Ευρωπαϊκή Επιτροπή, Ευρωπαϊκό Κοινοτικό Ταμείο Ελληνική Δημοκρατία, Υπουργείο Ανάπτυξης Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας

Πανεπιστήμιο Κρήτης Σχολή Επιστημών Υγείας Τμήμα Ιατρικής



Πρόγραμμα Ενίσχυσης του Ερευνητικού Δυναμικού (Π.ΕΝ.Ε.Δ) – 2003

Διδακτορική Διατριβή

## Θετική και αρνητική ρύθμιση των μικρών GTPασών Rho και του κυτταροσκελετού ακτίνης από τις BMP και TGF-β

## Κωνσταντινίδης Γεώργιος

# Επιβλέπων: Στουρνάρας Χρήστος, Καθηγητής Βιοχημείας Εργαστήριο Βιοχημείας Τομέας Βασικών Επιστημών

Ηράκλειο 2011

Το έργο συγχρηματοδοτείται κατά:

 75% της Δημόσιας Δαπάνης από την Ευρωπαϊκή Ένωση – Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο

 25% της Δημόσιας Δαπάνης από το Ελληνικό Δημόσιο – Υπουργείο Ανάπτυξης – Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας
και από τον Ιδιωτικό Τομέα

στο πλαίσιο του Μέτρου 8.3 του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα – Γ΄ Κοινοτικό Πλαίσιο Στήριξης.

## Επιβλέπων Καθηγητής

Χρήστος Στουρνάρας, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## Συμβουλευτική Επιτροπή

Χρήστος Στουρνάρας, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Δημήτρης Καρδάσης, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Χρήστος Τσατσάνης, Αναπλ. Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

## <u>Εξεταστική Επιτροπή</u>

Χρήστος Στουρνάρας, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Δημήτρης Καρδάσης, Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Χρήστος Τσατσάνης, Αναπλ. Καθηγητής Κλινικής Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Αριστείδης Μουστάκας, Καθηγητής, Πανεπιστήμιο Ουψάλας Αχιλλέας Γραβάνης, Καθηγητής Φαρμακολογίας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Γιώργος Σουρβίνος, Αναπλ. Καθηγητής Κλινικής Ιολογίας , Πανεπιστήμιο Κρήτης Ευαγγελία Παπακωνσταντή, Επίκ. Καθηγήτρια Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης Στα πλαίσια της παρούσας διδακτορικής διατριβής πειραματικά αποτελέσματα δημοσιεύτηκαν σε επιστημονικά περιοδικά και παρουσιάστηκαν σε συνέδρια με τη μορφή αναρτημένων ανακοινώσεων.

## Δημοσιεύσεις

1. Papadopoulou, N., Charalampopoulos, I., Anagnostopoulou, V., **Konstantinidis, G.**, Foller, M., Gravanis, A., Alevizopoulos, K., Lang, F., Stournaras, C. Membrane androgen receptor activation triggers down-regulation of PI-3K/Akt/NF-kappaB activity and induces apoptotic responses via Bad, FasL and caspase-3 in DU145 prostate cancer cells. *Mol Cancer* **7**, 88 (**2008**).

2. **Konstantinidis, G.**, Moustakas, A. & Stournaras, C. Regulation of myosin light chain by BMP signaling controls actin cytoskeleton remodeling. *Cell Physiol Biochem*. Accepted on Sep **2011**.

#### Αναρτημένες Ανακοινώσεις

 Konstantinidis G., Kardassis D., Moustakas A., Stournaras C. Signaling And Phenotypic Effects Of Bone Morphogenetic Protein 7 In Swiss3T3 Fibroblasts. 60° Πανελλήνιο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρείας Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας, 20-22 Νοεμβρίου 2009, Αίγλη Ζαππείου, Αθήνα. Υποτροφία συμμετοχής στο συνέδριο για τη αναρτημένη ανακοίνωση.

2. Galatea Kallergi, **Georgios Konstantinidis**, Maria Papadaki, Sophia Agelaki, Dimitris Mavroudis, Christos Stournaras, Vassilis Georgoulias. Apoptotic Circulating Tumor Cells (CTCs) in early and metastatic breast cancer patients. 102<sup>nd</sup> American Association for Cancer Research Annual Meeting, 2-6 Απριλίου **2011**, Orange Country Convention Center, Orlando, Florida.

#### Αντί προλόγου,

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στα πλαίσια του Προγράμματος Ενίσχυσης του Ερευνητικού Δυναμικού (ΠΕΝΕΔ)-2003, # 688 στο Εργαστήριο Βιοχημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Καθηγητή Χρήστο Στουρνάρα για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ ως διδακτορικός φοιτητής υπό την επίβλεψή του στο εργαστήριο Βιοχημείας. Η καθοδήγηση και επιστημοσύνη του ήταν διαρκώς δίπλα μου όλα αυτά τα χρόνια. Τον ευχαριστώ επίσης για τη συμβολή που είχε στη διαμόρφωση του νοητικού σχήματος της φιλοσοφίας της επιστήμης καθώς επίσης και για τις διαρκείς και επιτυχημένες προσπάθειές του να βρει επιπλέον πηγές χρηματοδότησης τις οποίες παρείχε σε αναλώσιμα και μισθούς.

Ευχαριστώ επίσης τους καθηγητές Δημήτρη Καρδάση και Χρήστο Τσατσάνη για τη συμμετοχή τους στη συμβουλευτική επιτροπή. Η συμβολή του καθηγητή Δημήτρη Καρδάση ήταν καθοριστικότατη είτε με την καθοδήγησή του σε όλες της ενδιάμεσες συναντήσεις ενημέρωσης της πορείας της διατριβής μου είτε με την φιλική και υλική υποστήριξη του εργαστηρίου του. Ευχαριστώ τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την τιμή που μου κάνουν να συμμετέχουν σε αυτή. Τον καθηγητή Γραβάνη Αχιλλέα για την υποστήριξή του στις ενδιάμεσες συναντήσεις, τον καθηγητή Σουρβίνο Γιώργο και την καθηγήτρια Ευαγγελία Παπακωνσταντή για την αδιάκοπη συνεισφορά της σε θεωρητικό και πρακτικό επίπεδο. Επίσης, ευχαριστώ ιδιαίτερα τον καθηγητή Άρη Μουστάκα για τη διαρκή και θεμελιώδη συμβολή του στη διατριβή μου. Τον ευχαριστώ για την ευκαιρία που μου έδωσε να εργαστώ στο εργαστήριό του στο Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala Branch και να έρθω σε επαφή με άλλους επιστήμονες και νέες τεχνικές. Η ακατάπαυστη βοήθειά του σε πειραματικό και συγγραφικό επίπεδο, ο ζήλος για την επιστήμη, η καλοσύνη και η ανθρωπιά του καθώς και η ευρύτητα του πνεύματός του θα με συνοδεύουν για πάντα.

Ευχαριστώ θερμότατα όλα τα μέλη των εργαστηρίων της πτέρυγας για την προθυμία, τη βοήθεια και τις αντοχές τους. Ιδιαίτερα ευχαριστώ: τη Λίνα Βαρδούλη για την καθοδήγηση και την υπομονή της στις πρώτες και όχι μόνο στιγμές της επαφής μου με το εργαστήριο, η συμβολή της οποίας είναι ανεκτίμητη, την Έλσα Παπαδημητρίου για την συνεργασία και αλληλοβοήθεια στα πλαίσια του κοινού μας προγράμματος, τη Βάλια Αναγνωστοπούλου για την ευχάριστη διάθεση που πάντα μου ενέπνεε, τη Ναταλία Παπαδοπούλου για τη διαρκή προθυμία και τη συνεργασία μας, την Ελευθερία Βασιλάκη για τη συμβολή της σε πειραματικό επίπεδο και τη Γαλάτεια Καλλέργη για τη υποστήριξή της στο ξεκίνημα της εργασίας μου και τη μετέπειτα συνεργασία μας. Ελπίζω η δική μου συνεισφορά να ήταν αντάξια των δικών σας. Ευχαριστώ επίσης τους φίλους μου Δημήτρη Κανέλλη, Μαρία Αμπράζη, Μάκη Καπέλλιο και Μιχάλη Σαϊτάκη για τη φιλοξενία.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον αδερφό μου Νίκο και τους γονείς μου Έλενα και Μπάμπη για την αγάπη, την κατανόηση και την εμπιστοσύνη τους όλα αυτά τα χρόνια. Η οικονομική τους βοήθεια αποτέλεσε ικανή και αναγκαία συνθήκη προκειμένου να εκπονηθεί η διδακτορική μου διατριβή.

<u>Περιεχόμενα</u>

<u>1. Περίληψη</u>	15
2. Abstract	19
3. Εισαγωγή	23
3.1. Η οικογένεια του TGF-β	25
3.2. TGF-β/BMP και αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα	26
3.3. Έκκριση και εξωκυτταρική ρύθμιση του TGF-β	27
3.4. TGF-β υποδοχείς	28
3.5. Οικογένεια των Smad	30
3.6. Non-Smad σηματοδότηση τις οικογένειας του TGF-β	34
3.7. Ρύθμιση και ενδοκύττωση των υποδοχέων του TGF-β	35
3.8. Αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων του TGF-β και I-Smads	37
3.9. Ρύθμιση της κυκλοφορίας των Smad μέσω κινητήριων πρωτεϊνών	38
3.10. Μετακίνηση των Smad δια μέσω του πυρηνικού φακέλου	39
3.11. Ρύθμιση της μετακίνησης των Smad στον πυρήνα	39
3.12. Τα μονοπάτια των Wnt και MAPK έχουν αρνητικές επιδράσεις στη σηματοδότηση του BMP/Smad μονοπατιού	41
3.13. Αλληλεπίδραση μεταξύ του TGF-β/BMP και άλλων μονοπατιών	42
3.14. Smad και μεταγραφική ρύθμιση	44
3.15. Η οικογένεια των Rho GTΡασών	48
3.16. Rho GTΡάσες και κυτταροσκελετός ακτίνης	49
3.17. Κυτταροσκελετός - Δομικά συστατικά	49
3.18. Οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης	52
3.19. Rho GTΡάσες και έκφραση γονιδίων	54
3.20. Rho GTΡάσες και κυτταρικός κύκλος	55
3.21. Rho GTΡάσες κατά τη μίτωση	58
3.22. Rho GTΡάσες κατά την κυτοκίνηση	58
3.23. Rho GTΡάσες και μορφογένεση – κυτταρική αλληλεπίδραση	59
3.24. Rho GTΡάσες και κυτταρική μετανάστευση	60
3.25. Rho GTΡάσες και κίνηση	60
<u>4. Στόχος της Διατριβής</u>	63
<u>5. Υλικά και Μέθοδοι</u>	69
5.1. Κύτταρα	71
5.2. Αυξητικοί παράγοντες	71
5.3. Αντισώματα	71
5.3.1. Πρωτογενή αντισώματα ανοσοαποτύπωσης	71
5.3.2. Δευτερογενή αντισώματα ανοσοαποτύπωσης	72
5.3.3. Αντισώματα ανοσοφθορισμού	72
5.4. Αντιδραστήρια άμεσου φθορισμού	72
5.5. Αναστολείς	72
5.6. RT-PCR εκκινητές	73
5.7. siRNAs	73

5.8. Διαλύματα	74
5.9. Καλλιέργεια κυττάρων	76
5.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης (SDS-PAGE) – Western blot	77
5.11. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος	78
5.12. Λύση κυττάρων – Ανοσοαποτύπωση	78
5.13. Ανοσοφθορισμός	79
5.14. Ποσοτική μέτρηση και διαχωρισμός του κυτταροσκελετού της ακτί σε διαλυτό και μη διαλυτό κλάσμα	ίνης 80
5.15. Κατακρήμνιση ενεργών Rho GTΡασών	82
5.16. Ανοσοκατακρήμνιση και in vitro δοκιμασία φωσφορυλίωσης κινάσ LIMK	ης 83
5.17. Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης	84
5.18. Δοκιμασία κινητικότητας (Επούλωση τραύματος, wound healing as	say) 85
5.19. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού (MTT assay)	85
5.20. Δοκιμασία απόπτωσης	86
5.21. Επιμόλυνση με μικρά κατασταλτικά RNA	86
5.21.1. NIH3T3	86
5.21.2. HaCaT	87
<u>6. Αποτελέσματα</u>	89
6.1. Ο BMP-7 προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνη	<b>ς91</b>
6.2. Ο BMP-7 επάγει την κυτταρική μετανάστευση χωρίς να επηρεάζει το πολλαπλασιασμό και την απόπτωση	ν 97
6.3. Ο BMP-7 επάγει τη σηματοδότηση των Smad1, MAPK και Rho GTPασα και την έκφραση του <i>RhoB</i> γονιδίου	ών 99
6.4. Η ROCK1 κινάση εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελ της ακτίνης η οποία προκαλείται από BMP-7	ετού 103
6.5. Ο BMP-7 προκαλεί άμεση και παρατεταμένη φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC)	106
6.6. Η φωσφορυλίωση της MLC παίζει βασικό ρόλο κατά την αναδιοργάνα του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από BMP-7	ωση 108
6.7. Ρόλος της Smurf1 λιγάσης ουβικυτίνης κατά την αναδιοργάνωση το κυτταροσκελετού της ακτίνης που επάγεται από BMP-7	υ 110
<u>7. Συζήτηση</u>	113
<u>8. Συμπεράσματα</u>	123
9. Βιβλιογραφία	127
<u>10. Δημοσιεύσεις</u>	147
Regulation of myosin light chain function by BMP signaling controls actin cytoskeleton remodeling	149

<u>1. Περίληψη</u>

Η δυναμική της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης υποστηρίζει και συντονίζει ένα ευρύ φάσμα σηματοδοτικών μονοπατιών τα οποία ελέγχουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, τη διαφοροποίηση και τη μετανάστευση. Η πλαστικότητα του κυτταροσκελετού βασίζεται σε πολυ-πρωτεϊνικά σύμπλοκα τα οποία ρυθμίζουν τον πολυμερισμό της ακτίνης, τη σταθερότητα του κυτταροσκελετού και την αλληλεπίδρασή του με την μυοσίνη. Διάφοροι αυξητικοί παράγοντες παρέχουν την απαραίτητη σηματοδότηση η οποία συντονίζει την δυναμική της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Μία τέτοια οικογένεια αυξητικών παραγόντων είναι αυτή του TGF-β (transforming growth factor β) η οποία περιλαμβάνει εκκρινόμενα πολυπεπτίδια όπως οι BMPs (bone morphogenetic proteins) και οι activins. Η παρούσα διατριβή δείχνει ότι η σηματοδότηση του BMP-7 περιλαμβάνει τις Smad1, p38 και p44/44 (Erk1/2) MAP κινάσες καθώς και την επαγωγή του πολυμερισμού της ακτίνης και την αναδιοργάνωση των συμπλόκων των πλακών πρόσφυσης σε Swiss3T3 ινοβλάστες και διάφορες άλλες κυτταρικές σειρές τόσο αποτελεσματικά όσο και ο TGF-β. Επιπλέον, ο BMP-7 επάγει τη μετανάστευση Swiss3T3 ινοβλαστών αφήνοντας ανεπηρέαστο τον κυτταρικό των πολλαπλασιασμό και την απόπτωση. Ένας σημαντικός ρυθμιστής της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, η ROCK κινάση, προκαλεί κατά τη σηματοδότη του BMP-7 αλλαγές στη δυναμική της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης, καθώς αυτός ο αυξητικός παράγοντας επάγει τη γρήγορη ενεργοποίηση των RhoA και RhoB GTPασών με ταυτόχρονη απενεργοποίηση της Cdc42. Παράλληλα, ο BMP-7 επάγει και την έκφραση των RhoB και Smad6 γονιδίων παρέχοντας ταυτοχρόνως έναν θετικό και έναν αρνητικό αντίστοιχα μηχανισμό ανατροφοδότησης στην ίδια τη σηματοδότηση του BMP-7. Η ενεργοποίηση των Rho GTΡασών από τον BMP-7 και επομένως της ROCK καθοδικά, συσχετίζεται με την επαγωγή της φωσφορυλίωσης της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης στη σερίνη 19, αλλά όχι με την ενεργοποίηση της LIMK1. Ο εξειδικευμένος αναστολέας της ROCK κινάσης, Y-27632 αναστέλλει τον πολυμερισμό της ακτίνης και περιορίζει τη μεταναστευτική ικανότητα που οφείλεται στον BMP-7. Επιπροσθέτως, μηχανιστικά, ο ίδιος αναστολέας της ROCK κινάσης αναστέλλει τη φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης στη σερίνη 19 κατά τη σηματοδότηση του BMP-7.

Αποσιώπηση του ενδογενούς πεπτιδίου της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης επίσης αναστέλλει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από τον BMP-7. Έτσι, κατ' επέκταση αυτό το νέο μονοπάτι ρυθμίζει τη μετανάστευση των ινοβλαστών χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό τους. Συμπερασματικά, στην παρούσα διατριβή ο BMP-7 φαίνεται να ενεργοποιεί όχι μόνο το Smad και το λεγόμενο non-Smad μονοπάτι των MAP κινασών, αλλά και το μονοπάτι Rho/ROCK/MLC. Η ενεργοποίηση αυτού του μονοπατιού ρυθμίζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης αλλά και τη μετανάστευση των Swiss3T3 ινοβλαστών.

2. Abstract

Actin cytoskeleton dynamics support and coordinate a large number of signaling events that control cell proliferation, differentiation and migration. Cytoskeletal plasticity is based on multi-protein complexes that regulate actin polymerization, stability and assembly with myosin. Growth factors provide essential signals that govern cytoskeletal dynamics. One such growth factor network is the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) that includes secreted polypeptides such as bone morphogenetic proteins (BMP) and activins. Here, it is demonstrated that BMP-7 signals through Smad1, p38 and p44/42 (Erk1/2) MAPKs and induces actin polymerization and focal adhesion remodeling in starved fibroblasts and various other cell lines as potently as TGF-B. Moreover, BMP-7 induces migration of Swiss3T3 fibroblasts letting at the same time proliferation and apoptosis unaffected. An important regulator of actin remodeling, the kinase ROCK1 mediates changes of actin dynamics by BMP-7, while this growth factor induces rapid activation of RhoA and RhoB GTPases with concomitant inactivation of Cdc42. In parallel, BMP-7 induces RhoB and Smad6 expression providing with a positive and a negative signalling feedback simultaneously. Activation of Rho GTPases and the downstream ROCK1 kinase by BMP-7 correlate well with induction of phosphorylation on Ser19 of the myosin light chain, but not with LIMK1 kinase activation. ROCK inhibitor Y-27632 blocks actin polymerization and reduces migration capacity induced by BMP-7. Furthermore, the same ROCK inhibitor blocks the myosin light chain phosphorylation of Ser19 during BMP-7 signalling. Depletion of endogenous myosin light chain also inhibits the actin remodeling induced by BMP-7. Thus, in a next step, this novel pathway regulates fibroblast migration without affecting cell proliferation. Taking everything into consideration, here it is established not only that BMP signals through Smad and, the so-called, non-Smad pathway of MAPKs, but also through Rho/ROCK pathway which targets myosin light chain during actin remodeling and migration of Swiss3T3 fibroblasts.

3. Εισαγωγή

#### 3.1. Η οικογένεια του TGF-β.

Η οικογένεια του ανθρώπινου TGF-β (Transforming Growth Factor β) αποτελείται από 33 μέλη, τα περισσότερα από τα οποία εκφράζονται ως διμερή, εκκρινόμενα πολυπεπτίδια και ελέγχουν την ανάπτυξη, από το στάδιο του γαστριδίου και την ασυμμετρία του σωματικού άξονα μέχρι τη μορφογένεση οργάνων και την ομοιόσταση των ιστών των ενηλίκων. Εκτός από τον TGF-β η οικογένεια συμπεριλαμβάνει τους BMPs (Bone Morphogenetic Proteins), GDFs (Growth and Differentiation Factors), activins και nodal. Η οικογένεια αυτή είναι συντηρημένη μεταξύ των μεταζώων. Σε κυτταρικό επίπεδο, οι παράγοντες αυτοί ρυθμίζουν τον πολλαπλασιασμό, διαφοροποίηση, πρόσφυση, μετανάστευση και θάνατο ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο και τον κυτταρικό τύπο. Για παράδειγμα ο TGF-β συνήθως αναστέλλει, αλλά κάποιες φορές επάγει, κυτταρικό πολλαπλασιασμό<sup>1</sup>. Επιπλέον, ο nodal μερικές φορές αναστέλλει, ενώ ο BMP επάγει διαφοροποίηση, π.χ. στα αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα<sup>2</sup>. Δρώντας με πολύπλοκο τρόπο σε διάφορους κυτταρικούς τύπους, οι παράγοντες αυτοί, παίζουν ρόλο και σε διάφορες ανθρώπινες ασθένειες, από αυτοάνοσα και καρδιαγγειακά νοσήματα μέχρι τον καρκίνο<sup>3, 4</sup>.

Η ανάπτυξη των αξόνων και της ασυμμετρίας στο σώμα των εμβρύων εξαρτάται από την εντοπισμένη δράση εξωκυτταρικών παραγόντων, όπως των Wnt, nodal και BMP. Η συγκέντρωση των παραπάνω παραγόντων, άλλοι εξωκυτταρικοί ρυθμιστές και ο ανταγωνισμός των υποδοχέων των κυττάρων παίζουν σημαντικό ρόλο κατά τη μορφογένεση των ιστών<sup>5, 6</sup>. Μέλη της οικογένειας του TGF-β συμβάλουν στη διαμόρφωση των ιστών και είναι σημαντικοί ρυθμιστές της ανανέωσης και διαφοροποίησης των αρχέγονων εμβρυϊκών κυττάρων<sup>2, 7</sup>. Οι παράγοντες αυτοί περιλαμβάνουν πολυάριθμα εκκρινόμενα και συντηρημένα πολυπεπτίδια (Πίνακας 1), τα οποία εμφανίζονται στις αρχές της ζωής πολυκυτταρικών οργανισμών (μετάζωα)8. Δομικά, η οικογένεια χαρακτηρίζεται από μία συγκεκριμένη τρισδιάστατη αναδίπλωση και από ένα συγκεκριμένο αριθμό και εντοπισμό καταλοίπων κυστεΐνης στο καρβοξυ-τελικό άκρο του ώριμου πολυπεπτιδίου. Οι πρωτότυπες ισομορφές του TGF-β (TGF-β1, β2, β3), και οι inhibins β διαθέτουν εννέα χαρακτηριστικές κυστεΐνες, οι οκτώ από τις οποίες δημιουργούν τέσσερις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς, ενώ ένας δισουλφιδικός δεσμός ενώνει τα δύο μονομερή. Οι inhibin α, BMPs και GDFs έχουν επτά κυστεΐνες, οι έξι από τις οποίες δημιουργούν τρεις ενδομοριακούς δισουλφιδικούς δεσμούς και η μία ένα διαμοριακό. Οι υπόλοιπες, GDF-3, GDF-9 και BMP-15A διαθέτουν έξι κυστεΐνες στην ώριμη αλληλουχία τους και λείπει ο δισουλφιδικός δεσμός που ενώνει τα μονομερή. Η έλλειψη ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των μονομερών παρέχει ρυθμιστική ευελιξία, για παράδειγμα, η lefty δημιουργεί μη ομοιοπολικό δεσμό με τη nodal και δεσμεύεται στον GDI (glycosylphosphatidylinositol)anchored συν-υποδοχέα της EGF-CFC (epidermal growth factor-Cripto/FRL-1/Cryptic) οικογένειας, οδηγώντας στην αναστολή της σηματοδότησης του nodal<sup>9</sup>.

#### 3.2. TGF-β/BMP και αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα.

Τα αρχέγονα εμβρυϊκά κύτταρα διαθέτουν δυνατότητα αυτο-ανανέωσης και πολυδυναμικότητας στην δημιουργία διάφορων εμβρυϊκών και εφηβικών κυτταρικών τύπων του σώματος ενός μεταζώου<sup>10</sup>. Αυξητικοί παράγοντες όπως ο TGF-β και ο FGF ρυθμίζουν την αυτο-ανανέωση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. 0 FGF2. αρχέγονων εμβρυϊκών 0 πιο διαδεδομένα χρησιμοποιούμενος αυξητικός παράγοντας ο οποίος υποστηρίζει την αυτοανανέωση των ESC (embryonic stem cells) ποντικού και ανθρώπου σε καλλιέργεια, επάγει τη δράση των TGF-β/activin και καταστέλλει τη δράση των BMP-like μονοπατιών<sup>11, 12</sup>. Επιπροσθέτως, φαρμακευτικοί αναστολείς της οικογένειας των υποδοχέων τύπου Ι του TGF-β/nodal καταστέλλει την αυτοανανέωση των ESC ποντικού και ανθρώπου<sup>12</sup>. Γενικά, ο TGF-β αναστέλλει τη διαφοροποίηση των πολυδύναμων προγονικών κυττάρων, ενώ ο BMP επάγει τη διαφοροποίησή τους. Για να προωθήσει την αυτο-ανανέωση των ESCs, ο TGFβ/nodal ενεργοποιεί τις Smad2 και Smad3, οι οποίες επάγουν απευθείας την έκφραση του Nanog, έναν από τους κρίσιμους μεταγραφικούς παράγοντες των αρχέγονων κυττάρων<sup>13</sup>. Τα μονοπάτια των TGF-β και FGF συνεργάζονται προωθώντας την δέσμευση των Smad στον υποκινητή του Nanog. Ο NANOG αποτελεί ένα ανταγωνιστικό μοριακό σημείο αλληλεπίδρασης μεταξύ του TGF-β (ανανεωτικός παράγοντας) και BMP (παράγοντας διαφοροποίησης) στα ESCs. Ο NANOG προσδένεται στη Smad1, αναστέλλοντας την μεταγραφική της

ικανότητα και περιορίζει τη σηματοδότηση του BMP για πρώιμη μεσοδερμική διαφοροποίηση ή ιστοειδική διαφοροποίηση σε μετέπειτα αναπτυξιακό στάδιο<sup>14</sup>. Σε αυτή τη λογική επιπλέον ρυθμιστές της αυτο-ανανέωσης και της διαφοροποίησης των ECSs μπορούν να προκύψουν από τη σάρωση του γονιδιώματος για μεταγραφικούς και σηματοδοτικούς παράγοντες αυτών των μονοπατιών<sup>15</sup>.

#### 3.3. Έκκριση και εξωκυτταρική ρύθμιση του TGF-β.

Όλα τα μέλη του TGF-β συντίθενται ως πρόδρομα μόρια με ένα πρόσθετο αμινοτελικό προ-πεπτίδιο ακολουθούμενο από ένα μικρότερο καρβοξυ-τελικό ώριμο πολυπεπτίδιο<sup>16</sup>. Διαμοριακοί δισουλφιδικοί δεσμοί ενώνουν τα διμερή αυτών των προδρόμων μέσω συντηρημένων καταλοίπων κυστεΐνης στις προπεπτιδικές και ώριμες πεπτιδικές αλληλουχίες. Επειδή οι πρόδρομες πρωτεΐνες βρίσκονται στο μονοπάτι της έκκρισης, furin-like πρωτεάσες πρωτεολύουν το προ-πεπτίδιο και το διαχωρίζουν από την ώριμη αλληλουχία. Το TGF-β προπεπτίδιο, LAP (latency-associated peptide), συνεχίζει να μεταφέρει το μικρότερο ώριμο πεπτίδιο, λειτουργώντας ως συνοδός κατά την εξωκύττωση του συμπλόκου. Επίσης, μεσολαβεί στην απόθεση του TGF-β στην ECM (extracellular matrix) μέσω της ομοιοπολικής του σύνδεσης με τις LTBPs (latent TGF-βbinding proteins), και με ECM-binding πρωτεΐνες, όπως η fibronectin και η fibrillin-1<sup>17</sup>. Η απελευθέρωση των ώριμων καρβοξυ-τελικών διμερών από τέτοια σύμπλοκα στηρίζεται σε διάφορες πρωτεάσες, όπως οι ελαστάσες (οι οποίες πρωτεολύουν τη fibrillin-1), πρωτεάσες της οικογένειας BMP-1/Tolloid (οι οποίες πρωτεολύουν τις LTBPs) και μεταλλοπρωτεάσες, όπως η MMP-2 (οι οποίες πρωτεολύουν τις TGF-β/LAPs)<sup>16</sup>.

Η ικανότητα του TGF-β-LAP να διατηρεί τους προσδέτες σε μία ανενεργή μορφή είναι συντηρημένη μεταξύ των προσδετών της οικογένειας του TGF-β, όπως των GDF-8 και GDF-11<sup>18, 19</sup>. Τα προπεπτίδια των nodal, BMP-4 και BMP-7 δεν δρουν ως εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές, αλλά ρυθμίζουν τη σταθερότητα και ενεργότητα των ώριμων προσδετών, συμπεριλαμβανομένης και της αποικοδόμησης στα λυσοσώματα, που περιορίζει τη διαθεσιμότητά τους<sup>20-22</sup>. Παρομοίως, το προ-πεπτίδιο του nodal δεσμεύεται στον Cripto συν-υποδοχέα

μέσα στα εκκριτικά κυστίδια και δίπλα στην επιφάνεια των κυττάρων<sup>23</sup>. Ο Cripto δημιουργεί σύμπλοκα και με τον ώριμο nodal και ενισχύει τη σηματοδότηση μέσω του συμπλόκου του υποδοχέα κινάσης<sup>24</sup>. Το σύμπλοκο Cripto-nodal-υποδοχέα ακολουθεί ένα συγκεκριμένο μονοπάτι ενδοκυττάρωσης το οποίο χαρακτηρίζεται από την πρωτεΐνη flotillin, πιθανόν οδηγούμενο σε αποικοδόμηση. Άλλοι TGF-β προσδέτες απενεργοποιούνται στον εξωκυττάριο χώρο από ανταγωνιστές, όπως ο noggin και ο chondrin, οι οποίοι απενεργοποιούν BMPs και ο follistatin, ο οποίος απενεργοποιεί activins<sup>25, 26</sup>. Αυτοί οι εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές βοηθούν στη διαμόρφωση της συγκέντρωσης αυτών των παραγόντων που επηρεάζουν την ανάπτυξη των εμβρύων<sup>27</sup>.

#### 3.4. TGF-β υποδοχείς.

Όλα τα μέλη του TGF-β επιδρούν στα κύτταρα με την πρόσδεσή τους στους υποδοχείς τύπου Ι και ΙΙ οι οποίοι δημιουργούν ετερο-τετραμερή κατά την αλληλεπίδρασή τους με τα διμερή των προσδετών. Υπάρχουν πέντε υποδοχείς τύπου ΙΙ και επτά υποδοχείς τύπου Ι στον άνθρωπο και σε άλλα θηλαστικά και χαρακτηρίζονται από μία κυτταροπλασματική περιοχή με ισχυρή δράση κινάσης σερίνης/θρεονίνης και μια πιο αδύνατη δράση κινάσης τυροσίνης, κατατάσσοντάς τους σε υποδοχείς διπλής εξειδίκευσης (Πίνακας 1). Οι υποδοχείς τύπου Ι είναι επίσης γνωστοί ως ALKs (activin-like kinases). Τα μέλη της οικογένειας του TGF-β αλληλεπιδρούν και με συν-υποδοχείς που άλλοτε ενισχύουν και άλλοτε περιορίζουν τη σηματοδότηση των Uποδοχείς που άλλοτε σα θηλαστικά είναι οι υποδοχείς τύπου ΙΙ, όπως ο endoglin και ο TβRIII (TGF-βR3 και proteoglycan betaglycan), καθώς και η οικογένεια του RGM (repulsive guidance molecule, γνωστός και ως Dragon) (Πίνακας 1).

Η δέσμευση των προσδετών στους διαρκώς ενεργούς υποδοχείς τύπου ΙΙ προκαλεί τη συμπλοκοποίηση τους με τους υποδοχείς τύπου Ι, επιτρέποντας στους υποδοχείς τύπου ΙΙ να φωσφορυλιώσουν τους υποδοχείς τύπου Ι στην κυτταροπλασματική περιοχή juxtamembrane, οδηγώντας στην ενεργοποίηση της δραστικότητας κινάσης. Π.χ. σύνδεση του TGF-β στον TβRII (TGF-βR2) δημιουργεί τις προϋποθέσεις που χρειάζονται για τη στρατολόγηση του ΤβRI (ALK5, TGF-βR1). Δομικές αναλύσεις των συμπλόκων προσδετών TGF-β και BMP με τις εξωκυτταρικές περιοχές των αντίστοιχων υποδοχέων τύπου Ι και ΙΙ δείχνουν ότι οι TGF-β προσδέτες συνδέονται και στους δύο ισχυρά, ενώ οι εξελικτικά αρχαιότεροι BMP προσδέτες δεσμεύονται πιο χαλαρά στους δύο υποδοχείς<sup>28</sup>.

	H. sapiens							
Pathway	BMP	GDF	Activin	TGFβ	AMH	Inhibitors		
Ligand	BMP2, 4 BMP5, 6, 7 BMP8A, 8B BMP9, 10	GDF5, 6, 7 GDF9b GDF10, 11 GDF15 (MIC1)  GDF1, 3 GDF8 (MYO) GDF9	Inhibin βA Inhibin βB Nodal	ΤGFβ1 ΤGFβ2 TGFβ3	AMH (MIS)	BMP3 Inhibin α Inhibin βC Inhibin βE LEFTYA LEFTYB		
RII	BMPRII ActRIIA, ActRIIB	BMPRII ActRIIA, ActRIIB	ActRIIA ActRIIB	τβrii	AMHRII	N/A		
RI	BMPRIA (ALK3) BMPRIB (ALK6) ALK2 ALK1	BMPRIA (ALK3) BMPRIB (ALK6) ALK2	ActRIB (ALK4) ALK7	TβRI (ALK5)  ALK1 ALK2	BMPRIA (ALK3) BMPRIB (ALK6) ALK2	N/A		
		ActRIB (ALK4) ALK7 TβRI (ALK5)		BMPRIA (ALK3)	MPRIA (ALK3)			
RIII	RGMa, b, c (+)	Cripto 3 (+)	Cripto 3 (–) Cripto 1 (+)	TβRIII (+) Endoglin (+) Cripto 3 (–)	?	TβRIII (–) Cripto 3 (–)		
R-Smad	SMAD1, 5, 8	SMAD1, 5, 8	SMAD2, 3	SMAD2, 3	SMAD1, 5, 8	N/A		
		SMAD2, 3		SMAD1, 5, 8				
Co-Smad	SMAD4	SMAD4	SMAD4	SMAD4	SMAD4	N/A		
I-Smad	SMAD6, 7	SMAD6, 7	SMAD7	SMAD7	SMAD6, 7	N/A		
		C. elegans						
Pathway	BMP	Activin	Other	Sma/Mab Dauer		Dauer		
Ligand	Dpp Gbb	dActivin Daw	Mav Myo	DBL-1		DAF-7		
RII	Put Wit	Put Wit	?	DAF-4		DAF-4		
RI	Tkv Sax	Babo	?	SMA-6		DAF-1		
RIII	?	?	?	?		?		
R-Smad	imad Mad dSmad2 ?		SM.	SMA-2 DAF-8 SMA-3 DAF-14				
Co-Smad	Medea	Medea	?	SM	A-4	DAF-3 (?)		
I-Smad	Dad	?	?	TAG-	68 (?)	TAG-68 (?)		

**Πίνακας 1. Μονοπάτια του TGF-β σε Η. sapiens, D. melanogaster και C. elegans.** Οι υποδοχείς παρουσιάζονται ως τύπου ΙΙ (RII), τύπου Ι (RI) και τύπου ΙΙΙ (RII) συν-υποδοχείς. Οι διακεκομμένες γραμμές διαχωρίζουν κατηγορίες προσδετών και υποδοχέων βασισμένοι στο διαχωρισμό μεταξύ BMP και TGF-β/activins-like μονοπατιών. Προσδέτες, υποδοχείς τύπου Ι και R-Smads είναι χρωματισμένοι: γαλάζιο, BMP-like μονοπάτια και κόκκινο, TGF-β/activins-like μονοπάτια. Τα ερωτηματικά συμβολίζουν άγνωστες σηματοδοτικές σχέσεις. Οι GDF-8 και GDF-15 παρουσιάζονται με τα εναλλακτικά τους ονόματα [myostatin (MYO) και macrophage inhibitory cytocine 1 (MIC1)] τα οποία είναι πιο συνηθισμένα στη βιβλιογραφία. Οι LEFTYA και B είναι επίσης γνωστοί ως LEFTY2 και 1 αντίστοιχα. Ο συν-υποδοχέας TβRII είναι γνωστός ως betaglycan. Οι Cripto 1 και 3 είναι επίσης γνωστοί ως TDGF-1 και TDGF-3 αντίστοιχα. Στο RII ομάδα, (+) και (-) συμβολίζουν θετικές και αρνητικές επιδράσεις αντίστοιχα, στη σηματοδότηση

από τον κάθε συν-υποδοχέα. N/A, not applicable. Πηγή πίνακα: Moustakas, A. & Heldin, C.H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714 (2009)<sup>29</sup>.

## 3.5. Οικογένεια των Smad.

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς τύπου Ι φωσφορυλιώνουν πρωτεΐνες της οικογένειας των Smad στο καρβοξυ-τελικό άκρο τους (Εικόνες 1, 2). Οι Smad αποτελούνται από τρεις περιοχές: (i) μία MH1 (N-terminal Mad-homology 1) περιοχή η οποία μπορεί να αλληλεπιδρά με άλλες πρωτεΐνες και μεταφέρει NLS (nuclear localization signals) και μία περιοχή πρόσδεσης στο DNA, (ii) μία μεσαία συνδετική περιοχή η οποία αλληλεπιδρά με ισομεράσες προλίνης και λιγάσες ουβικυτίνης, περιέχει προλίνες καθώς και σερίνες και θρεονίνες που φωσφορυλιώνονται και (iii) μία MH2 (C-terminal Mad-homology 2) περιοχή η οποία προσδένεται στους υποδοχείς τύπου Ι και μπορεί να αλληλεπιδράσει με άλλες πρωτεΐνες καθώς επίσης και να δημιουργεί Smad ομο- και ετεροολιγομερή μεσολαβώντας στην ενεργοποίηση των πυρηνικών μεταγραφικών συμπλόκων (Εικόνα 2). Η φωσφορυλίωση του καρβοξυ-τελικού άκρου των R (receptor-activated)-Smad τις επιτρέπει να αλληλεπιδρούν με την Co (commonmediator)-Smad, Smad4. Το σύμπλοκο που προκύπτει, λέγεται ότι αποτελείται από δύο R-Smad και μία Smad4 (π.χ. Smad2-Smad2-Smad4 αλλά και Smad2-Smad3-Smad4), το οποίο στη συνέχεια μετατοπίζεται στον πυρήνα. Τα πυρηνικά σύμπλοκα των Smad προσδένονται στη χρωματίνη και με τη συνέργεια άλλων μεταγραφικών παραγόντων ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων στόχων<sup>30, 31</sup> (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. TGF-β και BMP σηματοδότηση. (Α,Β) Τα μονοπάτια των TGF-β και activin/nodal (A) και BMP (B), με τις αντίστοιχες Smad πρωτεΐνες και τους μηχανισμούς αναστολής από τις Ι-Smads (Smad6/7). Παρουσιάζονται το σύμπλοκο του TGF-β και οι εξωκυτταρικοί ανταγωνιστές follistatin (προδεδομένη στην ακτιβίνη) και noggin (προσδεδεμένη στον BMP). (C) Non-Smad σηματοδοτικά μονοπάτια καθοδικά των TGF-β υποδοχέων [RI, TβRI (ALK5) and RII, ΤβRII (TGFβR2)]. Σε κάθε μονοπάτι παρουσιάζονται τα πυρηνικά σύμπλοκα των Smad που οδηγούν σε γονιδιακή ρύθμιση. Τα τριμερή σύμπλοκα αυτά των Smad συνήθως αποτελούνται από δύο R-Smad (όμοια ή όχι) και ένα Co-Smad. Επιπροσθέτως, ο TGF-β ενεργοποιεί BMP R-Smads σε συγκεκριμένες περιπτώσεις. BMP (bone morphogenetic protein), Erk (extracellular signalregulated kinase), LIMK2 (LIM domain kinase 2), JNK (Jun N- terminal kinase), p38 (p38 MAPK), PAR6 (partitioning-defective 6 homolog), Rho (Ras homolog), ROCK (Rho-associated, coiled-coilcontaining protein kinase), SHCA (SH2 domain-containing sequence A), Smurf (Smad ubiquitination regulatory factor), Src (Rous sarcoma virus oncoprotein), TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ), TAK1 (TGF- $\beta$ -activated kinase 1), TF (transcription factor), TRAF6 (tumor necrosis factor a receptor-associated factor 6). Πηγή εικόνας: Moustakas, A. & Heldin, C.H. The regulation of TGFbeta signal transduction. Development 136, 3699-3714 (2009)<sup>29</sup>.

