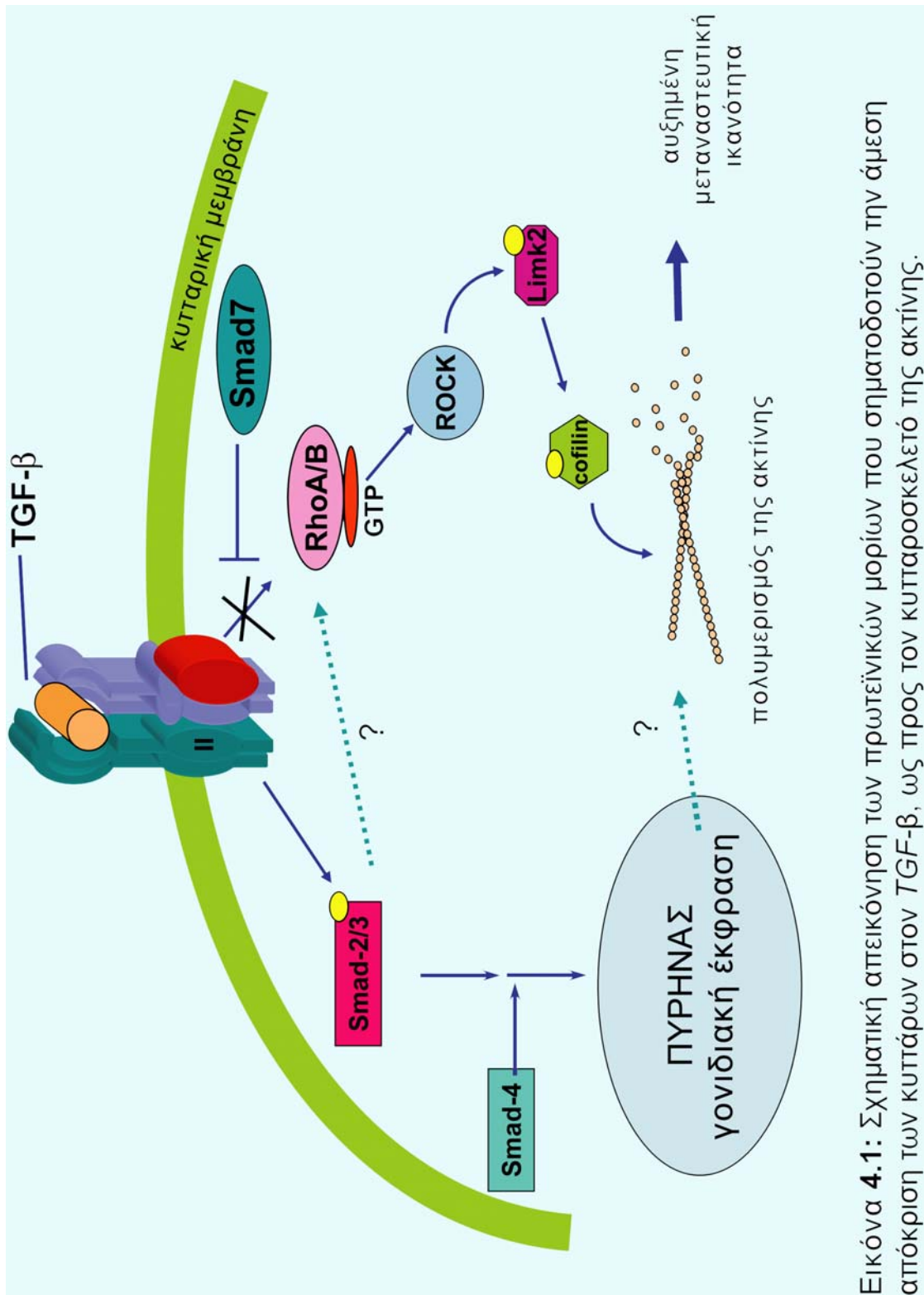
Ωστόσο, από την πρόσφατη βιβλιογραφία καταδεικνύεται ένας ακόμη διαφορετικός ρόλος για την πρωτεΐνη Smad7. Στα καρκινικά κύτταρα του προστάτη PC-3U, ο παράγοντας TGF-β1 ενεργοποιεί τις μικρές GTPάσες RhoA και Cdc42 επάγοντας κυτταροσκελετικές αλλαγές. Στα κύτταρα αυτά, υπερέκφραση της Smad7 επάγει

ενεργοποίηση της Cdc42, και σε πολύ μικρότερο βαθμό της RhoA. Γονιδιακή αποσιώπηση της Smad7 παρεμποδίζει την επαγόμενη από τον TGF- β 1 ενεργοποίηση της Cdc42 (όχι όμως και της RhoA), καθώς και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε αυτά τα κύτταρα (Edlund et al., 2004). Ο διαφορετικός ρόλος της Smad7 πιθανόν να οφείλεται σε διαφορετική εξειδίκευση ως προς την κυτταρική απόκριση ανάλογα με τον κυτταρικό τύπο και αξίζει μελλοντικής διερεύνησης.

Τα αποτελέσματα σχετικά με τον μεταλλαγμένο L45 υποδοχέα (caALK-5mL45) και την υπερέκφραση της Smad7 στους Swiss3T3 ινοβλάστες, υποδεικνύουν ότι είναι πολύ πιθανή η συμμετοχή του μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών στη μετάδοση του μηνύματος από τον TGF- β 1 προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Προκειμένου να υποστηριχθεί περαιτέρω αυτή η υπόθεση, διερευνήθηκε ο ρόλος των κυτταροπλασματικών Smad2 και Smad3 στην κυτταροσκελετική απόκριση στον TGF- β 1. Οι πρωτεΐνες εκφράστηκαν στους Swiss3T3 ινοβλάστες μετά από παροδική επιμόλυνση με αδενοϊικούς φορείς που εκφράζουν τις Smad2 και Smad3 αντίστοιχα στην αγρίου τύπου (wild type) μορφή. Μορφολογική και βιοχημική ανάλυση των Swiss3T3 ινοβλαστών απουσία ενεργοποίησης με τον παράγοντα TGF- β 1, κατέδειξε ότι υπερέκφραση είτε της Smad2 είτε της Smad3 οδηγεί σε έντονο πολυμερισμό της ακτίνης. Το φαινόμενο παρατηρήθηκε εντονότερα στα κύτταρα στα οποία υπερεκφράστηκε η Smad3, στα οποία εκτός από αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης, παρατηρήθηκε και η χαρακτηριστική έντονη μεταβολή του σχήματος των κυττάρων, η οποία παρατηρείται μετά από μακροχρόνια ενεργοποίηση με τον παράγοντα (24 ώρες ή περισσότερο) (εικόνα 3.6.3.1). Παράλληλα, υπερέκφραση της Smad2 ή της Smad3 σε Swiss3T3 ινοβλάστες επάγει ακόμα και απουσία ενεργοποίησης των κυττάρων με TGF- β 1 την ενεργοποίηση της RhoA. Καταδεικνύεται έτσι για πρώτη φορά, ότι οι κυτταροπλασματικές Smad, δηλαδή οι Smad2 και Smad3 εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και συμβάλουν στην ενεργοποίηση των Rho GTPασών. Ο μετασχηματισμός επιθηλιακών κυττάρων σε μεσεγχυματικά, και των ινοβλαστών σε μυοβλάστες, χαρακτηρίζεται από αυξημένη έκφραση της ισομορφής της α -λείας μυϊκής ακτίνης (α -Smooth muscle actin, α -SMA) (Evans et al., 2003; Masszi et al., 2003; Roy et al., 2001; Vaughan et al., 2000). Στην παρούσα μελέτη, μορφολογική και βιοχημική ανάλυση Swiss3T3 ινοβλαστών κατέδειξε ότι ενεργοποίηση των κυττάρων με TGF- β 1 οδηγεί σε αυξημένα επίπεδα α -SMA στα κύτταρα. Μάλιστα, η

α -SMA που εκφράζεται εντοπίζεται κυρίως στο αδιάλυτο κυτταροσκελετικό κλάσμα, καθώς ενσωματώνεται αμέσως σε ινίδια ακτίνης (εικόνα 3.6.2.Γ, διάδρομοι 1-4). Αναστολή της πρωτεΐνης ROCK1, με τον εξειδικευμένο αναστολέα της Y27632, μειώνει τα βασικά επίπεδα έκφρασης της α -SMA σε μη ενεργοποιημένα κύτταρα. Ωστόσο, δεν παρεμποδίζει την επαγωγή έκφραση της α -SMA από τον TGF- β 1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες (εικόνα 3.6.2.A). Παρομοίως, στην επιθηλιακή κυτταρική σειρά LLC-PK₁ η έκφραση της α -SMA από τον TGF- β 1 δεν παρεμποδίζεται όταν στα κύτταρα εκφραστεί η ROCK στην επικρατούσα ανενεργή της μορφή (Masszi et al., 2003). Στην ίδια κυτταρική σειρά η ενεργοποίηση της RhoA παίζει διπλό ρόλο στον επαγόμενο από τον TGF- β 1 μετασχηματισμό των κυττάρων, αφού είναι απαραίτητη και για την αναδιοργάνωση της ακτίνης και για την ενεργοποίηση της έκφρασης της α -SMA. Αξίζει να διερευνηθεί αν η ενεργοποίηση των Rho GTPασών στους Swiss3T3 ινοβλάστες παίζει κάποιο ρόλο στην ενεργοποίηση της έκφρασης του γονιδίου της α -SMA, είτε μέσω του μονοπατιού ROCK / LIMK2 / κοφιλίνη, είτε μέσω ενεργοποίησης κάποιου άλλου μονοπατιού. Τέλος, υπερέκφραση της Smad3 απουσία ενεργοποίησης των κυττάρων με TGF- β οδήγησε σε αυξημένη έκφραση της α -SMA στους Swiss3T3 ινοβλάστες, αν και όχι στον ίδιο βαθμό με κύτταρα που ενεργοποιήθηκαν με τον παράγοντα για 24 ώρες. Η επίδραση της υπερέκφρασης της Smad2 ήταν ακόμα μικρότερη, στα όρια του στατιστικού λάθους. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα υπερέκφρασης της Smad3 σε ηπατικά κύτταρα (Hepatic stellate cells), η οποία οδήγησε σε αυξημένη απόθεση εξωκυττάριας ουσίας και αυξημένη έκφραση της α -SMA (Uemura et al., 2005). Αντίθετα, σε ινοβλάστες από ανθρώπινο πνεύμονα η υπερέκφραση της Smad2 (και όχι της Smad3 ή της Smad4) απουσία TGF- β 1, ήταν αρκετή για την αύξηση του mRNA της α -SMA στα κύτταρα και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Ο ρόλος των Smad πρωτεϊνών αξίζει περαιτέρω διερεύνησης για να αποσαφηνιστεί η συμμετοχή τους τόσο στην άμεση απόκριση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στον TGF- β 1, όσο και στην μακρόχρονη σταθεροποίηση των κυτταροσκελετικών αλλαγών με την επαγωγή έκφρασης του γονιδίου της α -SMA. Συμπερασματικά, η σημασία της παρούσας διατριβής βασίζεται στο γεγονός της ταυτοποίησης για πρώτη φορά, των πρωτεϊνικών μορίων που σηματοδοτούν την άμεση απόκριση των κυττάρων στον TGF- β , ως προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Το μονοπάτι που ταυτοποιήθηκε ξεκινά από τον τύπου I υποδοχέα του TGF- β και μέσω των Rho GTPασών RhoA και RhoB, ROCK1, LIMK2 και κοφιλίνης