Τα εξειδικευμένα σύμπλοκα των Smad επάγουν την έκφραση των I (inhibitory)-Smad, Smad6 και Smad7 (Εικόνες 1 και 2), οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά την ένταση και τη διάρκεια της σηματοδότησης, δημιουργώντας έτσι έναν μηχανισμό αρνητικής ανάδρασης<sup>32</sup>. Η σηματοδότηση παραγόντων αυτής της οικογένειας χωρίζονται σε TGF-β-like και BMP-like σηματοδότηση, μία κατηγοριοποίηση βασισμένη στην αλληλεπίδραση μεταξύ της L45 loop των υποδοχέων τύπου Ι και της L3 loop της MH2 περιοχής των R-Smad (Εικόνα 2). Το TGF-β/activin μονοπάτι χρησιμοποιεί τις Smad2 και Smad3 ενώ το BMP/GDF μονοπάτι τις Smad1, Smad5 και Smad8. Παρόλα αυτά, σε μια ποικιλία κυτταρικών τύπων σε καλλιέργεια, όπως ενδοθηλιακά, αθανατοποιημένα ενδοθηλιακά, αδενοματικά και καρκινικά κύτταρα ακόμα και ΝΙΗ3Τ3 ινοβλάστες και χονδροκύτταρα<sup>33-36</sup>, ο TGF-β ενεργοποιεί ακόμα και τις Smad1 και Smad5. Ο TGF-β δεσμεύεται σε δύο υποδοχείς τύπου Ι, έτσι ενεργοποιεί τις Smad2 και Smad3 μέσω του TβRI και τις Smad1, Smad5 και Smad8 μέσω του BMP υποδοχέα τύπου Ι, Alk1 (ACVRL1). Ο Alk1 εκφράζεται κυρίως σε ενδοθηλιακά κύτταρα, όπου η σηματοδότηση των Smad2 και Smad3 αναστέλλει ενώ, των Smad1 και Smad5 επάγει τον πολλαπλασιασμό και τη μετανάστευση<sup>35</sup>. Ωστόσο, ο TGF-β μπορεί να ενεργοποιήσει τις Smad1 και Smad5 μέσω δύο ακόμα μηχανισμών. Πρώτον, σε αθανατοποιημένα επιθηλιακά κύτταρα EpH4 ποντικού και ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα MDA-MB-231, ο TGF-β επάγει τη φωσφορυλίωση του καρβοξυ-τελικού άκρου των Smad1 και Smad5 μέσω δημιουργίας ετερομερών συμπλόκων υποδοχέων μεταξύ ΤβRII και ΤβRI, καθώς και μεταξύ ΤβRII και Alk2 (ACVR1) και BMPRIA (Alk3)<sup>33</sup>. Δεύτερον, σε καρκινικά κύτταρα μαστού 4T1 ποντικού, ο TGF-β οδηγεί σε φωσφορυλίωση των Smad1 και Smad5 χωρίς να απαιτείται BMP-like υποδοχέας τύπου Ι, επειδή ο TβRI δύναται να φωσφορυλιώσει απευθείας τις Smad1 και Smad536. Αυτά τα ευρήματα προτείνουν μία επανεκτίμηση της σηματοδότησης του TGF-β μέσω της διευκρίνισης των υποδοχέων τύπου Ι και των Smad που συμμετέχουν σε συγκεκριμένα φυσιολογικά και αναπτυξιακά στάδια.



Εικόνα 2. Η οικογένεια των Smad. Απλοποιημένες δομές των οκτώ ανθρώπινων Smad χωρισμένες σε (A) Receptor-activated (R) Smads, (B) common-mediator (Co) Smad και (C) inhibitory (I) Smads. Με γαλάζιο παρουσιάζονται οι συντηρημένες N-terminal Mad-homology 1 (MH1) περιοχές και με πράσινο οι C-terminal MH2 περιοχές. Επίσης, φαίνονται τα NLS (nuclear localization signal) (κάθετα διακεκομμένα πλαίσια), τα δύο μοναδικά ενθέματα της Smad2 (τρίγωνα), το δεύτερο από αυτά αντιστοιχεί στο εξώνιο 3 (e3), η β-hairpin περιοχή η οποία προσδένεται σε DNA (β-h, μαύρο πλαίσιο), το μοτίβο προλίνης-τυροσίνης (PY) στη συνδετική περιοχή η οποία αναγνωρίζεται από την WW περιοχή των Smurf, η SAD (Smad activation domain) στα όρια συνδετικής και MH-2 περιοχής, το NES (nuclear export signal) (διαγώνια διακεκομμένα πλαίσια) και η L3 στροφή στην MH-2 περιοχή. S/T\* υποδεικνύουν κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης για τα οποία έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνονται ενώ τα (S/T\*) υποδεικνύουν συντηρημένα κατάλοιπα με προβλεπόμενα μοτίβα φωσφορυλίωσης τα οποία χρίζουν πειραματικής επιβεβαίωσης. Οι καρβοξυ-τελικές σερίνες οι οποίες φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου Ι φαίνονται με πράσινο (S\*VS\*, S\*MS\*), κόκκινα S/T κατάλοιπα φωσφορυλιώνονται από την MAP κινάση Erk1/2, καφέ S/T κατάλοιπα φωσφορυλιώνονται από την PKC (protein kinase C) και calmodulin-dependent kinase, γαλάζια S/T κατάλοιπα φωσφορυλιώνονται από την CDK (cyclin-dependent kinases) και μαύρα S/T κατάλοιπα φωσφορυλιώνονται από την GSK3-β (glycogen synthetase kinase 3β). Σουμοϋλίωση (Sumo), ουβικυτιλίωση (Ub), μεθυλίωση (Me) και ακετυλίωση (Ac) απεικονίζονται με χρωματιστά

βελάκια. Πηγή εικόνας: Moustakas, A. & Heldin, C.H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714 (2009)<sup>29</sup>.

#### 3.6. Non-Smad σηματοδότηση τις οικογένειας του TGF-β.

Εκτός από τις Smad η σηματοδότηση της οικογένειας του TGF-β εμπλέκει και άλλες πρωτεΐνες<sup>37</sup>. Ο ΤβRIΙ φωσφορυλιώνει την PAR6, η οποία ρυθμίζει την αποικοδόμηση της μικρής GTPάσης RhoA η οποία ελέγχει τη συναρμολόγηση των στενών συνδέσμων (tight junctions) σε κύτταρα θηλαστικών<sup>38</sup>. Κατά την αποσυναρμολόγηση των στενών συνδέσμων, η αρχιτεκτονική των επιθηλιακών κυττάρων καταστρέφεται, συνοδευόμενη από μία απο-διαφοροποίηση γνωστή ως EMT (epithelial-to-mesenchymal transition), μία σημαντική διαδικασία κατά την ανάπτυξη και την εμφάνιση νόσων, η οποία ρυθμίζεται από τον TGF-β<sup>39</sup>. Κατά την ΕΜΤ, εκτός από τους στενούς συνδέσμους, καταστρέφονται και οι σύνδεσμοι πρόσφυσης (adherens junctions) και τα δεσμοσώματα των πολωμένων επιθηλιακών κυττάρων και επαναδιαμορφώνονται έτσι ώστε να δημιουργήσουν μεσεγχυματικού τύπου κύτταρα τα οποία παρουσιάζουν αυξημένη κινητικότητα και ικανότητα εισβολής. Πέραν των ανωτέρω άμεσων μηχανισμών αποσυναρμολόγησης των στενών συνδέσμων ο TGF-β προκαλεί ΕΜΤ και μέσω της σηματοδότησης των Smad, οδηγώντας στην έκφραση εξειδικευμένων επαγωγέων αυτής της διαδικασίας διαφοροποίησης<sup>40</sup>.

Παρόλο που το μονοπάτι TGF-β-PAR6 αποικοδομεί τοπικά την RhoA σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού, παρουσιάζεται και ενεργοποίηση των Rho από TGF-β και BMP σε διάφορα κυτταρικά συστήματα<sup>41</sup>. Ο μηχανισμός ενεργοποίησης των Rho από τους υποδοχείς του TGF-β παραμένει άγνωστος αν και πολύ πρόσφατα αποτελέσματα εμπλέκουν στον μηχανισμό αυτό την Src και τον GEF (guanidine exchange factor) Vav2<sup>42</sup>.

Ο υποδοχέας τύπου Ι του TGF-β φωσφορυλιώνει κατάλοιπα σερίνης και τυροσίνης του ShcA (Shc1), ο οποίος στη συνέχεια στρατολογεί την GRB2 και τον GEF SOS (son of sevenless) σε κύτταρα θηλαστικών<sup>43</sup>. Αυτό, οδηγεί στην ενεργοποίηση των Ras-Raf-MEK-Erk MAP κινασών, οι οποίες ρυθμίζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό και μετανάστευση. Η Src κινάση τυροσίνης μπορεί να φωσφορυλιώσει την Thr284 της κυτταροπλασματικής περιοχής του TβRII, οδηγώντας στη στρατολόγηση των GRB2 και Shc και ενεργοποίηση του p38 MAPK μονοπατιού<sup>44</sup>. Η φωσφορυλίωση του TβRII από την Src ρυθμίζει τον πολλαπλασιασμό και την ικανότητα εισβολής καρκινικών κυττάρων μαστού, πιθανόν χωρίς να επηρεάζονται οι Smad<sup>45</sup>.

Ο TGF-β στρατολογεί στον ετερο-τετραμερή υποδοχέα την λιγάση ουβικυτίνης TRAF6 (tumor necrosis factor α receptor-associated factor 6) και συγκεκριμένα στην κυτταροπλασματική περιοχή του TβRI σε κύτταρα θηλαστικών (Εικόνα 1C). Ο TRAF6 ουβικυτιλιώνει και ενεργοποιεί την TAK1 (TGF-β-activated kinase 1), οδηγώντας στην ενεργοποίηση των p38 και JNK, που ρυθμίζουν την απόπτωση και την κυτταρικά μετανάστευση<sup>46, 47</sup>. Η ενεργότητα κινάσης του TβRI είναι επουσιώδης για αυτή τη διαδικασία.

#### 3.7. Ρύθμιση και ενδοκύττωση των υποδοχέων του TGF-β.

Η φωσφορυλίωση των υποδοχέων του TGF-β είναι σημαντική για την μεταγωγή του σήματος, όμως και η απο-φωσφορυλίωσή τους παίζει επίσης σημαντικό ρόλο. Οι υποδοχείς των TGF-β/nodal ρυθμίζονται αμοιβαία από τις δύο ισομορφές Βα και Βδ, της Β υπομονάδας της PP2A (protein phosphatase 2A). Η PP2A που διαθέτει την Βα υπομονάδα ρυθμίζει θετικά, ενώ αυτή που διαθέτει την Βδ υπομονάδα ρυθμίζει αρνητικά, τη σηματοδότηση των υποδοχέων στο έμβρυο του *Xenopus* και σε κύτταρα θηλαστικών<sup>48</sup>. Οι μοριακοί στόχοι της PP2A και τα κατάλοιπα σερίνης ή θρεονίνης που απο-φωσφορυλιώνουν χρήζουν περαιτέρω έρευνας.

Επιπροσθέτως, ο ΤβRΙ μπορεί να σουμοϋλιωθεί σε κύτταρα θηλαστικών (Εικόνα 3Α) από άγνωστη λιγάση, πράγμα το οποίο επιστρατεύει τη Smad3 στον υποδοχέα για φωσφορυλίωση και ενισχύει τη σηματοδότηση του TGF-β<sup>49</sup>.

Οι ενεργοποιημένοι υποδοχείς ενδοκυτταρώνονται μέσω κυστιδίων καλυμμένων με κλαθρίνη στα ενδοσώματα, όπου αλληλεπιδρούν με τη SARA (Smad anchor for receptor activation), η οποία στρατολογεί τις Smad2 και Smad3 στον TβRI για φωσφορυλίωση<sup>50</sup> (Εικόνα 3A, B). Η SARA προσδένεται στις Smad2 και Smad3 αλλά όχι στις BMP-R-Smads, καθώς και στον TβRI. Η endofin, ομόλογη της SARA, παίζει παρόμοιο ρόλο στο BMP μονοπάτι<sup>51</sup> (Εικόνα 3D, Ε). Ωστόσο, η endofin συμμετέχει και στην αλληλεπίδραση μεταξύ Smad2, Smad3, Smad4 και TβRI<sup>52</sup>.

Στα θηλαστικά η SARA αλληλεπιδρά με την cPML (cytoplasmic promyelocytic leukemia), η οποία σταθεροποιεί το σύμπλοκο SARA-Smad<sup>53</sup> (Εικόνα 3B). Σε αυτή τη διαδικασία εμπλέκεται και η PCTA (PML competitor for TGIF association), η οποία προσδένεται στην TGIF (5'TG3'-interacting factor) και διατηρεί την cPML εντός του πυρήνα<sup>54</sup>. Ο TGF-β οδηγεί σε απελευθέρωση του cPML από τον PCTA, η οποία μετατοπίζεται στο κυτταρόπλασμα και αλληλεπιδρά με τη SARA προωθώντας έτσι τη σηματοδότηση του TGF-β.

Η ενδοκύττωση των υποδοχέων ελέγχει τη ροή της σηματοδότησης καθώς επίσης και τη διαθεσιμότητα του TGF-β. In vitro κινητική ανάλυση της διαθεσιμότητας του TGF-β έδειξε ότι συνεχής ενδοκύττωση του TβRII μειώνει την περίσσεια του TGF-β<sup>55</sup> επιτρέποντας στα κύτταρα να καθορίζουν τη σηματοδότηση των αυξητικών παραγόντων.



**Εικόνα 3. Ενδοκύττωση και αποικοδόμηση των TGF-β υποδοχέων. (A,D)** Τα σύμπλοκα των υποδοχέων των (A) TGF-β και (D) BMP. RII, υποδοχείς τύπου ΙΙ, RI, υποδοχείς τύπου Ι. Σουμοϋλίωση (S) του TβRI επηρεάζει θετικά τη σηματοδότηση των Smad. **(B)** Οι υποδοχείς του TGF-β ενδοκυτταρώνονται από τα ενδοσώματα με την παρουσία της SARA και της ρυθμιστικής cPML. Οι υποδοχείς φωσφορυλιώνουν τις Smad2 και Smad3 οι οποίες συμπλοκοποιούνται με
την Co-Smad και μεταφέρονται στον πυρήνα όπου προσδένονται στη χρωματίνη. Ρυθμιστικές πρωτεΐνες κλειδιά που εμπλέκονται στη διαδικασία ενδοκύττωσης των υποδοχέων παρατίθενται δίπλα από τα βέλη που δείχνουν την ροή της ενδοσωμικής κυκλοφορίας. **(C)** Το μονοπάτι της αποικοδόμησης των υποδοχέων του TGF-β μέσω caveolae, το οποίο χαρακτηρίζεται από την παρουσία της CAV1 (caveolin 1) και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες κλειδιά εντός του κόκκινου πλαισίου. **(E)** Το αντίστοιχο μονοπάτι ενδοκύττωσης των υποδοχέων του BMP με την endofin είναι λιγότερο κατανοητό. **(F)** Το αντίστοιχο μονοπάτι αποικοδόμησης των υποδοχέων του BMP μέσω caveolae παραμένει άγνωστο (?). Οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες κλειδιά φαίνονται εντός του κόκκινου πλαισίου. BMP (bone morphogenetic protein), cPML (cytoplasmic promyelocytic leukemia protein), HSP90 (heat-shock protein of 90 kDa), RAP2 (Ras-related protein 2), RIN (Ras-like protein expressed in neurons), SARA (Smad anchor for receptor activation), SIK (salt-inducible kinase), Smurf (Smad ubiquitination regulatory factor), TGF-β (transforming growth factor β). Πηγή εικόνας: Moustakas, A. & Heldin, C.H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714 (2009)<sup>29</sup>.

### 3.8. Αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων του TGF-β και I-Smads.

Το σύμπλοκο υποδοχέα-προσδέτη μπορεί να ενδοκυττωθεί μέσω κυστιδίων (lipid rafts) και να αποικοδομηθεί στα λυσοσώματα<sup>56</sup> (Εικόνα 3C). Η κυκλοφορία των υποδοχέων μέσω caveolae είναι συνυφασμένη με τις I-Smads και Smurf1 ή Smurf2 λιγάσες ουβικυτίνης, οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά τη σηματοδότηση. Οι ανασταλτικές Smad, Smad6 και Smad7, δεσμεύονται στους υποδοχείς τύπου Ι, και έτσι αναστέλλουν την φωσφορυλίωση των R-Smad μέσω ανταγωνισμού και στρατολογούν φωσφατάσες και Smurf λιγάσες ουβικυτίνης οι οποίες ρυθμίζουν αρνητικά την ποσότητα και τη λειτουργία των υποδοχέων<sup>32</sup>. Ενώ η Smad7 αναστέλλει τη σηματοδότηση του TGF-β και του BMP, η Smad6 αναστέλλει επιλεκτικά τη σηματοδότηση του BMP (Εικόνα 1) και δείχνει μεγαλύτερη επιλεκτικότητα στους υποδοχείς τύπου Ι του BMP Alk1, Alk2, Alk3 και Alk6 σε κύτταρα θηλαστικών. Επιπλέον, η Smad6 προσδένεται με μεγαλύτερη συγγένεια σε κατάλοιπα αμινοξέων της περιοχής κινάσης των Alk3 και Alk6 παρά των Alk1 και Alk257. Αντιθέτως, η Smad7 παρουσιάζει ευρύτερη επιλεκτικότητα αφού δεσμεύεται σε όλους τους υποδοχείς τύπου Ι μέσω συγκεκριμένων καταλοίπων λυσίνης στην MH2 περιοχή<sup>58</sup>.

Δύο μηχανισμοί που προάγουν την ουβικυτιλίωση και την αρνητική ρύθμιση των υποδοχέων του TGF-β που προκαλείται από τη Smad7 φαίνονται στην εικόνα 3C. Η HSP90 (chaperone protein) δεσμεύεται στους TβRI και TβRII προστατεύοντας τους κατά αυτόν τον τρόπο από ουβικυτιλίωση από την Smurf2, συμμετέχοντας θετικά προς τη σηματοδότηση του TGF-β<sup>59</sup>. Αντιθέτως, η SIK (salk-inducible kinase) κινάση που ρυθμίζεται από AMP, επάγεται και εκφράζεται σε επίπεδο mRNA και πρωτεΐνης αντίστοιχα από τον TGF-β, ταυτοχρόνως με την επαγωγή των Smad7 και Smurf2<sup>60</sup>. Η SIK δεσμεύεται στον ΤβRI και στη Smad7 ρυθμίζοντας αρνητικά τον υποδοχέα.

Παρόλο που η Smad7 δρα στο επίπεδο του υποδοχέα τύπου Ι, απαντάται επίσης και στον πυρήνα, και φαίνεται ότι δεσμεύεται στο DNA και στα πυρηνικά σύμπλοκα των Smad2, Smad3 και Smad4, αναστέλλοντας τη μεταγραφική τους δραστηριότητα<sup>61</sup> (Εικόνα 4).

#### 3.9. Ρύθμιση της κυκλοφορίας των Smad μέσω κινητήριων πρωτεϊνών.

ενδοκύττωση των υποδοχέων Κατά την του TGF-β οι **R-Smads** φωσφορυλιώνονται από τους υποδοχείς τύπου Ι και συγκεντρώνονται στον πυρήνα. Ωστόσο, οι Smad, όπως και οι υποδοχείς, παρουσιάζουν μια δυναμική ισορροπία μετατοπιζόμενοι εντός κι εκτός του πυρήνα ακόμα και όταν δεν είναι ενεργοποιημένοι<sup>62</sup>. Η κυτταροπλασματική κυκλοφορία των υποδοχέων και των Smad συχνά πραγματοποιείται μέσω κινητήριων πρωτεϊνών των μικροσωληνίσκων οι οποίες παίζουν σημαντικό ρόλο πριν και μετά την φωσφορυλίωση των R-Smad στο καρβοξυ-τελικό άκρο.

Οι Smad αλληλεπιδρούν με την kinesin 1, η οποία συγκεκριμένα στρατολογεί τη Smad2 στο σύμπλοκο του υποδοχέα του *Xenopus* και θηλαστικών<sup>63</sup>. Οι Smad αποδεσμεύονται από τους υποδοχείς όταν δεσμεύονται στους μικροσωληνίσκους, από τους οποίους μπορούν επίσης να αποδεσμευτούν μέσω π.χ. της connexin 43 (GJα1), η οποία ανταγωνίζεται τους μικροσωληνίσκους για τη δέσμευση των Smad<sup>64</sup>. Άλλες κινητήριες πρωτεΐνες, όπως η dynein light chain km23-1 (DYNLRB1), προωθούν επίσης τη μετατόπιση των Smad προς τον πυρήνα σε κύτταρα θηλαστικών<sup>65</sup>.

Η Smad1 η οποία έχει φωσφορυλιωθεί από Erk MAPKs στη συνδετική περιοχή μετακινείται προς το κεντρόσωμα μέσω των μικροσωληνίσκων, όπου και αποικοδομείται στα πρωτεοσώματα<sup>66</sup>. Κατά το τέλος της μίτωσης εμβρυϊκών και εφηβικών κυττάρων θηλαστικών αλλά και βλαστοδερμικών κυττάρων Drosophila, η φωσφορυλιωμένη Smad1 και το σύμπλοκο αποικοδόμησης του κεντροσώματος διαχωρίζονται σε ένα μόνο από τα δύο θυγατρικά κύτταρα<sup>66</sup>. Έτσι, η κυκλοφορία και ο διαχωρισμός της Smad1 στα θυγατρικά κύτταρα ρυθμίζεται με εξειδικευμένο τρόπο κατά τα αναπτυξιακά στάδια. Σε έμβρυα Xenopus το σύμπλοκα Smad2-Smad4 στρατολογούνται στη χρωματίνη σε κάθε κυτταρική διαίρεση, όταν διαλύεται ο πυρηνικός φάκελος<sup>67</sup>. Και σε αυτή την περίπτωση το παραπάνω συμβαίνει μόνο μετά από ένα συγκεκριμένο αναπτυξιακό στάδιο (mid-blastula transition). Επιπροσθέτως, η Smad3 ρυθμίζει την είσοδο στην ανάφαση κατά τον κυτταρικό κύκλο κυττάρων θηλαστικών<sup>68</sup>.

### 3.10. Μετακίνηση των Smad δια μέσω του πυρηνικού φακέλου.

Η μεταφορά των Smad στον πυρήνα γίνεται μέσω των nucleoporin, οι οποίες βρίσκονται στους πυρηνικούς πόρους, και από τις importins, μεταφορικές πρωτεΐνες οι οποίες αλληλεπιδρούν με τις nucleoporins και τις cargo<sup>62</sup>. Όλες οι Smad έχουν μία συντηρημένη NLS περιοχή στην MH1 περιοχή τους (Εικόνα 2), η οποία αλληλεπιδρά με εξειδικευμένες importins, όπως η importin β (Smad1, Smad3) και η importin α (Smad4). Άλλες importins είναι η Msk, η οποία μεταφέρει τη Mad σε S2 κύτταρα Drosophila και τα ορθόλογά της στα θηλαστικά importin 7 και 8, οι οποίες μεταφέρουν τις Smad2, Smad3 και Smad4 μέσα στον πυρήνα<sup>69, 70</sup>.

Οι Smad έχουν χαρακτηριστικά NES (nuclear export signals) στις MH2 (Smad1 και Smad3) ή στις συνδετικές (Smad4) περιοχές (Εικόνα 2). Οι περιοχές αυτές αλληλεπιδρούν με εξειδικευμένες exportins, exportin 4 για την Smad3 και exportin 1 για τις Smad1 και Smad4 και η έξοδός τους από τον πυρήνα καταλύεται από την μικρή GTPάση RAN. Η RANBP3 (Ran-binding protein 3) αναγνωρίζει απο-φωσφορυλιωμένες Smad2 και Smad3 και τις μεταφέρει στο κυτταρόπλασμα<sup>71</sup>.

### 3.11. Ρύθμιση της μετακίνησης των Smad στον πυρήνα.

Η μετακίνηση των Smad εντός κι εκτός πυρήνα υπόκειται σε ρύθμιση. Η συγκέντρωση των Smad2 και Smad4 στον πυρήνα που προκαλείται από TGF-β

αντανακλά μία αλλαγή στην ισορροπία μεταξύ της κυτταροπλασματικής και της πυρηνικής συγκέντρωσής τους η οποία οφείλεται σε μείωση της εξόδου των Smad από τον πυρήνα<sup>72</sup>. Κατά τη διάρκεια της σηματοδότησης, ωστόσο, μεταξύ άλλων οι πυρηνικές φωσφατάσες των R-Smad εξασφαλίζουν την έξοδο των Smad από τον πυρήνα<sup>72</sup>.

Η κυκλοφορία των Smad δεν ρυθμίζεται μόνο από τη φωσφορυλίωσή τους στο καρβοξυ-τελικό άκρο τους από τους υποδοχείς τύπου Ι και την αποφωσφορυλίωσή τους από τις πυρηνικές φωσφατάσες<sup>73</sup>, αλλά και από σουμοϋλίωση και ουβικυτιλίωση. Σουμοϋλίωση της Smad3 από την PIASy (protein inhibitor of activated Stat y) σουμο-λιγάση επάγει την έξοδό της από τον πυρήνα<sup>74</sup>. Σουμοϋλίωση από τη Medea επίσης, επάγει την έξοδό της από τον πυρήνα εμβρυϊκών κυττάρων *Drosophila* μειώνοντας τον ανταγωνισμό της με την Dpp<sup>75</sup>, μηχανισμός ο οποίος μοιάζει με το ρόλο της σουμοϋλίωσης της Smad4 από την PIAS λιγάση στα θηλαστικά<sup>76</sup>.

Η Smad4 μπορεί να μονο-ουβικυτιλιωθεί<sup>77</sup> από την πυρηνική TIF1γ λιγάση ουβικυτίνης, η οποία επάγει την έξοδο από τον πυρήνα και αναστέλλει τη δημιουργία πυρηνικών συμπλόκων μεταξύ των Smad2, Smad3 και Smad4<sup>78</sup>. Την μονο-ουβικυτιλίωση ακολουθεί έξοδος της Smad4 από τον πυρήνα<sup>79</sup>, όπου η FAM (fat facets in mouse) την απο-ουβικυτιλιώνει προωθώντας έτσι την συνεχή κυκλοφορία της εντός κι εκτός πυρήνα σε *Drosophila, Xenopus* και ανθρώπινα κύτταρα<sup>78</sup>.

Ετερομερή σύμπλοκα μεταξύ Smad2, Smad3 και Smad4 δεσμεύονται στον TAZ (transcriptional co-activator with PDZ-binding motif) εντός του πυρήνα κυττάρων θηλαστικών και στη συνέχεια στρατολογούνται στη χρωματίνη μέσω άλλων παραγόντων όπως ο ARC105 (activator-recruited co-factor 105)<sup>80</sup>. Ο TAZ ρυθμίζεται μέσω φωσφορυλίωσης και από την αλληλεπίδρασή του με παράγοντες της οικογένειας 14-3-3 που ελέγχουν την παραμονή του στον πυρήνα. Εκτός από τη ρύθμιση της κυκλοφορίας των Smad η φωσφορυλίωση του καρξοξυ-τελικού άκρου, η φωσφορυλίωση της συνδετικής περιοχής και η ουβικυτιλίωση εμπλέκονται και στην αρνητική ρύθμιση της σηματοδότησης των Smad (Εικόνες 2 και 4).

# 3.12. Τα μονοπάτια των Wnt και ΜΑΡΚ έχουν αρνητικές επιδράσεις στη σηματοδότηση του BMP/Smad μονοπατιού.

Η σηματοδότηση των υποδοχέων του BMP καταλήγει στη μεταφορά ενεργοποιημένων Smad στον πυρήνα. Ενεργοποίηση των MAPK και Wnt μονοπατιών οδηγεί σε ρύθμιση της σηματοδότησης του BMP μέσω της αποικοδόμησης της Smad1 στα πρωτεοσώματα<sup>81</sup>.

MAP κινάσες όπως οι Erk, Jnk και p38 έχει δειχθεί ότι φωσφορυλιώνουν τις Smads (pSmad1<sup>MAPK</sup>) in vivo και in vitro αναστέλλοντάς τες<sup>82-85</sup>. Οι MAP κινάσες φωσφορυλιώνουν συντηρημένα κατάλοιπα σερίνης και θρεονίνης στη συνδετική περιοχή των Smad που ενώνουν τις MH1 και MH2 περιοχές. Αυτή η φωσφορυλίωση μειώνει δραματικά την συγκέντρωση των Smad στον πυρήνα και εμποδίζει την έκφραση γονιδίων στόχων του BMP. Ως λειτουργική συνέπεια, η σηματοδότηση των FGF/MAPK επάγει τη διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων του *Xenopus* και των πρόδρομων νευρικών κυττάρων αρουραίου σε νευρωνικά παρόλη την ανασταλτική δράση του BMP<sup>86, 87</sup>.

Η Ε3 λιγάση της ουβικυτίνης Smurf1 δεσμεύει εξειδικευμένα τις φωσφορυλιωμένες στη συνδετική περιοχή Smads<sup>88</sup> προσθέτοντας μόρια ουβικυτίνης και τις οδηγεί σε αποικοδόμηση στα πρωτεοσώματα<sup>89</sup>.

Για να οδηγηθεί η Smad1 σε αποικοδόμηση απαιτείται όχι μόνο η φωσφορυλίωση από τις ΜΑΡΚ αλλά η ταυτόχρονη φωσφορυλίωση σε διαφορετικά κατάλοιπα της συνδετικής περιοχής από την GSK3 (pSmad1<sup>GSK3</sup>)<sup>90</sup>. Ενεργοποίηση του Wnt μονοπατιού ή απενεργοποίηση της GSK3 οδηγεί σε παύση της αναστολής της Smad1. Αντίθετα, ο Sapkota et al. προτείνει ότι η φωσφορυλίωση της Smad1 από την GSK3 ενισχύει την δέσμευση και την ουβικυτιλίωση της Smad1 από την Smurf1 αλλά δεν είναι απαραίτητη<sup>88</sup>.

Σε κύτταρα προστάτη έχει αναφερθεί ότι η φωσφορυλίωση της συνδετικής περιοχής της Smad1 από την Erk επιτρέπει την αλληλεπίδρασή της με υποδοχείς ανδρογόνων (AR) δρώντας ως μεταγραφικός συν-καταστολέας. Αυτή η αλληλεπίδραση καταλήγει σε έναν ανταγωνισμό του κυτταρικού πολλαπλασιασμού που προκαλείται από ανδρογόνα και BMP<sup>91</sup>.

41

Τέλος, έχει αναφερθεί φωσφορυλίωση της MH1 περιοχής της Smad1/5 από την Nemo κινάση η οποία σταματά την συγκέντρωση της Smad1/5 στον πυρήνα<sup>92</sup>.

## 3.13. Αλληλεπίδραση μεταξύ του TGF-β/BMP και άλλων μονοπατιών.

Η φυσιολογική λειτουργία του μονοπατιού TGF-β/BMP εξαρτάται από τη συνέργεια και τον ανταγωνισμό πολλών μονοπατιών όπως αυτά των MAPK, PI3-K/Akt, Wnt, Hedgehog, Notch και Interleukin/Interferon-γ/TNF-α<sup>93</sup>.

Ενεργοποίηση των Erk και JNK από RTKs οδηγεί σε φωσφορυλίωση των ενδογενών Smad2/3 σε κύτταρα θηλαστικών χωρίς να επηρεάζουν τη συγκέντρωσή τους στον πυρήνα και την δράση τους ως μεταγραφικοί παράγοντες<sup>94-96</sup>. Έχουν προσδιοριστεί τρία κατάλοιπα (Thr178, Ser203 και Ser207) της συνδετικής περιοχής της Smad3 τα οποία φωσφορυλιώνει η Erk1/2 in vivo και in vitro αναστέλλοντας την μεταγραφική της ενεργότητα αλλά όχι και την συγκέντρωση της στον πυρήνα<sup>97</sup>, προτείνοντας την ύπαρξη ενός άγνωστου μηχανισμού αναστολής της Smad3 μέσω της φωσφορυλίωσής της στη συνδετική περιοχή. Στα ανθρώπινα καρκινικά κύτταρα μαστού MCF-10CA1h η ROCK (Rho-dependent kinase) και η p38 MAPK φωσφορυλιώνουν τα ίδια κατάλοιπα σερίνης (203 και 207) και προκαλούν, παρά αναστέλλουν, την κυτταρική αύξηση που προκαλείται από TGF-β<sup>98</sup>. Επιπροσθέτως, η GSK3-β η οποία μοιάζει δομικά με τις MAP κινάσες φωσφορυλιώνει επιλεκτικά την σερίνη 203 της συνδετικής περιοχής της Smad3<sup>99</sup>.

Οι ΜΑΡ κινάσες έχει αναφερθεί ότι εκτός από τις R-Smads φωσφορυλιώνουν την Co-Smad, Smad4 και την I-Smad, Smad7. Η Ras προκαλεί μέσω MEK/Erk μείωση της σταθερότητας της Smad4<sup>100</sup>. Οι JNK και p38 φαίνεται να φωσφορυλιώνουν επιλεκτικά τη μεταλλαγμένη Smad4 σε καρκινικά κύτταρα και να προωθούν την πρωτεοσωμική αποικοδόμησή της<sup>101</sup>. Τέλος, έχει αναφερθεί εμπλοκή των Erk, JNK και p38 στη μεταγραφική ρύθμιση της Smad7 επηρεάζοντας έμμεσα τη σηματοδότηση του TGF-β<sup>102-104</sup>.

Αν και η σηματοδότηση του BMP συνήθως καταστέλλεται από τον FGF, τα δύο μονοπάτια μπορεί να έχουν και συνεργατικό αποτέλεσμα. Σε συγκεκριμένα στάδια ανάπτυξης του κοτόπουλου η διαφοροποίηση των ηπατοκυττάρων σε επιθηλιακά κύτταρα χολής μέσω έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων επάγεται από BMP και απαιτεί ενεργό FGF/MAPK μονοπάτι<sup>105</sup>.

Οι ΜΑΡ κινάσες φωσφορυλιώνουν επίσης και μια πλειάδα πυρηνικών μεταγραφικών παραγόντων πολλοί από τους οποίους αλληλεπιδρούν με τις Smads και ρυθμίζουν την απόκριση των κυττάρων σε TGF-β/BMP. Οι πιο καλά χαρακτηρισμένη κατηγορία τέτοιων πρωτεϊνών είναι η AP1, συμπεριλαμβανομένων μελών των Jun, Fos, Maf και ATF<sup>106</sup>.

Σε διάφορους κυτταρικούς τύπους έχει δειχθεί ότι η ενεργοποίηση του PI3K/Akt μονοπατιού από ινσουλίνη, IGF, ιντερλευκίνη-6 και υιικές πρωτεΐνες αναστέλλει την απόπτωση και τη διακοπή του κυτταρικού κύκλου που προκαλείται από TGF-β<sup>107-111</sup>. Η Smad3, και όχι η Smad2, φαίνεται να είναι ο πρωταρχικός στόχος των PI3K/Akt, μιας και η Smad3 εμπλέκεται στην προαποπτωτική δράση του TGF-β<sup>112</sup>.

Τα μονοπάτια των TGF-β/BMP και Wnt αλληλεπιδρούν σε διάφορα επίπεδα<sup>93</sup>. Πρώτον, ρυθμίζουν αμοιβαία την παραγωγή των προσδετών, πράγμα το οποίο είναι κρίσιμο κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Δεύτερον, στον πυρήνα, το σύμπλοκο Smad/β-κατενίνη/Lef ρυθμίζει την έκφραση γονιδίων στόχων συνήθως με συνεργατικό τρόπο. Τρίτον, έχουν παρατηρηθεί αλληλεπιδράσεις κυτταροπλασματικών πρωτεϊνών των δύο μονοπατιών που επηρεάζουν τη σηματοδότησή τους όπως αυτή της Smad7 με τη β-κατενίνη<sup>113</sup> αλλά και της Smad7 με την Axin<sup>114</sup>.

Κατά την ανάπτυξη καθώς και την ογκογένεση τα Hedgehog (Hh) και TGF-β/BMP μονοπάτια δύναται άμεσα να επηρεάσουν το ένα τις σηματοδοτικές πρωτεΐνες του άλλου. Επίσης, ο TGF-β1 μπορεί να επάγει την έκφραση των Notch προσδετών. Σε κάποια κυτταρικά συστήματα τα δύο αυτά μονοπάτια δρουν συνεργατικά στην έκφραση γονιδίων στόχων, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις το Notch δρα ανταγωνιστικά του TGF-β/BMP<sup>93</sup>. Επιπλέον, οι επιδράσεις του TGF-β στο ανοσοποιητικό σύστημα αναπόφευκτα προκαλεί αλληλεπιδράσεις με τις ιντερλευκίνες (ILs), τον TNFα και την ιντερερόνη-γ<sup>115,</sup> <sup>116</sup>. Ο TGF-β ρυθμίζει τη διαθεσιμότητα αυτών των κυτοκινών καθώς και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που ελέγχουν. Ποικιλοτρόπως με τη σειρά τους αυτοί οι παράγοντες επηρεάζουν την ενεργότητα του TGF-β. Τέλος, έχουν αναφερθεί διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία αλληλεπιδρούν με αυτό του TGFβ/BMP συμπεριλαμβανομένων των πυρηνικών υποδοχέων, της απόπτωσης, του μεταβολισμού της ενέργειας (πρόσληψη/κατανάλωση γλυκόζης, AMPK, mTOR) και του NO (μονοξείδιο του αζώτου). Η σχετικά πρόσφατη ανακάλυψη ότι το TGF-β/BMP/Smad μονοπάτι ρυθμίζει την έκφραση microRNA ανοίγει ένα νέο πεδίο έρευνας<sup>117</sup>.