καταλήγει στον πολυμερισμό της ακτίνης (εικόνα 4.1). Επίσης, καταδεικνύονται για πρώτη φορά στοιχεία που υποδεικνύουν μια πιθανή επικοινωνία μεταξύ του μη γενωμικού μονοπατιού των Rho GTPασών που ενεργοποιείται από τον παράγοντα TGF- β 1, με το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών, μια και η έκφραση των Smad2 και Smad3 επηρεάζει την ενεργοποίηση του. Τα αποτελέσματα αυτά αποτελούν τη βάση για την κατανόηση των μηχανισμών που ελέγχουν την επαγόμενη από τον TGF- β μεταναστευτική ικανότητα των κυττάρων και αξίζουν μελλοντικής πειραματικής διερεύνησης, η οποία θα καταστήσει δυνατή την εύρεση του βαθμού της πιθανής επικοινωνίας μεταξύ των δύο μονοπατιών.



Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση των πρωτεϊνικών μορίων που σηματοδοτούν την άμεση απόκριση των κυτάρων στον TGF-β, ως προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

5. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Το γενικό συμπέρασμα που εξάγεται από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής είναι ότι ο παράγοντας TGF- β 1 έχει την ικανότητα να μεταβάλλει την οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης ινοβλαστών, γεγονός που φαίνεται ότι ρυθμίζει ταυτόχρονα την κινητικότητα των κυττάρων. Βρέθηκε ότι η κυτταροσκελετική απόκριση των κυττάρων γίνεται μέσα από ένα μη γενωμικό μεταγωγικό μονοπάτι, στο οποίο συμμετέχουν οι μικρές Rho GTPάσες, RhoA και RhoB, οι οποίες ενεργοποιούνται καθοδικά του τύπου I υποδοχέα του TGF- β 1 και οι πρωτεΐνες ROCK1, LIMK2 και κοφιλίνη. Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού επάγει τον πολυμερισμό και την αναδιοργάνωση του πλέγματος της ακτίνης σε ινίδια του στρες, ενώ η παρεμπόδιση του παρεμβαίνει όχι μόνο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, αλλά και στην επαγόμενη από τον TGF- β 1 αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων. Επίσης διαπιστώθηκε πιθανή επικοινωνία του μονοπατιού των Rho GTPασών με το μονοπάτι των Smad πρωτεϊνών και βρέθηκε ότι βασικά στοιχεία ή μόρια της κλασσικής σηματοδοτικής μηχανής του TGF- β επηρεάζουν ή είναι απαραίτητα τόσο για την αναδιοργάνωση της ακτίνης όσο και για την ενεργοποίηση των Rho.

Επιγραμματικά, τα συμπεράσματα της παρούσας διατριβής συνοψίζονται στα εξής:

- Ο παράγοντας TGF- β 1 οδηγεί σε άμεση και έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε Swiss3T3 ινοβλάστες και σε εμβρυονικούς ινοβλάστες ποντικού, MEF's. Η μακροχρόνια ενεργοποίηση με τον παράγοντα έχει σαν αποτέλεσμα τη δραματική αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων, τα οποία εμφανίζονται πιο πλατιά και με έντονο δίκτυο παράλληλων ινιδίων του στρες.
- Οι μικρές Rho GTPάσες, RhoA και RhoB ενεργοποιούνται ταχέως μετά την επίδραση του παράγοντα στα κύτταρα. Η ενεργοποίηση τόσο της RhoA όσο και της RhoB είναι απαραίτητες για την επαγόμενη από τον TGF- β 1 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.
- Η πρωτεΐνη LIMK2 ενεργοποιείται καθοδικά των Rho GTPασών και παίζει κεντρικό ρόλο στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF- β 1. Η ενεργοποίηση της LIMK2 από τον παράγοντα συνοδεύεται και από μια μεταβολή του κυτταροπλασματικού της εντοπισμού. Γονιδιακή

αποσιώπηση της πρωτεΐνης παρεμποδίζει την επαγόμενη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

- Όλα τα πειραματικά δεδομένα στους Swiss3T3 ινοβλάστες οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η LIMK1 δεν συμμετέχει στο σηματοδοτικό μονοπάτι αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον TGF-β1, καταδεικνύοντας έναν νέο διακριτό τρόπο ενεργοποίησης της LIMK2 μέσω των Rho GTPασών και της πρωτεΐνης ROCK1 από τον τύπου I υποδοχέα του TGF-β1, σε σχέση με την ενεργοποίηση της LIMK1 από τον τύπου II υποδοχέα του παράγοντα BMP (BMPRII) με τον οποίο αλληλεπιδρά άμεσα.
- Η LIMK2 φωσφορυλιώνει το φυσιολογικό υπόστρωμα της την κοφιλίνη, αναστέλοντας έτσι τη δράση της. Η κοφιλίνη δρα σαν αποπολυμεριστικός παράγοντας για την ακτίνη. Αναστολή της δράσης της από την LIMK2 μέσω φωσφορυλίωσης έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης.
- Η πρωτεϊνική κινάση ROCK1 ενεργοποιείται από τις Rho GTPάσες και φωσφορυλιώνει τη LIMK2 μεσολαβώντας την μετάδοση του μηνύματος από τον TGF-β1 προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.
- Η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης συνοδεύεται από αυξημένη κινητικότητα των Swiss3T3 ινοβλαστών σε απόκριση στον TGF-β. Η ενεργοποίηση του μονοπατιού Rho / ROCK1 / LIMK2 / κοφιλίνη παίζει καθοριστικό ρόλο στην επαγόμενη από τον TGF-β1 αυξημένη κινητικότητα των κυττάρων.
- Η έναρξη του μονοπατιού σηματοδοτείται από τον τύπου I υποδοχέα του TGF-β1, ενώ η θηλιά L45 η οποία είναι υπεύθυνη για την πρόσδεση και ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των Rho πρωτεϊνών και την επαγόμενη αύξηση του πολυμερισμού της ακτίνης.
- Αναστολή του κλασσικού σηματοδοτικού μονοπατιού των Smad πρωτεϊνών, είτε με υπερέκφραση της Smad7, είτε με εισαγωγή μεταλλάξεων στην θηλιά L45 καθιστώντας έτσι αδύνατη την πρόσδεση και ενεργοποίηση των Smad πρωτεϊνών, παρεμποδίζει τόσο την ενεργοποίηση του σηματοδοτικού

μονοπατιού των Rho πρωτεϊνών όσο και την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