## 3.14. Smad και μεταγραφική ρύθμιση.

Πολλοί είναι οι μεταγραφικοί παράγοντες που αλληλεπιδρούν με τις Smad για να ρυθμίσουν τη μεταγραφή γονιδίων<sup>118</sup> (Πίνακας 2). Τα πυρηνικά σύμπλοκα των Smad δεσμεύονται με μικρή συγγένεια στα SBEs (Smad-binding elements) του DNA<sup>31</sup>. Η πιο κοινή ισομορφή της Smad2 δεν δεσμεύεται στα SBEs εξαιτίας μιας ακολουθίας εντός της περιοχής πρόσδεσης με το DNA η οποία υπάρχει στην MH1 περιοχή όλων των Smad (Εικόνα 2). Η Smad3 αναγνωρίζει την ακολουθία 5'-GTCTG-3' ως SBE. Αντίθετα, οι BMP-Smad και η Smad4 αναγνωρίζουν αλληλουχίες πλούσιες σε GC οι οποίες έχουν λιγότερο συντηρημένα μοτίβα αλλά ομοιάζουν κάποιες φορές με SBEs. Γενικά, η στρατολόγηση συμπλόκων Smad στη χρωματίνη εξαρτάται από την άμεση αλληλεπίδρασή τους με μεταγραφικούς παράγοντες οι οποίοι έχουν μεγαλύτερη συγγένεια πρόσδεσης στο DNA (Εικόνα 4).

Κατά την αλληλεπίδραση των Smad με το DNA και άλλους μεταγραφικούς παράγοντες στρατολογούν συν-ενεργοποιητές και ακετυλοτρανσφεράσες των ιστονών, όπως ο p300, ο CBP (C/EBP-binding protein) και ο P/CAF (p300/CBP-associated factor), ενεργοποιώντας έτσι την έναρξη της μεταγραφής<sup>31</sup>. Το σύμπλοκο p300/CBP ακετυλιώνει τις Smad2/3, αυξάνοντας την ικανότητα πρόσδεσής τους στο DNA σε κύτταρα θηλαστικών<sup>119, 120</sup>. Αντίθετα, απο-ακετυλάσες των ιστονών αναστέλλουν την μεταγραφική ενεργότητα της Smad1 κατά τη νευρωνική διαφοροποίηση εμβρυϊκών εγκεφαλικών κυττάρων ποντικού<sup>121</sup>. Ωστόσο, άμεση ακετυλίωση ή αποακετυλίωση των BMP-Smad δεν έχει δειχθεί.

Έχει παρατηρηθεί θετική ρύθμιση της σηματοδότησης των Smad στον πυρήνα μέσω ουβικυτιλίωσης σε έμβρυα ποντικού και κύτταρα θηλαστικών<sup>122</sup>. Με την επίδραση προσδέτη τα πυρηνικά σύμπλοκα των Smad δεσμεύονται στην arkadia λιγάση ουβικυτίνης (RNF111) προωθώντας την ουβικυτιλίωση και αποικοδόμηση συν-καταστολέων Ski SnoN των και (SKIL) που αλληλεπιδρούν<sup>123-125</sup>. Αυτός ο μηχανισμός επιφέρει άρση της καταστολής και επαγωγή της μεταγραφής γονιδίων στόχων από τις Smad στον πυρήνα (Εικόνα 4). Η αποικοδόμηση του SnoN στα πρωτεοσώματα εξαρτάται από τη φωσφορυλίωσή του από την ΤΑΚ1 (Εικόνα 1C)<sup>126</sup>. Η arkadia επίσης ουβικυτιλιώνει την ανασταλτική Smad7127, χωρίς να είναι γνωστό αν αυτό συμβαίνει στον πυρήνα ή στο κυτταρόπλασμα.

Μέσω ανάλυσης μικροσυστοιχιών έχει δειχθεί αλληλεπίδραση μεταξύ των Smad και των ETS1 και TRAP2α (transcriptional factor activating enhancerbinding protein 2α)<sup>128</sup>, ενώ μέσω genome-wide screen αλληλεπίδραση με την BRG1 (SWI/SNF family chromatin remodeling protein Brahma)<sup>129</sup>. Έχει αναφερθεί ότι οι Smad που δεσμεύονται στη χρωματίνη δεν μπορούν να ενεργοποιήσουν τη μεταγραφή απουσία άλλων απαραίτητων παραγόντων όπως ο BRG1 και ο ARC105<sup>31</sup>. Ο εντοπισμός του ARC105 σε διάφορες περιοχές της χρωματίνης ρυθμίζεται από τον TAZ<sup>80</sup>.

Dathurau	Emod	Caladar	Cana	Deculation	Call tissue tune	Synex.	Bafaranaa
Pathway	Smad	Co-tactor	Gene	Regulation	Cell-tissue type	group	Reference
	Smad1/4	GATA1, 5, 6	Smad/	Induction	Mouse osteoblasts		(Benchabane and Wrana, 2003)
	Smad1/4	GATA4	Nkx2.5	Induction	Mouse cardiomyocytes		(Brown et al., 2004)
	Smad1/4	β-catenin, Tcf4	с-Мус	Induction	Human renal carcinoma		(Hu and Rosenblum, 2005)
	Smad1/4	β-catenin, Lef1	Msx2	Induction	Mouse ES cells		(Hussein et al., 2003)
4	Smad1/4	?	Id1	Induction	Mouse myoblasts		(Katagiri et al., 2002; Korchynskyi and ten Dijke, 2002; Lopez-Rovira et al., 2002)
	Smad1/4	β-catenin, Lef1	ld1	Repression	Mouse myoblasts		(Nakashima et al., 2005)
8	Smad1/4	Notch ICD	Hes1, Hey1	Induction	Mouse myoblasts		(Dahlqvist et al., 2003)
	Smad1/4	Notch ICD	Herp2	Induction	Human endothelial cells		(Itoh et al., 2004)
	Smad1/4	Sizn1	ChAT, VaChT	Induction	Mouse myoblasts, mouse cholinergic neurons		(Cho et al., 2008)
	Smad1/5/4	Runx2, Menin	ostepontin	Induction	Mouse osteoblasts, mouse bone marrow cells		(Sowa et al., 2004; Zhang et al., 2000)
	Smad1/4	OAZ, Runx2	Smad6	Induction	Human embryonal carcinoma, osteoblasts		(Ku et al., 2006; Wang et al., 2007)
	Smad3/4	Sp1, TFE3	Smad7	Induction	Universal		(Brodin et al., 2000; Hua et al., 2000)
	Smad2/3/4	Sp1, FoxO, p53, Notch1, Meox2, Runx3, SRF, Ets1, TFAP2A	р21 <sup>ср</sup>	Induction	Human keratinocytes, gastric epithelial cells	FoxO, HHM	(Chi et al., 2005; Cordenonsi et al., 2003; Ikushima et al., 2008; Koinuma et al., 2009; Lee, H. J. et al., 2007; Niimi et al., 2007; Pardali, K. et al., 2000; Seoane et al., 2004; Valcourt et al., 2007)
	Smad2/3/4	Sp1, Miz1, FoxO, C/EBPβ	p15 <sup>ink4b</sup>	Induction	Human keratinocytes	FoxO, HHM	(Feng et al., 2000; Gomis et al., 2006a; Gomis et al., 2006b; Ikushima et al., 2008; Seoane et al., 2001)
	Smad3/4	FoxO	GADD45β	Induction	Mouse hepatocytes, human keratinocytes	FoxO	(Gomis et al., 2006a; Major and Jones, 2004; Yoo et al., 2003)
	Smad3/4	Runx3	Bim1	Induction	Human gastric epithelial cells		(Yano et al., 2006)
	Smad3/4	E2F4/5	с-Мус	Repression	Human keratinocytes	ннм	(Chen, C. R. et al., 2002; Ikushima et al., 2008)
	Smad2/3/4	Olig1	PDGFB	Induction	Mouse mammary epithelial cells,	ннм	(Bruna et al., 2007; Ikushima et al., 2008)
	Smad3/4	HMGA2	Snail1	Induction	Mouse mammary epithelial cells		(Thuault et al., 2008)
	Smad3/4	HIF1a	VEGF	Induction	Human endothelial cells		(Sanchez-Elsner et al., 2001)
	Smad2/3/4	Sp1	LIF-1	Induction	Human glioma stem cells		(Peñuelas et al., 2009)
	Smad3/4	FoxO, Ets1	CTGF	Induction	Human mesangial cells, human	FoxO	(Chen, Y. et al., 2002: Gomis et al., 2006a: Van
		,			keratinocytes, mouse fibroblasts		Beek et al., 2006)
al	Smad3/4	FoxO, MAN1 (LEMD3)	MAN1 (LEMD3)	Induction	Human hepatoma cells, human keratinocytes, mouse endothelial cells, mouse ES cells	FoxO	(Cohen et al., 2007; Gomis et al., 2006a; Ikushima et al., 2008; Ishimura et al., 2008; Ishimura et al., 2006; Lin et al., 2005; Pan et al. 2005)
	Smad2/3/4	FoxO, ΙΚΚα	Ovol1	Induction	Human keratinocytes, human breast carcinomas	FoxO	(Descargues et al., 2008; Gomis et al., 2006a; Kowanetz et al., 2004)
in/noc	Smad3/4	HNF4	apolipoprotein C3	Induction	Human hepatoma		(Chou et al., 2003)
-β/activ	Smad3/4	GATA3	IL5	Induction	Mouse T helper cells		(Blokzijl et al., 2002)
	Smad3/4	GATA4	inhibin α	Induction	Human granulosa cells		(Anttonen et al., 2006)
10	Smad3/4	β-catenin	gastrin	Induction	Mouse pancreatic cells		(Lei et al., 2004)
	Smad3/4	Sox9	α1(II) collagen	Induction	Human mesenchymal stem cells		(Furumatsu et al., 2005)
	Smad3/4	SRF	SM22α	Induction	Mouse mesenchymal cells		(Qiu et al., 2003)
-	Smad2/4	p53	α-fetoprotein	Repression	Human hepatoma cells		(Wilkinson et al., 2008)
	Smad2/4	Mutant p53, p63	Sharp1, cyclin	Induction	Human breast carcinoma cells		(Adorno et al., 2009)
	Smad3/4	HNF3, Nkx2.1	surfactant B	Repression	Human lung epithelial cells		(Li et al., 2002)
	Smad3/4	ATF3	Id1	Repression	Human keratinocytes		(Kang et al., 2003)
	Smad3/4	Pax8	sodium/iodide	Repression	Human thyrocytes		(Costamagna et al., 2004)
	Smad2/3/4	Runx2	IgA, IgCα	Induction	Human B lymphocytes		(Hanai et al., 1999; Pardali, E. et al., 2000; Zhang and Dervnek, 2000)
	Smad3/4	NF-κB p52	JunB	Induction	Human tumor cells		(Lopez-Rovira et al., 2000)
	Smad3/4	TFE3, Sp1, Olig1	PAI1	Induction	Human epithelial, mesenchymal,	ннм	(Datta et al., 2000; Hua et al., 1999; Ikushima et al., 2008)
	Smad3/4	Max	PAI1	Repression	Human cancer cells		(Grinberg and Kerppola, 2003)
	Smad3/4	Notch ICD	Hes1, Hey1	Induction	Mouse myoblasts, mouse keratinocutes		(Blokzijl et al., 2003; Zavadil et al., 2004)
	Smad3/4	Ski	Pax3	Repression	Mouse melanocytes		(Yang et al., 2008)
	Smad3/4	MyoD, MEF2C	myogenin	Repression	Mouse myoblasts		(Liu et al., 2004)
	Smad2/3/4	?	Nanog	Induction	Human ES cells		(Xu, R. H. et al., 2008)
	Smad2/4	FoxH1, Nkx2	Pitx2	Induction	Lateral mouse plate, visceral		(Shiratori et al., 2001)
	Smad2/4	FoxH1	nodal, Leftv2	Induction	endoderm Early mouse embryo		(Saijoh et al., 1999)
1			· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				1 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

**Πίνακας 2. Γονίδια στόχοι της οικογένειας του TGF-β και εμπλεκόμενοι μεταγραφικοί** παράγοντες. Τα ερωτηματικά δείχνουν ότι η εμπλοκή ενός συγκεκριμένου μεταγραφικού παράγοντα είναι ασαφής. ATF3 (activating transcription factor 3); Bim1 (Bcl-2-interacting mediator 1); CTGF (connective tissue growth factor); ChAT (choline acetyltransferase); E2F4/5 (E2F transcription factor 4); FoxH1 (forkhead box H1); GADD45β (growth arrest and DNAdamage-inducible β); GATA (GATA binding protein); Herp2 (homocysteine-responsive endoplasmic reticulum-resident ubiquitin-like domain member 2 protein); Hes1 (hairy and enhancer of split 1); Hey1 (hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1); HIF1α (hypoxiainducible factor 1 $\alpha$ ); IgC $\alpha$  (immunoglobulin C $\alpha$ ); IgA (immunoglobulin A); IL5 (interleukin 5); HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4); Lef1 (lymphoid enhancer-binding factor 1); LEMD3 (LEM domain containing 3); LIF-1 (leukemia inhibitory factor 1); MAN1 (M antigen 1); Max (Mycbinding protein Max); MEF2C (myocyte enhancer factor 2C); Meox2 (mesenchyme homeobox 2); Miz1 (Myc-interacting zinc-finger protein 1); NF-κB (nuclear factor κ B); Nkx2.5 (NK2 transcription factor related, locus 5); Notch ICD (Notch intracellular domain); OAZ (O/E-associated zinc finger protein); p15<sup>Ink4b</sup> (cyclin-dependent kinase inhibitor p15); p21<sup>Cip1</sup> (cyclin-dependent kinase inhibitor p21); PAI1 (plasminogen activator inhibitor 1); Pax8 (paired box 8); PDGFB (platelet-derived growth factor B); Pitx2 (paired-like homeodomain 2); Sizn1 (Smad-interacting zinc finger protein); SM22α (smooth muscle 22α); Sox9 [SRY (sex determining region Y)-box 9]; SRF (serum response factor); Sp1 (stimulating protein 1); Tcf4 (transcription factor 4); TFE3 (transcription factor binding to IGHM enhancer 3); VaChT (vesicular acetylcholine transporter); VEGF (vascular endothelial growth factor). Πηγή πίνακα: Moustakas, A. & Heldin, C.H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714 (2009)<sup>29</sup>.



Εικόνα 4. Γονιδιακή ρύθμιση του πυρηνικού συμπλόκου των Smad. Μετά την ενεργοποίηση των Smad από τον υποδοχέα του TGF-β τα ενεργοποιημένα Smad σύμπλοκα μετατοπίζονται στον πυρήνα όπου αλληλεπιδρούν με άλλους παράγοντες [με γαλάζιο, TF (triangular transcription factors)] και υφίστανται μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις. (A, acetylation; U, ubiquitination; S, sumoylation; P, phosphorylation). Τα μαύρα βέλη υποδεικνύουν θετική επιρροή των μετα-μεταφραστικών τροποποιήσεων στη μεταγραφή που προκαλείται από τις Smad και τα κόκκινα Τ-βέλη υποδεικνύουν αρνητική επίδραση. (Αριστερά) Απαλοιφή της καταστολής των γονιδίων στόχων των Smad όταν οι SNON/SKI συν-καταστολείς αποικοδομούνται στα πρωτεοσώματα μετά την προσθήκη μορίων ουβικυτίνης από τις λιγάσες ουβικυτίνης arkadia, SMURF2 ή APC/CDH1. APC/CDH1 (anaphase-promoting complex και η

υπομονάδα λιγάση ουβικυτίνης CDH1), BRG1 (Brahma-related gene 1), ETS1 (v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1), HHM (human homolog of Maid), IKKa (IkB kinase a), SMURF2 (Smad ubiquitination regulatory factor 2), TFAP2A (transcription factor activating enhancer-binding protein 2a), TGF- $\beta$  (transforming growth factor  $\beta$ ). Πηγή εικόνας: Moustakas, A. & Heldin, C.H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714 (2009)<sup>29</sup>.

#### 3.15. Η οικογένεια των Rho GTΡασών.

Οι Rho GTΡάσες αποτελούν μία ξεχωριστή κατηγορία της υπερ-οικογένειας των Ras μικρών GTPασών και απαντώνται σε όλα τα ευκαρυωτικά κύτταρα. Έχουν περιγραφεί περισσότερα από 20 γονίδια τα οποία κωδικοποιούν Rho GTPάσες στα θηλαστικά: τρεις Rho ισομορφές A, B, και C, τρεις Rac ισομορφές 1, 2, και 3, Cdc42, RhoD, Rnd1, Rnd2, RhoE/Rnd3, RhoG, TC10 каι TCL, RhoH/TTF, Chp каι Wrch-1, Rif, RhoBTB1 και 2 και Miro-1 και 2<sup>130</sup>. Ο ζυμομύκητας Saccharomyces cerevisiae διαθέτει 5 Rho πρωτεΐνες (Rho 1, 2, 3, 4 και Cdc42), ενώ Caenorhabditis elegans και Drosophila melanogaster προβλέπεται να έχουν 10 και 11, αντίστοιχα. Όπως και οι υπόλοιπες GTPάσες λειτουργούν ως μοριακοί διακόπτες έχοντας ενεργή (GTP-bound) και ανενεργή (GDT-bound) μορφή. Αυτή η ενεργότητά τους ελέγχεται από (i) GEFs (guanine nucleotide-exchange factors) οι οποίες αντικαθιστούν το GDT με GTP ενεργοποιώντας έτσι τις GTP $\alpha$ σες<sup>131</sup>, (ii) GAPs (GTPase-activating proteins) οι οποίες ενεργοποιούν την ενδογενή ενεργότητα GTPάσης ώστε να τις απενεργοποιήσουν εντέλει<sup>132</sup> και (iii) GDIs τους εμποδίζουν την ενεργοποίηση των GTPασών<sup>133</sup>. Επιπλέον, οι Rho GTPάσες υπόκεινται σε φωσφορυλίωση και ουβικυτιλίωση<sup>134, 135</sup>, τροποποιήσεις των οποίων ο ρόλος δεν είναι πλήρως γνωστός. Η σηματοδότησή τους πραγματοποιείται μέσω ειδικών αλληλεπιδράσεων της ενεργής μορφής των Rho GTΡασών με ρυθμιστικές πρωτεΐνες. Έχουν χαρακτηριστεί πάνω από 50 τέτοιες ρυθμιστικές πρωτεΐνες για τις Rho, Rac και Cdc42 συμπεριλαμβανομένων κινασών σερίνης/θρεονίνης, τυροσίνης και λιπιδίων, λιπασών, οξειδασών και άλλων.

## 3.16. Rho GTΡάσες και κυτταροσκελετός ακτίνης.

Η ενεργοποίηση των Rho, Rac, και Cdc42 οδηγεί στη δημιουργία συσταλτών ινιδίων ακτινομυοσίνης, λαμελλιποδίων και φιλοποδίων αντίστοιχα<sup>136</sup>. Αυτές οι εξειδικευμένες λειτουργίες που στοχεύουν στην οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης ελέγχονται από κάθε μία μικρή GTPάση και εκτός από τη δημιουργία επηρεάζουν και την οργάνωση των ινιδίων της ακτίνης. Οι Rac και Cdc42 ενεργοποιούν την Arp2/3 μέσω των WAVE και WASP αντίστοιχα προκειμένου να δημιουργηθεί ένα διακλαδιζόμενο δίκτυο ινιδίων. Αντίθετα οι Rho ενεργοποιούν τις formins προωθώντας έτσι την γραμμική επιμήκυνση των ινιδίων.

Εκτός από το είδος της επιμήκυνσης οι διακριτές αλλαγές του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλούνται από τις Rho, Rac και Cdc42 απαιτούν και τη σωστή τοπολογική οργάνωση των ινιδίων. Κάτι τέτοιο έχει χαρακτηριστεί για τη δημιουργία των συσταλτών ινιδίων της ακτινομυοσίνης από τις Rho, η οποία πραγματοποιείται από την ROCK. Αν και αυτή η κινάση σερίνης/θρεονίνης έχει πλείστα υποστρώματα, καθοριστική φαίνεται να είναι η φωσφορυλίωση της MLCP (myosin light chain phosphatase) που οδηγεί στην απενεργοποίησή της<sup>137</sup>. Το γεγονός αυτό με τη σειρά του οδηγεί σε αυξημένη φωσφορυλίωση της MLC, η οποία προάγει την ολίσθηση της μυοσίνης ΙΙ στα ινίδια της ακτίνης. Λιγότερα είναι γνωστά για το πως Rac και Cdc42 οργανώνουν τα ινίδια της ακτίνης σε διακλαδιζόμενα ή μη δίκτυα αντίστοιχα. Τα μη διακλαδιζόμενα ινίδια ακτίνης που απαντώνται στα φιλοπόδια φαίνεται να δημιουργούνται από ένα αρχικά διακλαδισμένο δίκτυο ακτίνης του οποίου η δημιουργία οφείλεται στην ενεργοποίηση της Arp2/3 από την Cdc42<sup>138</sup>. Στη συνέχεια, μετασχηματισμός τους σε φιλοπόδια γίνεται με το συνδυασμό (i) αναστολής της επικάλυψης των άκρων των ινιδίων που οδηγεί σε επιμήκυνσή τους και (ii) δημιουργίας παράλληλων δεσμών των ινιδίων της ακτίνης μέσω πρωτεϊνών όπως η fascin<sup>139</sup>.

## 3.17. Κυτταροσκελετός - Δομικά συστατικά.

Οι βασικές πρωτεΐνες που απαρτίζουν τον κυτταροσκελετό συναρμολογούνται και δημιουργούν μεγαλύτερες οντότητες οι οποίες αναλόγως της

συναρμολόγησης έχουν διαφορετικές ιδιότητες, μπορούν να αποδημιουργώντας συναρμολογηθούν και να επανα-συναρμολογηθούν διαφορετικές δομές ανάλογα με τις αλλαγές που πρέπει να επιτελεσθούν. Υπάρχουν τρεις τύποι κυτταροσκελετικών πολυμερών: τα ινίδια της ακτίνης, οι μικροσωληνίσκοι και τα ενδιάμεσα ινίδια. Τα τρία αυτά πολυμερή μαζί ελέγχουν το σχήμα και τη μηχανική των ευκαρυωτικών κυττάρων, οργανώνονται σε δίκτυα τα οποία αντιστέκονται στις μηχανικές πιέσεις αλλά μπορούν ωστόσο να επανα-διοργανώνονται σε απόκριση εξωκυτταρικών δυνάμεων και έχουν σημαντικό ρόλο στη δημιουργία και διατήρηση της ακεραιότητας των ενδοκυτταρικών δομών. Πολυμερισμός και απο-πολυμερισμός των ινιδίων της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων ασκούν στοχευμένες δυνάμεις οι οποίες οδηγούν σε αλλαγές του σχήματος των κυττάρων και με τη συνέργεια κινητήριων πρωτεϊνών οι οποίες κινούνται κατά μήκος των ινιδίων της ακτίνης και των μικροσωληνίσκων ελέγχουν την οργάνωση στο εσωτερικό του κυττάρου. Η αρχιτεκτονική των δικτύων που σχηματίζονται από τα κυτταροσκελετικά πολυμερή ελέγχεται από διάφορες ομάδες ρυθμιστικών πρωτεϊνών: nucleation-promoting factors, οι οποίες ξεκινούν το σχηματισμό ινιδίων, capping proteins, οι οποίες τερματίζουν την επιμήκυνση των ινιδίων, πολυμεράσες, οι οποίες προωθούν γρηγορότερο και συνεχή πολυμερισμό των ινιδίων, παράγοντες απο-πολυμερισμού και severing proteins, οι οποίες αποδιοργανώνουν τα ινίδια και crosslinkers και πρωτεΐνες σταθεροποίησης, οι οποίες οργανώνουν και ενισχύουν ανώτερες δικτυακές δομές. Εξωτερικές ή εσωτερικές μηχανικές πιέσεις μπορούν να επηρεάσουν τη δραστικότητα αυτών των ρυθμιστικών παραγόντων και στη συνέχεια, την τοπική δικτυακή οργάνωση των ινιδίων. Οι πιο σημαντικές διαφορές μεταξύ των τριών κυτταροσκελετικών πολυμερών που διακρίνουν την αρχιτεκτονική και τη λειτουργία των δικτύων τα οποία παράγουν είναι η μηχανική ακαμψία, η δυναμική της συναρμολόγησής, η πολικότητά και ο τύπος των κινητηρίων πρωτεϊνών με τις οποίες συνεργάζονται.

Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης επιτελεί τρεις ευρείες λειτουργίες: οργανώνει μορφολογικά τα συστατικά των κυττάρων, συνδέει φυσικά και βιοχημικά το κύτταρο με το εξωτερικό περιβάλλον και παρέχει στο κύτταρο τη δυνατότητα συντονισμένης δύναμης ώστε να κινείται και να αλλάζει σχήμα. Για να πετύχει τα παραπάνω, ο κυτταροσκελετός της ακτίνης χρησιμοποιεί ένα πλήθος από κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες και οργανίδια. Ο κυτταροσκελετός της ακτίνης δεν αποτελεί μία στατική δομή η λειτουργία της οποίας μπορεί να κατανοηθεί μεμονωμένα. Αντίθετα, αποτελεί μία δυναμική και προσαρμοζόμενη δομή της οποίας τα συστατικά πολυμερή και οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες βρίσκονται σε διαρκή κίνηση. Πολλά βασικά δομικά συστατικά του κυτταροσκελετού της ακτίνης έχουν ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί in vitro, προσδιορίζοντας με ακρίβεια την τοπολογία και τη δυναμική αυτών των κυτταροσκελετικών πρωτεϊνών κατά τη διάρκεια διαδικασιών όπως η κυτταρική κίνηση και διαίρεση. Περισσότερες από 150 πρωτεΐνες έχουν βρεθεί οι οποίες διαθέτουν περιοχές πρόσδεσης της ακτίνης, η οποία πολυμερίζεται για να δημιουργήσει ινίδια<sup>140</sup>. Μία ομάδα ρυθμιστικών πρωτεϊνών της ακτίνης δημιουργεί ένα μακρομοριακό σύμπλοκο, το WAVE, το οποίο προωθεί τη σύνθεση ινιδίων ακτίνης στο προπορευόμενο άκρο των κυττάρων που κινούνται<sup>141</sup>. Το φαινόμενο αυτό είχε παρατηρηθεί στις προεξοχές λευκοκυττάρων σε κίνηση<sup>142</sup>. Κυτταροσκελετικές δομές ακτίνης οι οποίες παρατηρούνται in vivo μπορούν να αναπαραχθούν in vitro από ένα μικρό μόνο αριθμό απομονωμένων πρωτεϊνών.

της ακτίνης είναι λιγότερο Τα ινίδια άκαμπτα από τους μικροσωληνίσκους αλλά, η παρουσία των crosslinkers που δεσμεύονται στην ακτίνη σε μεγάλη συγκέντρωση προκαλούν τη συναρμολόγηση άκαμπτων δομών υψηλής οργάνωσης περιλαμβάνοντας δίκτυα όπως τα isotropic, bundled και branched. Τα δεύτερα σχηματίζουν προεξοχές ευθυγραμμισμένων ινιδίων (φιλοπόδια), οι οποίες προκαλούν μια συντονισμένη κίνηση προς μία αυξανόμενη χημική διαβάθμιση (chemotaxis) και κάνουν δυνατή την επικοινωνία μεταξύ των κυττάρων. Αντίθετα, δίκτυα με διακλαδιζόμενα ινίδια υποστηρίζουν το προπορευόμενο άκρο των κυττάρων σε κίνηση και παρέχουν τις δυνάμεις εκείνες που εμπλέκονται στην αλλαγή σχήματος όπως αυτές κατά την φαγοκύττωση. Δεν υπάρχει εναλλαγή μεταξύ συγκεκριμένων καταστάσεων πολυμερισμού και απο-πολυμερισμού της ακτίνης όπως γίνεται με τους μικροσωληνίσκους, αλλά επιμηκύνονται σταθερά με την παρουσία μονομερών. Αυτή η σταθερή επιμήκυνση ασκεί τη δύναμη η οποία είναι απαραίτητη στο προπορευόμενο άκρο των κυττάρων κατά τη μετανάστευση<sup>143</sup>. 0

51

κυτταροσκελετός της ακτίνης συνεχώς συναρμολογείται και αποσυναρμολογείται σε απόκριση σηματοδοτικών ερεθισμάτων σε αντίθεση με αυτόν των μικροσωληνίσκων η αρχιτεκτονική του οποίου καθορίζεται από ένα ή δύο συνήθως οργανωτικά κέντρα. Τα διακλαδιζόμενα ινίδια ακτίνης, όπως αυτά των λευκοκυττάρων που έρπουν, πολυμερίζονται στο προπορευόμενο άκρο σε απόκριση σηματοδότησης των μεμβρανικών υποδοχέων λόγω χημειόταξης<sup>144</sup>. Παρομοίως, σε ινοβλάστες δημιουργία ινιδίων του στρες προκαλείται τοπικά την ενεργοποίηση των ιντεγκρινών<sup>145</sup>. Κατά το τελικό στάδιο της από ενδοκύττωσης προκαλείται τοπικά συναρμολόγηση ινιδίων ακτίνης, βοηθώντας αυτή την περιοχή της μεμβράνης να εσωτερικευθεί σαν ένα ενδοκυτταρικό κυστίδιο. Πιο περίπλοκες διαδικασίες συμβαίνουν όταν τα ινίδια της ακτίνης αλληλεπιδρούν με παράγοντες απο-συναρμολόγησης όπως μέλη της οικογένειας της κοφιλίνης και πολυμεράσες όπως μέλη της οικογένειας της φορμίνης.

Τα ινίδια της ακτίνης, όπως και οι μικροσωληνίσκοι, είναι πολωμένα πολυμερή, πράγμα που σημαίνει ότι οι υπομονάδες τους είναι δομικά ασύμμετρες σε μοριακό επίπεδο. Ως αποτέλεσμα αυτής της δομικής ασυμμετρίας, τα πολυμερή δρουν σαν σιδηροδρομικές ράγες για τις κινητήριες πρωτεΐνες οι οποίες κινούνται επιλεκτικά προς μία κατεύθυνση. Για τους μικροσωληνίσκους, κινητήριες πρωτεΐνες είναι οι κινεσίνες και οι δυνεΐνες, ενώ για τα ινίδια της ακτίνης είναι οι πρωτεΐνες της μυοσίνης παίζοντας σημαντικό ρόλο στην οργάνωση του κυτταροσκελετού. Το διακλαδιζόμενο δίκτυο της ακτίνης που οικοδομεί το προπορευόμενο άκρο φαίνεται να συναρμολογείται χωρίς τη βοήθεια κινητήριων πρωτεϊνών, ενώ το συσταλτό άκρο που υπολείπεται χρειάζεται τη δραστικότητα της μυοσίνης. Η μυοσίνη δρα επίσης στα ινίδια του στρες επιτρέποντας στο κύτταρο να συστέλλεται και να ανταποκρίνεται στο εξωτερικό περιβάλλον.

### 3.18. Οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Το σύμπλοκο Arp2/3 (αποτελούμενο από επτά πρωτεΐνες, συμπεριλαμβανομένων των Arp2 και Arp3) δεσμεύεται στην ακτίνη και προκαλεί τη δημιουργία νέων ινιδίων ακτίνης από προϋπάρχοντα ινίδια, παράγοντας έτσι ένα δίκτυο με διακλαδώσεις μεταξύ των ινιδίων<sup>146</sup>. Αυτή η διαδικασία προκαλείται από nucleation-promoting factors οι οποίοι προσδιορίζουν ποιο θα είναι το προπορευόμενο άκρο του κυττάρου, επιτρέποντας τη δημιουργία νέου πλέγματος ινιδίων μόνο προς την κατεύθυνση της μεμβράνης του εν λόγω άκρου<sup>147, 148</sup>. Τερματισμό της διαδικασίας αυτής προκαλούν οι capping proteins οι οποίες εμποδίζουν την περεταίρω προσθήκη μονομερών ακτίνης<sup>149</sup>. Επαναλαμβανόμενα στάδια επιμήκυνσης, διακλάδωσης και τερματισμού οδηγούν στη δημιουργία δικτύου μικρομετρικής κλίμακας με διακλαδιζόμενα ινίδια ακτίνης, τα οποία παίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητικότητα. Κατά την απο-συναρμολόγηση αποδομείται το δίκτυο και τα μονομερή της ακτίνης ανακυκλώνονται και επαναχρησιμοποιούνται<sup>150</sup>.

Η γεωμετρία και η κινητική της δέσμευσης κάποιων πρωτεϊνών επηρεάζουν τη δομή και την οργάνωση του κυτταροσκελετικού δικτύου της ακτίνης. Η fascin επιλεκτικά σταθεροποιεί παράλληλες δέσμες ινιδίων, π.χ. φιλοπόδια, εξαιτίας της ακαμψίας μεταξύ των συνδέσεων της fascin με την ακτίνη. Αντίθετα, η α-actinin, της οποίας τα σημεία σύνδεσες με την ακτίνη μπορούν να περιστρέφονται πιο ελεύθερα, μπορούν να σταθεροποιούν ορθογώνια πλέγματα (όπως αυτά που υποστηρίζουν τη μεμβράνη των κυττάρων) ή παράλληλες δέσμες. Σε αυτή την περίπτωση, η αρχιτεκτονική του δικτύου καθορίζεται από την κινητική της αλληλεπίδρασης. Αν ο ρυθμός αποδέσμευσης των πρωτεϊνών αυτών από την ακτίνη είναι υψηλός, τα ινίδια δημιουργούν δέσμες. Αν ο ρυθμός αποδέσμευσης είναι χαμηλός, τα ινίδια σταθεροποιούνται σε μία πιο τυχαία κατάσταση<sup>151</sup>. Υπάρχουν και κυτταροσκελετικές δομές οι οποίες εκτίνονται πέρα από τις διαστάσεις ενός τυπικού κυττάρου, περιέχουν ινίδια ακτίνης, μοιάζουν με φιλοπόδια, φτάνουν σε μήκος μερικών μιλιμέτρων και εξυπηρετούν τη σηματοδότηση μεταξύ κυττάρων<sup>152</sup>.

Παρόλες τις διαφορές στις ιδιότητες και στα δίκτυα τα οποία δημιουργούν, τα πολυμερή του κυτταροσκελετού αλληλεπιδρούν μεταξύ τους. Η οργάνωση και το αρχιτεκτονικό αποτέλεσμα αυτών των αλληλεπιδράσεων παίζουν καθοριστικό ρόλο στη μετάδοση και ανταπόκριση στις μηχανικές πιέσεις<sup>153</sup>. Αλληλεπιδράσεις των πολυμερών του κυτταροσκελετού παρατηρούνται όχι μόνο μεταξύ τους αλλά και με άλλες υποκυτταρικές δομές ειδικά (μέσω πρωτεϊνών που ενώνουν ινίδια ενός τύπου με ινίδια άλλου τύπου)

53

ή μη (στερικές και μηχανικές αλληλεπιδράσεις). Για παράδειγμα, η πρωτεΐνη WHAMM αλληλεπιδρά όχι μόνο με τα ινίδια ακτίνης αλλά και με τους μικροσωληνίσκους και τη μεμβράνη<sup>154</sup> και η Rac1 GTPάση ενεργοποιείται από την επιμήκυνση των μικροσωληνίσκων η οποία προκαλεί με τη σειρά της τη δημιουργία λαμελλιποδίων<sup>155</sup>. Αυτή η διαρκής διασύνδεση δίνει στο κύτταρο ένα μέσω αίσθησης και μετάδοσης των εσωτερικών και εξωτερικών μηχανικών πιέσεων.

### 3.19. Rho GTΡάσες και έκφραση γονιδίων.

Εκτός από την επίδραση στον κυτταροσκελετό οι Rho GTPάσες ρυθμίζουν διάφορα σηματοδοτικά μονοπάτια τα οποία οδηγούν σε αλλαγή στην έκφραση γονιδίων. SRE (serum response elements) έχουν βρεθεί σε πολλούς υποκινητές, συμπεριλαμβανομένων και αυτών των γονιδίων των συστατικών του κυτταροσκελετού όπως η ακτίνη. Δύο μεταγραφικοί παράγοντες δρουν στα SRE: (i) ο TCF (ternary complex factor) ρυθμιζόμενος από το μονοπάτι των Ras/MAPK και (ii) o SRF (serum response factor) ο οποίος ρυθμίζεται από το μονοπάτι των Rho. Ο τελευταίος απαιτεί και έναν συν-ενεργοποιητή, τον MAL, ο οποίος μετατοπίζεται από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα σε απόκριση της ενεργοποίησης των Rho<sup>156</sup>. Ο MAL προσδένεται στη μονομερή G-ακτίνη και ο πολυμερισμός της ακτίνης οδηγεί σε μετατόπιση του MAL στον πυρήνα, δείχνοντας έτσι ότι ο MAL μπορεί να είναι ένας αισθητήρας της μείωσης των επιπέδων της κυτταροπλασματικής μονομερούς ακτίνης. Οι Rho, Rac και Cdc42 δύναται να ενεργοποιήσουν τα μονοπάτια των ΙΝΚ και p38 MAPK, γεγονός το οποίο δεν γενικεύεται και εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο και το περιβάλλον<sup>157-159</sup>. Τουλάχιστον τέσσερις ΜΑΡ κινάσες (ΜΑΡΚΚΚ) είναι άμεσοι στόχοι των Rho GTPασών: οι MLK2, MLK3 και ΜΕΚΚ4 αλληλεπιδρούν με τις Rac/Cdc42, ενώ η ΜΕΚΚ1 αλληλεπιδρά και με Rho και με Rac/Cdc42, σε διαφορετικά σημεία δέσμευσης<sup>160-162</sup>. Οι συνδετικές (scaffold) πρωτεΐνες παίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της ενεργοποίησης και της εξειδίκευσης των μονοπατιών των ΜΑΡ κινασών. Τουλάχιστον τρεις πρωτεΐνες στόχοι των Rho GTΡασών, οι POSH, CNK και ΜΕΚΚ1, λειτουργούν ως τέτοιες<sup>163</sup>. Η POSH αλληλεπιδρά με τις MLK2/3 (MAPKKK), MKK4/7 (MAPKK) και JNK (MAPK) και απαιτείται κατά την εξαρτώμενη από Rac ενεργοποίηση του JNK μονοπατιού σε νευρώνες κατά την έλλειψη NGF, ενώ η CNK αλληλεπιδρά με τις MLK2/3 και MKK7 και απαιτείται κατά την εξαρτώμενη από Rac ενεργοποίηση του JNK μονοπατιού κατά την επίδραση ορού σε κύτταρα HELA<sup>164, 165</sup>. Οι Rho, Rac και Cdc42 έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιούν τον NFκB σε απόκριση κυτοκινών<sup>166</sup>, με τις Rac και Cdc42 να ενεργοποιούν την έκφραση ROS (reactive oxygen species) και κυτοκινών που σχετίζονται με φλεγμονή, που δύναται να είναι και τα δύο ενεργοποιητές του NFκB<sup>167-169</sup>. Οι Rho GTPάσες επηρεάζουν πλήθος άλλων πρωτεϊνών (Πίνακας 3). Άλλες εμπλέκονται στον μεταβολισμό των λιπιδίων<sup>170</sup> και άλλες στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης<sup>171</sup>.

Enzymatic activity	Effector protein	GTPase	References
Lipid metabolism	PI4P 5-kinase	Rho, Rac	172
	PI-3-kinase	Rac, Cdc42	173
	DAG kinase	Rho, Rac	174
	PLD	Rho, Rac, Cdc42	175
	PLC	Rac, Cdc42	176
ROS generation	NADPH oxidases	Rac	177

**Πίνακας 3. Διάφορες πρωτεΐνες οι οποίες ρυθμίζονται από Rho GTΡάσες.** Πηγή πίνακα: Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269 (2005)<sup>178</sup>.

# 3.20. Rho GTΡάσες και κυτταρικός κύκλος.

Ο κυτταρικός κύκλος στους ευκαρυώτες αποτελείται από τη φάση S, κατά την οποία γίνεται η αντιγραφή του DNA, από τη φάση M κατά την οποία ο πυρήνας και το κύτταρο διαιρούνται και από της ενδιάμεσες φάσεις G<sub>1</sub> και G<sub>2</sub>. Οι Rho GTAάσες επηρεάζουν την ενεργοποίηση των κινασών που εξαρτώνται από κυκλίνες κατά την G<sub>1</sub> φάση και την οργάνωση των μικροσωληνίσκων και του κυτταροσκελετού της ακτίνης κατά την φάση M (Εικόνα 5).



**Εικόνα 5. Rho GTΡάσες και κυτταρικός κύκλος.** Οι Rho GTΡάσες ελέγχουν διάφορα στάδια των φάσεων M και G<sub>1</sub> όπου φαίνονται και τα σηματοδοτικά μονοπάτια που εμπλέκονται. Πράσινο: μικροσωληνίσκοι, κόκκινο: ακτίνη, μπλε: χρωμοσώματα. Πηγή εικόνας: Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269 (2005)<sup>178</sup>.

Αναστολή των Rho, Rac και Cdc42 αναστέλλει τον κυτταρικό κύκλο στη φάση G<sub>1</sub> σε μία πληθώρα κυττάρων θηλαστικών, αλλά ο μηχανισμός με τον οποίο πραγματοποιείται εξαρτάται από τον κυτταρικό τύπο<sup>179, 180</sup>. Η πρόοδος της φάσης G<sub>1</sub> ελέγχεται από δύο τύπους κινασών εξαρτώμενες από κυκλίνες (Cdks), τις Cdk4/Cdk6 και Cdk2, οι οποίες ενεργοποιούνται από τις κυκλίνες D και E αντίστοιχα, και αναστέλλονται από τις INK4A και Cip/Kip. Αυτοί οι ενεργοποιητές και αναστολείς της προόδου της φάσης  $G_1$  ελέγχονται με τη σειρά τους από αυξητικούς παράγοντες και πρωτεΐνες της εξωκυτταρικής μήτρας.

Τα επίπεδα μεταγραφής της κυκλίνης D επηρεάζονται από τη δράση αυξητικών παραγόντων μέσω του Ras/Erk μονοπατιού<sup>181</sup>. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση μεταγραφής της κυκλίνης D1 έχει αναφερθεί ότι συμβαίνει κατά την εκτοπική έκφραση Rac και Cdc42 και σε μία τουλάχιστον περίπτωση μεσολαβεί ο NFκB<sup>182, 183</sup>. Σε NIH3T3 ινοβλάστες η Rho είναι απαραίτητη για την έκφραση της κυκλίνης D η οποία πάλι εξαρτάται από την Rac<sup>184</sup>. Σε αυτήν την περίπτωση η Rho κατά τη διάρκεια του κυτταρικού κύκλου δρα ώστε να αναστέλλει τη δράση της Rac και να προωθεί την διαρκή ενεργοποίηση της Erk, γεγονότα τα οποία είναι αμφότερα απαραίτητα για το σωστό χρονικό έλεγχο της έκφρασης της κυκλίνης D. Στη διαρκή ενεργοποίηση της Erk εμπλέκονται οι ROCK και LIMK καθώς επίσης και η δημιουργία ινιδίων του στρες, ενώ η καταστολή της Rac είναι ανεξάρτητη της ακτίνης<sup>185</sup>. Σε ενδοθηλιακά κύτταρα η ενεργοποίηση ιντεγκρίνης είναι απαραίτητη για την ενεργοποίηση του Rac μονοπατιού το οποίο ελέγχει την μετάφραση της κυκλίνης D1<sup>186</sup>. Όσον αφορά την έκφραση της κυκλίνης Ε αυτή έχει αναφερθεί ότι ενεργοποιείται από την Cdc42 μέσω της κινάσης p70 S6 κατά το τέλος της φάσης  $G_1^{187}$  και είναι ανεξάρτητη από την ενεργότητα της Rho<sup>185</sup>.

Οι Rho GTPάσες ρυθμίζουν επίσης τα επίπεδα των αναστολέων της Cdk2, p21<sup>cip1</sup> και p27<sup>kip1</sup>. Έχει αναφερθεί ότι ενεργοποίηση της Ras προωθεί την συγκέντρωση υψηλών επιπέδων p21<sup>cip1</sup> πράγμα το οποίο εξασθενεί από τη δράση της Rho είτε μέσω αναστολής της μεταγραφής της p21<sup>cip1</sup>,είτε πιθανόν από αποικοδόμησή της<sup>188, 189</sup>. Σε ινοβλάστες και καρκινικά κύτταρα παχέως εντέρου, το αποτέλεσμα αυτό είναι ανεξάρτητο της ROCK, ενώ σε άλλους κυτταρικούς τύπους φαίνεται πως η ROCK εμπλέκεται<sup>190, 191</sup>. Η ρύθμιση της p27<sup>kip1</sup> από τη Rho είναι μετα-μεταγραφική, παρόλα αυτά υπάρχουν παραδείγματα στα οποία φαίνεται να πραγματοποιείται μέσω αποικοδόμησης ή μετάφρασης<sup>192, 193</sup>.

Κάποιες από τις επιδράσεις των Rho στη πρόοδο της φάσης  $G_1$ φαίνεται να αντανακλούν το σημαντικό ρόλο της σηματοδότησης που εξαρτάται από την πρόσφυση και επηρεάζουν τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό. Η έλλειψη πρόσφυσης είναι ένα από τα χαρακτηριστικά του καρκίνου πράγμα το οποίο δείχνει την πιθανή σημαντικότητα της απορύθμισης των μονοπατιών των Rho GTPασών στην πρόοδο του καρκίνου<sup>194</sup>.

# 3.21. Rho GTΡάσες κατά τη μίτωση.

Το σύμπλεγμα της ακτινομυοσίνης υπό τον έλεγχο της ROCK έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται στην τοποθέτηση των κεντροσωμάτων<sup>195</sup>, ενώ οι μικροσωληνίσκοι έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τις Rho GTPάσες με πιθανή τοπική αναστολή της Rho και κατ' επέκταση της συσταλτότητας<sup>196</sup>. Στο *C. elegans* oι Par1-6 και aPKC (atypical protein kinase C) είναι απαραίτητες για την ασύμμετρη διχοτόμηση του ζυγώτη. Οι ίδιες πρωτεΐνες είναι ασύμμετρα κατανεμημένες με τις Par6/aPKC/Par3 στο πρόσθιο άκρο και τις Par1/Par2 στο οπίσθιο άκρο, καθορίζοντας έτσι τη θέση της ατράκτου ώστε να προκύψουν δύο άνισου μεγέθους θυγατρικά κύτταρα. Η Par6 είναι στόχος της Cdc42 (η οποία είναι απαραίτητη για την ασύμμετρη διχοτόμηση<sup>197</sup>) προκαλώντας αλλαγή στη διαμόρφωσή της και ενεργοποιώντας την aPKC<sup>198-200</sup>. Τέλος, στο σύμπλοκο του κινητοχώρου συμπεριλαμβάνεται και η mDia3. Αναστολή της Cdc42 ή αποσιώπησή της προκαλούν αναστολή του κυτταρικού κύκλου και κάποια χρωμοσώματα δεν προσδένονται σωστά στους μικροσωληνίσκους<sup>201</sup>.

## 3.22. Rho GTΡάσες κατά την κυτοκίνηση.

Η κυτταρική διαίρεση αρχίζει στο τέλος του μιτωτικού κύκλου μέσω της συναρμολόγησης του συσταλτού δακτυλίου ο οποίος αποτελείται από ινίδια ακτίνης και μυοσίνης ΙΙ. Η Rho παίζει σημαντικό ρόλο στη λειτουργία του συσταλτού δακτυλίου και εντοπίζεται μαζί με τις ROCK, Citron kinase και mDia κατά μήκος του δακτυλίου<sup>202</sup>. Η μυοσίνη ενεργοποιείται μέσω της φωσφορυλίωσης της ελαφριάς της αλυσίδας στις Thr18 και Ser19, γεγονός το οποίο οδηγεί στη συστολή του δακτυλίου<sup>203, 204</sup>. Η Citron φωσφορυλιώνει άμεσα τη MLC σε αυτά τα δύο κατάλειπα<sup>205</sup>. Αναστολή της Citron αλλά όχι της ROCK, σταματάει την κυτοκίνηση στα HeLa, ενώ, σε άλλους κυτταρικούς τύπους η ROCK είναι επίσης σημαντική με τα knock out για την Citron ποντίκια να είναι βιώσιμα<sup>206-208</sup>. Οι δύο αυτές κινάσες είναι πιθανό να παίζουν διαφορετικό και/ή

εν μέρη συμπληρωματικό ρόλο. Εξωγενής έκφραση της Citron μπορεί να αντικαταστήσει τη ROCK κατά την συναρμολόγηση των ινιδίων του στρες<sup>205</sup>. Είναι, τέλος, ενδιαφέρον το γεγονός ότι οι υπεύθυνες GEF (Ect2) και GAP (MgcRacGAP) για τη ρύθμιση των Rho κατά τη διάρκεια της κυτοκίνησης<sup>209-211</sup> είναι ίδιες με αυτές που ελέγχουν τις προσδέσεις στον κινητοχώρο μέσω της Cdc42 κατά τη μίτωση<sup>212</sup>.

#### 3.23. Rho GTΡάσες και μορφογένεση - κυτταρική αλληλεπίδραση.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ συμπλόκων των συνδέσμων πρόσφυσης διαφορετικών κυττάρων και ο ταυτόχρονος καθορισμός της πολικότητας καθορίζουν την μορφογένεση σε πολλούς κυτταρικούς τύπους. Στα επιθηλιακά κύτταρα οι E-cadherins, μέλος της οικογένειας των ασβεστιο-εξαρτώμενων διαμεμβρανικών πρωτεϊνών, συμμετέχουν στην αλληλεπίδραση ομοίου τύπου κυττάρων μεταξύ τους μέσω της στρατολόγησης ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών (όπως οι α- και β-catenin) και του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Κάθε μία από τις Rho, Rac και Cdc42 εμπλέκονται στη συναρμολόγηση των συνδέσμων πρόσφυσης.

Η αλληλεπίδραση των συνδέσμων πρόσφυσης μεταξύ δύο κυττάρων φαίνεται πως οδηγεί στην τοπική δημιουργία φιλοποδίων και/ή λαμελλιποδίων τα οποία οδηγούν στην ολοκληρωμένη σύνδεση ομοίου τύπου γειτονικών κυττάρων μεταξύ τους<sup>213-215</sup>. Η δημιουργία τοπικών προεκβολών μπορεί να οφείλεται στην αρχική αλληλεπίδραση μεταξύ των cadherin οι οποίες ενεργοποιούν την Rac και ίσως και την Cdc42, οι οποίες με τη σειρά τους δημιουργούν μία θετική ανατροφοδότηση της διαδικασίας<sup>216</sup>. Ωστόσο, μία εναλλακτική πιθανότητα είναι αυτή των nectins. Είναι διαμεμβρανικές πρωτεΐνες ανεξάρτητες ασβεστίου οι οποίες δημιουργούν δια- και ετερομοριακές αλληλεπιδράσεις γεγονός πιθανώς απαραίτητο για να ακολουθήσει η αλληλεπίδραση μεταξύ των συμπλόκων των συνδέσμων πρόσφυσης<sup>217, 218</sup>. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των nectins ενεργοποιούν τις Cdc42 και Rac, γεγονός το οποίο δύναται να προκαλέσει την δημιουργία προεκβολών οι οποίες στη συνέχεια να διευκολύνουν τη σύνδεση μέσω cadherins<sup>219</sup>.

## 3.24. Rho GTΡάσες και κυτταρική μετανάστευση.

Ο πολυμερισμός της ακτίνης και η επιμήκυνση των ινιδίων στο πρόσθιο άκρο και η συστολή των ινιδίων της ακτινομυοσίνης στο οπίσθιο άκρο ενός κυττάρου είναι οι βασικότερες δυνάμεις που εμπλέκονται στην μετανάστευση των κυττάρων στα θηλαστικά. Οι δύο αυτές δυνάμεις μπορεί να εμφανιστούν τυχαία σε κάποιο κύτταρο μιας καλλιέργειας, γεγονός το οποίο είναι σύντομο και οδηγεί σε τυφλή μετανάστευση. In vivo, η κυτταρική μετανάστευση είναι κατένης ανάλογα με το παραπάνω ερέθισμα. Κατευθυνόμενη και σταθερή μετανάστευση απαιτεί επιπρόσθετες κυτταρικές αλλαγές συμπεριλαμβανομένων πόλωση του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων και των εκκριτικών μονοπατιών<sup>220</sup>.

## 3.25. Rho GTΡάσες και κίνηση.

Η Rac δρώντας μέσω των WAVE και Arp2/3, είναι απαραίτητη για τον πολυμερισμό της ακτίνης στο προπορευόμενο άκρο των κυττάρων σε μετανάστευση ωθώντας έτσι την μεμβράνη προς αυτή την κατεύθυνση. Στο προπορευόμενο άκρο εντοπίζεται η ενεργή GTP-Rac. Κατά τη χημειοταξία στα ουδετερόφιλα αυτή η ενεργοποίηση παραμένει σταθερή μέσω θετικής ανατροφοδότησης των PI3-K και του παράγωγού της PIP<sub>3</sub><sup>221-223</sup>. Σε *Dictyostelium* και ουδετερόφιλα αυτή η συγκέντρωση της PIP<sub>3</sub> στο προπορευόμενο άκρο ενισχύεται από τον πλάγιο και οπίσθιο, όσον αφορά την τοπολογία του κυττάρου σε μετανάστευση, εντοπισμό της PTEN λιπιδικής φωσφατάσης<sup>224, 225</sup>.

Η Rho δρα στο οπίσθιο άκρο ενός κυττάρου σε μετανάστευση παρέχοντας δυνάμεις συστολής μέσω της φωσφορυλίωσης της MLC από τη ROCK ωθώντας με αυτόν το τρόπο το κύτταρο προς τα εμπρός<sup>137</sup>. Η ROCK έχει αναφερθεί ότι αναστέλλει την ανεπιθύμητη δημιουργία πλευρικών προεκβολών πιθανόν μέσω του περιορισμού δημιουργίας συμπλόκων πρόσδεσης ιντεγκρίνης<sup>226</sup>. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι αναστολή της ROCK επάγει κυτταρική μετανάστευση<sup>227</sup>. Επιπροσθέτως, η Smurf1, E3 λιγάση ουβικυτίνης, εντοπίζεται στο πρόσθιο άκρο κυττάρων σε μετανάστευση<sup>135</sup>.

Πιο πρόσφατες μελέτες μετανάστευσης καρκινικών κυττάρων σε μήτρες τριών διαστάσεων αποκάλυψαν εκπληκτικές διαφορές από αυτές σε πιάτα καλλιέργειας δύο διαστάσεων, γεγονός το οποίο δύναται να έχει σημαντικές επιπτώσεις στη μετάσταση. Κάποια καρκινικά κύτταρα δημιουργούν προεκβολές στο πρόσθιο άκρο όπως είναι αναμενόμενο αλλά δε φαίνεται να είναι απαραίτητη ούτε η Rho ούτε η ROCK<sup>228</sup>. Πιθανόν να υπάρχει ένας διαφορετικός μηχανισμός ο οποίος προκαλεί τη συστολή της ακτινομυοσίνης στο οπίσθιο άκρο. Από την άλλη, μια δεύτερη κατηγορία καρκινικών κυττάρων δημιουργεί κύστες με τις Rho και ROCK να είναι απαραίτητες. Η Rac είναι απαραίτητη και στις δύο αυτές περιπτώσεις<sup>228</sup>.

Οι μηχανισμοί με τους οποίους εξωτερικά ερεθίσματα κατευθύνουν τη Rac και την ενεργοποίηση της Arp2/3 στο πρόσθιο άκρο και κατ' επέκταση καθορίζουν την κατεύθυνση της μετανάστευσης δεν είναι πλήρως χαρακτηρισμένοι, αλλά σε κάποιες περιπτώσεις εμπλέκεται η Cdc42. Οι πρώτες ενδείξεις ότι η Cdc42 συνδέει τα εξωκυτταρικά ερεθίσματα με την κυτταρική πολικότητα προήλθε από μελέτες σύζευξης ζύμης σε απόκριση φερομονών, γεγονός το οποίο επιβεβαιώθηκε αργότερα και σε ζωικά κύτταρα χρησιμοποιώντας είτε την παρατήρηση κίνησης μεμονωμένων κυττάρων προς ένα χημειοτακτικό παράγοντα αυξανόμενης κλίμακας, είτε την κίνηση ολόκληρων κυτταρικών μετώπων σε δοκιμασίες επούλωσης τραύματος<sup>227, 229,</sup> <sup>230</sup>. Για παράδειγμα, η Cdc42 είναι απαραίτητη για την κατευθυνόμενη μετανάστευση μακροφάγων προς τον χημειοτακτικό παράγοντα M-CSF1, όταν όμως αναστέλλεται η δράση της, τα κύτταρα εξακολουθούν να κινούνται αλλά σε τυχαία κατεύθυνση<sup>229</sup>. Αναστολή της Rac στα ίδια κύτταρα αναστέλλει πλήρως τη μετανάστευση. Ομοίως, η Cdc42 είναι απαραίτητη για τον περιορισμό του πολυμερισμού της ακτίνης που εξαρτάται από τη Rac στο πρόσθιο άκρο ινοβλαστών οι οποίοι μεταναστεύουν σε δοκιμασία τραύματος μιας μονοστιβάδας κυττάρων<sup>231</sup>. Τοπικά, η Cdc42 φαίνεται να ενεργοποιείται από εξωτερικά ερεθίσματα (χημειοτακτικούς παράγοντες ή απώλεια της επαφής κυττάρων) και στη συνέχεια να ενεργοποιεί ένα μονοπάτι το οποίο καθορίζει τον εντοπισμό της ενεργής Rac. Στα ουδετερόφιλα προτείνεται ότι στον παραπάνω μηχανισμό εμπλέκεται ο εντοπισμός της α-PIX, δηλαδή ενός εξειδικευμένου GEF για τη Rac και της PAK η οποία δρα ως συνδετικός κρίκος παρά ως κινάση<sup>224</sup>.

Η κατευθυνόμενη μετανάστευση εμπλέκει και την πόλωση του κυτταροσκελετού των μικροσωληνίσκων μέσω του προσανατολισμού του κεντροσώματος δίπλα στον πυρήνα αντικρίζοντας την κατεύθυνση της μετανάστευσης. Η Cdc42 ρυθμίζει την κυτταρική πολικότητα χρησιμοποιώντας μηχανισμούς που εμπεριέχουν κοινά μονοπάτια με αυτά της πόλωσης των κυττάρων κατά τη μορφογένεση και την ασύμμετρη κυτταρική διαίρεση.

4. Στόχος της Διατριβής

Πρόσφατα έχει παρουσιασθεί ένα ραγδαία αυξανόμενο ενδιαφέρον για τους μηχανισμούς ρύθμισης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και τον ρόλο των μικρών GTPασών της οικογένειας Rho στην μεταγωγή του σήματος από τον TGF-β. Αντίθετα, λιγότερα είναι γνωστά για την επίδραση των μελών BMP προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης όπως και για τον ρόλο των πρωτεϊνών Rho στη σηματοδότηση από BMP. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με το γεγονός ότι ο TGF-β και οι BMP ανήκουν στην ίδια υπερ-οικογένεια εξωκυτταρικών μορφογενετικών παραγόντων, και επιπλέον σηματοδοτούν παρόμοιες ενδοκυττάριες οδούς στις οποίες συμμετέχουν διακριτά μέλη της οικογένειας Smad όπως αναφέρθηκε προηγουμένως. Συγκεκριμένα, οι μεμβρανικοί υποδοχείς του TGF-β ενεργοποιούν τις Smad2 και Smad3, ενώ οι υποδοχείς των BMP ενεργοποιούν τις Smad1, Smad5 και Smad8.

Ο μέχρι σήμερα γνωστός ρόλος του ΒΜΡ στη ρύθμιση του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι έμμεσος και αποσπασματικός. Συγκεκριμένα, κατά τη σηματοδότηση του BMP η RhoA έχει δειχθεί ότι εμπλέκεται στην ρύθμιση της κυτταρικής πρόσφυσης και στην δημιουργία των κρανιακών δομών του Xenopus in vivo <sup>232</sup>. In vitro, σε κυτταρικά μοντέλα, ο BMP-2 δείχθηκε ότι επάγει οργάνωση ινιδίων του στρες σε καρκινικά κύτταρα του πνεύμονα Α549, ένα φαινόμενο που συσχετίσθηκε με την επαγωγή καταστολής της κυτταρικής αύξησης από τον BMP-2<sup>233</sup>. Μία σειρά συστηματικών αναλύσεων γονιδιακής έκφρασης μέσω τεχνικών RT-PCR και μικροσυστοιχιών σε νευροεπιθηλιακά κύτταρα, κύτταρα λείου μυός του αγγειοποιητικού συστήματος και χονδροκύτταρα, έδειξαν ότι σημαντικά γονίδια που κωδικοποιούν ρυθμιστικές πρωτεΐνες του κυτταροσκελετού ακτίνης και το γονίδιο της RhoB ρυθμίζονται από μέλη των BMP<sup>234-236</sup>. Ο φυσιολογικός ρόλος του γονιδιακού αυτού ελέγχου παραμένει ανεξερεύνητος, με εξαίρεση την RhoB, η οποία συνεισφέρει στην εξαρτώμενη από BMP αποφλοίωση και μετακίνηση νευροεπιθηλιακών κυττάρων από τον νευρικό σωλήνα κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη<sup>235</sup>. Επιπλέον, έχει βρεθεί ότι ο υποδοχέας τύπου ΙΙ των ΒΜΡ αλληλεπιδρά άμεσα με την LIMK1 με αποτέλεσμα την απενεργοποίησή της<sup>237</sup>. Ενεργοποίηση του υποδοχέα από BMP-4 αφ' ενός επάγει φωσφορυλίωση των Smad, αφ' ετέρου απελευθερώνει την LIMK1 ώστε να επάγει ρύθμιση της κοφιλίνης και τελικά της οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Στον

μηχανισμό αυτό η εμπλοκή των Rho πρωτεϊνών παραμένει άγνωστη, όπως και αγνοείται αν ο μηχανισμός αυτός εξηγεί κάποια από τα ελάχιστα γνωστά παραδείγματα φυσιολογικής ρύθμισης της ακτίνης από BMP. Πρόσφατα, έχει δειχθεί ενεργοποίηση των Rac1, Cdc42 και Rho GTΡασών από BMP-4 η οποία πιθανόν είναι υπεύθυνη για την αυξημένη πρόσφυση, κινητικότητα και εισβολή καρκινικών κυττάρων ωοθήκης<sup>238</sup>.

Μελέτες έχουν δείξει ότι σε επιθηλιακά κύτταρα μαστού τα οποία υφίστανται επιθηλιο-μεσεγχυματική εξαλλαγή σε απόκριση προς τον TGF-β αλλά όχι προς τον BMP-7, και οι δύο παράγοντες επάγουν ταχεία αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού ακτίνης<sup>239, 240</sup>. Η παρατήρηση αυτή συσχετίζεται επίσης και με την ικανότητα του TGF-β, αλλά όχι των BMP να επάγουν καταστολή της επιθηλιακής κυτταρικής αύξησης. Κατά συνέπεια είναι σημαντικό να αναλυθεί με συστηματικό τρόπο ο ρόλος των BMP στην ρύθμιση της λειτουργίας της ακτίνης και του πιθανού ρόλου που παίζουν οι μικρές GTPάσες της οικογένειας Rho.

Με βάση τα παραπάνω στα πλαίσια της παρούσας διατριβής θα αναλυθεί ο μηχανισμός που συνδέει τη δράση του BMP με τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Έτσι, θα εξετασθούν μόρια που πιθανόν εμπλέκονται στη σηματοδότηση του BMP όπως Smad, MAP κινάσες, Rho GTPάσες, κινάσες και υποστρώματα που εμπλέκονται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης, όπως τα ζεύγη LIM κινάση – κοφιλίνη, ROCK/MLC κινάση – MLC. Επιπλέον, θα διερευνηθεί ο ρόλος κάποιων αρνητικών ρυθμιστών της σηματοδότησης του TGF-β όπως ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου p21 η κυτταροπλασματική μορφή του οποίου αναστέλλει άμεσα την ROCK<sup>241, 242</sup> και οδηγεί στην αρνητική ρύθμιση της οδού RhoA/ROCK/LIMK/κοφιλίνη/ακτίνη<sup>243</sup> και η λιγάση E3 της ουβικυτίνης, Smurf1, η οποία ρυθμίζει την πρωτεόλυση των RhoA<sup>135</sup>, Smad και των υποδοχέων των TGF-β και BMP<sup>244, 245</sup>. Τα γονίδια αυτών των πρωτεϊνών έχει δειχθεί ότι επάγονται μεταγραφικά άμεσα από την οδό των Smad, σε απόκριση επιθηλιακών κυττάρων τόσο σε TGF-β όσο και σε BMP.

Βασικοί στόχοι της διατριβής είναι η συστηματική ανάλυση της φυσιολογικής ρύθμισης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της λειτουργίας της σηματοδοτικής οδού των μικρών GTPασών Rho από BMP, ο χαρακτηρισμός νέων μορίων ή/και οδών σηματοδότησης του BMP προς ρύθμιση της δυναμικής οργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η πιθανή επίδραση των Rho GTPασών, της ROCK κινάσης, καθώς και των νέων μορίων που πιθανόν να προκύψουν σε φυσιολογικές κυτταρικές λειτουργίες όπως η αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης και η μετανάστευση.

5. Υλικά και Μέθοδοι

# 5.1. Κύτταρα

Swiss3T3 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) NIH3T3 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) HaCaT (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) MCF7 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) MEF (Ευγενική προσφορά του Dr. R. Heuchel, Ludwig Institute for Cancer Research Uppsala, Sweden.) DU145 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) MCF 10A wild type (Ευγενική προσφορά του Dr. A. Μουστάκα, Ludwig Institute for Cancer Research, Biomedical Center, SE-751 24 Uppsala, Sweden.) MCF 10A p21-/- (Ευγενική προσφορά του Dr. A. Μουστάκα, Ludwig Institute for Cancer Research, Biomedical Center, SE-751 24 Uppsala, Sweden.)

# 5.2. Αυξητικοί παράγοντες

Bone Morphogenetic Protein: Recombinant Human BMP-7 (R&D SYSTEMS #354-BP). Τελική συγκέντρωση: 30ng/mL

Transforming Growth Factor: Recombinant Human TGF-β1 (R&D SYSTEMS #240-B). Τελική συγκέντρωση: 5ng/mL

# 5.3. Αντισώματα

<u>5.3.1. Πρωτογενή αντισώματα ανοσοαποτύπωσης</u>
Mouse Anti-Actin: 1:1000 (Millipore #MAB1501)
Rabbit Anti-Phospho-Smad1: 1:1000 (Homemade LICR)
Rabbit Anti-Smad1: 1:1000 (Epitomics #1649-1)
Rabbit Anti-Smurf1 1:500/5% milk (Santa Cruz #sc-25510)
Mouse Anti-α-Tubulin 1:1000 (Santa Cruz #sc-8035)
Rabbit Anti-Phospho-p38 MAPK: 1:1000/5% BSA (Cell Signaling #4511)
Rabbit Anti-p38 MAPK: 1:1000/5% BSA (Cell Signaling #9212)
Rabbit Anti-p44/42 MAPK (Erk1/2): 1:2000 (Cell Signaling #9102)

Rabbit Anti-Phospho-p44/p42 MAPK (Erk1/2): 1:2000 (Cell Signaling #9101) Rabbit Anti-Phospho-Myosin Light Chain 2: 1:1000/5% BSA (Cell Signaling #3671) Mouse Anti-Myosin (Light Chains): 1:200 (Sigma #M4401) Mouse Anti-RhoA: 1:100 (Santa Cruz #sc-418) Rabbit Anti-RhoB: 1:100/3% milk (Santa Cruz #sc-180) Mouse Anti-Cdc42: 1:100 (Santa Cruz #sc-8401)

<u>5.3.2. Δευτερογενή αντισώματα ανοσοαποτύπωσης</u>
Anti-Mouse: 1:10.000 (Millipore AP124P)
Anti-Rabbit: 1:40.000/3% milk (Millipore AP132P)

<u>5.3.3. Αντισώματα ανοσοφθορισμού</u>
Mouse Anti-Vinculin: 1:500 (Sigma #4505)
FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG: 1:200 (Chemicon)

# 5.4. Αντιδραστήρια άμεσου φθορισμού

Poδαμίνη – Φαλλοϊδίνη: 1:100 (Invitrogen #R415) DAPI: ProLong® Gold AntiFade Reagent with DAPI (Invitrogen)

# 5.5. Αναστολείς

ROCK (Rho Associated Kinase) αναστολέας: Y-27632 dihydrochloride monohydrate (Sigma #Y0503). Τελική συγκέντρωση: 10μM
MLCK (Myosin Light Chain Kinase) αναστολέας: ML-7 (Sigma I2764). Τελική συγκέντρωση: 5μM
### 5.6. RT-PCR εκκινητές

Οι εκκινητές για την αντίστροφη μεταγραφή των RhoA, RhoB και GAPDH μεταγράφων (Microchemistry lab, IMBB, FORTH) ήταν μια ευγενική προσφορά του εργαστηρίου βιοχημείας του καθηγητή Καρδάση Δημήτρη (Πίνακας 4).

Εκκινητής	Αλληλουχία
mRhoA sense	5' CCAGACTAGATGTAGTATTTTTTG 3'
mRhoA antisense	5' GAGCCAGACCCTGCAGTCCAG 3'
mRhoB sense	5' CCCACCGTCTTCGAGAACTA 3'
mRhoB antisense	5' CTTCCTTGGTCTTGGCAGAG 3'
GAPDH forward	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'
GAPDH reverse	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'

Πίνακας 4. Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν για την αντίστροφη μεταγραφή.

### 5.7. siRNAs

siMLC: (Eurofins Mwg Operon): 5'-GAGAAGGGCAGGAGCGGAA-3' (sense strand) Οι βάσεις αυτές αντιστοιχούν στις βάσεις 114 με 133 του MLC mRNA μυός (accession number XM\_914902), μετρώντας ως βάση 1 την Α από το κωδικόνιο έναρξης AGT.

siSmurf1: (Dharmavon RNA Technologies): 5'-GCACUAUGAUCUAUAUGUUUU-3', GGAGGAGACCUGCGGGUUUUU-3', 5'-GAUCGACAUUCCACCAUAUUU-3' και 5'-AAGAAUACGUCCGGUUGUAUU-3'. ON-TARGETplus SMARTpool L-007191-00-0010, Human Smurf1 (accession number NM\_181349)

Silencer negative control (Ambion).

### 5.8. Διαλύματα

<u>Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS) 10X pH 7,2 (1L)</u> 80g NaCl 2g KCl 14,4g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,4g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

<u>30% Ακρυλαμίδιο (100mL)</u> 29,2g Acrylamide 0,8g Bis-acrylamide Φιλτράρισμα – Αποθήκευση στους 4°C

<u>Διάλυμα διαχωρισμού pH 8,8 (100mL)</u> 18,165g Tris (1,5M)

0,4g SDS (0,4%)

Φιλτράρισμα – Αποθήκευση στους 4°C

<u>Διάλυμα επιστοίβαξης pH 6,8 (100mL)</u> 6,05 Tris (0,5M)

0,4g SDS (0,4%)

Φιλτράρισμα – Αποθήκευση στους 4°C

<u>Υπερθειϊκό Αμμώνιο (APS) 10% (10mL)</u> 1g APS Συμπλήρωση έως τα 10mL Αποθήκευση στους 4°C

### Διάλυμα Ηλεκτροφόρησης 10X pH8,3 (1L)

30,3g Tris

144,2g Glycin

10g SDS

### <u>Αποδιατακτικό Διάλυμα 4X pH 6,8 (20mL)</u>

0,6057g Tris

1,6mL  $\beta$ -mercaptoethanol

1,6g SDS

1mL Glycerol

8g Bromophenol Blue

Πήκτωμα	Διαχ	ωρισμού	Επιστοίβαξης
Ποσοστό	10%	12%	2,5%
dH <sub>2</sub> O	4mL	3,3mL	1,8mL
30% Ακρυλαμίδιο	3,3mL	4mL	450µL
Πήκτωμα	2,5mL	2,5mL	750µL
APS 10%	100µL	100µL	30µL
TEMED	3,3µL	3,3µL	1,5µL
Total	10mL	10mL	3mL

Πίνακας 5. Ενδεικτικές ποσότητες περιεχομένων πηκτής πολυακρυλαμιδίου.

<u>Διάλυμα μεταφοράς (5L)</u>

500mL Electrophoresis Buffer 10X (10%)

1000mL Methanol (20%)

3500mL dH<sub>2</sub>O (70%)

<u>Ρυθμιστικό διάλυμα Tris με Tween (TBS-T) 10X pH 7,6 (2L)</u> 48,4g Tris (0,2M) 160g NaCl (1,37M) 20mL Tween-20 (1%)

Διάλυμα απομάκρυνσης (Stripping buffer) pH 6,7 (500ml)

3,75g Tris (62,5mM)

10g SDS (2%)

3,5mL β-mercaptoethanol (100mM)

Η μεμβράνη εμβαπτίζεται στο διάλυμα απομάκρυνσης και θερμαίνεται για 30 λεπτά στους 50°C. Ακολουθούν δύο πλύσεις με TBS-T και επανάληψη της διαδικασίας ανοσοανίχνευσης.

Τα αναλυτικής καθαρότητας κοινά αντιδραστήρια των οποίων η προέλευση δεν αναφέρεται παραπάνω προέρχονται από τις εταιρείες Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), Merck (Darmstradt, Germany), Biorad (Palo Alto, CA, USA) και Serva (New York, USA)

### 5.9. Καλλιέργεια κυττάρων

Οι κυτταρικές σειρές διατηρούνται σε μονοστιβάδες μέσα σε πλαστικές φλάσκες επιφάνειας 75 cm<sup>2</sup>, σε επωαστήρα (Forma Scientific, Ohaio, USA) με υγρή ατμόσφαιρα συστάσεως 5% CO2 - 95% αέρας και θερμοκρασία 37°C. Το θρεπτικό μέσω καλλιέργειας ανανεώνεται κάθε 48 ή 72 ώρες. Ως βασικό μέσο καλλιέργειας χρησιμοποιείται το DMEM εμπλουτισμένο 10% με αδρανοποιημένο (Θέρμανση στους 56°C για 30 λεπτά) ορό εμβρύου βοός (FBS), 50IU/mL πενικιλίνη και 50mg/mL στρεπτομυκίνη. Όταν οι καλλιέργειες φτάσουν σε πλήρη ανάπτυξη (100% πληρότητα της επιφάνειας της φλάσκας) για την ανακαλλιέργειά τους εκτίθενται σε διάλυμα τρυψίνης (0,25% τρυψίνη, 5mM EDTA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών) για 1-2 λεπτά. Στη συνέχεια, τα κύτταρα παραλαμβάνονται με θρεπτικό καλλιέργειας και μοιράζονται σε νέες φλάσκες στην επιθυμητή αραίωση και σύμφωνα με τις ανάγκες του κάθε πειράματος όπως περιγράφονται παρακάτω. Πριν από την επίδραση οποιασδήποτε ουσίας τα κύτταρα καλλιεργούνται για 24 ώρες σε θρεπτικό μέσο απουσία ορού. Για μορφολογικές παρατηρήσεις τα κύτταρα καλλιεργούνται πάνω σε γυάλινες καλυπτρίδες. Για την κατάψυξη των κυττάρων, αιώρημα (1x10<sup>6</sup> κύτταρα/mL σε θρεπτικό μέσο καλλιέργειας) συμπληρώνεται με 5% DMSO και κλάσματα του 1-2mL τοποθετούνται αμέσως σε αποστειρωμένους σωλήνες και φυλάσσονται στους -85°C. Για την απόψυξη των κυττάρων, το κατεψυγμένο κλάσμα θερμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου και αμέσως φυγοκεντρείται σε 1500 rpm για 5 λεπτά. Μετά την απομάκρυνση του υπερκειμένου διαλύματος, τα κύτταρα επαναδιαλύονται σε θρεπτικό μέσο

## 5.10. Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμιδίου υπό συνθήκες αποδιάταξης (SDS-PAGE) – Western blot

Στα πρωτεϊνικά δείγματα προστίθεται ίσος όγκος αποδιατακτικού διαλύματος 2x (με προσθήκη DTT (dithiothreitol) σε τελική συγκέντρωση 100mM) και στη συνέχεια θερμαίνονται στους 95°C για 5 λεπτά, ώστε να επιτευχθεί η πλήρης μετουσίωση των πρωτεϊνών. Η πλήρης αποδιάταξη των πρωτεϊνών και η κάλυψή τους με SDS έχει ως συνέπεια η ηλεκτροφορητική τους κινητικότητα μέσα στο πήκτωμα του πολυακρυλαμιδίου να εξαρτάται μόνο από το μοριακό τους βάρος, με αποτέλεσμα το διαχωρισμό του κατά μήκος του πηκτώματος με βάση το μοριακό βάρος. Τα δείγματα τοποθετούνται στα πηγάδια του πηκτώματος και στο δοχείο της συσκευής προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης 1x. Στα μικρού μεγέθους πηκτώματα εφαρμόζεται σταθερή τάση 100V (150V για τα μεσαίου μεγέθους πηκτώματα) έως ότου τα δείγματα εισέλθουν στο πήκτωμα διαχωρισμού οπότε και αυξάνεται τάση 150V (250V για τα μεσαίου μεγέθους πηκτώματα). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η μεταφορά των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης. Μεταξύ δύο σφουγγαριών της συσκευής μεταφοράς τοποθετούνται κατά σειρά ένα χαρτί Whatman, το πήκτωμα, η μεμβράνη και ξανά ένα χαρτί Whatman, όλα εμβαπτισμένα σε διάλυμα μεταφοράς χωρίς να δημιουργηθούν φυσαλίδες μεταξύ των στρώσεων. Η πλαστική θήκη με το περιεχόμενο των στρώσεων τοποθετείται στη συσκευή

μεταφοράς πρωτεϊνών (Biorad ή Amersham Pharmacia Biotech), η οποία περιέχει διάλυμα μεταφοράς, με τη μεριά του πηκτώματος προς την κάθοδο (αρνητικός πόλος). Εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο περίπου 800mA για 1,5 ώρα. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς η συσκευή διατηρείται στους 4°C.

### 5.11. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος

Για τη μέτρηση της ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνών σε ένα κυτταρικό εκχύλισμα το οποίο περιέχει απορρυπαντικό χρησιμοποιείται το σύστημα Bio-Rad protein assay (Bio-Rad Laboratories, Palo Alto, CA, USA), το οποίο βασίζεται σε στη μέθοδο Bradford<sup>246</sup>, σύμφωνα με τις οδηγίες της κατασκευάστριας εταιρίας. Η οπτική πυκνότητα των δειγμάτων μετράται στα 595nm. για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των πρωτεϊνών στα δείγματα χρησιμοποιείται πρότυπη καμπύλη η οποία δημιουργείται με τη μέτρηση της οπτικής πυκνότητας δειγμάτων γνωστής συγκέντρωσης της πρωτεΐνης BSA (Bovine Serum Albumin)

### 5.12. Λύση κυττάρων - Ανοσοαποτύπωση

1. Ξέπλυμα με PBS+/+ (x2).