- Οι κυτταροπλασματικές Smad2 και Smad3 επηρεάζουν την κυτταροσκελετική απόκριση των κυττάρων, αφού υπερέκφραση τους οδηγεί σε ενεργοποίηση του σηματοδοτικού μονοπατιού των Rho GTPασών και αυξημένο πολυμερισμό της ακτίνης.
- Η έντονη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η παρατηρούμενη έντονη μεταβολή της μορφολογίας των κυττάρων οφείλεται σε αύξηση της έκφρασης της ισομορφής της α -λείας μυϊκής ακτίνης, α -SMA, από τον TGF- β 1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Η νέα α -SMA που συντίθεται ενσωματώνεται κυρίως σε ινίδια ακτίνης και δεν απαντάται σε μονομερή μορφή.
- Για την αύξηση της έκφρασης της α -SMA στους Swiss3T3 ινοβλάστες σημαντικό ρόλο παίζει η Smad3 αφού υπερέκφραση της πρωτεΐνης απουσία ενεργοποίησης από τον TGF- β 1 οδηγεί σε αύξηση της α -SMA στα κύτταρα και ενσωμάτωσή της σε ινίδια ακτίνης.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Afrakhte M, Moren A, Jossan S, Itoh S, Sampath K, Westermarck B, et al., (1998): Biochem. Biophys. Res. Commun., 249: 505-511.
- Alexandrow MG, Moses HL, (1995): Transforming growth factor β and cell cycle regulation. Cancer Res., 55:1452-1457.
- Amano T, Tanabe K, Eto T, Narumiya S, Mizuno K., (2001): Lim-kinase 2 induces formation of stress fibers, focal adhesions and membrane blebs, dependent on its activation by Rho-associated kinase-catalysed phosphorylation at threonine-505. Biochem J. 353: 149-159.
- Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K, (2000): Regulation and functions of Rho-associated kinase. Exp. Cell Res., 261:44-51.
- Amano M, Ito M, Kimura K, Fukata Y, Chihara K, Nakano T, Matsuura Y, Kaibuchi K, (1996): Phosphorylation and activation of myosin by Rho associated kinase (Rho kinase). J. Biol. Chem., 271:20246-20249.
- Arias-Salgado EG, Lizaro S, Sarkar S, Brugge JS, Ginsberg MH, Shattil SJ, (2003): Src kinase activation by direct interaction with the integrin (beta) cytoplasmic domain. Proc. Natl. Acad. Sci. Usa, 100:13298-13302.
- Arimura N, Inagaki N, Chihara K, Menager C, Nakamura N, et al., (2000): phosphorylation of collapsin response mediator protein -2 by Rho-kinase: Evidence for two separate signaling pathways for growth cone collapse. J. Biol. Chem. 275:23973-23980.
- Aspenstrom P, (1999): Effectors of the Rho GTPases. Curr. Opin. Cell Biol., 11:95-102.
- Bach I, (2000): The Limk domain: regulation by association. Mech. Dev., 9:-17.
- Bakin AV, Safina A, Rinehart C, Daroqui C, Darbary H, Helfman DM, (2004): A critical role of tropomyosins in TGF- β regulation of the actin cytoskeleton and cell motility in epithelial cells. Mol. Biol. Cell, 15:4682-4694.
- Bamburg JR, McGough A, Ono S, (1999): Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. Trends Cell Biol., 9:364-370.
- Barios-Rodiles M, Brown KR, Ozdamar B, Bose R, Liu Z, Donovan RS, Shinjo F, Liu Y, Dembowy J, Taylor IW, Luga V, Przulj N, Robinson M, Susuki H, Hayashizaki Y, Jurisica I, Wrana JL, (2005): High-throughput Mapping of a dynamic signalling network in mammalian cells. Science, 307:1621-1625.
- Bhadriraju K, Hansen LK, (2002): Extracellular matrix- and cytoskeleton-dependent changes in cell shape and stiffness. Exp. Cell Res., 278:92-100.

- Bhowmick NA, Ghiassi M, Aakre M, Brown K, Singh V, Moses HL, (2003): TGF- β -induced RhoA and p160^{ROCK} activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell cycle arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100:15548-15553.
- Bhowmick NA, Ghiassi M, Bakin A, Aakre M, Lundquist C, Engel M, Arteaga C, Moses H, (2001): Transforming growth factor β 1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12:27-36.
- Bishop A and Hall A, (2000): Rho GTPases and their effector proteins *Biochem. J.*, 348:241-255
- Bohmer RM, Scharf E, Assoian RK, (1996): Cytoskeletal integrity is required throughout the mitogen stimulation phase of the cell cycle and mediates the anchorage-dependent expression of cyclin D1. *Mol. Biol. Cell.*, 7:101-111.
- Bonder EM and Mooseker MS, (1983): Direct electron microscopic visualization of the barbed end capping and filament cutting by intestinal microvillar 95-kDalton protein (villin): a new actin assembly assay using the *Limulus* acrosomal process. *J. Cell Biol.*, 96:1097-1107.
- Bonder EM, Fishkind DJ, Mooseker MS, (1983): Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell*, 34:491-501.
- Bonni S, Wang HR, Causing CG, Kavsak P, Stroschein SL, Luo K, Wrana JL, (2001): TGF- β induces assembly of a Smad2-Smurf2 ubiquitin ligase complex that targets SnoN for degradation. *Nat. Cell Biol.*, 3:587-595.
- Bresnick AR, (1999): Molecular mechanisms of nonmuscle myosin-II regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:26-33.
- Bretscher A, (1991): Microfilaments structure and function in the animal cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 7:337-374.
- Burgoyne RD, Cheek TR, (1987): Reorganization of peripheral actin filaments as a prelude to exocytosis. *Biosci. Rep.*, 7:281-288
- Burridge K and Chrzanowska-Wodnicka M, (1996): Focal adhesions, contractility and signaling. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.*, 12:463-519.
- de Caestecker M, (2004): The Transforming Growth Factor- β superfamily of receptors. *Cytok. Growth Fact. Rev.*, 15:1-11.
- Cannizzaro LA, Madaule P, Hecht F, Axel R, Croce CM, Huebner K, (1990): Chromosome localization of human ARH genes, a ras related gene family. *Genomics*, 6:197-203.

- Carlier MF, Pantaloni D, Korn ED, (1986): The effect of Mg²⁺ at the high-affinity and low affinity sites on the polymerization of actin and associated ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 261:10785-10792
- Carlier MF, (1989): Role of nucleotide hydrolysis in the dynamics of actin filaments and microtubules. *Int. Rev. Cytol.*, 115:139-170.
- Carlier MF, (1991): Actin: protein structure and filament dynamics. *J. Biol. Chem.*, 166:1-4.
- Carlier MF, Ressard F, Pantaloni D, (1999): Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J. Biol. Chem.*, 274:33827-33830.
- Caron E and Hall A, (1998): Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science*, 282:1717-1721.
- Cerione RA and Zheng Y, (1996): The Dbl family of oncogenes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8:216-222.
- Cerwenka A, Swain SL, (1999): TGFβ1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes Infect.* 1:1291-1296.
- Chai J, Wu J-W, Massagué J, Pavletich NP, Shi Y, (2003): Features of a Smad3 MH1-DNA complex: roles of water and zinc in DNA binding at 2,4 Å resolution. *J. Biol. Chem.*, 278:20327-31.
- Chaponnier C, Gabbiani G, (1989): Gelsolin modulation in epithelial and stromal cells of mammary carcinoma. *Am. J Pathol.*, 134:597-603.
- Charalampopoulos I, Dermitzaki E, Vardouli L, Tsatsanis C, Stournaras C, Margioris N, Gravanis A, (2005): Deydroepiandrosterone sulfate and Allopregnanolone directly stimulate catecholamine production via induction of tyrosine hydroxylase and secretion by affecting actin polymerization. *Endocrinology*, 146:3309-3318.
- Chang MJ, Zhang D, Kinnunen P, Schneider MD, (1998): A novel protein distinguishes between quiescent and activated forms of the type I transforming growth factor beta receptor. *J. Biol. Chem.*, 273: 9365-9368.
- Chen YG, Hata A, Lo RS, Wotton D, Shi Y, Pavletich N, et al., (1998): Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev.*, 12:2144-2152.
- Chen YG, Liu F, Massagué J, (1997): Mechanism of TGFbeta receptor inhibition by FKBP12. *EMBO J.*, 16: 3866-3876.
- Chen Q, Kinch MS, Lin TH, Burrige K, Suliano RL, (1994): Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 269:26602-26605.

- Choy L, Derynck RJ, (1998): The type II transforming growth factor (TGF)-beta receptor-interacting protein TRIP-1 acts as a modulator of the TGF-beta response. *J. Biol. Chem.*, 273: 31455-31462.
- Condeelis J, Segall JE, (2003): Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat. Rev. Cancer*, 3:921-930.
- Conery AR, Cao Y, Thompson EA, Townsend CM, Jr Ko TC, Luo K, (2004): Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF- β induced apoptosis. *Nat. Cell Biol.*, 6:366-372.
- Condenonsi M, Dupont S, Maretto S, Insinga A, Imbriano C, Piccolo S, (2003): Links between tumor suppressors: p53 is required for TGF- β gene responses by cooperating with Smads. *Cell*, 113: 301-314.
- Datta PK, Moses HL, (2000): STRAP and Smad7 synergize in the inhibition of transforming growth factor beta signaling *Mol. Cell Biol.*, 20: 3157-3167.
- Dawid IB, Toyama R, Taira M, (1995): LIM domain proteins. *C. R. Acad. Sci. III*, 318:295-306.
- Dawid I, Breen JJ, Toyama R, (1998): LIM domains: multiple roles as adaptors and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet.*, 14:156-162.
- Debant A, Serra-Pages C, Seipel K, O'Brien S, Tang M, Park SH, Streuli M, (1996): The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ; 93:5466-5471.
- de Caestecker MP, Yahata T, Wang D, Parks WT, Huang S, Hill CS, Shioda T, Roberts AB, Lechleider RJ, (2000): The Smad4 activation domain (SAD) is a proline-rich, p300-dependent transcriptional activation domain. *J. Biol. Chem.*, 275: 2115-2122.
- De Lacro JE, Todaro GJ, (1978): Growth Factors from murine sarcoma virus transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:4001-4005.
- Dennier S, Gourmans MJ, ten Dijke P, (2002): Transforming Growth Factor β signal transduction. *J. Leuk. Boil.*, 71:731-740.
- Dennier S, Itoh S, Vivien D, ten Dijke P, Huet S, Gauthier J-M, (1998): Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF β -inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene. *EMBO J.*, 17: 3091-3100.
- Dennler S, Huet S, Gauthier JM, (1999): A short amino-acid sequence in MH1 domain is responsible for functional differences between Smad2 and Smad3. *Oncogene*, 18:1643-1648.

- Desrosier RR, Gauthier F, Lanthier J, Beliveau R, (2000): Modulation of Rho and cytoskeletal protein attachment to membranes by a prenylcysteine analog. *J. Biol. Chem.*, 275:14949-14957.
- Diekmann D, Brill S, Garrett MD, Totty N, Hsuan J, Monfries C, Hall C, Limk L, Hall A, (1991): Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature*, 351:400-402.
- Di Guglielmo GM, Le Roy C, Goodfellow AF, Wrana JL, (2003): Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat. Cell Biol.*, 5:410-421.
- Dong C, Li Z, Alvarez JrR, Feng X-H, Goldschmidt-Clermont PJ, (2000): Microtubule binding to Smads may regulate TGF- β activity. *Mol. Cell*, 5: 27-34.
- Dooley S, Delvoux B, Streckert M, Bonzel L, Stopa M, ten Dijke P, Gressner AM, (2001): Transforming growth factor beta signal transduction in hepatic stellate cells via Smad2/3 phosphorylation, a pathway that is abrogated during in vitro progression to myofibroblasts. TGFbeta signal transduction during transdifferentiation of hepatic stellate cells. *FEBS Lett.* 502, 4-10.
- Dudas M, Nagy A, Laping NJ, Moustakas A, Kaartinen V, (2004): Tgf-beta3-induced palatal fusion is mediated by Alk-5/Smad pathway. *Dev. Biol.* 266, 96-108.
- Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL, (2003): Autocrine transforming growth factor- β signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J. Biol. Chem.*, 278: 3275-3285.
- Durrbach A, Louvard D, Coudrier E, (1996): Actin filaments facilitate two steps of endocytosis. *J. Cell Sci.*, 109:457-465.
- Ebisawa T, Fukuchi M, Murakami G, Tanaka K, Imamura T, Miyazono K, (2001): Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. *J. Biol. Chem.*, 276: 12477-12480.
- Edlund S, Landström M, Heldin C-H, Aspenström P, (2002): Transforming growth factor- β -induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol. Biol. Cell.*, 13: 902-914.
- Edlund S, Bu S, Schuster N, Aspenström P, Heuchel R, Heldin NE, ten Dijke P, Heldin C-H, Landström M, (2003): Transforming growth factor- β 1 (TGF- β)-induced apoptosis of prostate cancer cells involves Smad7-dependent activation of p38 by TGF- β -activated kinase 1 and mitogen-activated protein kinase kinase 3. *Mol. Biol. Cell*, 14: 529-544.
- Edlund S, Landström M, Heldin C-H, Aspenström P, (2004): Smad7 is required for the TGF- β -induced activation of the small GTPase Cdc42. *J. Cell Sci.*, 117: 1835-1847.

- Edwards DC, Sanders LC, Bokoch GM, Gill GN, (1999): Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* 1: 253-259.
- Egelman EH, (1985): The structure of F-actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 6:129-151.
- Ellis S, Mellor H, (2000): Regulation of endocytic traffic by Rho family GTPases. *Trends Cell Biol.*, 10: 85-88.
- Estes JE, Selden LA, Kinoshita H, Gerishman LC, (1992): Tightly bound divalent cation of actin. *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 13:272-284.
- Evans RA, Tian YC, Steadman R, Phillips AO, (2003): TGF- β 1-mediated fibroblast-myofibroblast terminal differentiation- the role of Smad proteins. *Exp. Cell Res.* 282: 90-100.
- Feng XH, Derynck R, (1997): A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *EMBO J.*, 16:3912-3923.
- Fishkind D, Wang YL, (1995): New horizons for cytokinesis. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 7:23-31.
- Foletta VC, Moussi N, Sarmier D, Bamburg JR, Bernard O, (2004): LIM kinase 1, a key regulator of actin dynamics, is widely expressed in embryonic and adult tissues. *Exp. Cell Res.*, 294: 392-405.
- Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AS, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massagué J, Bernard O, (2003): Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J. Cell Biol.*, 162:1089-1098.
- Freyd G, Kim SK, Horvitz HR, (1990): Novel cysteine rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature*, 344:879-879.
- Frieden C and Patane K, (1988): Mechanism of nucleotide exchange in monomeric actin. *Biochemistry*, 27:3812-3820.
- Fujii M, Takeda K, Imamura T, Aoki H, Sampath TK, Enomoto S, Kawabata M, Kato M, Ichijo H, Miyazono K, (1999): Roles of bone morphogenetic protein type I receptors and Smad proteins in osteoblast and chondroblast differentiation. *Mol. Biol. Cell* 10, 3801-3813.
- Gabbiani G, (2003): The myofibroblasts in wound healing and fibrocontractive diseases. *J. Pathol.*, 200: 500-503.
- Gampel A et al., (1999): Regulation of EGF receptor traffic by the small GTPase RhoB. *Curr. Biol.*, 9: 955-958.

- Geneste O, Copeland JW, Treisman R, (2002): LIM kinase and Diaphanous cooperate to regulate serum response factor and actin dynamics. *J. Cell Biol.*, 157:831-838.
- Goto H, Kosako H, Tanabe K, Yanagida M, Sakurai M, et al., (1998): Phosphorylation of vimentin by rho-associated kinase a a unique amino-terminal site that is specifically phosphorylated during cytokinesis. *J. Biol. Chem.* 273:11728-11736.
- Gottfried Y, Rotem A, Lotan R, Steller H, Larisch S, (2004): The mitochondrial ARTS protein promotes apoptosis through targeting XIAP. *EMBO J.*, 23: 1627-1635.
- Gotzmann J, Mikula M, Eger A, Schulte-Hermann R, Foisner R, Beug H, Mikulits W, (2004): Molecular aspects of epithelial cell plasticity: implications for local tumor invasion and metastasis. *Mutat. Res.*, 566: 9-20.
- Griswold-Prenner I, Kamibayashi C, Maruoka EM, Mumby MC, Derynck R (1998): Physical and functional interactions between type I transforming growth factor β receptors and $B\alpha$, a WD-40 repeat subunit of phosphatase 2A. *Mol. Cell Biol.*, 18: 6595-6604.
- Gulli M-P, Peter M, (2001): Temporal and special regulation of Rho-type guanine nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev.*, 15:365-379.
- Haberts GG, Scholtes EH, Zuydgeest D, van der Kammen RA, Stam JC, Berns A, Collard JG, (1994): Identification of an invasion-inducing gene, Tiam-1, that encodes a protein with homology to GDP-GTP exchangers for Rho like proteins. *Cell*, 77:537-549.
- Hall A, (1998): Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*, 279:509-514.
- Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, Nishita M, Fujisawa J, Shibuya H, Matsumoto K, Nishida E, (1999): Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J. Biol. Chem.*, 274: 27161-27167.
- Hansen LK, Albrecht JH, (2003): Regulation of the hepatocyte cell cycle by type I collagen matrix: role of cyclin D1. *J. Cell Sci.*, 112:2971-2981.
- Hart MJ, Sharma S, el Masry N, Qiu RG, Mc Cabe P, Polakis P, Bollag G, (1996): Identification of a novel guanine nucleotide exchange factor for the Rho GTPase. *J. Biol. Chem.*, 271:25452-25458.
- Hart MJ, Eva A, Zangrilli D, Aaronson SA, Evans T, Cerione RA, Zheng Y, (1994): Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J. Biol. Chem.*, 269:62-65.

- Hart MJ, Eva A, Evans T, Aaronson SA, Gerione RA, (1991): Catalysis of guanine nucleotide exchange on the Cdc42Hs protein by the Dbl oncogene product. *Nature*, 354:311-314.
- Hata A, Lo RS, Wotton D, Lagna G, Massagué J, (1997): Mutations increasing autoinhibition inactivate tumour suppressors Smad2 and Smad4. *Nature*, 388:82-87.
- Hennessey ES, Drummond DR, Sparrow JC, (1993): Molecular genetics of actin function. *Biochem. J.* 281:657-671.
- Herman IM, (1993): Actin Isoforms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 5: 48-55.
- Higftower RC, Meagher RB, (1986): The molecular evolution of Actin. *Genetics* 114:315-322.
- Higgs HN and Pollard TD, (1999): Regulation of actin polymerization by Arp2/3 complex and WASp/Scar proteins. *J. Biol. Chem.*, 274:32571-32584.
- Hiraoka J., Okano I., Higuchi O., Yang N., Mizuno K. (1996): Self-association of LIM-kinase 1 mediated by the interaction between an N-terminal LIM domain and a C-terminal kinase domain. *FEBS* 399:117-121.
- Hocevar BA, Smine A, Xu XX, Howe PH, (2001): The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor-beta receptors to the Smad pathway. *EMBO J.*, 20: 2789-2801.
- Hofmann TG, Stollberg N, Schmitz ML, Will H, (2003): HIPK2 regulates transforming growth factor-β-induced c-Jun NH₂-terminal kinase activation and apoptosis in human hepatoma cells. *Cancer Res.*, 63:8271-8277.
- Homma Y, Emori Y, (1995): A dual functional signal mediator showing RhoGAP and phospholipase C-delta stimulating activities. *EMBO J.*, 14:286-291.
- Hu PP, Shen X, Huang D, Liu Y, Counter C, Wang X-F, (1999): The MEK pathway is required for stimulation of p21^{WAF1/CIP1} by transforming growth factor-β. *J. Biol. Chem.* 274: 35381-35387.
- Huse M, Muir TW, Xu L, Chen YG, Kuriyan J, Massagué J, (2001): The TGF beta receptor activation process: an inhibitor- to substrate-binding switch. *J. Mol. Cell*, 8:671-682.
- Huse M, Chen YG, Massagué J, Kuriyan J, (1999): Crystal structure of the cytoplasmic domain of the type I TGF beta receptor in complex with FKBP12 *Cell*, 96: 425-436.
- Ijichi H, Otsuka M, Tateishi K, Ikenoue T, Kawakami T, Kanai F, Arakawa Y, Seki N, Shimizu K, Miyazono K, et al., (2004): Smad4-independent regulation of p21/WAF1 by transforming growth factor-β. *Oncogene*, 23: 1043-1051.

- Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K, (2000): Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter. *J. Biol. Chem.*, 275: 6075-6079.
- Ishizaki T, Maekawa M, Fujisawa K, Okawa K, Iwamatsu A et al., (1996): The small GTP binding protein Rho Binds to and activates a 160kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase. *EMBO J.*, 15:1885-1893.
- Itoh, S., Thorikay, M., Kowanetz, M., Moustakas, A., Itoh, F., Heldin, C.-H., and ten Dijke, P. (2003): Elucidation of Smad requirement in Transforming Growth Factor- β Type I Receptor-induced responses. *J. Biol. Chem.* 278: 3751-3761.
- Janknecht R, Wells NJ, Hunter T, (1998): TGF- β stimulated cooperation of Smad proteins with the coactivators CBP/p300. *Genes Dev.*, 12: 2114-2119.
- Jordan MA and Wilson L.,(1998): Microtubules and actin filaments: dynamic targets for cancer chemotherapy., *Curr Opin Cell Biol.*, 10:123-30.
- Kabsch W, Mannhertz HG, Suck D, Pai EF, Holmes KC, (1990): Atomic structure of the actin: DNase I complex. *Nature* 347:37-44.
- Kaibuchi K, Kuroba S, Amano M, (1999): Regulation of cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu. Rev. Biochem.*, 68:459-486.
- Kaibuchi K, Mizuno T, Fujioka H, Yamamoto T, Kishi K, Fukumoto Y, Hori Y, Takai Y, (1991): Molecular cloning of the cDNA for stimulatory GDP/GTP exchange protein for smg p21s (ras p21-like small GTP-binding proteins) and characterization of stimulatory GDP/GTP exchange protein. *Mol. Cell Biol.*, 11:2873-2880.
- Kallergi G, Tsapara A, Kampa M, Papakonstanti EA, Krasagakis K, Castanas E, Stournaras C, (2003): Distinct signaling pathways regulate differential opioid effects on actin cytoskeleton in malignant MCF7 and nonmalignant MCF12A human breast epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, 288:94-109.
- Kampa M, Papakonstanti EA, Hatzoglou A, Stathopoulos S, Stournaras C, Castanas E, (2002): The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors, which increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *FASEB J.*, 16:1429-1431.
- Katsantonis J, Tosca A, Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Gravanis A and Stournaras C.,(1994): Differences in the G/total actin ratio and microfilament stability between normal and malignant human keratinocytes., *Cell Biochem Func.* 12:267-74.
- Katz BZ, Romer L, Miyamoto S, Volberg T, Matsumoto K, Cukierman E, Geiger B, Yamada KM, (2003): Targeting membrane-localized focal hesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases. *J. Biol. Chem.*, 278:29115-29120.

- Kavsak P, Rasmussen RK, Causing CG, Bonni S, Zhu H, Thomsen GH, et al., (2000): Smad7 binds to Smurf2 to form an E3 ubiquitin ligase that targets the TGF beta receptor for degradation. *Mol. Cell*, 6:1365-1375.
- Kawano Y, Fukata Y, Oshiro N, Amano M, Nakamura T, Ito M, Matsumura F, Inagaki M, Kaibuchi K, (1999): Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho kinase in vivo. *J. Cell Biol.*, 147:1023-1038.
- Kim J, Johnson K, Chen HJ, Carroll S, Laughon A, (1997): Drosophila Mad binds to DNA and directly mediates activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature*, 388: 304-308.
- Kim SG, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Hong SH, Bang YJ, (2004): Transforming growth factor- β 1 induces apoptosis through Fas ligand-independent activation of the Fas death pathway in human gastric SNU-620 carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell* 15: 420-434.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A, Kaibuchi K, (1996): Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*, 273:245-248.
- Kivinen L, Laiho M, (1999): Ras- and mitogen activated protein kinase kinase dependent and independent pathways in p21^{Cip1/Waf1} induction by fibroblast growth factor-2, platelet-derived growth factor, and transforming growth factor- β 1. *Cell Growth Differ.* 10:621-628.
- Korn ED, (1982): Actin polymerization and its regulation by proteins from non-muscle cells. *Physiol. Rev.*, 62:672-737.
- Korn ED, Carlier MF, Pantaloni D, (1987): Actin polymerization and Atp hydrolysis. *Science*, 238:638-644.
- Koukouritaki SB, Vardaki EA, Papakonstanti EA, Lianos E, Stournaras C and Emmanouel DS., (1999): TNF-alpha induces actin cytoskeleton reorganization in glomerular epithelial cells involving tyrosine phosphorylation of paxillin and focal adhesion kinase., *Mol Med*, 5:382-92.
- Kretschmar M, Doody J, Timokhina I, Massagué J, (1999): A mechanism of repression of TGF- β /Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev.*, 13: 804-816.
- Kretschmar M, Doody J, Massagué J, (1997): Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- β family mediator Smad1. *Nature*, 389: 618-622.
- Kurokawa M, Mitani K, Irie K, Matsuyama T, Takahashi T, Chiba S, Yazaki Y, Matsumoto K, Hirai H, (1998): The oncoprotein Evi-1 represses TGF- β signaling by inhibiting Smad3. *Nature*, 394: 92-96.

- Lai C-F, Feng X, Nishimura R, Teitelbaum SL, Avioli LV, Ross FP, Cheng S-L, (2000): TGF β upregulates the β 5 integrin subunit expression via Sp1 and Smad family members. *J. Biol. Chem.*, 275:36400-36406.
- Lamarche N, and Hall A, (1994): GAPs for Rho related GTPases. *Trends Genet.*, 10:436-440.
- Lancaster CA, Taylor-Harris PM, Self AJ, Brill S, van Erp HE, Hall A, (1994): Characterization of rhoGAP. A GTPase-activating protein for rho-related small GTPases. *J. Biol. Chem.*, 269:1137-1142.
- Larisch S, Yi Y, Lotan R, Kerner H, Eimerl S, Tony Parks W, Gottfried Y, Birkey Reffey S, de Caestecker MP, Danielpour D, et al., (2000): A novel mitochondrial septin-like protein ARTS, mediates apoptosis dependent on its P-loop motif. *Nat. Cell Biol.* 2: 915-921.
- Lawrence DA, (2001): Latent TGF β : an overview. *Mol. Cell. Biochem.*, 219:163-170.
- Lebman DA, Edmiston JS, (1999): The role of TGF β in growth, differentiation, and maturation of B lymphocytes. *Microbes Infect.* 1:1297-1304.
- Lebowitz PF, Davide JP, Prendergast GC, (1995): Evidence that farnesyltransferase inhibitors suppress Ras transformation by interfering with Rho activity. *Mol. Cell. Biol.*, 15: 6613-6622.
- Lee MS, Ko SG, Kim HP, Kim YB, Lee SY, Kim SG, Jong HS, Kim TY, Lee JW, Bang YJ, (2004): Smad2 mediates Erk1/2 activation by TGF- β 1 is suspended, but not in adherent, gastric carcinoma cells. *Int. J. Oncol.*, 24: 1229-1234.
- Lee-Hoeflich ST, Causing CG, Podkova M, Zhao X, Wrana JL, Attisano L, (2004): Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J.*, 23: 4792-4801.
- Lees-Miller JP, Henry G, Helfman DM, (1992): Identification of act2, an essential gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that encodes a protein related to actin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:80-83.
- Letterio JJ, Roberts AB, (1998): Regulation of immune responses by TGF β . *Annu. Rev. Immunol.* 16:1370161.
- Leung T, How BE, Manser E, Lim L, (1993): Germ cell beta-chimaerin, a new GTPase-activating protein for p21rac, is specifically expressed during the acrosomal assembly stage in rat testis. *J. Biol. Chem.*, 268:3813-3816.
- Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Shen X, Wong C, Rougier-Chapman EM, Wang X-F, (1999): Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 4844-4849.

- Liu F, Poupponnot C, Massagué J, (1997): Dual role of the Smad4/DPC4 tumor suppressor in TGF- β inducible transcriptional complexes. *Genes Dev.*, 11: 3157-3167.
- Liu X, Sun Y, Weinberg RA, Lodish HF, (2001): Ski/Sno and TGF- β signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12:1-8.
- Luna EJ and Hitt A, (1992): Cytoskeleton plasma membrane interactions. *Science*, 285:955-964.
- Lutz M, Knaus P, (2003): Integration of the TGF- β pathway into the cellular signaling network. *Cell. Sign.*, 14:977-988.
- Machesky LM, Hall A, (1997): Role of actin polymerization and adhesion to extracellular matrix in Rac- and Rho-induced cytoskeletal reorganization. *J. Cell Biol.*, 138:913-26.
- Maciver SK, (1998): How ADF/cofilin depolymerises actin filaments. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 10:140-144.
- Maekawa M, Ishizaki T, Boku S, Watanabe N, Fujita A, Iwamatsu A, Obinata T, Ohashi K, Mizuno K, Narumiya S, (1999): Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase *Science* 285, 895-898.
- Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S, (2002): The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298:1912-1934.
- Manser E, Loo TH, Koh CG, Zhao ZS, Chen XQ, (1998): PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol. Cell* 1:183-192.
- Mason AJ, Hayflick JS, Ling N, Esch F, Ueno N, Ying SY, Guillemain R, Niall H, Seeburg PH, (1985): complementary DNA sequences of ovarian follicular fluid inhibin show precursor structure and homology with transforming growth factor- β . *Nature*, 318:659-663.
- Massagué J, (2004): G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432: 298-306.
- Massagué J, (2000): How cells read TGF- β signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 1: 169-178.
- Massol P, Montcourrier P, Guillemot JC, Chavrier P, (1998): Fc receptor-mediated phagocytosis requires Cdc42 and Rac1. *Embo J.*, 17:6219-6229.
- Masszi A, Di Ciano C, Sirokmary G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McGulloch CAG, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A, (2003): Central role for Rho in TGF- β 1-induced α -smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 284: 911-924.