Προσθήκη επιθυμητού όγκου ice cold Lysis Buffer (20mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1% TritonX-100, 1x Inhibitor Coctail).

- 3. Απόξεση κυττάρων.
- 4. Μεταφορά του εκχυλίσματος σε eppendorf.
- 5. Sonication (αν είναι απαραίτητο για 10 δευτερόλεπτα).
- 6. Φυγοκέντρηση 14800rpm για 10 λεπτά στους 4°C.
- 7. Μεταφορά υπερκείμενου σε νέα eppendorf.

8. Αποθήκευση στους -20°C ή -80°C για μεγάλα χρονικά διαστήματα. (Κάθε βήμα πραγματοποιείται σε πάγο χρησιμοποιώντας παγωμένα διαλύματα).

 Προσδιορισμός ολικής συγκέντρωσης πρωτεϊνικού διαλύματος και παραλαβή ίσης πρωτεϊνικής συγκέντρωσης δειγμάτων.

10. Ηλεκτροφόρηση.

11. Western Blot.

12. Πλύση της μεμβράνης με PBS για 1 λεπτό.

13. Blocking για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4°C σε 5% non-fat milk/TBS-T (για ακτίνη).

14. Πλύση με TBS-T 15 λεπτά (x1) και 5 λεπτά (x2).

15. Επώαση με το πρώτο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

16. Πλύση με TBS-T 15 λεπτά (x1) και 5 λεπτά (x2).

17. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

18. Πλύση με TBS-T 15 λεπτά (x1) και 7 λεπτά (x3).

19. Επώαση σε ΕCL για 1 λεπτό.

20. Εμφάνιση του film.

21. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Tina Scan v2 αν απαιτείται.

#### 5.13. Ανοσοφθορισμός

Swiss3T3 ινοβλάστες (Passage 10-20) χωρίζονται σε 6-well πιάτα (με καλυπτρίδες σε κάθε πηγάδι) με 100.000 κύτταρα (0-4 ώρες επώασης) και 80.000 κύτταρα ανά πηγάδι (24-48 ώρες επώασης), NIH3T3 ινοβλάστες (Passage 10-20) με 150.000 κύτταρα ανά πηγάδι, ενώ HaCaT κερατινοκύτταρα και MCF 10A επιθηλιακά κύτταρα μαστού με 100.000 κύτταρα ανά πηγάδι. Αφήνονται σε θρεπτικό χωρίς FBS/FCS για 24 ώρες και επωάζονται με TGF-β1 (2ng/mL) και BMP-7 (30ng/mL) για κάθε χρονικό διάστημα που αναφέρεται στις εικόνες. Τα κύτταρα προ-επωάζονται ή όχι με τον εξειδικευμένο αναστολέα της ROCK κινάσης, Y-27632 (10μM) και της MLCK, ML-7 (5μM) για 45 λεπτά πριν την επώαση των TGF-β1 και BMP-7.

1. Πλύση με PBS+/+ για 5 λεπτά (x2).

 Μονιμοποίηση με 3% (w/v) παρα-φορμαλδεΰδη για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου (1mL ανά πηγάδι) χωρίς ανάδευση.

3. Πλύση με PBS+/+ για 5 λεπτά (x2).

4. Δημιουργία διαπερατής μεμβράνης των κυττάρων με 0,5% (v/v) Triton-X-100/PBS για 30 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου χωρίς ανάδευση. 5. Πλύση με 1,5% FBS/PBS+/+ για 5 λεπτά (x2).

6. Blocking με 5% FBS/0,1M Γλυκίνη/PBS+/+ για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου με ανάδευση.

7. Πλύση με 1,5% FBS/PBS+/+ για 5 λεπτά (x2).

8. Εφαρμογή πρώτου αντισώματος σε 5% FBS/PBS+/+ για μία ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον χωρίς ανάδευση.

9. Πλύση με 1,5% FBS/PBS+/+ για 5 λεπτά (x4).

10. Εφαρμογή δεύτερου αντισώματος σε 5% FBS/PBS+/+ για μισή ώρα σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον χωρίς ανάδευση.

11. Πλύση με 1,5% FBS/PBS+/+ για 5 λεπτά (x4).

12. Εφαρμογή ροδαμίνης – φαλοϊδίνης (1:100) σε 1,5% FBS/PBS+/+ για 40 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και σε σκοτεινό και υγρό περιβάλλον χωρίς ανάδευση αν απαιτείται.

13. Πλύση με PBS για 3 λεπτά (x4).

14.  $\Xi \epsilon \pi \lambda \upsilon \mu \alpha \mu \epsilon d d H_2 0.$ 

15. Μεταφορά των καλυπτρίδων σε αντικειμενοφόρους και κλείσιμο με Pro -Longed Gold Anti - Fade Reagent with DAPI.

16. Αποθήκευση στους 4°C.

17. Μικροσκοπία.

Κάθε επώαση γίνεται με 100μL ανά καλυπτρίδα. Για τους NIH3T3 ινοβλάστες ακολουθούνται μόνο τα βήματα του άμεσου φθορισμού μετά από την επιμόλυνση με siRNA ή όχι και την επιθυμητή επώαση.

### 5.14. Ποσοτική μέτρηση και διαχωρισμός του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε διαλυτό και μη διαλυτό κλάσμα

Swiss3T3 ινοβλάστες (Passage 10-20) χωρίζονται σε 6-well πιάτα με 80.000 κύτταρα ανά πηγάδι, MEF ινοβλάστες (Passage 8-12) χωρίζονται σε 6-well plates με 80.000 κύτταρα ανά πηγάδι, MCF7 επιθηλιακά κύτταρα (Passage 12-20) χωρίζονται με 150.000 κύτταρα (15-30 λεπτά επώασης) και 100.000 κύτταρα ανά πηγάδι (24 ώρες επώασης) και DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη (Passage 65-72) χωρίζονται σε 6-well plates με 150.000 κύτταρα (1

ώρα επώασης) και 100.000 κύτταρα ανά πηγάδι (24 ώρες επώασης). Στη συνέχεια αυτές οι κυτταρικές σειρές αφήνονται σε θρεπτικό χωρίς FBS για 24 ώρες και επωάζονται με TGF-β1 (2ng/mL) και BMP-7 (30ng/mL) για κάθε χρονικό διάστημα που προαναφέρεται στους πίνακες. Τα κύτταρα προεπωάζονται ή όχι με τον εξειδικευμένο αναστολέα της ROCK κινάσης, Y26763, 45 λεπτά πριν την επώαση με TGF-β1 και BMP-7.

1. Πλύση με TBS-Τ για 1 λεπτό.

2. Επώαση των κυττάρων σε 500 μL διαλύματος εκχύλισης 0,3% Triton-X-100 (5mM Tris, 2mM EGTA, 300mM Sucrose, 400μM PMSF, 10μM Leupeptin, 2μM Phalloidin) για 5 λεπτά με την επιφάνεια του 6-well σε πάγο (Κλάσμα T<sub>s</sub>) Μετά την απομάκρυνση του διαλύματος εκχύλισης, οι διαλυτές στο Triton-X-100 κυτταροπλασματικές πρωτεΐνες που περιέχει (στις οποίες συμπεριλαμβάνετε και η μονομερής ακτίνη) κατακρημνίζονται με ίσο όγκο (500μL) διαλύματος PCA (Perchloric Acid).

3. Οι αδιάλυτες στο Triton-X-100 πρωτεΐνες που παραμένουν στο 6-well κατακρημνίζονται σε 1mL διαλύματος 3% PCA και απομακρύνονται από αυτό με απόξεση (Κλάσμα  $T_1$ ).

4. Τα δύο κλάσματα φυγοκεντρούνται για 5 λεπτά, 12.000rpm και το ίζημα διαλυτοποιείται σε 100μL NaOH 0.1N.

5. Λαμβάνονται ίσοι όγκοι από κάθε κυτταρικό κλάσμα και μετά την ανάμιξή τους με ίσο όγκο διαλύματος μετουσίωσης 2x, ακολουθεί η διαδικασία της ηλεκτροφόρησης σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου 10% και της μεταφοράς των πρωτεϊνών σε μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

6. Πλύση με PBS για 1 λεπτό.

7. Blocking για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου ή O/N στους 4°C σε 5% non-fat milk/TBS-T.

8. Πλύση με TBS-T 15 λεπτά (x1) και 5 λεπτά (x2).

9. Επώαση με το πρώτο αντίσωμα (anti-actin 1:1.000/0,02%NaN<sub>3</sub>/TBS-T) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

10. Πλύση με TBS-T 15 λεπτά (x1) και 5 λεπτά (x2).

11. Επώαση με το δεύτερο αντίσωμα (HRP-mouse 1:10.000) για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου.

12. Πλύση με TBS-T 15 λεπτά (x1) και 7 λεπτά (x3).

13. Επώαση σε ΕCL για 1 λεπτό.

14. Εμφάνιση του film.

15. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Tina Scan v2.

### 5.15. Κατακρήμνιση ενεργών Rho GTΡασών

Swiss3T3 ινοβλάστες (Passage 10-20) χωρίζονται σε p100 πιάτα (2 πιάτα ανά συνθήκη). Την επόμενη μέρα αφήνονται σε θρεπτικό χωρίς FBS για 24 ώρες και επωάζονται με BMP-7 (30ng/mL).

1. Ξέπλυμα με παγωμένο PBS.

2. Προσθήκη επιθυμητού όγκου Cell Lysis Buffer (50mM Tris pH7,5, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 0,3M NaCl, 2% Igepal, 10µg/mL Aprotinin and Leupeptin, 1mM PMSF and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25mM NaF).

 3. Φυγοκέντρηση 14.000rpm, 4°C για 5 (PAK-GST Protein Beats) ή 15 λεπτά (Rhotekin-RBD Protein GST Beads).

4. Δέσμευση 50μL για δείγμα ολικών πρωτεϊνών.

5. Προσθήκη 20μL (20mg PAK-GST Protein Beads και 60mg Rhotekin-RBD Protein GST Beads) σε ίσους όγκους υπερκείμενου.

6. Ανάδευση στους 4°C για 1 ώρα.

7. Φυγοκέντρηση 8.000rpm για PAK-GST Protein Beads και 5.000rpm για Rhotekin-RBD Protein GST Beads, στους 4°C για 1  $\lambda$ επτό.

8. Ξέπλυμα των beads με 500μL Wash Buffer (25mM Tris pH, 30mM MgCl<sub>2</sub>, 40mM NaCl, 10µg/mL Aprotinin and Leupeptin, 1mM PMSF and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 25mM NaF) (x3).

9. Επαναδιάλυση των beads σε 25μL 2X Sample Buffer για PAK-GST Protein Beads και 30μL για Rhotekin-RBD Protein GST Beads.

10. Θέρμανση στους 100°C για 10 λεπτά. Αποθήκευση στους -20°C αν απαιτείται.

## 5.16. Ανοσοκατακρήμνιση και in vitro δοκιμασία φωσφορυλίωσης κινάσης LIMK

Swiss3T3 ινοβλάστες (Passage 10-20) χωρίζονται σε p100 πιάτα (2 πιάτα ανά συνθήκη). Την επόμενη μέρα αφήνονται σε θρεπτικό χωρίς FBS για 24 ώρες, επωάζονται ή όχι με τον αναστολέα Y-27632 για 45 λεπτά και εν τέλη επωάζονται με BMP-7 (30ng/mL).

1. Ξέπλυμα με παγωμένο PBS (x2).

2. Προσθήκη 300µL Cell Lysis Buffer (50mM Tris-HCl pH7,6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 10% Glycerol, 2µg/mL Aprotinin and Leupeptin, 1mM PMSF and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM NaF για LIMK1 και 50mM Tris-HCl pH7,6, 0,5M NaCl, 1% Triton-X-100, 10% Glycerol, 2µg/mL Aprotinin and Leupeptin, 1mM PMSF and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM NaF, 25mM β-glycerophosphate για LIMK1).

3. Επώαση για 20 λεπτά στον πάγο.

4. Φυγοκέντρηση 13.000rpm για 2 λεπτά.

5. Μέτρηση ολικών πρωτεϊνών. Δέσμευση 50μL για δείγμα ολικών πρωτεϊνών.

6. Προ-επώαση με 20μL A-protein Agaroze Beads για 1 ώρα στους 4°C με ανάδευση.

7. Φυγοκέντρηση 13.000rpm για 2 λεπτά.

8. Επώαση του υπερκειμένου με 2μg LIMK1/2 (10μL) για 2 ώρες στους 4°C με ανάδευση.

9. Προσθήκη 20μL A-protein Agaroze Beats και επώαση για 2 ώρες στους 4°C με ανάδευση.

Ξέπλυμα με 500μL Cell Lysis Buffer (x3) και επαναδιάλυση των Beads σε
20μL 2X Sample Buffer. Για τη δοκιμασία αυτοφωσφορυλίωσης το ξέπλυμα
γίνεται με 500μL Kinase Buffer (50mM Hepes pH7,2, 150mM NaCl, 5mM MgCl<sub>2</sub>,
2mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM NaF για LIMK1 και 50mM Hepes-NaOH pH7,5,
5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM MnCl<sub>2</sub>, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10mM NaF, 25mM β-glycerophosphate).

11. Θέρμανση στους 100°C για 10 λεπτά. Αποθήκευση στους -20°C αν απαιτείται. Για τη δοκιμασία αυτοφωσφορυλίωσης επανα-διαλύονται τα Beads σε 20μL Kinase Buffer με 15μM ATP και 5μCi [<sup>32</sup>P]-ATP. Επώαση στους 30°C για

20 λεπτά. Προσθήκη 13,3μL 4X Sample Buffer. Θέρμανση στους 100°C για 10 λεπτά.

### 5.17. Αντίστροφη μεταγραφή - Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης

Swiss3T3 ινοβλάστες (Passage 10-20) και HaCaT κερατινοκύτταρα χωρίζονται σε p60 πιάτα με 50.000 και 100.000 κύτταρα ανά πιάτο αντίστοιχα. Την επόμενη μέρα αφήνονται σε θρεπτικό χωρίς FBS για 24 ώρες και επωάζονται με BMP-7 (30ng/mL).

- 1. Ξέπλυμα με στείρο PBS+/+
- 2. Προσθήκη 1mL Trizol.
- 3. Απόξεση και πιπετάρισμα. Μεταφορά του εκχυλίσματος σε eppendorf.
- 4. Επώαση για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

5. Προσθήκη 200μL CHCl<sub>3</sub>, βίαιη ανάδευση για 10 δευτερόλεπτα, επώαση για 3 λεπτά.

6. Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.

7. Μεταφορά της υδατικής φάσης σε νέο eppendorf.

- 8. Προσθήκη 500μL ισοπροπανόλης, ανάδευση.
- 9. Επώαση για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.
- 10. Φυγοκέντρηση 12.000rpm για 15 λεπτά στους 4°C.
- 11. Απόρριψη υπερκείμενου και προσθήκη 1mL 75% αιθανόλης, ανάδευση.
- 12. Φυγοκέντρηση 7.500rpm για 5 λεπτά στους 4°C.
- 13. Απόρριψη υπερκείμενου.
- 14. Στέγνωμα του ιζήματος 3 λεπτά στον απαγωγό.
- 15. Προσθήκη 35μL φιλτραρισμένου WFI.
- 16. Θέρμανση στους 65°C για 15 λεπτά ώστε να διαλυθεί το ίζημα.
- 17. Μεταφορά των δειγμάτων αμέσως στον πάγο και στη συνέχεια στους -80°C.
- 18. Μέτρηση ποσότητας RNA.
- 19. Αραίωση RNA σε 200<br/>ng/μL.
- 20. RT-PCR: 1mg RNA, 300ng Random Primers, 0,5mM dNTPs, dH<sub>2</sub>O.

21. 65°C για 5 λεπτά.

22. Γρήγορη μεταφορά στον πάγο.

23. Προσθήκη 5x Buffer, 0,1M DTT.

24. 25°C για 2 λεπτά.

25. Προσθήκη 200U/μL αντίστροφη μεταγραφάση, 40U/μL RNAse.

26. 25°C για 10 λεπτά, 42°C για 50 λεπτά, 70°C για 15 λεπτά.

27. PCR. 5x Buffer, 25mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM dNTPs, 10mM Reverse and Forward Primers, 5U Go Taq, cDNA, WFI.

28. Ηλεκτροφόρηση.

29. Επεξεργασία των αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα Tina Scan v2 αν απαιτείται.

# 5.18. Δοκιμασία κινητικότητας (Επούλωση τραύματος, wound healing assay)

1. Swiss3T3 ινοβλάστες (Passage 10-20) χωρίζονται σε 6-well πιάτα.

2. Αναμονή έως ότου τα κύτταρα καλύψουν 100% την επιφάνεια των πηγαδιών.

3. 24 ώρες επώαση σε θρεπτικό χωρίς ορό.

4. Δημιουργία τραύματος, έκθεση στον επιθυμητό παράγοντα και φωτογράφηση (t=0h).

5. Φωτογράφηση στις 6 ώρες επώασης (t=6h).

6. Φωτογράφηση στις 12 ώρες επώασης (t=12h).

7. Φωτογράφηση στις 24 ώρες επώασης (t=24h).

8. Φωτογράφηση στις 48 ώρες επώασης (t=48h) αν απαιτείται.

9. Επεξεργασία αποτελεσμάτων με το πρόγραμμα ImajeJ 1,42q.

#### 5.19. Δοκιμασία πολλαπλασιασμού (MTT assay)

1. Swiss3T3 ινοβλάστες (Passage 10-20) χωρίζονται σε 96-well πιάτο με 12.000 κύτταρα ανά πηγάδι.

2. 24 ώρες επώαση σε θρεπτικό χωρίς ορό.

3. 24ωρη έκθεση στον επιθυμητό παράγοντα.

4. 4 ώρες πριν το τέλος του 24ώρου αλλαγή του θρεπτικού, προσθήκη 100μL MTT 5mg/mL (τελική συγκέντρωση 0,25mg/mL) και επώαση για άλλες 4 ώρες.

5. Απομάκρυνση θρεπτικού και προσθήκη 200μL DMSO. Πιπετάρισμα.

6. Φωτομέτρηση σε Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories (UK) Ltd). Measurement Filter 550nM, Reference Filter 655nM.

### 5.20. Δοκιμασία απόπτωσης

1. DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη (Passage 65-72) χωρίζονται σε 96-well plate.

2. Αναμονή έως ότου τα κύτταρα καλύψουν 100% την επιφάνεια των πηγαδιών.

3. 24ωρη έκθεση στον επιθυμητό παράγοντα σε μέσο με ορό.

4. Προσθήκη 5μL APOPercentage Dye σε κάθε πηγάδι 30 λεπτά πριν την ολοκλήρωση του επιθυμητής διάρκειας της επώασης.

 5. Απομάκρυνση θρεπτικού μέσου και χρωστικής. Πλύση με 200μL PBS για 2 λεπτά (x2). Λήψη μικροφωτογραφιών αν απαιτείται.

6. Προσθήκη 100μL APOPercentage Release Dye σε κάθε πηγάδι. Ανάδευση για 10 λεπτά.

7. 6. Φωτομέτρηση σε Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories (UK)
Ltd). Measurement Filter 550nM, Reference Filter 655nM.

### 5.21. Επιμόλυνση με μικρά κατασταλτικά RNA

### 5.21.1. NIH3T3

1. NIH3T3 ινοβλάστες χωρίζονται σε κάθε πηγάδι 6-well πιάτου ώστε την επόμενη μέρα να υπάρχει 50-60% επικάλυψη του πιάτου.

2. Διαλύεται 1,33μg siMLC σε 100μL Opti-MEM και 5μL Lipofectamine 2000 επίσης σε 100μL Opti-MEM. Μετά από ήπια ανάδευση αφήνονται για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

3. Ανάμιξη των διαλυμένων ολιγομερών με τη διαλυμένη Lipofectamine 2000, ήπια ανάδευση και επώαση για 20 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου.

4. Προσθήκη του διαλύματος ολιγομερών-Lipofectamine 2000 σε κάθε πηγάδι που περιέχει 1mL θρεπτικό χωρίς αντιβιοτικά. Ήπια ανάδευση.

5. Επώαση για 24 ώρες.

### <u>5.21.2. HaCaT</u>

1. Χωρίζονται 100.000 HaCaT κερατινοκύτταρα ανά πηγάδι σε 6-well πιάτο έτσι ώστε να υπάρχει 15% επικάλυψη την επόμενη μέρα.

Απομάκρυνση του θρεπτικού 30 λεπτά πριν την επιμόλυνση. Προσθήκη
1,25mL/3%FBS θρεπτικού (χωρίς αντιβιοτικά) σε κάθε πηγάδι.

 Προσθήκη σε δύο eppendorfs που περιέχουν 125μL Opti-mem το καθένα 2μL/5μL SilentFect στο πρώτο και επιθυμητή ποσότητα siRNA στο δεύτερο (Τελική συγκέντρωση στο πηγάδι 5nM).

4. Ανάμειξη του διαλυμένου SilentFect και siRNA. Επώαση για 20 λεπτά.

5. Προσθήκη του μείγματος στο 3%FBS θρεπτικό.

6. Για διπλή επιμόλυνση επαναλαμβάνεται η διαδικασία τις επόμενες μέρες.

6. Αποτελέσματα

### 6.1. Ο BMP-7 προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Αρχικά αναλύθηκε η απόκριση ινοβλαστών ποντικού (Swiss3T3, MEF και NIH3T3), ανθρώπινων επιθηλιακών κυττάρων μαστού (MCF7 και MCF 10A αγρίου τύπου καθώς και p21 null), επιδερμίδας (κερατινοκύτταρα HaCaT) και καρκινικών κυττάρων προστάτη (DU145), σε BMP-7 και TGF-β1, απουσία ορού, με τις τεχνικές της μικροσκοπίας φθορισμού και της ποσοτικής μέτρησης των διαλυτών (T<sub>s</sub>) και πολυμερισμένων [μη διαλυτών (T<sub>1</sub>)] κλασμάτων της ακτίνης.

Δοκιμασίες χρονοεξάρτησης όπου συγκρίθηκαν μέσω μικροσκοπίας φθορισμού η επίδραση των TGF-β1 και BMP-7 στους Swiss3T3 ινοβλάστες έδειξαν ότι ο BMP-7 όπως και ο TGF-β1 προκαλεί άμεση, έντονη και παρατεταμένη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους ινοβλάστες οι οποίοι προ-επωάστηκαν για 24 ώρες απουσία ορού (Εικόνα 6Α). Μετά από 24 ώρες έκθεσης των ινοβλαστών σε TGF-β1 και BMP-7 παρατηρήθηκε εμφανής αλλαγή της μορφολογίας των κυττάρων λόγω της κορύφωσης του πολυμερισμού της ακτίνης. Ποσοτικοποίηση του πολυμερισμού της ακτίνης πραγματοποιήθηκε διαχωρίζοντας το διαλυτό (T<sub>s</sub>) κλάσμα της ακτίνης από το μη διαλυτό (T<sub>1</sub>)<sup>247</sup>. Συγκεκριμένα, ο TGF-β1 επάγει μία σταδιακή μείωση του λόγου T<sub>s</sub>/T<sub>Total</sub>, ενώ ο BMP-7 προκαλεί ένα πιο άμεσο πολυμερισμό της ακτίνης ο οποίος παραμένει μέχρι και τις 24 ώρες επώασης των ινοβλαστών (Εικόνα 6Β).



Εικόνα 6: Οι TGF-β1 και BMP-7 προκαλούν άμεση και παρατεταμένη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες. (Α) Τα κύτταρα προεπωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού και επωάστηκαν στη συνέχεια με TGF-β1 και BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε). (Β) Στα γραφήματα αντιπροσωπεύονται οι μέσοι όροι ± το τυπικό σφάλμα των λόγων  $T_s/T_{Total}$  τριών ανεξάρτητων πειραμάτων (\*, p<0.05 and \*\*, p<0.01). Οι ίδιοι μέσοι όροι φαίνονται εντός των μικροφωτογραφιών.

Πολυμερισμός της ακτίνης επίσης παρατηρήθηκε με την ποσοτική μέτρηση διαλυτών και αδιάλυτων κλασμάτων της ακτίνης και στους MEF ινοβλάστες μετά από 24ωρη έκθεσή τους σε TGF-β1 και BMP-7 με πιο εκτεταμένο πολυμερισμό να προκαλείται από τον BMP-7 (Εικόνα 7Α). Έντονος πολυμερισμός της ακτίνης παρατηρήθηκε και στα MCF7 επιθηλιακά κύτταρα μαστού μετά από έκθεσή τους για 24 ώρες σε BMP-7 και TGF-β1, ενώ οριακά αυξημένος πολυμερισμός παρατηρείται στην ίδια κυτταρική σειρά για μικρής διάρκειας (15-30 λεπτά) επώασή τους με TGF-β1 και BMP-7 (Εικόνα 7Β). Τέλος, εκτεταμένος πολυμερισμός της ακτίνης παρατηρείται στην είδια κυτταρική σειρά για μικρής διάρκειας (15-30 λεπτά) επώασή τους με TGF-β1 και BMP-7 (Εικόνα 7Β). Τέλος, εκτεταμένος πολυμερισμός της ακτίνης παρατηρείται και στα DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη μετά από έκθεσή τους για 24 ώρες σε TGF-β1 και BMP-7, ενώ δεν παρατηρείται πολυμερισμός της ακτίνης μετά από έκθεσή τους για 1 ώρα τόσο σε TGF-β1 όσο και σε BMP-7 (Εικόνα 7Γ).

Α		MEF		В
	Treatmen	t	24 hours	
	-		0.80 ± 0.027	
Γ	TGF-β1		0.74 ± 0.017	
	BMP-7		0.67 ± 0.042	
г		DU145	_	
	Treatment	1 hour	24 hours	
		0.72	± 0.005	
	TGF-β1	$0.71 \pm 0.040$	$0.55 \pm 0.033$	
	BMP-7	0.70 ± 0.003	0.54 ± 0.023	

	MC	F-7		
Treatment	15	min	30 min	
	0.79 ± 0.019			
BMP-7	0.75 ±	0.045	0.74 ± 0.020	
Treatment		24 hours		
			24 110015	
		0	.79 ± 0.019	
- TGF-β1		0	.79 ± 0.019 .59 ± 0.016	

Εικόνα 7: Οι TGF-β1 και BMP-7 προκαλούν πολυμερισμό της ακτίνης σε (A) MEF ινοβλάστες, (B) MCF7 επιθηλιακά κύτταρα μαστού και (Γ) DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη. Τα κύτταρα προ-επωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού και επωάστηκαν στη συνέχεια με TGF-β1 και BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. Οι τιμές στους πίνακες αντιπροσωπεύουν τους μέσους όρους ± το τυπικό σφάλμα των λόγων T<sub>s</sub>/T<sub>Total</sub> τριών (B-15 και 30 λεπτά, Γ) ή τεσσάρων (A, B-24 ώρες) ανεξάρτητων πειραμάτων.



Εικόνα 8: Ο BMP-7 προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους NIH3T3 ινοβλάστες. Τα κύτταρα προ-επωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού και επωάστηκαν στη συνέχεια με BMP-7 για άλλες 24 ώρες. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε).

Μετά από 24 ώρες έκθεσης των ΝΙΗ3Τ3 ινοβλαστών σε BMP-7 παρατηρήθηκε μέσω μικροσκοπίας φθορισμού έντονος πολυμερισμός της ακτίνης (Εικόνα 8). Παρομοίως, μετά από 72 ώρες έκθεσης των αγρίου τύπου αλλά και των p21-/- MCF 10A επιθηλιακών κυττάρων μαστού με BMP-7 παρατηρείται μέσω μικροσκοπίας φθορισμού εμφανής πολυμερισμός της ακτίνης (Εικόνα 9). Τα p21-/- MCF 10A χρησιμοποιήθηκαν για να διερευνηθεί το κατά πόσο ο αναστολέας του κυτταρικού κύκλου p21 επηρεάζει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μιας και έχει αναφερθεί ότι η κυτταροπλασματική του μορφή αναστέλλει άμεσα την ROCK<sup>241, 242</sup> η οποία είναι ο άμεσος τελεστής της ενεργοποιημένης RhoA. Η έλλειψη αυτού του πιθανού αρνητικού ρυθμιστή ενός μονοπατιού που έχει σημαντικότατη επίδραση στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης αναμενόταν ότι ίσως οδηγήσει σε ένα πιο εκτεταμένο ή/και μεγαλύτερης διάρκειας πολυμερισμό της ακτίνης.



Εικόνα 9: Οι TGF-β1 και BMP-7 προκαλούν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα MCF 10Α επιθηλιακά κύτταρα μαστού αγρίου τύπου και p21-/-. Τα κύτταρα προ-επωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού και επωάστηκαν στη συνέχεια με TGF-β1 και BMP-7 για 72 ώρες. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με ροδαμίνηφαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε).

Μετά από έκθεση 72 ωρών των HaCaT κερατινοκυττάρων σε BMP-7 αλλά και TGF-β1 παρατηρήθηκε μέσω μικροσκοπίας φθορισμού εμφανής δημιουργία ινιδίων της ακτίνης η οποία αναστέλλεται με τη χρήση του GW6604 αναστολέα του υποδοχέα Alk5 του TGF-β1 (Εικόνα 10). Ενώ η αναστολή του πολυμερισμού της ακτίνης από τον TGF-β1 με τη χρήση αυτού του αναστολέα είναι αναμενόμενη, η αναστολή του πολυμερισμού της ακτίνης και από τον BMP-7 προκαλεί έκπληξη. Το γεγονός αυτό μας οδηγεί στην υπόθεση ότι το τελικό αποτέλεσμα της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού μετά από τη μακράς διάρκειας επώαση (72 ωρών) των κυττάρων με BMP-7 ίσως οφείλεται στη επαγωγή, έκφραση και έκκριση TGF-β από τα κύτταρα μιας και το γονίδιο του TGF-β είναι στόχος της σηματοδότησης του BMP. Η πιθανή αυτή έκκριση του TGF-β δύναται να δρα εκ νέου και να επηρεάζει τον τελικό φαινότυπο όσον αφορά την παρατηρούμενο πολυμερισμό της ακτίνης.



Εικόνα 10: Οι TGF-β1 και BMP-7 προκαλούν αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Τα κύτταρα προ-επωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού και επωάστηκαν στη συνέχεια με TGF-β1 και BMP-7 για 72 ώρες παρουσία ή όχι του GW6604 αναστολέα του Alk5 υποδοχέα του TGF-β. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε).

αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης συνήθως Η συνοδεύεται από την δημιουργία πλακών πρόσφυσης στην κυτταρική μεμβράνη. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε ο εντοπισμός της βινκουλίνης, ενός κεντρικού συστατικού των συμπλόκων των πλακών πρόσφυσης μέσω ανοσοφθορισμού παράλληλα με τον άμεσο φθορισμό της ακτίνης χρησιμοποιώντας τις ίδιες συνθήκες με αυτές της μελέτης της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε Swiss3T3 ινοβλάστες (Εικόνα 11). Πράγματι, επώαση των Swiss3T3 ινοβλαστών με BMP-7 για 24 και 48 ώρες προκαλεί συσσώρευση της βινκουλίνης στις πλάκες πρόσφυσης οι οποίες εντοπίζονται στα άκρα των ινιδίων του στρες, όπως συμβαίνει και με τον TGFβ1. Έτσι, από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η σηματοδότηση των BMP-7 και TGF-β1 έχουν παρόμοια αποτελέσματα όσον αφορά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες.



Εικόνα 11. Οι TGF-β1 και BMP-7 επηρεάζουν τον εντοπισμό της βινκουλίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Τα κύτταρα προ-επωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού και επωάστηκαν στη συνέχεια για 24 και 48 ώρες με TGF-β1 και BMP-7. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με αντίσωμα κατά της βινκουλίνης (πράσινο), ροδαμίνηφαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε). Παρατηρείται αυξημένη συσσώρευση βινκουλίνης στα άκρα των ινιδίων της ακτίνης τόσο μετά από 24 ώρες όσο και για 48 ώρες επώασης των ινοβλαστών με TGF-β1 και BMP-7.

## 6.2. Ο BMP-7 επάγει την κυτταρική μετανάστευση χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό και την απόπτωση.

Μία φυσιολογική δυναμικής συνέπεια της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε απόκριση αυξητικών παραγόντων είναι η κυτταρική μετανάστευση. Για το λόγο αυτό ελέγχθηκε η μετανάστευση Swiss3T3 ινοβλαστών χρησιμοποιώντας τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος (Εικόνα 12Α). Οι ινοβλάστες ελλείψει ορού μεταναστεύουν αργά για την επούλωση πληγής μέσα σε ένα χρονικό διάστημα 24 ωρών. Με την παράλληλη επώασή τους με BMP-7 παρατηρήθηκε σημαντικά αυξημένη όμως μεταναστευτικότητα όπως φαίνεται από τον βαθμό του κλεισίματος της ίδιας πληγής. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που συμβαίνει στις 24 ώρες επώασης των ίδιων ινοβλαστών με BMP-7.



**Εικόνα 12. Επιρροή του BMP-7 στη μετανάστευση και το πολλαπλασιασμό των Swiss3T3 ινοβλαστών και την απόπτωση των DU145 καρκινικών κυττάρων προστάτη.** (A) O BMP-7 επάγει τη μετανάστευση των Swiss3T3 ινοβλαστών. Σε μονοστιβάδα κυττάρων η οποία προεπωάστηκε 24 ώρες απουσία ορού δημιουργήθηκε τραύμα και επωάστηκε στη συνέχεια για 24 ώρες παρουσία ή όχι BMP-7. Οι μικροφωτογραφίες παρουσιάζουν την πρόοδο της μετανάστευσης των ινοβλαστών για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. Η παρουσία

BMP-7 εμφανώς προκαλεί μετανάστευση των Swiss3T3 ινοβλαστών και γρηγορότερη επούλωση του τραύματος. (B) Ο BMP-7 δεν επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό των Swiss3T3 ινοβλαστών. Swiss3T3 ινοβλάστες προ-επωάστηκαν για 24 ώρες απουσία ορού, επωάστηκαν στη συνέχεια με TGF-β1 και BMP-7 για 24 ώρες με την παράλληλη προσθήκη MTT για τις 4 τελευταίες ώρες και τέλος μετρήθηκε η χρωματική ένταση του ιζήματος. Ενώ, ο TGF-β1 επάγει τον πολλαπλασιασμό των Swiss3T3 ινοβλαστών, ο BMP-7 παρουσιάζει μία ελάχιστη επαγωγή του πολλαπλασιασμού μετά από 24 ώρες επώασης. Το γράφημα παρουσιάζει τους μέσους όρους ± το τυπικό σφάλμα της απορρόφησης έξι ανεξάρτητων πειραμάτων (\*\*, p<0.01). (Γ) Ο BMP-7 δεν επηρεάζει την απόπτωση των DU145 καρκινικών κυττάρων προστάτη. Τα κύτταρα επωάστηκαν με TGF-β1 και BMP-7 παρουσία ή όχι των αναστολέων Y-27632 (εξειδικευμένος αναστολέας της ROCK) και κυτοχαλασίνης (αναστολέας του πολυμερισμού της ακτίνης) για 24 ώρες. Το γράφημα παρουσιάζει τους μέσους όρους ± το τυπικό σφάλμα της απορρόφησης έξι ους φους του πολυμερισμού της ακτίνης για 24 ώρες. Το γράφημα παρουσιάζει τους μέσους όρους ± το τυπικό σφάλμα της απορρόφησης έξι τους μέσους όρους ± το τυπικό σφάλμα της απορρόφησης και με τος μέσους όρους ± το τυπικό σφάλμα της απορρόφησης δύο ανεξάρτητων πειραμάτων.

Οι δοκιμασίες επούλωσης πληγής πολλές φορές συνυπολογίζουν την ικανότητα των κυττάρων να μεταναστεύουν αλλά και να πολλαπλασιάζονται. Για αυτόν το λόγο μετρήθηκε η δυνατότητα του BMP-7 να επάγει κυτταρικό πολλαπλασιασμό κάτω από τις ίδιες ακριβώς συνθήκες (Εικόνα 12B). Ενώ ο TGF-β1, όπου εδώ χρησιμοποιήθηκε ως θετικό control, επάγει τον πολλαπλασιασμό των ινοβλαστών, ο BMP-7 δεν προκαλεί κάποια σημαντική αλλαγή στον πολλαπλασιασμό τους.

Συνυπολογίζοντας τα παραπάνω ευρήματα συμπεραίνεται ότι ο BMP-7 προκαλεί μία εκτεταμένη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες η οποία συσχετίζεται με την μετανάστευση αλλά όχι με τον πολλαπλασιασμό τους.

Σε κύτταρα προστάτη έχει αναφερθεί ότι η καταστολή της απόπτωσης η οποία προκαλείται από την ενεργοποίηση υποδοχέων ανδρογόνων ρυθμίζεται από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μέσω του μονοπατιού Rho/ROCK/actin<sup>248</sup> και από μία σειρά άλλων πρωτεϊνών που δρουν καθοδικά των υποδοχέων των ανδρογόνων<sup>249</sup>. Για να ελεγχθεί η πιθανότητα πρόκλησης απόπτωσης από τη σηματοδότηση του BMP-7 χρησιμοποιήθηκαν τα DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη σε μία δοκιμασία απόπτωσης παράλληλα με TGF-β1 παρουσία ή όχι των αναστολέων Υ-27632 (εξειδικευμένος αναστολέας της ROCK) και κυτοχαλασίνης (αναστολέας του πολυμερισμού της ακτίνης). Τόσο ο BMP-7 όσο και ο TGF-β1 ανεξάρτητα από την παρουσία ή όχι των αναστολέων δεν επάγουν απόπτωση στα DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη (Εικόνα 12Γ).

## 6.3. Ο BMP-7 επάγει τη σηματοδότηση των Smad1, MAPK και Rho GTΡασών και την έκφραση του *RhoB* γονιδίου.

Για να ερευνηθεί ο μηχανισμός με τον οποίο ο BMP-7 επιδρά στο κυτταροσκελετό της ακτίνης, μελετήθηκαν μία σειρά από γνωστές πρωτεΐνες οι οποίες ενεργοποιούνται από τον υποδοχέα του BMP. Αρχικά αναλύθηκε η Smad1, μία από τις Smads οι οποίες ενεργοποιούνται από τη σηματοδότηση του υποδοχέα του BMP και οι MAPK (mitogen activated protein kinases) p38 και Erk1/2, οι οποίες είναι επίσης γνωστοί αποδέκτες της σηματοδότησης καθοδικά των υποδοχέων του BMP<sup>250</sup>. Επιπροσθέτως, μελετήθηκε και η επίδραση του BMP-7 στην ενεργοποίηση των μικρών GTPασών Rho, μιας και αυτές οι πρωτεΐνες είναι οι κύριου ρυθμιστές της δυναμικής αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε διάφορα κυτταρικά συστήματα<sup>41, 251</sup>.