- Matsui T, Maeda M, Doi Y, Yonemura S, Amano M, et al., (1998): Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J. Cell Biol.*, 140:647-657.
- Matsui T, Ammano M, Yamamoto T, Chihara K, Nakafuku M, et al., (1996): Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho. *EMBO J.* 15:2208-2216.
- Mckay DJG, & Hall A, (1998): Rho GTPases. *J. Biol. Chem.*, 273:20685-20688.
- Mc Laughlin PJ, Gooch JT, Mannhertz HG, Weeds AG, (1993): Structure of gelsolin segment 1-actin complex and the mechanism of filament severing. *Nature* 364:685-692.
- Miralles F, Posern G, Zaromytidou AT, Treisman R, (2003): Actin dynamics control SRF activity by regulation of its co-activator MAL. *Cell*, 113:329-342.
- Miyazaki M, Sakaguchi M, Akiyama I, Sakaguchi Y, Nagamori S, Huh NH, (2004): Involvement of interferon regulatory factor 1 and S100C/A11 in growth inhibition by transforming growth factor β 1 in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.*, 64:4155-4166.
- Mizuno K, Okano I, Ohashi K, Numoue K, Kuma K, Miyata T, Nakamura T, (1994): Identification of a human cDNA encoding a novel protein kinase with N-terminal two LIM/double zing finger motifs. *Oncogene*, 9:1605-1612.
- Morino N, Mimura T, Hamasaki K et al., (1995): Matrix/integrin interaction activates the mitogen-activated protein kinase, p44erk-1 and p42erk-2. *J. Biol. Chem.*, 270:269-273.
- Morrel NW, Yang X, Upron PD, Jourdan KB, Morgan N, Sheares KK, Trembath RC, (2001): Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor- β 1 and bone morphogenetic proteins. *Circulation*, 104:790-795.
- Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH, (2001): Smad regulation in TGF- β signal transduction. *J. Cell Sci.*, 114:4359-4369.
- Moustakas A and Stournaras C., (1999): Regulation of actin organisation by TGF-beta in H-ras-transformed fibroblasts., *J Cell Sci* , 112:1169-79.
- Moustakas A, Kardassis D, (1998): Regulation of the human p21/WAF1/Cip1 promoter in hepatic cells by functional interactions between Sp1 and Smad family members. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 6733-6738.
- Muallem S, Kwiatkowska K, Xu X, Yin HL, (1995): Actin filament disassembly is a sufficient final trigger for exocytosis in nonexcitable cells. *L. Cell Biol.*, 128:589-598.

- Mullauer L, Fujita H, Suzuki H, Katabami M, Hitomi Y, Ogiso Y, Kuzumaki N, (1990): Elavated gelsolin and α -actin expression in a flat revertant R1 of Ha-Ras oncogene transformed NIH3T3 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 171:852-859
- Nachmias VT, (1993): Small actin-binding proteins: the β -thymosin family. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 5:56-62.
- Nagarajan RP, Zhang J, Li W, Chen Y, (1999): Regulation of Smad7 promoter by direct association with Smad3 and Smad4. *J. Biol. Chem.*, 274: 33412-33418.
- Nakagawa O, Fujisawa K, Ishizaki T, Saito Y, Nakao K, et al., (1996): ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. *FEBS Lett.*, 392:189-193.
- Needham J., (1936): *Order and Life*. New Heaven, Yale University Press, 147-157.
- Nieto MA, (2002): The snail superfamily of zinc-finger transcription factors. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 3: 155-166.
- Nobes CD, Hall A, (1995): Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*, 81:53-62.
- Ohashi K, Nagata K, Maekawa M, Ishizaki T, Narumiya S, Mizuno K, (2000): Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation Loop. *J. Biol. Chem.* 275:3577-3582.
- Okadome T, Oeda E, Saitoh M, Ichijo H, Moses HL, Miyazono K, Kawabata M, (1996): Characterization of the interaction of FKBP12 with the transforming growth factor-beta type I receptor in vivo. *J. Biol. Chem.*, 271: 21687-21690.
- Okano I, Hiraoka J, Otera H, Numoue K, Ohashi K, Iwashita S, Hirai M, Mizuno K, (1995): Identification and characterization of a novel family of serine/threonine kinases containing two N-terminal LIM motifs. *J. Biol. Chem.*, 270:31321-31330.
- Olofsson B, (1999): Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signalling*, 11:545-554.
- Olson MF, Pasteris NG, Gorski JL, Hall A, (1996): Faciogenital dysplasia protein (FGD1) and Vav, two related proteins required for normal embryonic development, are upstream regulators of Rho GTPases. *Curr. Biol.*, 6:1628-1633.
- Otto JJ, (1994): Actin-bundling proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 6:105-109.
- Ozdamar B, Bose R, Barios-Rodiles M, Wang HR, Zhang Y , Wrana JL, (2005): Regulation of the polarity protein Par6 by TGF β receptors controls epithelial cell plasticity. *Science*, 307: 1603-1609.

- Panagiotou S, Bakogeorgou E, Papakonstanti E, Hatzoglou A, Wallet F, Dussert C, Stournaras C, Martin PM and Castanas E.,(1999): Opioid agonists modify breast cancer cell proliferation by blocking cells to the G2/M phase of the cycle: involvement of cytoskeletal elements., *J Cell Biochem.*, 73:204-11.
- Panopoulou E, Gillooly DJ, Wrana JL, Zerial M, Stenmark H, Murphy C, Fotsis T, (2002): Early endosomal regulation of Smad-dependent signalling in endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 277: 18046-18052.
- Papakonstanti EA and Stournaras C, (2004): Tumor Necrosis Factor- α promotes survival of Opossum Kidney cells via Cdc42-induced phospholipase C- γ 1 activation and actin filament redistribution. *Mol. Biol. Cell*, 15:1273-1286
- Papakonstanti EA, Kampa M, Castanas E, Stournaras C, (2003): A rapid, nongenomic, signalling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol. Endocrin.*, 17:870-881.
- Papakonstanti E, Vardaki E, Stournaras C.,(2000): Actin Cytoskeleton: A Signaling Sensor in Cell Volume Regulation., *Cell Physiol Biochem.*,10:257-264
- Papakonstanti EA, Bakogeorgou E, Castanas E, Emmanouel DS, Hartig R and Stournaras C.,(1998): Early alterations of actin cytoskeleton in OK cells by opioids., *J Cell Biochem.*, 70:60-9.
- Pardali K, Kurisaki A, Morén A, ten Dijke P, Kardassis D, Moustakas A, (2000): Role of the Smad proteins and transcription factor Sp1 in p21^{Waf1/Cip1} regulation by transforming growth factor- β . *J. Biol. Chem.*, 275: 29244-29256.
- Pardali E, Xie X-Q, Tsapogas P, Itoh S, Arvanitidis K, Heldin C-H, ten Dijke P, Grundström T, Sideras P, (2000b): Smad and AML proteins synergistically confer transforming growth factor β 1 responsiveness to human germ line IgA genes. *J. Biol. Chem.*, 275: 3552-3560.
- Peinado H, Quintanilla M, Cano A., (2003): Transforming growth factor β -1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J. Biol. Chem.*, 278:21113-21123.
- Pendergast GC, (2001): Actin'up: RhoB in cancer and apoptosis. *Nat. Rev. Cancer*, 1:162-168.
- Penheiter SG, Mitchell H, Garamszegi N, Edems M, Dore Jr JJ, Leof EB, (2002): internalization-dependent and -independent requirements for transforming growth factor beta receptor signalling via the smad pathway. *Mol. Cell Biol.*, 22:4750-4759.
- Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, Lodish HF, Weinberg RA, (2001): TGF- β -induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat. Cell Biol.*, 3: 708-714.

- Persson U, Izumi H, Souchelnytskyi S, Itoh S, Grimsby S, Engstrom U, Heldin C-H, Funahashi K, ten Dijke P, (1998): The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett.*, 434:83-87.
- Petritsch C, Beug H, Balmain A, Oft M, (2000): TGF- β inhibits p70 S6 kinase via protein phosphatase 2A to induce G1 arrest. *Genes Dev.*, 14: 3093-3101.
- Piek E, Moustakas A, Kurisaki A, Heldin C-H, ten Dijke P, (1999): TGF-(beta) type I receptor/ALK-5 and Smad proteins mediate epithelial to mesenchymal transdifferentiation in NMuMG breast epithelial cells. *J. Cell Sci.* 112, 4557-4568.
- Pircher R, Jullien P, Lawrence DA, (1986): Beta-transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 136:30-37.
- Pokorna E, Jordan PW, O'Neil CH, Zicha D, Gilbert CS, Vesely P, (1994): Actin cytoskeleton and motility in rat sarcoma cell populations with different metastatic potential. *Cell Motil Cytoskeleton*, 28:25-33.
- Pollard TD and Cooper JA, (1986): Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Ann. Rev. Biochem.*, 55:987-1035.
- Pollard TD, (1990): Actin. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 2:33-40.
- Pollard TD and Borisy GG, (2003): Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*, 112:453-465.
- Ponte P, Gunning P, Blau H, Kedes L, (1983): Human actin genes are single copy for α -skeletal and α -cardiac actin but multicopy for β - and γ -cytoskeletal genes: 3' untranslated regions are isotype specific but are conserved in evolution. *Mol. Cell Biol.* 3:1783-1791.
- Pouponnot C, Jayaraman L, Massagué J, (1998): Physical and functional interaction of SMADs and p300/CBP. *J. Biol. Chem.*, 273: 22865-22868.
- Qiu R-G, Chen J, McCormick F, Symons M, (1995): A role for Rho in Ras transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 11781-11785.
- Qualman B, Mellor H, (2003): Regulation of endocytic traffic by Rho GTPases. *Biochem. J.*, 371:233-241.
- Raftopoulou M, Hall A, (2004): Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Deve. Biol.*, 265:23-32.
- Razani B, Zhang XL, Bitzer M, von Gersdorff G, Bottinger EP, Lisanti MP, (2001): Caveolin-1 regulates transforming growth factor (TGF)-beta/SMAD signaling through an interaction with the TGF-beta type I receptor. *J. Biol. Chem.* 276:6227-6238.

- Reid T., Furuyashiki T., Ishizaki T., Watanabe G., Watanabe N., Fujisawa K., Morii N., Madaule P., Narumiya S. (1996) Rhotekin, a putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN and Rhophilin in the Rho binding domain. *J. Biol. Chem.* 271: 13556-13560.
- Remy I, Montmarquette A, Michnick SW, (2004): PKB/Akt modulates TGF- β signaling through a direct interaction with Smad3. *Nat. Cell Biol.*, 6: 358-365.
- Ren XD, Schwartz MA, (2000): Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol.* 325, 264-272.
- Ridley A, (2001): Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol.*, 11:471-477.
- Ridley AJ, Hall A, (1992): The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*, 70:389-399.
- Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A, (1992): The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*, 70:401-410.
- Robinson RC, Mejillano M, Le VP, Burtnick LD, Yin HL, Choe S, (1999): Domain movement in gelsolin: A calcium-activated switch. *Science*, 286:1939-1942.
- Roovers K, Klein EA, Castagnino P, Assoian RK, (2003): Nuclear translocation of LIM kinase mediates Rho-Rho kinase regulation of cyclin D1 expression. *Dev. Cell.*, 5:273-284.
- Roovers K, Assoian RK, (2003): Effects of Rho kinase and actin stress fibers on sustained extracellular signal-regulated kinase activity and activation of G(1) phase cyclin dependent kinases. *Mol. Cell Biol.*, 23:4283-4294.
- Roy SG, Nozaki Y, Phan SH, (2001): Regulation of α -smooth muscle actin gene expression in myofibroblast differentiation from rat lung fibroblasts. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 33: 723-734.
- Runyan CE, Schnaper W, Poncelet AC, (2005): The role of internalization in Transforming Growth Factor- β 1-induced Smad2 association with Smad Anchor for Receptor Activation (SARA) and Smad2-dependent signaling in human mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, 280:8300-8308.
- Sakaguchi M, Miyazaki M, Sonogawa H, Kashiwagi M, Ohba M, Kuroki T, Namba M, Huh NH, (2004): PKC α mediates TGF β -induced growth inhibition of human keratinocytes via phosphorylation of S100C/A11. *J. Cell Biol.*, 164: 979-984.
- Sakai T, Jove R, Fassler R, Masher DF, (2001): Role of the cytoplasmic tyrosines of beta 1A integrins in transformation by v-src. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98:3808-3813.

- Sakurai H, Miyoshi H, Mizukami J, Sugita T, (2000): Phosphorylation-dependent activation of TAK1 mitogen-activated protein kinase kinase kinase by TAB1 FEBS Lett., 474: 141-145.
- Sanger JW, Sanger JM, Jackush, (1983): Differences in the stress fibers between fibroblasts and epithelial cells. J. Cell Biol., 96:961-969.
- Sasaki A, Masuda Y, Ohta Y, Ikeda K, Watanabe K, (2001): Filamin associates with Smads and regulates transforming growth factor- β signaling. J. Biol. Chem., 276: 17871-17877.
- Schiffer M, Mundel P, Shaw AS, Böttinger EP, (2004): A novel role for the adaptor molecule CD2-associated protein in transforming growth factor- β -induced apoptosis. J. Biol. Chem., 279:37004-37012.
- Schlüter K, Jockusch BM, Rothkegel M, (1997): Profilins as regulators of actin dynamics. Biochim. Biophys. Acta, 1359:97-109.
- Schmitz AP, Govek EE, Bottner B, van Aelst L, (2000): Rho GTPases: Signaling, Migration and Invasion. Exp. Cell Res., 261:1-12.
- Schwob E and Martin RP, (1992): New yeast actin-like gene required late in the cell cycle. Nature, 355:179-182.
- Seabra MC, (1998): Membrane association and targeting of prenylated Ras-like GTPases. Cell Signal. 10: 167-172.
- Settleman J, (2001): Rac 'n Rho: the music that shapes a developing embryo. Dev. Cell, 1:321-331.
- Settleman J, Albright CF, Foster LC, Weinberg RA, (1992): Association between GTPase activators for Rho and Ras families. Nature, 359:153-154.
- Shen X, Li J, Hu PP, Waddell D, Zhang J, Wang X-F, (2001): The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor- β -mediated stress fiber formation. J. Biol. Chem., 276: 15362-15368.
- Shen X, Hu PP, Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Wang X-F, (1998): TGF- β -induced phosphorylation of Smad3 regulates its interaction with coactivator p300/CREB-binding protein. Mol. Biol. Cell, 9: 3309-3319.
- Shi Y, Massagué J, (2003): Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. Cell, 113:685-700.
- Shi Y, Wang Y-F, Jayaraman L, Yang H, Massagué J, Pavletich NP, (1998): Crystal structure of a Smad MH1 domain bound to DNA: insights on DNA binding in TGF- β signaling. Cell, 94:585-594.

- Siegel PM, Massagué J, (2003): Cytostatic and apoptotic actions of TGF- β in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3: 807-820.
- Simokawa-Kuroki R, Sadano H, Taniguchi S, (1994): a variant actin (β -M) reduces metastasis of mouse B16 melanoma. *Int J Cancer*, 56:689-697
- Small JV, Isenberg G, Gelis JE, (1978): Polarity of actin at the leading edge of cultured cells. *Nature*, 272:638-639.
- Small JV, Rottner K, Kaverina I, Aderson KI, (1998): Assembling an actin cytoskeleton for cell attachment and movement. *Biochim. Biophys. Acta*, 1404:271-281.
- Sontag JM, Aunis D, Bader MF, (1988): Peripheral actin filaments control calcium mediated catecholamine release from streptolysin-O-permeabilized chromaffin cells. *Eur. J. Cell Biol.*, 46:316-326.
- Stiakaki E, Stournaras C, Dimitriou H, and Kalmanti M.,(1997):High sensitivity of leukemic peripheral blood lymphocytes to triethyllead action. *Biochem Pharmacol.*, 54:1371-6.
- Stournaras C, Stiakaki E, Koukouritaki SB, Theodoropoulos PA, Kalmanti M, Fostinis Y and Gravanis A., (1996): Altered actin polymerization dynamics in various malignant cell types: evidence for differential sensitivity to cytochalasin B. *Biochem Pharmacol*, 52:1339-46.
- Stournaras C, Merkler I, Faulstich H, (1988): Thiol group reactivity and polymerization of actin in the presence of ATP analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 155:962-970.
- Sumi T., Matsumoto K., Nakamura T., (2001): Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of Threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276(1): 670-676.
- Sumi T, Matsumoti K, Takai Y, Nakamura T, (1999): Cofilin phosphorylation and actin cytoskeleton dynamics regulated by Rho- and Cdc42- activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.*, 147:1519-1532.
- Sun H-Q, Kwiatkowska K, Yin HL, (1995): Actin monomer binding proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 7:102-110.
- Sun H-Q, Yamamoto M, Mejillano M, Yin HL, (1999): Gelsolin, a multifunctional actin regulatory protein. *J. Biol. Chem.*, 274:33179-33182.
- Sun PD, Davies DR, (1990); The cysteine-knot growth factor superfamily. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 24:269-291.
- Suya E, Wadhawa R, Kawasaki H, Yaguchi T, Kaul SC, Nakajima M, Taira K, (2004): LIM kinase-2 targeting as a possible anti-metastasis therapy. *J. Gene. Med.* 6:357-363.

- Tapon N, Hall A, (1997): Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organisation of the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9:86-92
- ten Dijke P, Goumans M-J, Itoh F, Itoh S, (2002): Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J. Cell Physiol.*, 191: 1-16.
- Theriot JA, Satterwhite LL, (1997): New wrinkles in cytokinesis. *Nature*, 385(6615):388-9.
- Thiery JP, (2003): Epithelial-mesendhymal transitions in development and pathologies. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 15:740-746.
- Tian F, DaCosta Byfield S, Parks WT, Yoo S, Felici A, Tang B, Piek E, Wakefield LM, Roberts AB, (2003): Reduction in Smad2/3 signaling enhances tumorigenesis but suppresses metastasis of breast cancer cell lines. *Cancer Res.*, 63: 8284-8292.
- Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA, (2002): Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 349-363.
- Topper JN, DiChiara MR, Brown JD, Williams AJ, Falb D, Collins T, Gimbrone MA Jr, (1998): CREB binding protein is a required coactivator for Smad-dependent transforming growth factor β transcriptional responses in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95: 9506-9511.
- Tosh D, Slack JM, (2002): How cells change their phenotype. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 187-194.
- Tsukazaki T, Chiang TA, Davison AF, Attisano L, Wrana JL, (1998): SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGF- β receptor. *Cell*, 95:779-791.
- Ueda Y, Wang S, Dumont N, Yi JY, Koh Y, Arteaga CL, (2004): Overexpression of HER2 (erbB2) in human breast epithelial cells unmasks transforming growth factor β -induced cell motility. *J. Biol. Chem.*, 279: 24505-24513.
- Uemura M, Swenson ES, Gaca MDA, Giordano FJ, Reiss M, Wells RG, (2005): Smad2 and Smad3 play different roles in rat hepatic stellate cells function and α -smooth muscle actin organization. *Mol. Biol. Cell*, 16:4214-4224.
- Valster AH, Hepler PK, Chernoff J, (2000): Plant GTPases: The Rhos in bloom. *Trends Cell Biol.*, 10:141-146.
- Van Aelst L, and D'Souza-Schorey C, (1997): Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.*, 11: 2295-2322.