Κατά τις 4 πρώτες ώρες μετά την επώαση Swiss3T3 ινοβλαστών με BMP-7 παρατηρήθηκε άμεση, ισχυρή και παρατεταμένη ενεργοποίηση της Smad1, μέσω της φωσφορυλίωσής της (Εικόνα 13Α). Το αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευσή της, αναγνωρίζει την φωσφορυλίωση δύο καρβοξυ-τελικών καταλοίπων σερίνης της Smad1 τα οποία φωσφορυλιώνονται απευθείας από τον υποδοχέα τύπου Ι του BMP, και παρατίθεται ως άμεση ένδειξη της σηματοδότησης του υποδοχέα. Το μέγιστο επίπεδο φωσφορυλίωσης παρατηρήθηκε ήδη από τα 15 πρώτα λεπτά επώασης με τον BMP-7, ενώ δεν επηρεάζονται τα επίπεδα της ολικής ποσότητας της Smad1 σε αυτά τα χρονικά διαστήματα. Παράλληλα, επιβεβαιώθηκε και η ενεργοποίηση της Smad1 στα HaCaT κερατινοκύτταρα μία ώρα μετά την επίδραση του BMP-7 σε αυτά.

Ο BMP-7 επίσης επάγει τη φωσφορυλίωση της p38 MAPK με κορύφωση 1 ώρα μετά την επώαση. Αντίθετα, παρόλη την 24ωρη έλλειψη ορού των ινοβλαστών παρουσιάζονται αυξημένα επίπεδα φωσφορυλίωσης της Erk1/2 MAPK σε κανονικές συνθήκες. Ο BMP-7 προκαλεί μείωση της φωσφορυλίωσης της Erk1/2 μία ώρα μετά την επώαση των κυττάρων με BMP-7, ενώ τα επίπεδα της ολικής πρωτεΐνης παραμένουν σταθερά (Εικόνα 13Α). Από τα παραπάνω συμπεραίνεται ότι η επίδραση του BMP-7 στο κυτταροσκελετό της ακτίνης μπορεί να συσχετίζεται με την ενεργοποίηση της Smad1 και πιθανόν με την ενεργοποίηση της p38 MAPK και την απενεργοποίηση της Erk1/2 MAPK στους Swiss3T3 ινοβλάστες.



Εικόνα 13. Σηματοδοτικά μονοπάτια που επηρεάζονται από τον BMP-7 στους Swiss3T3 ινοβλάστες και στα HaCaT κερατινοκύτταρα. (A) Ο BMP-7 επηρεάζει την φωσφορυλίωση των Smad1 και των p38 και Erk1/2 MAPK. Αντιπροσωπευτικές ανοσοαποτυπώσεις δείχνουν την έκταση της φωσφορυλίωσης των Smad1, p38 και Erk1/2 μετά από επώαση ή όχι Swiss3T3 ινοβλαστών και HaCaT κερατινοκυττάρων, προ-επωασμένων απουσία ορού για 24 ώρες, με BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. (B) Ο BMP-7 επάγει την ενεργοποίηση των RhoA και RhoB και την απενεργοποίηση της Cdc42. Αντιπροσωπευτικές ανοσοαποτυπώσεις δείχνουν την έκταση της φόρτισης με GTP των RhoA, RhoB και Cdc42, προσδιορισμένη μέσω GST ανοσοκατακρήμνισης μετά από επώαση ή όχι Swiss3T3 ινοβλαστών, προ-επωασμένων απουσία ορού για 24 ώρες, με BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. Επώαση των ινοβλαστών για 15 λεπτά με BMP-7 προκαλεί φόρτιση της RhoA με GTP. Το εντονότερο σημείο φόρτισης παρατηρείται μετά από 1 ώρα επώασης με BMP-7 για τη RhoA και στις 2 και 4 ώρες για τη RhoB. Κατά τα 15 και 30 λεπτά επώασης των ινοβλαστών με BMP-7 παρατηρείται αποφόρτιση της Cdc42. Οι τιμές μεταξύ των ανοσοαποτυπώσεων δείχνουν ποσοτικοποιημένη την αλλαγή φωτεινότητας των ζωνών των φορτισμένων GTPασών κανονικοποιημένες προς αυτές των αντίστοιχων ζωνών των ολικών πρωτεϊνών.

Παράλληλα με τις Smad1 και p38, ο BMP-7 οδηγεί στην γρήγορη και αρκετά ισχυρή ενεργοποίηση των RhoA και RhoB στους Swiss3T3 ινοβλάστες (Εικόνα 13B). Η ενεργοποίηση της RhoA γίνεται εμφανής από τα πρώτα 15 λεπτά της επώασης των ινοβλαστών με BMP-7, αυξάνεται σταδιακά μέχρι την 1η ώρα και στη συνέχεια μειώνεται. Από την άλλη, η RhoB παραμένει σχεδόν ανεπηρέαστη σε αυτά τα αρχικά χρονικά διαστήματα και ενεργοποίησή της εμφανίζεται 2 και 4 ώρες μετά την επώαση των κυττάρων με BMP-7. Αντίθετα, η Cdc42 παρουσιάζει υψηλά επίπεδα φόρτισης με GTP σε κανονικές συνθήκες χωρίς επώαση τα οποία ελαττώνονται άμεσα με την επίδραση του BMP-7.

Στη συνέχεια ελέγχθηκε η δυνατότητα του BMP-7 να επηρεάζει την έκφραση των *RhoA* και *RhoB* mRNA στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Πράγματι, μέσω RT-PCR παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του *RhoB* mRNA μετά από 1 έως και 4 ώρες επώασης των ινοβλαστών με BMP-7 (Εικόνα 14A,B). Αντιθέτως, η έκφραση του γονιδίου της RhoA παραμένει ανεπηρέαστη κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Τέλος, παρατηρήθηκε εκτεταμένη έκφραση ενός γνωστού γονιδίου στόχου της σηματοδότησης του BMP, αυτό της ανασταλτικής Smad6 (Εικόνα 14Γ,Δ).



Εικόνα 14: Ο BMP-7 επάγει την έκφραση των *RhoB* και *Smad6* γονιδίων στους Swiss3T3 ινοβλάστες. (Α,Γ) Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα RT-PCR δείχνουν τα επίπεδα των *RhoA*, *RhoB* και *Smad6* mRNA μετά από επώαση ή όχι Swiss3T3 ινοβλαστών, προ-επωασμένων απουσία ορού για 24 ώρες, με BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. (Β,Δ) Η

φωτεινότητα της κάθε ζώνης cDNA κανονικοποιήθηκε προς αυτή της αντίστοιχης ζώνης του *GAPDH* cDNA και παρουσιάζεται στα γραφήματα ως μέσος όρος ± το τυπικό σφάλμα των *RhoA*, *RhoB* και *Smad6* που εκφράστηκαν σε τρία ανεξάρτητα πειράματα. (\*, p<0.05 and \*\*, p<0.01). Παρόλο που ο BMP-7 δεν προκαλεί κάποια σημαντική αλλαγή στα επίπεδα του *RhoA* mRNA, επάγει αύξηση των επιπέδων των *RhoB* (1-4 ώρες επώασης) και *Smad6* (1-24 ώρες επώασης) mRNA.

Με την ίδια λογική ελέγχθηκε η δυνατότητα του BMP-7 να επηρεάζει την έκφραση των *RhoA* και *RhoB* mRNA στα HaCaT κερατινοκύτταρα. Πράγματι, και σε αυτό το κυτταρικό σύστημα μέσω RT-PCR παρατηρήθηκε αύξηση των επιπέδων του *RhoB* mRNA μετά από 1 έως και 6 ώρες επώασης των κερατινοκυττάρων με BMP-7 (Εικόνα 15Α,Β). Αντιθέτως, η έκφραση του γονιδίου της RhoA παραμένει ανεπηρέαστη κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Τέλος, παρατηρήθηκε εκτεταμένη έκφραση της Smad6 με κορύφωση αυτή τη φορά μετά από 2 ώρες επώασης των κερατινοκυττάρων με BMP-7 και σταδιακή μείωση στη συνέχεια (Εικόνα 15Γ,Δ).



Εικόνα 15: Ο BMP-7 επάγει την έκφραση των *RhoB* και *Smad6* γονιδίων στα HaCaT κερατινοκύτταρα. (Α,Γ) Αντιπροσωπευτικά αποτελέσματα RT-PCR δείχνουν τα επίπεδα των *RhoA*, *RhoB* και *Smad6* mRNA μετά από επώαση ή όχι HaCaT κερατινοκυττάρων, προεπωασμένων απουσία ορού για 24 ώρες, με BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. (Β,Δ) Η φωτεινότητα της κάθε ζώνης cDNA κανονικοποιήθηκε προς αυτή της

αντίστοιχης ζώνης του *GAPDH* cDNA και παρουσιάζεται στα γραφήματα ως μέσος όρος ± το τυπικό σφάλμα των *RhoA*, *RhoB* και *Smad6* που εκφράστηκαν σε δύο ανεξάρτητα πειράματα. (\*, p<0.05 and \*\*, p<0.01). Παρόλο που ο BMP-7 δεν προκαλεί κάποια σημαντική αλλαγή στα επίπεδα του *RhoA* mRNA, επάγει αύξηση των επιπέδων των *RhoB* (1-6 ώρες επώασης) και *Smad6* (1-6 ώρες επώασης) mRNA.

Συμπερασματικά, ο BMP-7 επάγει τα σηματοδοτικά μονοπάτια των Smad1 και p38 MAPK. Επιπλέον, επάγει τη φόρτιση της RhoA με GTP, πράγμα το οποίο δεν πραγματοποιείται μέσω μεταγραφικού μηχανισμού που οφείλεται στο μονοπάτι των Smad. Πιθανόν, αυτή η πρωταρχική ενεργοποίηση της RhoA από τον BMP-7 να ελέγχει τα αντίστοιχα αρχικά χρονικά στάδια της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Ταυτόχρονα, η μεταγραφική ενεργοποίηση του *RhoB* γονιδίου και η επακόλουθη ενεργοποίηση της RhoB ίσως να ελέγχει τα μεταγενέστερα χρονικά στάδια της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Τα ευρήματα της εικόνας 9Α ενισχύουν το προφίλ ενεργοποίησης των RhoA και RhoB της εικόνας 8B.

### 6.4. Η ROCK1 κινάση εμπλέκεται στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης η οποία προκαλείται από BMP-7.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, ο BMP-7 προκαλεί άμεση ενεργοποίηση της RhoA, η οποία στη συνέχεια πιθανόν έχει ως λειτουργικό αποτέλεσμα τον πολυμερισμό της ακτίνης Ο άμεσος γνωστός αποδέκτης της ενεργοποιημένης RhoA είναι η ROCK1 κινάση<sup>251</sup>. Έτσι, παρεμβαίνοντας στην ενεργοποίηση της ROCK1 κινάσης αναμένεται να ανασταλεί η εν λόγω επαγωγή του πολυμερισμού της ακτίνης.

Πράγματι, συν-επώαση των ινοβλαστών με BMP-7 και Y-27632 (εξειδικευμένος αναστολέας της ROCK1) αναστέλλει πλήρως τη δημιουργία κεντρικών ινιδίων ακτίνης (Εικόνα 16Α), ενώ τα περιφερειακά ινίδια ακτίνης που εντοπίζονται στην εσωτερική πλευρά της μεμβράνης παραμένουν ανεπηρέαστα, πράγμα το οποίο είναι σε συμφωνία με προηγούμενες αναφορές για τη δράση του ίδιου αναστολέα σε ανθρώπινους ινοβλάστες ακροβυστίας FS-133<sup>252</sup>. Η επίδραση του αναστολέα Y-27632 επιβεβαιώθηκε και με την ποσοτική μέτρηση διαλυτών και αδιάλυτων κλασμάτων της ακτίνης κάτω από τις ίδιες συνθήκες (Εικόνα 16Β). Οι παραπάνω παρατηρήσεις για τη δράση του αναστολέα Υ-27632 στη σηματοδότηση του BMP-7 με αποδέκτη τον κυτταροσκελετό της ακτίνης συνάδουν με τη δράση του ίδιου αναστολέα στην ανάλογη σηματοδότηση του TGF-β1<sup>247</sup>.



Εικόνα 16: Ο αναστολέας Υ-27632 αναστέλλει την επαγόμενη από τον BMP-7 αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης στους Swiss3T3 ινοβλάστες. (A) Τα κύτταρα προ-επωάστηκαν για 24 ώρες απουσία ορού και στη συνέχεια επωάστηκαν αρχικά με τον αναστολέα Υ-27632 για 45 λεπτά και με BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με ροδαμίνηφαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε). (B) Στο γράφημα αντιπροσωπεύονται οι μέσοι όροι ± το τυπικό σφάλμα των λόγων  $T_s/T_{Total}$  τριών ανεξάρτητων πειραμάτων για την 24ωρη επώαση των ινοβλαστών με BMP-7 (\*, p<0.05 and \*\*, p<0.01). (Γ) Ο αναστολέας Υ-27632 επηρεάζει την επαγόμενη από τον BMP-7 μετανάστευση των Swiss3T3 ινοβλαστών. Σε μονοστιβάδες κυττάρων οι οποίες προ-επωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού, δημιουργήθηκε τραύμα και στη συνέχεια επωάστηκαν αρχικά με τον αναστολέα Υ-27632 ή όχι για 45 λεπτά και ακολούθως για 24 ώρες παρουσία ή όχι BMP-7. Οι μικροφωτογραφίες παρουσιάζουν την πρόοδο της μετανάστευσης των ινοβλαστών για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. Η παρουσία του αναστολέα Υ-27632 προκαλεί μείωση της πυκνότητας των ινοβλαστών σε μετανάστευση εντός της περιοχής του τραύματος.

Η παρουσία του αναστολέα Y-27632 παράλληλα αναστέλλει και τη μετανάστευση των Swiss3T3 ινοβλαστών η οποία προκαλείται από τον BMP-7 κατά τη δοκιμασία επούλωσης τραύματος κάτω από τις ίδιες συνθήκες οι οποίες περιγράφθηκαν στην εικόνα 7Α (Εικόνα 16Γ). Παρουσία του αναστολέα Y-27632 παρατηρείται μία εμφανώς μειωμένη πυκνότητα μεταναστευόντων ινοβλαστών εντός της περιοχής του τραύματος. Έτσι, φαίνεται ότι η δράση της ROCK1 κινάσης είναι καθοριστική για τη σηματοδότηση που έχει ως αποδέκτη τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, γεγονός το οποίο μπορεί να μεταφραστεί περαιτέρω και στην ικανότητα των ινοβλαστών να μεταναστεύουν.

Για να ελεγχθεί αν ο αναστολέας της ROCK1 κινάσης διαταράσσει τη σηματοδότηση του υποδοχέα του BMP προς τις Smad1, p38 και Erk1/2 επαναλήφθηκαν τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης που περιγράφηκαν στην εικόνα 8Α κάτω από τις ίδιες συνθήκες παρουσία ή όχι του αναστολέα Y-27632 (Εικόνα 17). Έτσι, συν-επώαση των ινοβλαστών με Y-27632 και BMP-7 δεν εμφάνισε καμία μετρήσιμη επίπτωση στο προφίλ της κινητικής της φωσφορυλίωσης των Smad1, p38 και Erk1/2 όπως και αναμενόταν. Εν κατακλείδι, φαίνεται ότι ο αναστολέας Y-27632 δρα καθοδικά των Smad1, p38 και Erk1/2, επηρεάζοντας πιθανώς μόνο τη δραστικότητα της ROCK1 κινάσης.



Εικόνα 17. Οι αναστολείς Y-27632 της ROCK και ML-7 της MLCK δεν επηρεάζουν το προφίλ της κινητικής της φωσφορυλίωσης των Smad1, p38 και Erk1/2 που οφείλεται στον BMP-7 στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Αντιπροσωπευτικές ανοσοαποτυπώσεις δείχνουν ότι τα προφίλ της κινητικής της φωσφορυλίωσης των Smad1, p38 και Erk1/2 μετά από επώαση ή όχι Swiss3T3 ινοβλαστών, προ-επωασμένων απουσία ορού για 24 ώρες, αρχικά με τους αναστολείς Y-27632 και ML-7 για 45 λεπτά και στη συνέχεια με BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται δεν εμφανίζουν καμία αλλαγή.

# 6.5. Ο BMP-7 προκαλεί άμεση και παρατεταμένη φωσφορυλίωση της ελαφριάς αλυσίδας της μυοσίνης (MLC).

Η σηματοδότηση της ROCK1 μπορεί να κατευθυνθεί προς διάφορες κινάσες συμπεριλαμβανομένων μελών των οικογενειών των ΡΑΚ και LIMK και περαιτέρω σε υποστρώματα όπως η κοφιλίνη και η MLC<sup>253-258</sup>. Για να διαχωρισθούν αυτά τα σηματοδοτικά μονοπάτια μεταξύ τους χρησιμοποιήθηκε ο αναστολέας Y-27632 της ROCK1 και θεωρήθηκε ότι ο BMP-7 δρα μέσω αυτής της κινάσης. Αρχικά, γνωρίζοντας ότι η LIMK διαδραματίζει βασικό ρόλο στη σηματοδότηση του BMP σε νευρώνες, νεφρικά κύτταρα και μυοβλάστες<sup>237, 259,</sup> <sup>260</sup>, ελέγχθηκε η ενεργοποίηση της LIMK1. Μέσω μιας in vitro δοκιμασίας αυτοφωσφορυλίωσης της ενδογενούς LIMK1 με ραδιενεργό ATP και ανοσοκατακρήμνισής της από Swiss3T3 ινοβλάστες που έχουν επωαστεί με BMP-7 φαίνεται ότι ο BMP-7 προκαλεί σημαντική αύξηση της φωσφορυλίωσης της LIMK1 (Εικόνα 18Α). Παραδόξως, συν-επώαση των ινοβλαστών με τον αναστολέα Y-27632 προκάλεσε αύξηση της φωσφορυλίωσης της LIMK1 στα επωασμένα και μη κύτταρα με BMP-7. Η φωσφορυλίωση της LIMK στα Swiss3T3 κύτταρα που οφείλεται στον BMP-7 επάγεται άμεσα και παραμένει μέχρι και 3 ώρες μετά την αρχική επώαση (Εικόνα 18Β), γεγονός το οποίο συμβαδίζει με τις παρατηρήσεις σε άλλα κυτταρικά συστήματα<sup>237, 259, 260</sup>. Ωστόσο, το γεγονός ότι ο αναστολέας Υ-27632 δεν αναστέλλει αλλά μάλλον ενισχύει την ενεργοποίηση της LIMK1 κατά της σηματοδότηση του BMP-7 υποδηλώνει ότι η LIMK1 ίσως δεν είναι ο κύριος ρυθμιστής ο οποίος επιδρά στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης.



Εικόνα 18. Ο BMP-7 επάγει άμεση και παρατεταμένη φωσφορυλίωση των LIMK1 και MLC στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Ο αναστολέας της ROCK, Y-27632 προκαλεί αναστολή της φωσφορυλίωσης της MLC και παραδόξως, επαγωγή της φωσφορυλίωσης της LIMK1 που προκαλείται από BMP-7. Αντιπροσωπευτικά πειράματα αυτοραδιογραφίας (Α: [<sup>32</sup>P]-γΑΤΡ in vitro δοκιμασία αυτοφωσφορυλίωσης) και ανοσοαποτύπωσης (Β-Δ) με εξειδικευμένα αντισώματα για τις φωσφο-LIMK1/2 (T508/505) και φωσφο-MLC (S19) δείχνουν το βαθμό της φωσφορυλίωσης των LIMK1 και MLC μετά από επώαση ή όχι Swiss3T3 ινοβλαστών, προεπωασμένων απουσία ορού για 24 ώρες, με BMP-7 (Δ: παρουσία του αναστολέα Υ-27632) για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. Οι τιμές μεταξύ των ανοσοαποτυπώσεων δείχνουν ποσοτικοποιημένη την αλλαγή φωτεινότητας των ζωνών των φωσφορυλιωμένων LIMK1 και MLC κανονικοποιημένες προς αυτές των αντίστοιχων ζωνών της ακτίνης. (Ε) Ο αναστολέας της MLCK, ML-7 αναστέλλει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από BMP-7 μετά από 24 ώρες στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Τα κύτταρα προεπωάστηκαν 24 ώρες απουσία ορού και στη συνέχεια επωάστηκαν αρχικά με τον αναστολέα ML-7 για 45 λεπτά και με BMP-7 για τα χρονικά διαστήματα που υποδεικνύονται. Ακολούθως μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI ( $\mu\pi\lambda\epsilon$ ).

Στη συνέχεια, ελέγχθηκε η ενεργοποίηση της MLC, η οποία διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο κατά την αναδιοργάνωση του συμπλόκου της ακτινομυοσίνης με άμεσο αντίκτυπο στην κινητικότητα των κυττάρων<sup>258</sup>. Πράγματι, ο BMP-7 επάγει στους Swiss3T3 ινοβλάστες άμεση φωσφορυλίωση της MLC στο κατάλοιπο Ser19 η οποία διαρκεί έως και 4 ώρες μετά την επώαση (Εικόνα 18Γ), ενώ η συν-επώαση BMP-7 και Y-27632 έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση αυτής της φωσφορυλίωσης (Εικόνα 18Δ). Έτσι, συμπεραίνεται ότι η σηματοδότηση του RhoA/ROCK1/MLC μονοπατιού είναι σημαντική για την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από BMP-7 στους Swiss3T3 ινοβλάστες.

## 6.6. Η φωσφορυλίωση της MLC παίζει βασικό ρόλο κατά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από BMP-7.

Για να αξιολογηθεί ο λειτουργικός ρόλος της φωσφορυλίωσης της MLC η οποία επάγεται από τον BMP-7 πραγματοποιήθηκε αναστολή της MLC κινάσης (MLCK) η οποία φωσφορυλιώνει άμεσα την MLC και αποσιώπηση της MLC χρησιμοποιώντας siRNA. Συν-επώαση Swiss3T3 ινοβλαστών με BMP-7 και τον εξειδικευμένο αναστολέα της MLCK, ML-7 δεν προκαλεί κάποια αλλαγή στο φαινότυπο της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τα πρώτα λεπτά της επώασής τους μέχρι και 2 ώρες αργότερα. Αντιθέτως, ο ML-7 αναστέλλει εμφανώς την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που επάγεται μετά από 24ωρη επώαση των ινοβλαστών με BMP-7 (Εικόνα 18Ε).

Κατά ανάλογο τρόπο με αυτόν που χρησιμοποιήθηκε για τον αναστολέα Y-27632, και προκειμένου να ελεγχθεί αν ο αναστολέας της MLC κινάσης διαταράσσει τη σηματοδότηση του υποδοχέα του BMP προς τις Smad1, p38 και Erk1/2 επαναλήφθηκαν τα πειράματα ανοσοαποτύπωσης που περιγράφηκαν στην εικόνα 13Α κάτω από τις ίδιες συνθήκες παρουσία ή όχι του αναστολέα ML-7 (Εικόνα 17). Έτσι, συν-επώαση των ινοβλαστών με ML-7 και BMP-7 δεν εμφάνισε καμία μετρήσιμη επίπτωση στο προφίλ της κινητικής της φωσφορυλίωσης των Smad1, p38 και Erk1/2 όπως και αναμενόταν. Έτσι, φαίνεται ότι και ο αναστολέας ML-7 δρα καθοδικά των Smad1, p38 και Erk1/2, επηρεάζοντας πιθανώς μόνο τη δραστικότητα της MLC κινάσης.

Με την ίδια λογική, αποσιωπώντας την ενδογενή MLC στους NIH3T3 ινοβλάστες, οι οποίοι προ-επωάστηκαν απουσία ορού για 24 ώρες, μέσω
εξειδικευμένου για την MLC siRNA, κατεστάλη η δυνατότητα του BMP-7 να επάγει αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μετά από 24ωρη επώαση (Εικόνα 19Α). Στις κανονικές συνθήκες το ίδιο siRNA για την MLC δεν επηρεάζει τη βιωσιμότητα των κυττάρων και το φαινότυπο του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Η αποδοτικότητα της αποσιώπησης της ενδογενούς MLC στους NIH3T3 ινοβλάστες ήταν μεγαλύτερη από 85% (Εικόνα 19B), ενώ όταν η ίδια μεθοδολογία αποσιώπησης εφαρμόστηκε στους Swiss3T3 ινοβλάστες η αποδοτικότητα δεν ξεπέρασε το 20 με 30% και για αυτό το λόγο προτιμήθηκαν οι NIH3T3 ινοβλάστες για το πείραμα της αποσιώπησης.



Εικόνα 19. Αποσιώπηση της ενδογενούς MLC αναστέλλει την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που επάγεται από BMP-7 στους NIH3T3 ινοβλάστες. (A) NIH3T3 ινοβλάστες επιμολύνθηκαν ή όχι με εξειδικευμένο για την MLC siRNA ή αρνητικό control (siControl) για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με BMP-7 ή όχι για άλλες 24 ώρες. Ακολούθως τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε). (B) Αντιπροσωπευτικές ανοσοαποτυπώσεις από πείραμα αποσιώπησης της MLC κάτω από τις ίδιες συνθήκες, παρουσιάζοντας τις ολικές ποσότητες MLC και ακτίνης.

Συνδυαστικά, τα πειράματα αναστολής της MLCK και της αποσιώπησης της MLC υποδεικνύουν ότι η ρύθμιση της λειτουργίας της MLC είναι ένας κρίσιμος στόχος κατά την επίδραση του BMP-7 στον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

## 6.7. Ρόλος της Smurf1 λιγάσης ουβικυτίνης κατά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που επάγεται από BMP-7.

Η δράση της λιγάσης E3 της ουβικυτίνης, Smurf1, έχει συνδεθεί με τη λειτουργία των Smad, των υποδοχέων των TGF-β και BMP, των μικρών GTPασών της οικογένειας Rho και κατ' επέκταση με τη δυναμική οργάνωση της ακτίνης. Συγκεκριμένα, η Smurf1 ουβικυτιλιώνει τις παραπάνω πρωτεΐνες και τις οδηγεί στα πρωτεοσώματα για αποικοδόμηση<sup>135, 244, 245</sup>. Έτσι, αποσιώπηση αυτού του αρνητικού ρυθμιστή μιας πλειάδας πρωτεϊνών που έχουν σημαντικότατη επίδραση στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης αναμενόταν ότι ίσως οδηγήσει σε έναν πιο εκτεταμένο ή/και μεγαλύτερης διάρκειας πολυμερισμό της ακτίνης. Ελέγχθηκε η αποδοτικότητα της αποσιώπησης της ενδογενούς Smurf1 στα HaCaT κερατινοκύτταρα κάτω από διάφορες συνθήκες (Εικόνα 20Α) και επιλέχθηκε η πιο ικανοποιητική (Πρωτόκολλο της Dharmacon, ολιγονουκλεοτίδιο της Dharmacon, τελική συγκέντρωση 5nM). Παρόλο, το γεγονός ότι στις ανοσοαποτυπώσεις το αντίσωμα της Smurf1 λειτουργεί σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό, δεν παρουσιάζει αντίστοιχο αποτέλεσμα κατά τη διάρκεια ανοσοφθορισμού κάτω από τις ίδιες πειραματικές συνθήκες ώστε να αξιολογηθεί η επίδρασή του στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που επάγεται από BMP-7 (Εικόνα 20B).



Εικόνα 20. Αποσιώπηση της ενδογενούς Smurf1 στα HaCaT κερατινοκύτταρα. (Α) HaCaT κερατινοκύτταρα επιμολύνθηκαν ή όχι με εξειδικευμένο για την Smurf1 siRNA ή αρνητικό control (siControl) χρησιμοποιώντας διάφορους συνδυασμούς πρωτοκόλλων, ολιγονουκλεοτιδίων και τελικών συγκεντρώσεων (SilentFect: πρωτόκολλο Dharmacon, HiPerFect: πρωτόκολλο Qiagen, D: ολιγονουκλεοτίδιο Dharmacon, Q: ολιγονουκλεοτίδιο Qiagen) για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με BMP-7 ή όχι για άλλες 24 ώρες. Αντιπροσωπευτικές ανοσοαποτυπώσεις δείχνουν την αποτελεσματικότητα της αποσιώπησης της Smurf1 στους διαφορετικούς συνδυασμούς συνθηκών και τα επίπεδα της α-τουμπουλίνης να παραμένουν ανεπηρέαστα. (Β) Κατά τον ίδιο τρόπο HaCaT κερατινοκύτταρα επιμολύνθηκαν ή όχι με εξειδικευμένο για την Smurf1 siRNA ή αρνητικό control (siControl) για 24 ώρες, προ-επωάστηκαν απουσία ορού για 24 ώρες και στη συνέχεια επωάστηκαν με BMP-7 ή όχι για άλλες 24 ώρες. Ακολούθως τα κύτταρα μονιμοποιήθηκαν και πραγματοποιήθηκε επισήμανση με το αντίσωμα κατά της Smurf1 (πράσινο), ροδαμίνη-φαλοϊδίνη (κόκκινο) και DAPI (μπλε).

<u>7. Συζήτηση</u>

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβή δείχνουν ότι ένα μέλος της οικογένειας του TGF-β, ο BMP-7, ενεργοποιεί ένα νέο σηματοδοτικό μονοπάτι το οποίο επιδρά στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης. Αυτό το μονοπάτι έχει κοινά χαρακτηριστικά με το αντίστοιχο που έχει περιγραφεί από το εργαστήριό μας για τον TGF-β1 στους Swiss3T3 ινοβλάστες<sup>261</sup>. Όμως διαπιστώνονται παράλληλα σημαντικές διαφορές στη δράση του BMP-7 σε σχέση με αυτή του TGF-β. Έτσι, συνδυάζοντας τη δράση εξειδικευμένων αναστολέων κινασών και δοκιμασιών οι οποίες μετρούν το επίπεδο φωσφορυλίωσης κινασών και υποστρωμάτων, προτείνεται ότι ο BMP-7 επάγει τη σηματοδότησή του μέσω των Rho GTPασών και της ROCK1 κινάσης στοχεύοντας τελικά στη ρυθμιστική υπομονάδα της μυοσίνης (MLC) επηρεάζοντας κατά αυτό τον τρόπο την λειτουργία του συμπλόκου της ακτινομυοσίνης. Η ενεργοποίηση λοιπόν του σηματοδοτικού μονοπατιού αναδιοργάνωση Rho/ROCK/MLC οδηγεί στην παρατηρούμενη του κυτταροσκελετού της ακτίνης.

Η επιρροή της σηματοδότησης των υποδοχέων του BMP στη δυναμική οργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης έχει αναφερθεί πολλάκις<sup>237, 259, 260</sup>. Έτσι, αρχικά επιβεβαιώθηκε η δράση του BMP-7 αλλά και του TGF-β1 στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης σε ινοβλάστες ποντικού (Swiss3T3 - Εικόνα 6, MEF - Εικόνα 7Α και ΝΙΗ3T3 - Εικόνα 8), ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα μαστού (MCF7 – Εικόνα 7Β και MCF 10Α αγρίου τύπου καθώς και p21 null - Εικόνα 9), επιδερμίδας (κερατινοκύτταρα HaCaT - Εικόνα 10) και καρκινικά κύτταρα προστάτη (DU145 - Εικόνα 7Γ). Κοινός παρονομαστής σε όλες τις κυτταρικές σειρές είναι ο παρατηρούμενος πολυμερισμός της ακτίνης μετά από 24 ή 72 ώρες επώασης με BMP-7, ο οποίος τεκμηριώνεται είτε μέσω μικροσκοπίας άμεσου φθορισμού (Εικόνες 6, 8, 9, 10) είτε μέσω της βιοχημικής μέτρησης των διαλυτών (μονομερής ακτίνη) και αδιάλυτων (πολυμερής ακτίνη) κλασμάτων της ακτίνης (Εικόνες 6, 7). Στη συνέχεια παρατηρήθηκε η ικανότητα αυτών των αυξητικών παραγόντων να προκαλούν συσσώρευση βινκουλίνης στις πλάκες πρόσφυσης στους Swiss3T3 ινοβλάστες (Εικόνα 11). Πράγματι, ο BMP-7 αλλά και ο TGF-β1 προκαλούν συσσώρευση βινκουλίνης στις πλάκες πρόσφυσης, δείχνοντας τη γενικότερη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που συμβαίνει πέραν του

πολυμερισμού. Έτσι οι Swiss3T3 ινοβλάστες κατέσθησαν υποσχόμενο εργαλείο για την περαιτέρω μελέτη της σηματοδότησης του BMP-7 προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης.

Στις παραπάνω αναφορές η LIMK1 είναι ένας κοινός ενδιάμεσος σηματοδοτικός ρυθμιστής, φωσφορυλιώνοντας άμεσα την κοφιλίνη με αποτέλεσμα να ελέγχει τον πολυμερισμό της ακτίνης. Μολονότι μετρήθηκε ενεργοποίηση της LIMK1 μετά από έκθεση Swiss3T3 ινοβλαστών σε BMP-7 (Εικόνα 18Α, Β), η χρήση του αναστολέα της ROCK1 ο οποίος κατά τα άλλα αναστέλλει την επίδραση του BMP-7 στο σύμπλοκο της ακτινομυοσίνης και στην κινητικότητα των κυττάρων (Εικόνα 16), ενίσχυσε κατά παράδοξο τρόπο την ενεργοποίηση της LIMK1 (Εικόνα 18Α). Αυτό το αποτέλεσμα οδήγησε στον αποκλεισμό της LIMK1 ως ρυθμιστή της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από BMP-7 στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Παρόλο το γεγονός ότι η LIMK1 έχει καθιερωθεί ως ενδιάμεσος ρυθμιστής της σηματοδότησης των BMP-2 και BMP-7 σε νευρώνες, νεφρικά επιθηλιακά κύτταρα και μυοβλάστες<sup>237, 259, 260</sup>, καμία από τις παραπάνω αναφορές δεν τεκμηρίωσε ένα λειτουργικό ρόλο στη LIMK1 όσον αφορά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης αυτή καθαυτή. Καθοριστική έχει αναφερθεί ότι είναι η LIMK1 κατά τη δενδριτογένεση σε καλλιέργει $\alpha^{259}$ , ενώ in vivo μελέτες σε Xenopus παρουσιάζουν ότι η LIMK1 είναι σημαντική για τη δημιουργία του άξονα και όχι για τη δενδριτογένεση<sup>262</sup>, δείχνοντας έτσι την πολυπλοκότητα της λειτουργίας που μπορεί να έχει μία και μόνο πρωτεΐνη, όπως η LIMK1 σε διαφορετικά κυτταρικά συστήματα. Η μόνη αναφορά μέλους της οικογένειας των LIMK το οποίο δρα καθοδικά των TGF-β και BMP και επιδρά άμεσα στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης είναι αυτή της LIMK2 η οποία δρα καθοδικά του TGF-β<sup>261</sup>. Έτσι, ο ακριβής ρόλος της LIMK1 καθοδικά των υποδοχέων του BMP που οδηγεί στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης απαιτεί περαιτέρω μελέτη.

Για πρώτη φορά όμως αποδίδεται σημαντικός λειτουργικός ρόλος στα επίπεδα φωσφορυλίωσης της MLC κατά τη σηματοδότηση ενός μέλους της οικογένειας των TGF-β/BMP, συγκεκριμένα του BMP-7 (Εικόνα 18Γ). Η φωσφορυλίωση της MLC από την MLCK είναι ένας μηχανισμός που ελέγχει τη λειτουργία του συμπλόκου της ακτινομυοσίνης σε μυϊκά και μη κύτταρα<sup>258, 263</sup>.

Παρόλο που δεν μετρήθηκε άμεσα η δραστικότητα της MLCK κατά τη σηματοδότηση του BMP-7, η χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα της MLCK, ML-7 και η δοκιμασία αποσιώπησης της MLC (Εικόνες 18Ε, 19) της αποδίδουν σημαντικό ρυθμιστικό ρόλο, αναστέλλοντας την μακροπρόθεσμη αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από τον BMP-7.

Κατά παρόμοιο τρόπο, με τη χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα της ROCK1, Y-27632 (Εικόνα 16Α, Γ και Εικόνα 18Δ), για πρώτη φορά καταγράφεται η ROCK1 ως ο αποδέκτης της ενεργοποίησης των Rho GTPασών και κατά τη σηματοδότηση του BMP-7 προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Η ROCK1 δύναται να ενεργοποιηθεί εξ ίσου από τη RhoA-GTP και την RhoB-GTP<sup>251, 253</sup>, ενεργοποίηση των οποίων λαμβάνει χώρα υπό την επίδραση BMP-7 στους Swiss3T3 ινοβλάστες (Εικόνα 13B). Επιπλέον, η παρατήρηση ότι ο BMP-7 ρυθμίζει την έκφραση του RhoB mRNA αλλά όχι και αυτό του RhoA (Εικόνες 14, 15), υποδηλώνει πιθανή διαφοροποίηση των ρόλων αυτών των μικρών GTΡασών κατά τη σηματοδότηση του BMP-7. Πράγματι, συνδυάζοντας την κινητική της ενεργοποίησης των RhoA και RhoB πρωτεϊνών (Εικόνα 13B) και την κινητική της έκφρασης των *RhoA* και *RhoB* mRNA (Εικόνες 14, 15), φαίνεται ότι η RhoA εμπλέκεται στη βραχυπρόθεσμη επίδραση (15 λεπτά – 2 ώρες) του BMP-7 στον κυτταροσκελετό της ακτίνης, ενώ η μεταγραφική επαγωγή του *RhoB* γονιδίου με την επακόλουθη ενεργοποίηση αυτής της μικρής GTPάσης ίσως ελέγχει τη μακροπρόθεσμη (2-4 ώρες) επίδραση του BMP-7 στον κυτταροσκελετό. Παράλληλα, επαγωγή της έκφρασης του *RhoB* και όχι του RhoA mRNA παρατηρήθηκε και στα HaCaT κερατινοκύτταρα, ενισχύοντας αυτό το πρότυπο μεταγραφικής επαγωγής του *RhoB* γονιδίου που οφείλεται στον BMP-7 (Εικόνα 15). Παρόμοια μεταγραφική επαγωγή του γονιδίου της RhoB και όχι του γονιδίου της RhoA έχει δειχθεί στα HaCaT κερατινοκύτταρα μετά από έκθεσή τους για 1 έως 24 ώρες σε TGF-β1<sup>264</sup> δείχνοντας ότι το συγκεκριμένο πρότυπο μεταγραφής των *RhoA* και *RhoB* γονιδίων παρουσιάζει ομοιότητες όχι μόνο μεταξύ διαφορετικών κυτταρικών σειρών αλλά και μεταξύ διαφορετικών μελών της οικογένειας του TGF-β. Τέλος, αντίθετα με τον BMP-2 ο οποίος προκαλεί ενεργοποίηση της Cdc42 σε νευρώνες και μυοβλάστες<sup>259, 260</sup>, ο BMP-7 φαίνεται να ρυθμίζει αρνητικά αυτή τη μικρή GTPάση στους Swiss3T3

ινοβλάστες (Εικόνα 13Β) όπως και ο TGF-β1 στα HaCaT κερατινοκύτταρα αντίστοιχα (Τρέχοντα δεδομένα του εργαστηρίου). Έχει αναφερθεί ότι η Cdc42 είναι απαραίτητη για την κατευθυνόμενη μετανάστευση μακροφάγων ενώ παρόλη την αναστολή της δράσης της τα κύτταρα εξακολουθούν να κινούνται προς τυχαία όμως κατεύθυνση<sup>229</sup>. Κατά πόσο αυτή η διαφοροποίηση οφείλεται στην κυτταρική σειρά ή στη διακριτή δράση των μελών της οικογένειας του BMP και κατ' επέκταση της ενεργοποίησης των υποδοχέων του BMP παραμένει άγνωστο.

Όπως έχει προαναφερθεί η Rho μέσω της ROCK επάγει τη φωσφορυλίωση της MLC παρέχοντας δυνάμεις συστολής στο οπίσθιο άκρο ενός κυττάρου σε μετανάστευση<sup>137</sup>. Επιπλέον, οι BMPs επάγουν την έκφραση μυοσίνης X (Myo 10) σε ενδοθηλιακά κύτταρα και προκαλούν τη μετανάστευσή τους κατά την αγγειογένεση<sup>265</sup>. Σε αυτά τα κύτταρα, η Μγο 10 εντοπίζεται στα φιλοπόδια και η συναρμολόγηση των φιλοποδίων που προκαλείται από τον BMP-6 εξασθενεί όταν μειώνεται η έκφραση της Myo 10. Μάλιστα η νεοσχηματισθείσα μυοσίνη Χ συνεντοπίζεται με τον υποδοχέα τύπου Ι του BMP, Alk6 στα φιλοπόδια, και το σύμπλοκο αυτό συμμετέχει στην κίνηση. Η διαδικασία αυτή είναι απαραίτητη για τη διαρκή ενεργοποίηση των Smad σε απόκριση της σηματοδότησης του BMP, οδηγώντας σε αμφίδρομη ενίσχυση της σηματοδότησης του BMP και της κυτταροσκελετικής κινητικότητας. Κατά την σηματοδότηση του BMP-6 ο Alk6 και η Myo 10 μετατοπίζεται διαρκώς στα φιλοπόδια. Επιπροσθέτως, για την ενεργοποίηση των Smad από τον BMP-6 απαιτείται η Μγο 10, δείχνοντας ότι επιπλέον της λειτουργίας της στα φιλοπόδια η Μγο 10 συμμετέχει και στην ανατροφοδότηση της σηματοδότης του BMP στις Smad. Η παρουσία του αναστολέα Y-27632 εκτός από την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης μειώνει και τη μεταναστευτική ικανότητα των Swiss3T3 ινοβλαστών η οποία οφείλεται στον BMP-7 (Εικόνα 16Γ - 24 ώρες) κατά την οποία μάλιστα δεν παρατηρείται πολλαπλασιασμός των ινοβλαστών (Εικόνα 12B). Έτσι, φαίνεται ότι η δράση της ROCK1 κινάσης είναι καθοριστική για τη σηματοδότηση που έχει ως αποδέκτη τον κυτταροσκελετό της ακτίνης, γεγονός το οποίο μπορεί να μεταφραστεί περαιτέρω και στην ικανότητα των ινοβλαστών να μετακινούνται. Η προαναφερθείσα συμμετοχή της μυοσίνης στη λειτουργία των φιλοποδίων

και στην ανατροφοδότηση της σηματοδότησης του BMP προς τις Smad, ίσως επιδρά και στην αναστολή της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης εν μέρη και κατά την αποσιώπηση της ενδογενούς MLC στους NIH3T3 ινοβλάστες.

Οι ινοβλάστες οι οποίοι προ-επωάστηκαν με τον εξειδικευμένο αναστολέα της ROCK, Y-27632, παρουσίασαν έντονη απώλεια των κεντρικών και μόνο ινιδίων του στρες. Τα περιφερειακά ινίδια έμειναν ανέπαφα και το σχήμα των κυττάρων δεν παρουσίασε κάποια αισθητή αλλαγή. Αντίθετα αποτελέσματα παρατηρηθήκαν όταν οι Swiss3T3 ινοβλάστες προ-επωάστηκαν με τον εξειδικευμένο αναστολέα της MLCK, ML-7, για κάθε χρονικό διάστημα έως αυτό των 2 ωρών με τα κεντρικά ινίδια αυτή τη φορά να παραμένουν ανέπαφα. Η ίδια διαφοροποίηση έχει παρατηρηθεί με την χρήση των ίδιων αναστολέων και σε ανθρώπινους ινοβλάστες ακροβυστίας FS-133<sup>252</sup>. Σε Balb/c ινοβλάστες έχει αναφερθεί πιο συγκεκριμένα ότι η ROCK εμπλέκεται στη δημιουργία των κεντρικών ινιδίων του στρες, ενώ η MLCK λειτουργεί στην περιφέρεια του κυττάρου<sup>266</sup>. Στο κέντρο των κυττάρων η ROCK ελέγχει όχι μόνο την φωσφορυλίωση της MLC, φωσφορυλιώνοντάς την άμεσα η ίδια, αλλά και την απο-φωσφορυλίωσή της, φωσφορυλιώνοντας την MBS (myosin binding subunit) της MLCP με αποτέλεσμα την αναστολή της δράσης της MLCP. Σε αυτήν την περίπτωση η MLCK δε φαίνεται να παίζει ρόλο στη φωσφορυλίωση της MLC. Από τη άλλη, στην περιφέρεια των ινοβλαστών ο ρόλος της ROCK περιορίζεται στο να ελέγχει μόνο την απο-φωσφορυλίωση της MLC φωσφορυλιώνοντας και αναστέλλοντας την MLCP. Η MLCK ίσως είναι υπεύθυνη για την φωσφορυλίωση της MLC αυτή τη φορά χωρίς να επηρεάζεται από το μονοπάτι Rho/ROCK μιας και ο εξειδικευμένος αναστολέας της ROCK δεν επηρεάζει τη δομή των περιφερειακών ινιδίων.

Επίσης, στα DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη οι BMP-7 και TGF-β δεν επάγουν απόπτωση (Εικόνα 12Γ) όπως θα αναμενόταν από την κυτοστατική και αποπτωτική λειτουργία που εμφανίζει ο TGF-β<sup>245</sup>. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μειωμένη ευαισθησία των καρκινικών κυττάρων που παρουσιάζουν σε κυτοκίνες, και μάλιστα σε συγκεκριμένες μεταλλάξεις στο γονίδιο του υποδοχέα τύπου Ι του TGF-β που έχουν εντοπισθεί σε κύτταρα παγκρέατος<sup>267</sup>.

Όπως παρουσιάζεται και από προηγούμενες αναφορές<sup>237, 259, 260</sup> κατά την κινητοποίηση του Rho/LIMK μονοπατιού, παρατηρείται αρχική ενεργοποίηση της Smad1 από τους υποδοχείς του BMP. Παράλληλα, είναι γνωστό ότι η ορθή λειτουργία του μονοπατιού TGF-β/BMP γενικότερα εξαρτάται από τη διαρκή επικοινωνία με άλλα σηματοδοτικά μονοπάτια οδηγώντας σε συνέργεια ή ανταγωνισμό. Έτσι, παρατηρείται κινητοποίηση και των κλασσικών non-Smad μονοπατιών των ΜΑΡΚ, που προκαλείται από του υποδοχείς της οικογένειας του TGF-β (Εικόνα 13A). Οπότε, εκτός από την φωσφορυλίωση της Smad1 στο καρβοξυ-τελικό της άκρο, ο BMP-7 επάγει άμεση φωσφορυλίωση της p38 MAPK και αποφωσφορυλίωση της Erk1/2 MAPK (Εικόνα 13A) χωρίς να επηρεάζεται η κινητικότητα αυτών των φωσφορυλιώσεων από τη χρήση των αναστολέων Υ-27632 και ML-7 (Εικόνα 17). Παραμένει άγνωστος ο ρόλος αυτών των κινασών στην ενεργοποίηση των Rho GTΡασών, ένα σηματοδοτικό βήμα το οποίο συγκαταλέγεται στα λιγότερο γνωστά κατά τη σηματοδότηση των υποδοχέων της οικογένειας του TGF-β προς τον κυτταροσκελετό της ακτίνης. Δεν έχει διαλευκανθεί ακόμα αν οι μικρές GTPάσες της οικογένειας των Rho ενεργοποιούνται απευθείας από τους υποδοχείς του TGF-β/BMP ή μέσω των Smads ή από κάποια από τις MAPKs οι οποίες ενεργοποιούνται άμεσα<sup>41</sup>. Η PI3-K επίσης έχει αναφερθεί ότι εμπλέκεται στη ρύθμιση της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης από τον BMP-2<sup>260</sup>. Ο μηχανισμός με το οποίο οι υποδοχείς του BMP ενεργοποιούν την PI3-K ή ο τρόπος με τον οποίο αυτή η κινάση ρυθμίζει τη δράση των Rho GTΡασών καθοδικά του BMP παραμένει επίσης άγνωστος, καθιστώντας το πεδίο σημαντικό για μελλοντική έρευνα.

Εν κατακλείδι (Εικόνα 21), ο BMP-7 σηματοδοτεί μέσω της ενεργοποίησης των Smad1, p38 MAPK, RhoA, RhoB, LIMK1 και MLC και παράλληλα μέσω της απενεργοποίησης των p44/42 MAPK (Erk1/2) και Cdc42. Επάγει την έκφραση των *RhoB* και *Smad6* γονιδίων. Προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού μέσω πολυμερισμού της ακτίνης και της συναρμολόγησης των πλακών πρόσφυσης και μετανάστευση των ινοβλαστών, βιολογικές επιδράσεις της οποίες αναστέλλει ο εξειδικευμένος αναστολέας της ROCK, Y-27632 μειώνοντας παράλληλα την φωσφορυλίωση της MLC. Τέλος, χρήση του εξειδικευμένου αναστολέα της MLCK, ML-7 (καθώς και αποσιώπηση της

ενδογενούς MLC), προκαλεί επίσης αναστολή της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης που επάγεται από τον BMP-7.



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση των προτεινόμενων μηχανισμών ρύθμισης της φωσφορυλίωσης και έκφρασης πρωτεϊνών, της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης και της μετανάστευσης των Swiss3T3 ινοβλαστών που προκαλούνται από BMP-7. Τα κανονικά βέλη υποδεικνύουν πειραματικώς επιβεβαιωμένα μονοπάτια. Τα διακεκομμένα βέλη υποδεικνύουν πειραματικώς επαληθευμένα σηματοδοτικά βήματα με άγνωστα ενδιάμεσα στάδια. Επίσης, υποδεικνύονται τα σημεία δράσης των αναστολέων που χρησιμοποιήθηκαν. Πηγή εικόνας: Konstantinidis, G., Moustakas, A. & Stournaras, C. Regulation of myosin light chain by BMP signaling controls actin cytoskeleton remodeling. *Cell Physiol Biochem*. Accepted on Sep 2011.

8. Συμπεράσματα

Είναι γνωστό ότι εκτός από τη ικανότητα να επάγουν τη δημιουργία οστών οι BMPs είναι παράγοντες που επιδρούν στη μορφογένεση και στην ανάπτυξη ενός μεγάλου φάσματος ιστών και κυτταρικών τύπων. Οι επιδράσεις αυτές άλλοτε είναι κοινές μεταξύ των μελών της οικογένειας του TGF-β, άλλοτε αποδίδονται σε ένα μικρό υποσύνολο παραγόντων της οικογένειας και άλλοτε είναι μοναδικές για έναν και μόνο παράγοντα. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε σε μοριακό και φαινοτυπικό επίπεδο η επίδραση του BMP-7 κυρίως στην κυτταρική σειρά των Swiss3T3 ινοβλαστών. Έμφαση δόθηκε στην αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από τον BMP-7 και στον μηχανισμό στον οποίο οφείλεται αυτή η αναδιοργάνωση. Έτσι, φάνηκε ότι καθοριστικός είναι ο ρόλος του μονοπατιού Rho/ROCK/MLC. Πιο αναλυτικά:

- Ο BMP-7 προκαλεί αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού της ακτίνης επάγοντας: α) πολυμερισμό της ακτίνης σε Swiss3T3, MEF και NIH3T3 ινοβλάστες, MCF7 και MCF 10A επιθηλιακά κύτταρα μαστού, HaCaT επιθηλιακά κύτταρα επιδερμίδας και DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη και β) στρατολόγηση της βινκουλίνης στις πλάκες πρόσφυσης των Swiss3T3 ινοβλαστών.
- 2. Ο BMP-7 επάγει την κυτταρική μετανάστευση χωρίς να επηρεάζει τον πολλαπλασιασμό στους Swiss3T3 ινοβλάστες και την απόπτωση στα DU145 καρκινικά κύτταρα προστάτη.
- 3. Η σηματοδότηση του BMP-7 περιλαμβάνει: α) φωσφορυλίωση των Smad1 και p38 MAPK καθώς και ενεργοποίηση των RhoA και RhoB GTPασών. Αντίθετα, προκαλεί αποφωσφορυλίωση της p44/42 MAPK (Erk1/2) και απενεργοποίηση της Cdc42 GTPάσης στους Swiss3T3 ινοβλάστες, β) έκφραση των RhoB και Smad6 γονιδίων σε Swiss3T3 ινοβλάστες και HaCaT επιθηλιακά κύτταρα επιδερμίδας και γ) φωσφορυλίωση των LIMK1 και MLC στους Swiss3T3 ινοβλάστες.
- 4. Ο αναστολέας Υ-27632: α) αναστέλλει τον επαγόμενο από τον BMP-7 πολυμερισμό της ακτίνης προσδίδοντας στη ROCK κινάση σημαντικό ρόλο κατά την αναδιοργάνωση του κυτταροσκελετού. Επιπλέον αυτού, ο ίδιος αναστολέας αναστέλλει εν μέρη την επαγόμενη από BMP-7 κυτταρική μετανάστευση των Swiss3T3 ινοβλαστών και β) προκαλεί αναστολή της

φωσφορυλίωσης της MLC στους Swiss3T3 ινοβλάστες. Παράλληλα, χρήση του αναστολέα της MLCK, ML-7 καθώς και αποσιώπηση της ενδογενούς MLC αναστέλλει τον long-term πολυμερισμό της ακτίνης, σε Swiss3T3 και NIH3T3 ινοβλάστες αντίστοιχα, καθιστώντας τη MLC σημαντικό ρυθμιστή της αναδιοργάνωσης του κυτταροσκελετού της ακτίνης που προκαλείται από BMP-7.

9. Βιβλιογραφία

- 1. Yang, L. & Moses, H.L. Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer? *Cancer Res* **68**, 9107-9111 (2008).
- 2. Watabe, T. & Miyazono, K. Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Res* **19**, 103-115 (2009).
- 3. Gordon, K.J. & Blobe, G.C. Role of transforming growth factor-beta superfamily signaling pathways in human disease. *Biochim Biophys Acta* **1782**, 197-228 (2008).
- 4. Massague, J. TGFbeta in Cancer. *Cell* **134**, 215-230 (2008).
- 5. Affolter, M. & Basler, K. The Decapentaplegic morphogen gradient: from pattern formation to growth regulation. *Nat Rev Genet* **8**, 663-674 (2007).
- 6. Smith, J.C. & Gurdon, J.B. Many ways to make a gradient. *Bioessays* **26**, 705-706 (2004).
- 7. De Robertis, E.M. & Kuroda, H. Dorsal-ventral patterning and neural induction in Xenopus embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* **20**, 285-308 (2004).
- 8. Huminiecki, L. *et al.* Emergence, development and diversification of the TGF-beta signalling pathway within the animal kingdom. *BMC Evol Biol* **9**, 28 (2009).
- 9. Chen, C. & Shen, M.M. Two modes by which Lefty proteins inhibit nodal signaling. *Curr Biol* **14**, 618-624 (2004).
- 10. Rossi, D.J., Jamieson, C.H. & Weissman, I.L. Stems cells and the pathways to aging and cancer. *Cell* **132**, 681-696 (2008).
- 11. Greber, B., Lehrach, H. & Adjaye, J. Fibroblast growth factor 2 modulates transforming growth factor beta signaling in mouse embryonic fibroblasts and human ESCs (hESCs) to support hESC self-renewal. *Stem Cells* **25**, 455-464 (2007).
- 12. Ogawa, K. *et al.* Activin-Nodal signaling is involved in propagation of mouse embryonic stem cells. *J Cell Sci* **120**, 55-65 (2007).
- 13. Xu, X. *et al.* Ectodermal Smad4 and p38 MAPK are functionally redundant in mediating TGF-beta/BMP signaling during tooth and palate development. *Dev Cell* **15**, 322-329 (2008).
- 14. Suzuki, A. *et al.* Nanog binds to Smad1 and blocks bone morphogenetic protein-induced differentiation of embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 10294-10299 (2006).
- 15. Chen, X. *et al.* Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell* **133**, 1106-1117 (2008).
- 16. ten Dijke, P. & Arthur, H.M. Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 857-869 (2007).
- 17. Rifkin, D.B. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem* **280**, 7409-7412 (2005).

- 18. Ge, G., Hopkins, D.R., Ho, W.B. & Greenspan, D.S. GDF11 forms a bone morphogenetic protein 1-activated latent complex that can modulate nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells. *Mol Cell Biol* **25**, 5846-5858 (2005).
- 19. Wolfman, N.M. *et al.* Activation of latent myostatin by the BMP-1/tolloid family of metalloproteinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15842-15846 (2003).
- 20. Degnin, C., Jean, F., Thomas, G. & Christian, J.L. Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4. *Mol Biol Cell* **15**, 5012-5020 (2004).
- 21. Dick, A. *et al.* Essential role of Bmp7 (snailhouse) and its prodomain in dorsoventral patterning of the zebrafish embryo. *Development* **127**, 343-354 (2000).
- 22. Le Good, J.A. *et al.* Nodal stability determines signaling range. *Curr Biol* **15**, 31-36 (2005).
- 23. Blanchet, M.H. *et al.* Cripto recruits Furin and PACE4 and controls Nodal trafficking during proteolytic maturation. *EMBO J* **27**, 2580-2591 (2008).
- 24. Bianco, C., Normanno, N., Salomon, D.S. & Ciardiello, F. Role of the cripto (EGF-CFC) family in embryogenesis and cancer. *Growth Factors* **22**, 133-139 (2004).
- 25. Gazzerro, E. & Canalis, E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. *Rev Endocr Metab Disord* **7**, 51-65 (2006).
- 26. Harrison, C.A., Gray, P.C., Vale, W.W. & Robertson, D.M. Antagonists of activin signaling: mechanisms and potential biological applications. *Trends Endocrinol Metab* **16**, 73-78 (2005).
- 27. Umulis, D., O'Connor, M.B. & Blair, S.S. The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. *Development* **136**, 3715-3728 (2009).
- 28. Groppe, J. *et al.* Cooperative assembly of TGF-beta superfamily signaling complexes is mediated by two disparate mechanisms and distinct modes of receptor binding. *Mol Cell* **29**, 157-168 (2008).
- 29. Moustakas, A. & Heldin, C.H. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development* **136**, 3699-3714 (2009).
- 30. Massague, J., Seoane, J. & Wotton, D. Smad transcription factors. *Genes Dev* **19**, 2783-2810 (2005).
- 31. Schmierer, B. & Hill, C.S. TGFbeta-SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 970-982 (2007).
- 32. Itoh, S. & ten Dijke, P. Negative regulation of TGF-beta receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* **19**, 176-184 (2007).
- 33. Daly, A.C., Randall, R.A. & Hill, C.S. Transforming growth factor betainduced Smad1/5 phosphorylation in epithelial cells is mediated by novel receptor complexes and is essential for anchorage-independent growth. *Mol Cell Biol* **28**, 6889-6902 (2008).
- 34. Finnson, K.W., Parker, W.L., ten Dijke, P., Thorikay, M. & Philip, A. ALK1 opposes ALK5/Smad3 signaling and expression of extracellular matrix

components in human chondrocytes. *J Bone Miner Res* **23**, 896-906 (2008).

- 35. Goumans, M.J. *et al.* Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell* **12**, 817-828 (2003).
- 36. Liu, I.M. *et al.* TGFbeta-stimulated Smad1/5 phosphorylation requires the ALK5 L45 loop and mediates the pro-migratory TGFbeta switch. *EMBO J* **28**, 88-98 (2009).
- 37. Moustakas, A. & Heldin, C.H. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* **118**, 3573-3584 (2005).
- 38. Ozdamar, B. *et al.* Regulation of the polarity protein Par6 by TGFbeta receptors controls epithelial cell plasticity. *Science* **307**, 1603-1609 (2005).
- 39. Moustakas, A. & Heldin, C.H. Signaling networks guiding epithelialmesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* **98**, 1512-1520 (2007).
- 40. Thuault, S. *et al.* Transforming growth factor-beta employs HMGA2 to elicit epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* **174**, 175-183 (2006).
- 41. Kardassis, D., Murphy, C., Fotsis, T., Moustakas, A. & Stournaras, C. Control of transforming growth factor beta signal transduction by small GTPases. *FEBS J* **276**, 2947-2965 (2009).
- 42. Papadimitriou, E., Kardassis, D., Moustakas, A. & Stournaras, C. TGFbetainduced early activation of the small GTPase RhoA is Smad2/3independent and involves Src and the guanine nucleotide exchange factor Vav2. *Cell Physiol Biochem* **28**, 229-238.
- 43. Lee, M.K. *et al.* TGF-beta activates Erk MAP kinase signalling through direct phosphorylation of ShcA. *EMBO J* **26**, 3957-3967 (2007).
- 44. Galliher, A.J. & Schiemann, W.P. Src phosphorylates Tyr284 in TGF-beta type II receptor and regulates TGF-beta stimulation of p38 MAPK during breast cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Res* **67**, 3752-3758 (2007).
- 45. Galliher-Beckley, A.J. & Schiemann, W.P. Grb2 binding to Tyr284 in TbetaR-II is essential for mammary tumor growth and metastasis stimulated by TGF-beta. *Carcinogenesis* **29**, 244-251 (2008).
- 46. Sorrentino, A. *et al.* The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner. *Nat Cell Biol* **10**, 1199-1207 (2008).
- 47. Yamashita, M. *et al.* TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* **31**, 918-924 (2008).
- 48. Batut, J. *et al.* Two highly related regulatory subunits of PP2A exert opposite effects on TGF-beta/Activin/Nodal signalling. *Development* **135**, 2927-2937 (2008).
- 49. Kang, J.S., Saunier, E.F., Akhurst, R.J. & Derynck, R. The type I TGF-beta receptor is covalently modified and regulated by sumoylation. *Nat Cell Biol* **10**, 654-664 (2008).

- 50. Tsukazaki, T., Chiang, T.A., Davison, A.F., Attisano, L. & Wrana, J.L. SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* **95**, 779-791 (1998).
- 51. Shi, W. *et al.* Endofin acts as a Smad anchor for receptor activation in BMP signaling. *J Cell Sci* **120**, 1216-1224 (2007).
- 52. Chen, Y.G., Wang, Z., Ma, J., Zhang, L. & Lu, Z. Endofin, a FYVE domain protein, interacts with Smad4 and facilitates transforming growth factorbeta signaling. *J Biol Chem* **282**, 9688-9695 (2007).
- 53. Lin, H.K., Bergmann, S. & Pandolfi, P.P. Cytoplasmic PML function in TGFbeta signalling. *Nature* **431**, 205-211 (2004).
- 54. Faresse, N. *et al.* Identification of PCTA, a TGIF antagonist that promotes PML function in TGF-beta signalling. *EMBO J* **27**, 1804-1815 (2008).
- 55. Clarke, D.C., Brown, M.L., Erickson, R.A., Shi, Y. & Liu, X. Transforming growth factor beta depletion is the primary determinant of Smad signaling kinetics. *Mol Cell Biol* **29**, 2443-2455 (2009).
- 56. Di Guglielmo, G.M., Le Roy, C., Goodfellow, A.F. & Wrana, J.L. Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* **5**, 410-421 (2003).
- 57. Goto, K., Kamiya, Y., Imamura, T., Miyazono, K. & Miyazawa, K. Selective inhibitory effects of Smad6 on bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* **282**, 20603-20611 (2007).
- 58. Mochizuki, T. *et al.* Roles for the MH2 domain of Smad7 in the specific inhibition of transforming growth factor-beta superfamily signaling. *J Biol Chem* **279**, 31568-31574 (2004).
- 59. Wrighton, K.H., Lin, X. & Feng, X.H. Critical regulation of TGFbeta signaling by Hsp90. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 9244-9249 (2008).
- 60. Kowanetz, M. *et al.* TGFbeta induces SIK to negatively regulate type I receptor kinase signaling. *J Cell Biol* **182**, 655-662 (2008).
- 61. Zhang, S. *et al.* Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol Cell Biol* **27**, 4488-4499 (2007).
- 62. Moustakas, A. & Heldin, C.H. Dynamic control of TGF-beta signaling and its links to the cytoskeleton. *FEBS Lett* **582**, 2051-2065 (2008).
- 63. Batut, J., Howell, M. & Hill, C.S. Kinesin-mediated transport of Smad2 is required for signaling in response to TGF-beta ligands. *Dev Cell* **12**, 261-274 (2007).
- 64. Dai, P., Nakagami, T., Tanaka, H., Hitomi, T. & Takamatsu, T. Cx43 mediates TGF-beta signaling through competitive Smads binding to microtubules. *Mol Biol Cell* **18**, 2264-2273 (2007).
- 65. Jin, Q., Ding, W. & Mulder, K.M. Requirement for the dynein light chain km23-1 in a Smad2-dependent transforming growth factor-beta signaling pathway. *J Biol Chem* **282**, 19122-19132 (2007).
- 66. Fuentealba, L.C., Eivers, E., Geissert, D., Taelman, V. & De Robertis, E.M. Asymmetric mitosis: Unequal segregation of proteins destined for degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 7732-7737 (2008).

- 67. Saka, Y., Hagemann, A.I., Piepenburg, O. & Smith, J.C. Nuclear accumulation of Smad complexes occurs only after the midblastula transition in Xenopus. *Development* **134**, 4209-4218 (2007).
- 68. Fujita, T., Epperly, M.W., Zou, H., Greenberger, J.S. & Wan, Y. Regulation of the anaphase-promoting complex-separase cascade by transforming growth factor-beta modulates mitotic progression in bone marrow stromal cells. *Mol Biol Cell* **19**, 5446-5455 (2008).
- 69. Xu, L. *et al.* Msk is required for nuclear import of TGF-{beta}/BMP-activated Smads. *J Cell Biol* **178**, 981-994 (2007).
- 70. Yao, X., Chen, X., Cottonham, C. & Xu, L. Preferential utilization of Imp7/8 in nuclear import of Smads. *J Biol Chem* **283**, 22867-22874 (2008).
- 71. Dai, F., Lin, X., Chang, C. & Feng, X.H. Nuclear export of Smad2 and Smad3 by RanBP3 facilitates termination of TGF-beta signaling. *Dev Cell* **16**, 345-357 (2009).
- 72. Schmierer, B., Tournier, A.L., Bates, P.A. & Hill, C.S. Mathematical modeling identifies Smad nucleocytoplasmic shuttling as a dynamic signal-interpreting system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 6608-6613 (2008).
- 73. Wrighton, K.H., Lin, X. & Feng, X.H. Phospho-control of TGF-beta superfamily signaling. *Cell Res* **19**, 8-20 (2009).
- 74. Imoto, S. *et al.* Sumoylation of Smad3 stimulates its nuclear export during PIASy-mediated suppression of TGF-beta signaling. *Biochem Biophys Res Commun* **370**, 359-365 (2008).
- 75. Miles, W.O. *et al.* Medea SUMOylation restricts the signaling range of the Dpp morphogen in the Drosophila embryo. *Genes Dev* **22**, 2578-2590 (2008).
- 76. Lonn, P., Moren, A., Raja, E., Dahl, M. & Moustakas, A. Regulating the stability of TGFbeta receptors and Smads. *Cell Res* **19**, 21-35 (2009).
- 77. Moren, A. *et al.* Differential ubiquitination defines the functional status of the tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* **278**, 33571-33582 (2003).
- 78. Dupont, S. *et al.* FAM/USP9x, a deubiquitinating enzyme essential for TGFbeta signaling, controls Smad4 monoubiquitination. *Cell* **136**, 123-135 (2009).
- 79. Wang, B., Suzuki, H. & Kato, M. Roles of mono-ubiquitinated Smad4 in the formation of Smad transcriptional complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **376**, 288-292 (2008).
- 80. Varelas, X. *et al.* TAZ controls Smad nucleocytoplasmic shuttling and regulates human embryonic stem-cell self-renewal. *Nat Cell Biol* **10**, 837-848 (2008).
- 81. Verheyen, E.M. Opposing effects of Wnt and MAPK on BMP/Smad signal duration. *Dev Cell* **13**, 755-756 (2007).
- 82. Kretzschmar, M., Liu, F., Hata, A., Doody, J. & Massague, J. The TGF-beta family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* **11**, 984-995 (1997).
- 83. Aubin, J., Davy, A. & Soriano, P. In vivo convergence of BMP and MAPK signaling pathways: impact of differential Smad1 phosphorylation on development and homeostasis. *Genes Dev* **18**, 1482-1494 (2004).

- 84. Eivers, E., Fuentealba, L.C. & De Robertis, E.M. Integrating positional information at the level of Smad1/5/8. *Curr Opin Genet Dev* **18**, 304-310 (2008).
- 85. Kretzschmar, M., Doody, J. & Massague, J. Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF-beta family mediator Smad1. *Nature* **389**, 618-622 (1997).
- 86. Kuroda, H., Fuentealba, L., Ikeda, A., Reversade, B. & De Robertis, E.M. Default neural induction: neuralization of dissociated Xenopus cells is mediated by Ras/MAPK activation. *Genes Dev* **19**, 1022-1027 (2005).
- 87. Bilican, B., Fiore-Heriche, C., Compston, A., Allen, N.D. & Chandran, S. Induction of Olig2 precursors by FGF involves BMP signalling blockade at the Smad level. *PLoS One* **3**, e2863 (2008).
- 88. Sapkota, G., Alarcon, C., Spagnoli, F.M., Brivanlou, A.H. & Massague, J. Balancing BMP signaling through integrated inputs into the Smad1 linker. *Mol Cell* **25**, 441-454 (2007).
- 89. Zhu, H., Kavsak, P., Abdollah, S., Wrana, J.L. & Thomsen, G.H. A SMAD ubiquitin ligase targets the BMP pathway and affects embryonic pattern formation. *Nature* **400**, 687-693 (1999).
- 90. Fuentealba, L.C. *et al.* Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* **131**, 980-993 (2007).
- 91. Qiu, T., Grizzle, W.E., Oelschlager, D.K., Shen, X. & Cao, X. Control of prostate cell growth: BMP antagonizes androgen mitogenic activity with incorporation of MAPK signals in Smad1. *EMBO J* **26**, 346-357 (2007).
- 92. Zeng, Y.A., Rahnama, M., Wang, S., Sosu-Sedzorme, W. & Verheyen, E.M. Drosophila Nemo antagonizes BMP signaling by phosphorylation of Mad and inhibition of its nuclear accumulation. *Development* **134**, 2061-2071 (2007).
- 93. Guo, X. & Wang, X.F. Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other pathways. *Cell Res* **19**, 71-88 (2009).
- 94. de Caestecker, M.P. *et al.* Smad2 transduces common signals from receptor serine-threonine and tyrosine kinases. *Genes Dev* **12**, 1587-1592 (1998).
- 95. Brown, J.D., DiChiara, M.R., Anderson, K.R., Gimbrone, M.A., Jr. & Topper, J.N. MEKK-1, a component of the stress (stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase) pathway, can selectively activate Smad2-mediated transcriptional activation in endothelial cells. *J Biol Chem* **274**, 8797-8805 (1999).
- 96. Mori, S. *et al.* TGF-beta and HGF transmit the signals through JNKdependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* **23**, 7416-7429 (2004).
- 97. Matsuura, I., Wang, G., He, D. & Liu, F. Identification and characterization of ERK MAP kinase phosphorylation sites in Smad3. *Biochemistry* **44**, 12546-12553 (2005).
- 98. Kamaraju, A.K. & Roberts, A.B. Role of Rho/ROCK and p38 MAP kinase pathways in transforming growth factor-beta-mediated Smad-dependent

growth inhibition of human breast carcinoma cells in vivo. *J Biol Chem* **280**, 1024-1036 (2005).

- 99. Guo, X. *et al.* Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling. *Genes Dev* **22**, 106-120 (2008).
- 100. Saha, D., Datta, P.K. & Beauchamp, R.D. Oncogenic ras represses transforming growth factor-beta /Smad signaling by degrading tumor suppressor Smad4. *J Biol Chem* **276**, 29531-29537 (2001).
- 101. Liang, M. *et al.* Ubiquitination and proteolysis of cancer-derived Smad4 mutants by SCFSkp2. *Mol Cell Biol* **24**, 7524-7537 (2004).
- 102. Brodin, G., Ahgren, A., ten Dijke, P., Heldin, C.H. & Heuchel, R. Efficient TGF-beta induction of the Smad7 gene requires cooperation between AP-1, Sp1, and Smad proteins on the mouse Smad7 promoter. *J Biol Chem* 275, 29023-29030 (2000).
- 103. Dowdy, S.C., Mariani, A. & Janknecht, R. HER2/Neu- and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81. *J Biol Chem* **278**, 44377-44384 (2003).
- 104. Uchida, K. *et al.* Involvement of MAP kinase cascades in Smad7 transcriptional regulation. *Biochem Biophys Res Commun* **289**, 376-381 (2001).
- 105. Yanai, M. *et al.* FGF signaling segregates biliary cell-lineage from chick hepatoblasts cooperatively with BMP4 and ECM components in vitro. *Dev Dyn* **237**, 1268-1283 (2008).
- 106. Shaulian, E. & Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat Cell Biol* **4**, E131-136 (2002).
- 107. Chen, R.H., Su, Y.H., Chuang, R.L. & Chang, T.Y. Suppression of transforming growth factor-beta-induced apoptosis through a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *Oncogene* **17**, 1959-1968 (1998).
- 108. Chen, R.H., Chang, M.C., Su, Y.H., Tsai, Y.T. & Kuo, M.L. Interleukin-6 inhibits transforming growth factor-beta-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and signal transducers and activators of transcription 3 pathways. *J Biol Chem* **274**, 23013-23019 (1999).
- 109. Fukuda, M. & Longnecker, R. Latent membrane protein 2A inhibits transforming growth factor-beta 1-induced apoptosis through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Virol* **78**, 1697-1705 (2004).
- 110. Shih, W.L., Kuo, M.L., Chuang, S.E., Cheng, A.L. & Doong, S.L. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem* **275**, 25858-25864 (2000).
- 111. Song, K., Cornelius, S.C., Reiss, M. & Danielpour, D. Insulin-like growth factor-I inhibits transcriptional responses of transforming growth factor-beta by phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent suppression of the activation of Smad3 but not Smad2. *J Biol Chem* **278**, 38342-38351 (2003).
- 112. Siegel, P.M., Shu, W., Cardiff, R.D., Muller, W.J. & Massague, J. Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary

tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8430-8435 (2003).

- 113. Han, G. *et al.* Smad7-induced beta-catenin degradation alters epidermal appendage development. *Dev Cell* **11**, 301-312 (2006).
- 114. Tang, Y., Liu, Z., Zhao, L., Clemens, T.L. & Cao, X. Smad7 stabilizes betacatenin binding to E-cadherin complex and promotes cell-cell adhesion. *J Biol Chem* **283**, 23956-23963 (2008).
- 115. Li, M.O. & Flavell, R.A. TGF-beta: a master of all T cell trades. *Cell* **134**, 392-404 (2008).
- 116. Gorelik, L. & Flavell, R.A. Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* **2**, 46-53 (2002).
- 117. Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G. & Hata, A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* **454**, 56-61 (2008).
- 118. Feng, X.H. & Derynck, R. Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 659-693 (2005).
- 119. Simonsson, M., Kanduri, M., Gronroos, E., Heldin, C.H. & Ericsson, J. The DNA binding activities of Smad2 and Smad3 are regulated by coactivatormediated acetylation. *J Biol Chem* **281**, 39870-39880 (2006).
- 120. Tu, A.W. & Luo, K. Acetylation of Smad2 by the co-activator p300 regulates activin and transforming growth factor beta response. *J Biol Chem* **282**, 21187-21196 (2007).
- 121. Shaked, M. *et al.* Histone deacetylases control neurogenesis in embryonic brain by inhibition of BMP2/4 signaling. *PLoS One* **3**, e2668 (2008).
- 122. Mavrakis, K.J. *et al.* Arkadia enhances Nodal/TGF-beta signaling by coupling phospho-Smad2/3 activity and turnover. *PLoS Biol* **5**, e67 (2007).
- 123. Le Scolan, E. *et al.* Transforming growth factor-beta suppresses the ability of Ski to inhibit tumor metastasis by inducing its degradation. *Cancer Res* **68**, 3277-3285 (2008).
- 124. Levy, L. *et al.* Arkadia activates Smad3/Smad4-dependent transcription by triggering signal-induced SnoN degradation. *Mol Cell Biol* **27**, 6068-6083 (2007).
- 125. Nagano, Y. *et al.* Arkadia induces degradation of SnoN and c-Ski to enhance transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* **282**, 20492-20501 (2007).
- 126. Kajino, T., Omori, E., Ishii, S., Matsumoto, K. & Ninomiya-Tsuji, J. TAK1 MAPK kinase kinase mediates transforming growth factor-beta signaling by targeting SnoN oncoprotein for degradation. *J Biol Chem* **282**, 9475-9481 (2007).
- 127. Koinuma, D. *et al.* Arkadia amplifies TGF-beta superfamily signalling through degradation of Smad7. *EMBO J* **22**, 6458-6470 (2003).
- 128. Koinuma, D. *et al.* Chromatin immunoprecipitation on microarray analysis of Smad2/3 binding sites reveals roles of ETS1 and TFAP2A in transforming growth factor beta signaling. *Mol Cell Biol* **29**, 172-186 (2009).

- 129. Xi, Q., He, W., Zhang, X.H., Le, H.V. & Massague, J. Genome-wide impact of the BRG1 SWI/SNF chromatin remodeler on the transforming growth factor beta transcriptional program. *J Biol Chem* **283**, 1146-1155 (2008).
- 130. Aspenstrom, P., Fransson, A. & Saras, J. Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J* **377**, 327-337 (2004).
- 131. Schmidt, A. & Hall, A. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-1609 (2002).
- 132. Bernards, A. GAPs galore! A survey of putative Ras superfamily GTPase activating proteins in man and Drosophila. *Biochim Biophys Acta* **1603**, 47-82 (2003).
- 133. Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* **11**, 545-554 (1999).
- 134. Lang, P. *et al.* Protein kinase A phosphorylation of RhoA mediates the morphological and functional effects of cyclic AMP in cytotoxic lymphocytes. *EMBO J* **15**, 510-519 (1996).
- 135. Wang, H.R. *et al.* Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* **302**, 1775-1779 (2003).
- 136. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635 (2002).
- 137. Riento, K. & Ridley, A.J. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 446-456 (2003).
- 138. Svitkina, T.M. *et al.* Mechanism of filopodia initiation by reorganization of a dendritic network. *J Cell Biol* **160**, 409-421 (2003).
- 139. Vignjevic, D. *et al.* Formation of filopodia-like bundles in vitro from a dendritic network. *J Cell Biol* **160**, 951-962 (2003).
- 140. dos Remedios, C.G. *et al.* Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* **83**, 433-473 (2003).
- 141. Machesky, L.M. *et al.* Scar, a WASp-related protein, activates nucleation of actin filaments by the Arp2/3 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 3739-3744 (1999).
- 142. Weiner, O.D., Marganski, W.A., Wu, L.F., Altschuler, S.J. & Kirschner, M.W. An actin-based wave generator organizes cell motility. *PLoS Biol* **5**, e221 (2007).
- 143. Pollard, T.D. & Borisy, G.G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* **112**, 453-465 (2003).
- 144. Parent, C.A. Making all the right moves: chemotaxis in neutrophils and Dictyostelium. *Curr Opin Cell Biol* **16**, 4-13 (2004).
- 145. Naumanen, P., Lappalainen, P. & Hotulainen, P. Mechanisms of actin stress fibre assembly. *J Microsc* **231**, 446-454 (2008).
- 146. Mullins, R.D., Heuser, J.A. & Pollard, T.D. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6181-6186 (1998).