- Vandekerckhove J, Weber K, (1978): At least six different actins are expressed in a higher mammal: an analysis based on the amino acid sequence of the amino-terminal tryptic peptide. *J. Mol. Biol.* 122:783-802.
- Vandekerckhove J, Weber K, (1979): The complete amino acid sequence of actins from Bovine Aorta, Bovine Heart, Bovine fast skeletal Muscle and Rabbit slow skeletal Muscle. *Differentiation* 14:123-133.
- Vandekerckhove J, Vancompernelle K, Honore B, Celis J, (1990): Comparative two-dimensional gel analysis and microsequencing identifies gelsolin as one of the most prominent downregulated markers of transformed human fibroblasts and epithelial cells. *J Cell Biol*, 111:95-102.
- Vaughan MB, Howard EW, Tomasek JJ, (2000): Transforming growth factor- β 1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast. *Exp. Cell Res.*, 257: 180-189.
- Vershueren H, Van der Taelen I, Dewit J, DeBraekeleer J, De Baetselier, (1994): Metastatic competence of BW5147 T-lymphoma cell lines is correlated with in vitro metastasis. *J Leukoc Biol*, 55:552-556.
- Walker JL, Fournier AK, Assoian RK, (2005): Regulation of growth factor signalling and cell cycle progression by cell adhesion and adhesion dependent changes in cellular tension. *Cytok. Growth Factor Rev.*, 16:395-405.
- Walsh TP, Weber A, Higgins J, Bonder EM, Mooseker MS, (1984): Effect of villin on the kinetics of actin polymerization, *Biochemistry* 23:2613-2621.
- Wang T, Li BY, Danielson PD, Shah PC, Rockwell S, Lechleider RJ, Martin J, Manganaro T, Danahoe PK, (1996): The immunophilin FKBP12 functions as a common inhibitor of the TGF beta family type I receptors. *Cell*, 86: 435-444.
- Watanabe M, Masuyama N, Fukuda M, Nishida E, (2000): Regulation of intracellular dynamics of Smad4 by its leukemia-rich nuclear export signal. *EMBO R.* 1: 176-182.
- Weeds A and Maciver SK, (1993): F-actin capping proteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.*, 5:63-69.
- Wheeler AP, Ridley AJ, (2004): Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp. Cell Res.* 301:43-49.
- Wherlock M, Gampel A, Futter C, Mellor H, (2004): Farnesyltransferase inhibitors disrupt EGF receptor traffic through modulation of the RhoB GTPase. *J. Cell Sci.*, 117:3221-3231.
- Wherlock M and Mellor H, (2002): The Rho GTPase family: a Racs to Wrchs story. *J. Cell Sci.* 115:239-240

- Wieser R., Wrana J. L., Massagué J., (1995): GS domain mutations that constitutively activate T β R-I, the downstream signaling component in the TGF- β receptor complex. *EMBO J.* 14(10): 2199-2208.
- Wilkes MC, Murphy SJ, Garamszegi N, Leof EB, (2003): Cell-type specific activation of PAK2 by transforming growth factor β independent of Smad2 and Smad3. *Mol. Cell. Biol.*, 23: 8878-8889.
- Wilkins A and Insall RH, (2001): Small GTPases in Dictyostelium: lessons from a social amoeba. *Trends Gene.*, 17:41-48.
- Wong C, Rougier-Chapman EM, Frederick JP, Datto MB, Liberatint, Li J-M, Wang X-F, (1999): Smad3/Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-June promoter by transforming growth factor- β . *Mol. Cell. Biol.*, 19: 1821-1830.
- Wotton D, Knoepfler PS, Laherty D, Eisenman RN, Massagué J, (2001): The Smad transcriptional corepressor TGIF recruits mSin3. *Cell Growth Differ.*, 12: 457-463.
- Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Milsock LM, Whillers MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA (1988): Novel regulators of bone formation:molecular clones and activities. *Science*, 242:1528-1534.
- Wozniak MA, Modzelewska K, Kwong L, Keely PJ, (2004): Focal adhesion regulation of cell behavior. *Biochim. Bioph. Acta*, 1692: 103-119.
- Wrana JL, Attisano L, (2000): The Smad pathway. *Cytok. Growth Fact. Rev.*, 11:5-13.
- Wrana J, Attisano L, Wieser R, Ventura F, Massague J, (1994): Mechanism of activation of the TGF- β 1 receptor. *Nature*, 370:341-347.
- Wu G, Chen Y-G, Ozdamar B, Gyuricza CA, Chong PA, Wrana JL, Massagué J, Shi Y, (2000): Structural basis of Smad2 recognition by the Smad Anchor for Receptor Activation. *Science*, 287: 92-97.
- Wu J-W, Hu M, Chai J, Seoane J, Huse M, Li C, Rigotti DJ, Kyin S, Muir TW, Fairman R, et al., (2001): Crystal structure of a phosphorylated Smad2: recognition of phosphoserine by the MH2 domain and insights on Smad function in TGF- β signaling. *Mol. Cell*, 8: 1277-1289.
- Wu J-W, Krawitz AR, Chai J, Li W, Zhang F, Luo K, Shi Y, (2002): Structural mechanism of Smad4 recognition by the nuclear oncoprotein Ski: Insights on Ski-mediated repression of TGF- β signaling. *Cell*, 111: 357-367.
- Xiao Z, Latek R, Lodish HF, (2003): An extended bipartite nuclear localization signal in Smad4 is required for its nuclear import and transcriptional activity. *Oncogene*, 22: 1057-1069.

- Xiao Z, Liu X, Henis YI, Lodish HF, (2000a): A distinct nuclear localization signal in the N terminus of Smad 3 determines its ligand-induced nuclear translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 7853-7858.
- Xiao Z, Liu X, Lodish HF, (2000b): Importin β mediates nuclear translocation of Smad3. *J. Biol. Chem.*, 275: 23425-23428.
- Xu L, Chen Y-G, Massagué J, (2000): Smad2 nuclear import function masked by SARA and unmasked by TGF- β -dependent phosphorylation. *Nat. Cell Biol.*, 2: 559-562.
- Xu L, Kang Y, Col S, Massagué J, (2002): Smad2 nucleocytoplasmic shuttling by nucleoporins CAN/Nup214 and Nup153 feeds TGF- β signaling complexes in the cytoplasm and nucleus. *Mol. Cell*, 10: 271-282.
- Yagi K, Goto D, Hamamoto T, Takenoshita S, Kato M, Miyazono K, (1999): Alternatively spliced variant of Smad2 lacking exon 3. *J. Biol. Chem.*, 274: 703-709.
- Yakymovych I, ten Dijke P, Heldin C-H, Souchlnytskyi S, (2001): Regulation of Smad signalling by protein kinase C. *FASEB J.*, 15: 553-555.
- Yamaguchi K, Nagai S, Ninomiya-Tsuji J, Nishita M, Tamai K, Irie K, Ueno N, Nishida E, Shibuya H, Matsumoto K, (1999): XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *EMBO J.*, 18:179-187.
- Yao D, Dore JJ Jr, Leof EB, (2000): FKBP12 is a negative regulator of transforming growth factor-beta receptor internalization. *J. Biol. Chem.*, 275: 13149-12154.
- Yi JY, Shin I, Arteaga CL, (2005): Type I transforming growth factor β receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J. Biol. Chem.*, 280: 10870-10876.
- Yingling JM, Datto MB, Wong C, Frederick JP, Liberati NT, Wang X-F, (1997): Tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor β -inducible DNA binding protein. *Mol. Cell Biol.*, 17: 7019-7028.
- Yoshioka K, Foletta V, Bernard O, Itoh K, (2003): A role for LIM kinase in cancer invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100:7247-7252.
- Yu L., Hebert M. C., Zhang Y. E., (2002): TGF- β receptor-activated p38 MAP kinase mediates Smad-independent TGF- β responses. *EMBO J.* 21(14): 3749-3759.
- Zalcman G, Closson I, Linares-Cruz G, Lerebours F, Honore N, Tavitian B, Olofsson B, (1995): Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene*, 10:1935-1945.

- Zawel L, Dai JL, Buckhaults P, Zhou S, Kinzler KW, Vogelstein B, Kern SE, (1998): Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators. *Mol. Cell*, 1: 611-617.
- Zhang FL, Casey PJ, et al., (1996): Protein prenylation: molecular mechanisms and functional consequences *Annu. Rev. Biochem.*, 65:241- 269
- Zhang L, Duan CJ, Binkley C, Li G, Uhler MD, Logsdon CD, Simeone DM, (2004): A transforming growth factor β -induced Smad3/Smad4 complex directly activates protein kinase A. *Mol. Cell. Biol.*, 24: 2169-2180.
- Zhang L, Deng M, Parthasarathy R, Wang L, Mongan M, Molkentin JD, Zheng Y, Xia Y, (2005): MEKK1 transduces activin signals in ketarinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol. Cell. Biol.*, 25: 60-65.
- Zhang Y, Derynck R, (2000): Transcriptional regulation of the transforming growth factor $-\beta$ -inducible mouse germ line Iga constant region gene by functional cooperation of Smad, CREB, and AML family members. *J. Biol. Chem.*, 275: 16979-16985.
- Zhang Y, Feng X-H, Derynck R, (1998): Smad3 and Smad4 cooperate with c-June/c-Fos to mediate TGF- β -induced transcription. *Nature*, 394: 909-913.
- Zheng Y, Fischer DJ, Santos MF, Tigyi G, Pasteris NG, Gorski JL, Xu Y, (1996): The faciogenital dysplasia gene product-1 FGD1 functions as a Cdc42Hs-specific guanine nucleotide exchange factor. *J. Biol. Chem.*, 271: 33169-33172.
- Zhu X, Assoian RK, (1995): Integrin-dependent activation of MAP kinase: a link to shape-dependent cell proliferation. *Mol. Biol. Cell.*, 6:273-282.
- Zimemerle CT and Frieden C, (1986): Effect of temperature on the mechanism of actin polymerization. *Biochemistry*, 25:6432-6438.