- 147. Bailly, M. *et al.* Relationship between Arp2/3 complex and the barbed ends of actin filaments at the leading edge of carcinoma cells after epidermal growth factor stimulation. *J Cell Biol* **145**, 331-345 (1999).
- 148. Svitkina, T.M. & Borisy, G.G. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* **145**, 1009-1026 (1999).
- 149. Cooper, J.A. & Sept, D. New insights into mechanism and regulation of actin capping protein. *Int Rev Cell Mol Biol* **267**, 183-206 (2008).
- 150. Carlier, M.F. *et al.* Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol* **136**, 1307-1322 (1997).
- 151. Wachsstock, D.H., Schwarz, W.H. & Pollard, T.D. Cross-linker dynamics determine the mechanical properties of actin gels. *Biophys J* **66**, 801-809 (1994).
- Hsiung, F., Ramirez-Weber, F.A., Iwaki, D.D. & Kornberg, T.B. Dependence of Drosophila wing imaginal disc cytonemes on Decapentaplegic. *Nature* 437, 560-563 (2005).
- 153. Janmey, P.A. & McCulloch, C.A. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu Rev Biomed Eng* **9**, 1-34 (2007).
- 154. Campellone, K.G., Webb, N.J., Znameroski, E.A. & Welch, M.D. WHAMM is an Arp2/3 complex activator that binds microtubules and functions in ER to Golgi transport. *Cell* **134**, 148-161 (2008).
- 155. Waterman-Storer, C.M., Worthylake, R.A., Liu, B.P., Burridge, K. & Salmon, E.D. Microtubule growth activates Rac1 to promote lamellipodial protrusion in fibroblasts. *Nat Cell Biol* **1**, 45-50 (1999).
- 156. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I. & Treisman, R. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell* **113**, 329-342 (2003).
- 157. Coso, O.A. *et al.* The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**, 1137-1146 (1995).
- 158. Minden, A., Lin, A., Claret, F.X., Abo, A. & Karin, M. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**, 1147-1157 (1995).
- 159. Puls, A. *et al.* Activation of the small GTPase Cdc42 by the inflammatory cytokines TNF(alpha) and IL-1, and by the Epstein-Barr virus transforming protein LMP1. *J Cell Sci* **112 (Pt 17)**, 2983-2992 (1999).
- 160. Burbelo, P.D., Drechsel, D. & Hall, A. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J Biol Chem* **270**, 29071-29074 (1995).
- 161. Gallagher, E.D., Gutowski, S., Sternweis, P.C. & Cobb, M.H. RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity. *J Biol Chem* **279**, 1872-1877 (2004).
- 162. Teramoto, H. *et al.* Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. A role for mixed lineage kinase 3/protein-tyrosine kinase 1, a

novel member of the mixed lineage kinase family. *J Biol Chem* **271**, 27225-27228 (1996).

- 163. Morrison, D.K. & Davis, R.J. Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **19**, 91-118 (2003).
- 164. Jaffe, A.B., Hall, A. & Schmidt, A. Association of CNK1 with Rho guanine nucleotide exchange factors controls signaling specificity downstream of Rho. *Curr Biol* **15**, 405-412 (2005).
- 165. Xu, Z., Kukekov, N.V. & Greene, L.A. POSH acts as a scaffold for a multiprotein complex that mediates JNK activation in apoptosis. *EMBO J* **22**, 252-261 (2003).
- 166. Perona, R. *et al.* Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* **11**, 463-475 (1997).
- 167. Joneson, T. & Bar-Sagi, D. A Rac1 effector site controlling mitogenesis through superoxide production. *J Biol Chem* **273**, 17991-17994 (1998).
- 168. Kheradmand, F., Werner, E., Tremble, P., Symons, M. & Werb, Z. Role of Rac1 and oxygen radicals in collagenase-1 expression induced by cell shape change. *Science* **280**, 898-902 (1998).
- 169. Tapon, N., Nagata, K., Lamarche, N. & Hall, A. A new rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF-kappaB signalling pathways. *EMBO J* **17**, 1395-1404 (1998).
- 170. Tolias, K.F. *et al.* Type Ialpha phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase mediates Rac-dependent actin assembly. *Curr Biol* **10**, 153-156 (2000).
- 171. Wang, F. *et al.* Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol* **4**, 513-518 (2002).
- 172. Weernink, P.A. *et al.* Activation of type I phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase isoforms by the Rho GTPases, RhoA, Rac1, and Cdc42. *J Biol Chem* **279**, 7840-7849 (2004).
- 173. Zheng, Y., Bagrodia, S. & Cerione, R.A. Activation of phosphoinositide 3kinase activity by Cdc42Hs binding to p85. *J Biol Chem* **269**, 18727-18730 (1994).
- 174. Houssa, B., de Widt, J., Kranenburg, O., Moolenaar, W.H. & van Blitterswijk, W.J. Diacylglycerol kinase theta binds to and is negatively regulated by active RhoA. *J Biol Chem* **274**, 6820-6822 (1999).
- 175. Hess, J.A., Ross, A.H., Qiu, R.G., Symons, M. & Exton, J.H. Role of Rho family proteins in phospholipase D activation by growth factors. *J Biol Chem* **272**, 1615-1620 (1997).
- 176. Illenberger, D. *et al.* Stimulation of phospholipase C-beta2 by the Rho GTPases Cdc42Hs and Rac1. *EMBO J* **17**, 6241-6249 (1998).
- 177. Takeya, R. & Sumimoto, H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells* **16**, 271-277 (2003).
- 178. Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247-269 (2005).

- 179. Olson, M.F., Ashworth, A. & Hall, A. An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* **269**, 1270-1272 (1995).
- 180. Yamamoto, M. *et al.* ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* **8**, 1449-1455 (1993).
- 181. Coleman, M.L., Marshall, C.J. & Olson, M.F. RAS and RHO GTPases in G1phase cell-cycle regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 355-366 (2004).
- 182. Joyce, D. *et al.* Integration of Rac-dependent regulation of cyclin D1 transcription through a nuclear factor-kappaB-dependent pathway. *J Biol Chem* **274**, 25245-25249 (1999).
- 183. Westwick, J.K. *et al.* Rac regulation of transformation, gene expression, and actin organization by multiple, PAK-independent pathways. *Mol Cell Biol* **17**, 1324-1335 (1997).
- 184. Welsh, C.F. *et al.* Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nat Cell Biol* **3**, 950-957 (2001).
- 185. Roovers, K. & Assoian, R.K. 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 (2003).
- 186. Mettouchi, A. *et al.* Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G(1) phase of the cell cycle. *Mol Cell* **8**, 115-127 (2001).
- 187. Chou, M.M., Masuda-Robens, J.M. & Gupta, M.L. Cdc42 promotes G1 progression through p70 S6 kinase-mediated induction of cyclin E expression. *J Biol Chem* **278**, 35241-35247 (2003).
- 188. Olson, M.F., Paterson, H.F. & Marshall, C.J. Signals from Ras and Rho GTPases interact to regulate expression of p21Waf1/Cip1. *Nature* **394**, 295-299 (1998).
- 189. Weber, J.D., Hu, W., Jefcoat, S.C., Jr., Raben, D.M. & Baldassare, J.J. Rasstimulated extracellular signal-related kinase 1 and RhoA activities coordinate platelet-derived growth factor-induced G1 progression through the independent regulation of cyclin D1 and p27. *J Biol Chem* **272**, 32966-32971 (1997).
- 190. Lai, J.M., Wu, S., Huang, D.Y. & Chang, Z.F. Cytosolic retention of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and a Rhoassociated kinase-mediated signal impair expression of p21(Cip1/Waf1) in phorbol 12-myristate-13- acetate-induced apoptotic cells. *Mol Cell Biol* **22**, 7581-7592 (2002).
- 191. Sahai, E., Olson, M.F. & Marshall, C.J. Cross-talk between Ras and Rho signalling pathways in transformation favours proliferation and increased motility. *EMBO J* **20**, 755-766 (2001).
- 192. Hu, W., Bellone, C.J. & Baldassare, J.J. RhoA stimulates p27(Kip) degradation through its regulation of cyclin E/CDK2 activity. *J Biol Chem* **274**, 3396-3401 (1999).
- 193. Vidal, A., Millard, S.S., Miller, J.P. & Koff, A. Rho activity can alter the translation of p27 mRNA and is important for RasV12-induced

transformation in a manner dependent on p27 status. *J Biol Chem* **277**, 16433-16440 (2002).

- 194. Jaffe, A.B. & Hall, A. Rho GTPases in transformation and metastasis. *Adv Cancer Res* **84**, 57-80 (2002).
- 195. Rosenblatt, J., Cramer, L.P., Baum, B. & McGee, K.M. Myosin II-dependent cortical movement is required for centrosome separation and positioning during mitotic spindle assembly. *Cell* **117**, 361-372 (2004).
- 196. Wittmann, T. & Waterman-Storer, C.M. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* **114**, 3795-3803 (2001).
- 197. Gotta, M., Abraham, M.C. & Ahringer, J. CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in C. elegans. *Curr Biol* **11**, 482-488 (2001).
- 198. Ahringer, J. Control of cell polarity and mitotic spindle positioning in animal cells. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 73-81 (2003).
- 199. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**, 489-498 (2001).
- 200. Peterson, F.C., Penkert, R.R., Volkman, B.F. & Prehoda, K.E. Cdc42 regulates the Par-6 PDZ domain through an allosteric CRIB-PDZ transition. *Mol Cell* **13**, 665-676 (2004).
- 201. Yasuda, S. *et al.* Cdc42 and mDia3 regulate microtubule attachment to kinetochores. *Nature* **428**, 767-771 (2004).
- 202. Glotzer, M. Animal cell cytokinesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 351-386 (2001).
- 203. Komatsu, S., Yano, T., Shibata, M., Tuft, R.A. & Ikebe, M. Effects of the regulatory light chain phosphorylation of myosin II on mitosis and cytokinesis of mammalian cells. *J Biol Chem* **275**, 34512-34520 (2000).
- 204. Matsumura, F., Ono, S., Yamakita, Y., Totsukawa, G. & Yamashiro, S. Specific localization of serine 19 phosphorylated myosin II during cell locomotion and mitosis of cultured cells. *J Cell Biol* **140**, 119-129 (1998).
- 205. Yamashiro, S. *et al.* Citron kinase, a Rho-dependent kinase, induces diphosphorylation of regulatory light chain of myosin II. *Mol Biol Cell* **14**, 1745-1756 (2003).
- 206. Di Cunto, F. *et al.* Defective neurogenesis in citron kinase knockout mice by altered cytokinesis and massive apoptosis. *Neuron* **28**, 115-127 (2000).
- 207. Kosako, H. *et al.* Rho-kinase/ROCK is involved in cytokinesis through the phosphorylation of myosin light chain and not ezrin/radixin/moesin proteins at the cleavage furrow. *Oncogene* **19**, 6059-6064 (2000).
- 208. Madaule, P. *et al.* Role of citron kinase as a target of the small GTPase Rho in cytokinesis. *Nature* **394**, 491-494 (1998).
- 209. Lee, J.S., Kamijo, K., Ohara, N., Kitamura, T. & Miki, T. MgcRacGAP regulates cortical activity through RhoA during cytokinesis. *Exp Cell Res* **293**, 275-282 (2004).
- 210. Prokopenko, S.N. *et al.* A putative exchange factor for Rho1 GTPase is required for initiation of cytokinesis in Drosophila. *Genes Dev* **13**, 2301-2314 (1999).

- 211. Tatsumoto, T., Xie, X., Blumenthal, R., Okamoto, I. & Miki, T. Human ECT2 is an exchange factor for Rho GTPases, phosphorylated in G2/M phases, and involved in cytokinesis. *J Cell Biol* **147**, 921-928 (1999).
- 212. Oceguera-Yanez, F. *et al.* Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. *J Cell Biol* **168**, 221-232 (2005).
- 213. Ehrlich, J.S., Hansen, M.D. & Nelson, W.J. Spatio-temporal regulation of Rac1 localization and lamellipodia dynamics during epithelial cell-cell adhesion. *Dev Cell* **3**, 259-270 (2002).
- 214. Jacinto, A. *et al.* Dynamic actin-based epithelial adhesion and cell matching during Drosophila dorsal closure. *Curr Biol* **10**, 1420-1426 (2000).
- 215. Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M. & Fuchs, E. Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* **100**, 209-219 (2000).
- 216. Noritake, J. *et al.* Positive role of IQGAP1, an effector of Rac1, in actinmeshwork formation at sites of cell-cell contact. *Mol Biol Cell* **15**, 1065-1076 (2004).
- 217. Irie, K., Shimizu, K., Sakisaka, T., Ikeda, W. & Takai, Y. Roles and modes of action of nectins in cell-cell adhesion. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 643-656 (2004).
- 218. Kawakatsu, T. *et al.* Trans-interactions of nectins induce formation of filopodia and Lamellipodia through the respective activation of Cdc42 and Rac small G proteins. *J Biol Chem* **277**, 50749-50755 (2002).
- 219. Fukuhara, T. *et al.* Activation of Cdc42 by trans interactions of the cell adhesion molecules nectins through c-Src and Cdc42-GEF FRG. *J Cell Biol* **166**, 393-405 (2004).
- 220. Ridley, A.J. *et al.* Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709 (2003).
- 221. Gardiner, E.M. *et al.* Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. *Curr Biol* **12**, 2029-2034 (2002).
- 222. Itoh, R.E. *et al.* Activation of rac and cdc42 video imaged by fluorescent resonance energy transfer-based single-molecule probes in the membrane of living cells. *Mol Cell Biol* **22**, 6582-6591 (2002).
- 223. Kraynov, V.S. *et al.* Localized Rac activation dynamics visualized in living cells. *Science* **290**, 333-337 (2000).
- 224. Li, Z. *et al.* Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* **114**, 215-227 (2003).
- 225. Merlot, S. & Firtel, R.A. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* **116**, 3471-3478 (2003).
- 226. Worthylake, R.A. & Burridge, K. RhoA and ROCK promote migration by limiting membrane protrusions. *J Biol Chem* **278**, 13578-13584 (2003).
- 227. Nobes, C.D. & Hall, A. Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* **144**, 1235-1244 (1999).

- 228. Sahai, E. & Marshall, C.J. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat Cell Biol* **5**, 711-719 (2003).
- 229. Allen, W.E., Zicha, D., Ridley, A.J. & Jones, G.E. A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* **141**, 1147-1157 (1998).
- 230. Simon, M.N. *et al.* Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast matingpheromone signal pathway. *Nature* **376**, 702-705 (1995).
- 231. Cau, J. & Hall, A. Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J Cell Sci* **118**, 2579-2587 (2005).
- 232. Wunnenberg-Stapleton, K., Blitz, I.L., Hashimoto, C. & Cho, K.W. Involvement of the small GTPases XRhoA and XRnd1 in cell adhesion and head formation in early Xenopus development. *Development* **126**, 5339-5351 (1999).
- 233. Tada, A., Nishihara, T. & Kato, H. Bone morphogenetic protein 2 suppresses the transformed phenotype and restores actin microfilaments of human lung carcinoma A549 cells. *Oncol. Rep.* **5**, 1137-1140 (1998).
- 234. Dorai, H. & Sampath, T.K. Bone morphogenetic protein-7 modulates genes that maintain the vascular smooth muscle cell phenotype in culture. *J. Bone Joint Surg. Am.* **83-A Suppl 1**, S70-78 (2001).
- 235. Liu, J.P. & Jessell, T.M. A role for rhoB in the delamination of neural crest cells from the dorsal neural tube. *Development* **125**, 5055-5067 (1998).
- 236. Vinall, R.L. & Reddi, A.H. The effect of BMP on the expression of cytoskeletal proteins and its potential relevance. *J. Bone Joint Surg. Am.* **83-A**, S63-69. (2001).
- 237. Foletta, V.C. *et al.* Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* **162**, 1089-1098 (2003).
- 238. Theriault, B.L., Shepherd, T.G., Mujoomdar, M.L. & Nachtigal, M.W. BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* **28**, 1153-1162 (2007).
- 239. Kowanetz, M., Valcourt, U., Bergstrom, R., Heldin, C.H. & Moustakas, A. Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol* **24**, 4241-4254 (2004).
- 240. Valcourt, U., Kowanetz, M., Niimi, H., Heldin, C.H. & Moustakas, A. TGFbeta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* **16**, 1987-2002 (2005).
- 241. Lee, S. & Helfman, D.M. Cytoplasmic p21Cip1 is involved in Ras-induced inhibition of the ROCK/LIMK/cofilin pathway. *J Biol Chem* **279**, 1885-1891 (2004).
- 242. Tanaka, H. *et al.* Cytoplasmic p21(Cip1/WAF1) regulates neurite remodeling by inhibiting Rho-kinase activity. *J Cell Biol* **158**, 321-329 (2002).
- 243. Denicourt, C. & Dowdy, S.F. Cip/Kip proteins: more than just CDKs inhibitors. *Genes Dev.* **18**, 851-855 (2004).

- 244. Shi, Y. & Massague, J. Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* **113**, 685-700 (2003).
- 245. Siegel, P.M. & Massague, J. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nat Rev Cancer* **3**, 807-821 (2003).
- 246. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254 (1976).
- 247. Papakonstanti, E.A. & Stournaras, C. Actin cytoskeleton architecture and signaling in osmosensing. *Methods Enzymol* **428**, 227-240 (2007).
- 248. Papakonstanti, E.A., Kampa, M., Castanas, E. & Stournaras, C. A rapid, nongenomic, signaling pathway regulates the actin reorganization induced by activation of membrane testosterone receptors. *Mol Endocrinol* **17**, 870-881 (2003).
- 249. Papadopoulou, N. *et al.* Membrane androgen receptor activation triggers down-regulation of PI-3K/Akt/NF-kappaB activity and induces apoptotic responses via Bad, FasL and caspase-3 in DU145 prostate cancer cells. *Mol Cancer* **7**, 88 (2008).
- 250. Heldin, C.H., Landstrom, M. & Moustakas, A. Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition. *Curr Opin Cell Biol* **21**, 166-176 (2009).
- 251. Heasman, S.J. & Ridley, A.J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690-701 (2008).
- 252. Katoh, K., Kano, Y., Amano, M., Kaibuchi, K. & Fujiwara, K. Stress fiber organization regulated by MLCK and Rho-kinase in cultured human fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol* **280**, C1669-1679 (2001).
- 253. Narumiya, S., Tanji, M. & Ishizaki, T. Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 65-76 (2009).
- 254. Parrini, M.C., Matsuda, M. & de Gunzburg, J. Spatiotemporal regulation of the Pak1 kinase. *Biochem Soc Trans* **33**, 646-648 (2005).
- 255. Bernard, O. Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1071-1076 (2007).
- 256. Bernstein, B.W. & Bamburg, J.R. ADF/cofilin: a functional node in cell biology. *Trends Cell Biol* **20**, 187-195 (2010).
- 257. Oser, M. & Condeelis, J. The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. *J Cell Biochem* **108**, 1252-1262 (2009).
- 258. Takashima, S. Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. *Circ J* **73**, 208-213 (2009).
- 259. Lee-Hoeflich, S.T. *et al.* Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J* **23**, 4792-4801 (2004).
- 260. Gamell, C. *et al.* BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity. *J Cell Sci* **121**, 3960-3970 (2008).
- 261. Vardouli, L., Moustakas, A. & Stournaras, C. LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* **280**, 11448-11457 (2005).
- 262. Hocking, J.C. *et al.* LIMK1 acts downstream of BMP signaling in developing retinal ganglion cell axons but not dendrites. *Dev Biol* **330**, 273-285 (2009).
- 263. Fukata, Y., Amano, M. & Kaibuchi, K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci* **22**, 32-39 (2001).
- 264. Vasilaki, E. *et al.* Transcriptional regulation of the small GTPase RhoB gene by TGF{beta}-induced signaling pathways. *FASEB J* **24**, 891-905.
- 265. Pi, X. *et al.* Sequential roles for myosin-X in BMP6-dependent filopodial extension, migration, and activation of BMP receptors. *J Cell Biol* **179**, 1569-1582 (2007).
- 266. Totsukawa, G. *et al.* Distinct roles of ROCK (Rho-kinase) and MLCK in spatial regulation of MLC phosphorylation for assembly of stress fibers and focal adhesions in 3T3 fibroblasts. *J Cell Biol* **150**, 797-806 (2000).
- 267. Goggins, M. *et al.* Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res* **58**, 5329-5332 (1998).

<u>10. Δημοσιεύσεις</u>

# Regulation of myosin light chain function by BMP signaling controls actin cytoskeleton remodeling

# Georgios Konstantinidis<sup>1</sup>, Aristidis Moustakas<sup>2,3\*</sup> and Christos Stournaras<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, University of Crete Medical School, Heraklion, GR-71110 Greece. <sup>2</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, Uppsala University, Box 595 Biomedical Center, Sweden. <sup>3</sup>Department of Medical Biochemistry and Microbiology, Science for Life Laboratory, Uppsala University, Sweden.

\* Corresponding authors:

C. Stournaras, Department of Biochemistry, University of Crete Medical School, Heraklion, GR-71110, Greece. Tel.: +30-2810-394563. Fax: +30-2810-394530. E-mail: <u>cstourn@med.uoc.gr</u>.

A. Moustakas, Ludwig Institute for Cancer Research, Box 595, SE-751 24 Uppsala, Sweden. Tel.: +46-18-160411. Fax: +46-18-160420. E-mail: aris.moustakas@licr.uu.se

## Running head: BMP signaling and actin remodeling

## Key words:

Actin, bone morphogenetic protein, cytoskeleton, myosin light chain, myosin light chain kinase, Rho coiled-coiled kinase 1, transforming growth factor  $\beta$ 

## Abstract

*Background/Aims*: Actin cytoskeleton dynamics support and coordinate signaling events that control cell proliferation, differentiation and migration. Growth factors provide essential signals that act on multi-protein complexes that regulate actin assembly with myosin. We previously analyzed the action of the transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) and now extend our studies to the bone morphogenetic proteins (BMP) 7, an important regulator of stem cell function and bone differentiation.

*Methods*: Using a well-established cell model of actin dynamics, Swiss3T3 fibroblasts, we applied cell biological and biochemical approaches to monitor the pathway that links the BMP-7 receptors to the acto-myosin complex.

*Results*: We demonstrate that BMP-7 induces actin and focal adhesion remodeling in starved fibroblasts as potently as TGF-β. BMP-7 mediates changes of actin dynamics via the kinase ROCK1 and induces rapid activation of RhoA and RhoB with concomitant inactivation of Cdc42. These molecular events correlate well with induction of phosphorylation on Ser19 of the myosin light chain, but not with LIMK1 kinase activation. Depletion of endogenous myosin light chain inhibits actin remodeling induced by BMP-7. This novel pathway regulates fibroblast migration without affecting cell proliferation.

*Conclusion*: We establish a BMP-Rho-ROCK1 pathway, which targets myosin light chain to control actin remodeling in fibroblasts.

#### Introduction

Signal transduction pathways control the local and global architecture of actin microfilaments, which is a critical process supporting cellular morphogenesis and differentiation, proliferation, motility and secretion [1, 2]. In many cell types, signaling by various cytokines initiates a rapid reorganization of the actin cytoskeleton. Small GTPases of the Rho family play critical roles in transmitting the signals that target dynamic changes of the actin microfilament [3]. In a well-established signaling scenario, signaling receptors from the plasma membrane induce phosphorylation of guanine exchange factors, which results in the loading of a Rho family GTPase with GTP, thus locking the enzyme in its active form [4]. The activated Rho GTPase induces the kinase activity of the Rho coiled-coiled kinase 1 (ROCK1) [5] or alternatively can induce the p21-activated kinase 1 (PAK1) [6]. Downstream of the PAK1 and ROCK1 kinases act the related kinases LIM-kinase 1 and 2 (LIMK1 and LIMK2), which can be directly phosphorylated by their upstream regulators respectively [7]. A critical target of the LIMKs is cofilin, which is inactivated after phosphorylation, a condition required for actin polymerization to occur [8, 9]. The functional impact of the actin microfilament network on cell motility is controlled by its association with the myosin chain and regulatory enzymes that control the activity of myosin, such as myosin light chain kinases [10]. In summary, a coordinated cascade of GTPase and kinase activities control the assembly and contractility of the acto-myosin filaments in non-muscle cells, ensuring proper motility under the guidance of growth factors.

The transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) family of cytokines plays major roles in many different cellular processes, including proliferation, cell apoptosis, immune response and differentiation [11]. This family includes several cytokines, including bone morphogenetic proteins (BMPs) and activins. Misregulation of signaling in this family is involved in several diseases, including cancer [12, 13]. Like other ligands in the TGF- $\beta$  family, the BMPs signal through binding to two types of transmembrane serine/threonine kinase receptors. Ligand binding allows the constitutively active type II receptor to phosphorylate the type I receptor at its Gly-Ser juxtamembrane domain, thus activating the kinase activity of the type I receptor [14]. Activated BMP type I receptors phosphorylate receptor-regulated Smads (R-Smads), Smad1, Smad5 and Smad8 at the carboxy-terminal Ser-X-Ser motifs where after they form complexes with the common-mediator Smad (Co-Smad; Smad4) [14]. Together with Smad4, Smad1/5/8 accumulate in the nucleus and bind to the promoters of target genes to regulate their transcription. In addition to Smad signaling, the BMP receptors activate other signaling effectors such as TAK1 (TGF $\beta$ -activated kinase 1), p38 MAP kinase and JNK (c-Jun N-terminal kinase) [15].

The control of cell motility by TGF- $\beta$  is important during wound healing and cancer cell invasiveness [16, 17]. An important mechanism that mediates motility changes by TGF- $\beta$  is the regulation of the actin cytoskeleton by TGF- $\beta$ , a process that is currently understood in good detail [16, 18]. However, the role of BMP signaling in mediating changes on the actin cytoskeleton and acto-myosin contractility remains less explored [16]. A signaling pathway has been studied in

pulmonary cells and during dendritogenesis of neurons, whereby the long cytoplasmic tail of the BMP type II receptor binds directly to LIMK1 and sequesters it from regulating cofilin [19, 20]. Upon BMP signaling, LIMK1 dissociates from the BMP receptor and phosphorylates cofilin, thus affecting actin polymerization. During dendrite formation, the BMP type II receptor also binds to the c-Jun N-terminal kinase, which mediates the stabilization of microtubules, an event required for dendritogenesis concomitant to the actin remodeling [21]. A BMP receptor-LIMK1-microtubule (but not actin) pathway has also been delineated during neuronal synaptic stabilization in *Drosophila* [22], while in *Xenopus* retinal ganglia, LIMK1 was shown to be activated by the BMP type II receptor in axons but not dendrites [23]. These studies suggest a complexity and cell-type or species specificity of the BMP-LIMK1 pathway. In C2C12 myoblasts that undergo differentiation into osteoblasts in response to BMPs but also exhibit enhanced motility, BMP-2 was shown to initiate signaling via the Cdc42 small GTPase and the phosphoinositide-3'-kinase, which affected the activation of several PAK isoforms and LIMK1 [24]. This pathway had a critical impact on the actin cytoskeleton reorganization induced by BMP-2 in the motile myoblasts.

We have previously shown that TGF- $\beta$  signals in Swiss3T3 fibroblasts via its canonical type I receptor to elicit activation of RhoA and RhoB, and subsequent phosphorylation of LIMK2 and cofilin, as critical events during reorganization of the actin cytoskeleton [25]. We have now expended this work to the BMP signaling system and demonstrate that similar to TGF- $\beta$ , BMP-7 induces activation of RhoA and RhoB, however, this correlates with phosphorylation of ROCK1 and not of LIMK1/2. A consequence of this new pathway is the regulation of the myosin light chain (MLC) during BMP-induced remodeling of the actin network.

#### **Materials and Methods**

#### Reagents and transfections

Mouse Swiss3T3 and NIH3T3 fibroblasts were obtained from the American Type Culture Collection. Recombinant mature human TGF-β1 was from R&D Systems Inc., and mature recombinant BMP-7 was a gift from K. Sampath (Curis Inc.). ROCK inhibitor Y-27632 and MLCK inhibitor ML-7 were from Sigma. RT-PCR primers for RhoA, RhoB and Gapdh transcripts (Table 1) were from the Microchemistry lab, IMBB, FORTH (kindly provided by Dr. D. Kardassis). Mouse MLC-specific siRNA, 5'-GAGAAGGGCAGGAGCG GAA-3' (sense strand) corresponding to nucleotides 114–133 (Genbank ID: NM\_016754), by numbering as nucleotide 1 the A of the ATG translational start codon was from Eurofins MWG Operon. The Silencer negative control siRNA was from Ambion. Transient transfection of NIH3T3 cells in 6-well plates using 1.33μg siMLC or Silencer negative control and 5μL Lipofectamine 2000 transfection reagent (Invitrogen) per well was performed according to the manufacturer's instructions.

#### Direct Actin Fluorescence and Immunofluorescence Microscopy

Swiss3T3 cell monolayers were serum-starved for 24 h and then treated with 5 ng/mL TGF-  $\beta$ 1 or 30 ng/mL BMP-7; alternatively, cells were pretreated for 45 min with ROCK and MLCK inhibitors (10  $\mu$ M Y-27632 and 5  $\mu$ M ML-7 respectively) and then treated with 30 ng/mL BMP-7 as indicated in the corresponding figure legends. Cells were prepared as previously described [25]. Rhodamine-phalloidin was from Molecular Probes, Inc. (1:100 dilution); mouse monoclonal anti-vinculin (Clone VIN-11-5 1:500 dilution) was from Sigma-Aldrich; FITC-conjugated rabbit anti-mouse IgG (1:200 dilution) was from Chemicon. Slides were mounted using ProLong® Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen). Photomicrographs were obtained with a Leica DMLB microscope equipped with fluorescence illumination and photographed with Leica DC 300F camera, using the Leica Germany 40/0.75 HCX PL FLUOTAR objective lens and photographing at ambient temperature in the absence of immersion oil. Images were acquired with the camera's Leica IM 50 software and, using the Adobe Photoshop software, image memory content was reduced and brightness-contrast was adjusted.

#### Immunoblotting Analysis

Total protein extracts were analyzed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting as described previously [25]. For immunodetection, mouse monoclonal anti-RhoA (26C4, 1:100 dilution), rabbit

polyclonal anti-RhoB (119, 1:100 dilution), mouse monoclonal anti-Cdc42 (B-8, 1:100 dilution), rabbit anti-pLIMK1/2 (Thr508/505 1:100 dilution), goat anti-LIMK1 (C-18 1:100 dilution), were purchased from Santa Cruz Biotechnology, Inc., mouse anti-myosin (light chains) (clone MY-21 1:200 dilution) from Sigma-Aldrich, rabbit anti-phospho- p38 (Thr180/Tyr182 1:2000 dilution), rabbit anti-p38 (1:2,000 dilution), rabbit anti-phospo- p44/p42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204 1:2,000 dilution), rabbit anti-p44/p42 MAPK (Erk1/2) (1:2,000 dilution), rabbit anti-phospho-Myosin Light Chain 2 (Ser19 1:100 dilution) from Cell Signaling Technology, mouse anti-actin (Clone C4 1:1,000 dilution) from Chemicon International, rabbit anti-Smad1 (1:1,000 dilution) from Epitomics and rabbit anti- phospho-Smad1 (1:1,000 dilution) was produced in house (Ludwig Institute for Cancer Research). Secondary anti-mouse-IgG and anti-rabbit-IgG coupled to horseradish peroxidase were from Amersham Biosciences (1:10,000 dilution). Anti-goat-IgG coupled to horseradish peroxidase was from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (1:8,000 dilution). The enhanced chemiluminescence detection system was purchased from Amersham Biosciences. Protein band intensity was quantified using the Tina Scan v.2 software for image analysis. For biochemical determination of the ratio of soluble actin to total actin after desired stimulation as indicated in the corresponding figure legends, Swiss3T3 cells were incubated for 5 min in 0.3% Triton-X-100 lysis buffer (5 mM Tris, 2 mM EGTA, 300 mM sucrose, 400 µM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µM leupeptin, 2 µM phalloidin) and precipitated with equal volume of 6% perchloric acid [Total soluble cluster (Ts)]. Insoluble proteins were scraped and precipitated with 3% perchloric acid [Total insoluble cluster (Ti)]. Pellets were diluted in 0.1 M NaOH. Equal volumes of Ts and Ti clusters mixed with 2x sample buffer were analyzed by sodium dodecyl sulfate/polyacrylamide gel electrophoresis/Western blotting and band intensity of Ts cluster were divided with the summary (total) of the band intensity of Ts and Ti cluster.

#### Rho-GTP assay

For affinity precipitation with Rhotekin-RBD Protein GST Beads and PAK-GST Protein Beads (Cytoskeleton), Swiss3T3 cells were serum-starved for 24 h and then stimulated with 30 ng/mL BMP-7 as indicated in the corresponding figure legend. The cells were then washed with ice-cold Tris-buffered saline and lysed with cell lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.3 M NaCl, 2% IGEPAL ((Octylphenoxy)-polyethoxyethanol), 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 1 mM dithiolthreitol). Cleared cell lysates were incubated with 60 µg of Rhotekin-RBD Protein GST (glutathione S-transferase) beads for RhoA and RhoB and 20 µg PAK-GST Protein beads for Cdc42 at 4°C for 1 h and washed with wash buffer (25 mM Tris pH 7.5, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 40 mM NaCl, 10 µg/mL aprotinin, 10 µg/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 25 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 1 mM DTT). GTP- bound Rho was detected by immunoblotting using the appropriate antibody. Protein band intensity was quantified using the Tina Scan v.2 software.

## In Vitro Kinase Assay

Swiss3T3 cells were serum-starved for 24 h then treated or not with 10  $\mu$ M Y-27632 for 45 min and stimulated with 30 ng/mL BMP-7 for the time periods indicated in the corresponding figure legend. Then cells were washed with ice-cold Tris-buffered saline, suspended in lysis buffer (50 mM Tris pH 7.5, 1% Triton X-100, 500 mM NaCl, 10 mM NaF, 10% glycerol, 25 mM glycerophosphate, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> , 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 $\mu$ g/ml aprotinin, 2  $\mu$ g/ml leupeptin) and incubated on ice for 30 min. Cleared lysates were pre- adsorbed to A-protein-agarose beads (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) for 1 h at 4°C and centrifuged, the supernatants (equal amounts of protein) were subjected to immunoprecipitated LIMK1 beads were washed three times with kinase buffer (50 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 25 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) and incubated for 30 min at 30°C in 20  $\mu$ l of the kinase buffer containing 15  $\mu$ M ATP and 5  $\mu$ Ci of [<sup>32</sup>P] ATP (5,000 Ci/mmol, Amersham Biosciences). Proteins were resolved by 11% polyacrylamide gel electrophoresis (0.4% w/v sodium dodecyl sulfate), transferred onto nitrocellulose, and <sup>32</sup>P-labeled proteins were visualized by autoradiography on X-ray films.

Migration and Proliferation Assays Wound healing 100% confluent Swiss3T3 cells were serum-starved for 24 h, then treated or not with 10  $\mu$ M Y-27632 for 45 min, scratched and stimulated with 30 ng/mL BMP-7 for 24 h. Photomicrographs were obtained as described at Immunofluorescence Analysis and as indicated in the corresponding figure legend.

## MTT assay

12,000 Swiss3T3 cells per well of 96-well plate were serum-starved for 24 h, stimulated with 30 ng/mL BMP-7 for 20 h, and incubated with 0.25 mg/mL tetrazolium for 4 h. Then, insoluble purple formazan crystals were solubilized by the addition of 200 μL DMSO and color quantified by Model 680 Microplate Reader (Bio-Rad Laboratories (UK) Ltd) using measurement filter at 550 nm and reference filter at 655 nm.

## RT-PCR assay

Swiss3T3 cells were serum-starved for 24 h then stimulated with 30 ng/mL BMP-7 as indicated in the corresponding figure legend. Cell lysates were processed for total RNA extraction using Trizol reagent (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. The first cDNA strand was synthesized using Superscript II Rnase H-reverse transcriptase (Invitrogen). Amplification of mouse RhoA and RhoB cDNA were performed using the primers indicated in the Table 1. Normalization of cDNA production was performed by amplifying the mouse housekeeping glyceraldehydes-3'-phosphate dehydrogenase (Gapdh) gene. The quantification of the results was performed by measuring the intensity of the bands using the Tina Scan v.2 software.

#### Statistical analysis

Quantitative experimental data derived from actin solubility assays, proliferation assays and RT-PCR assays were analyzed statistically based on a standard two-tailed t-test for samples with unequal variance. Significance is indicated with p values as reported in the figure legends.

#### Results

#### BMP-7 induces rapid and sustained reorganization of the actin cytoskeleton

We previously delineated a mechanism that controls actin cytoskeleton reorganization downstream of TGF- $\beta$  in Swiss3T3 fibroblasts [25]. We then asked whether the same or a distinct molecular pathway could regulate actin dynamics downstream of the related cytokine BMP-7. Time course experiments where TGF- $\beta$ 1 and BMP-7 were compared side-by-side revealed that BMP-7 was equally potent as TGF- $\beta$ 1 in inducing rapid, robust and sustained actin reorganization in serum-starved Swiss3T3 cells (Fig. 1A). The architectural effect on actin microfilaments was quantified by measuring the Triton-X-100-soluble (Ts) and insoluble (Ti) levels of actin from the cells using quantitative immunoblotting [26]. As expressed in the sets of Fig. 1A and graphed in Fig. 1B, TGF- $\beta$ 1 induced a gradual reduction in the Ts/Total actin ratio, which is equivalent to an increase in polymerized (insoluble) actin, while BMP-7 induced a more rapid induction in actin polymerization that sustained for up to 24 h post-stimulation.

Actin reorganization is usually associated with formation of focal adhesions at the plasma membrane. We therefore co-stained the stimulated cells for polymerized actin and vinculin, a central component of focal adhesions (Fig. 2). BMP-7 potently induced large numbers of brightly stained focal adhesions localizing at the tips of actin stress fibers, similar to TGF- $\beta$ 1. We therefore conclude that BMP-7 signaling is equipotent to TGF- $\beta$  signaling in mediating actin reorganization in fibroblasts.

#### BMP-7 promotes cell migration without affecting cell proliferation

A strong physiological corollary of dynamic actin reorganization in response to growth factor signaling often is cell migration. We measured Swiss3T3 cell migration using a wound healing assay (Fig. 3A). Cells slowly migrated into the wound over the course of 24 h under serum starvation conditions. Upon stimulation with BMP-7, cell migration was significantly accelerated as visualized by the degree of wound closure (Fig. 3A). This finding agrees with the observed

actin reorganization occurring in the cells during the same time interval of 24 h.

Wound healing assays often measure the combined ability of cells to migrate and proliferate. For this reason we also measured the potential of BMP-7 in modulating cell proliferation under the same conditions (Fig. 3B). In the Swiss3T3 system, while TGF- $\beta$ 1 could potently stimulate cell proliferation as established before (and here used as positive control), BMP-7 failed to score significantly in any of the proliferation assays performed. These data suggest that BMP-7 stimulates a genuine actin reorganization that correlates with cell migration but not with any significant proliferative response of the target cells.

#### BMP-7 induces Smad1, MAPK and Rho GTPase signaling

In order to investigate the mechanism by which BMP-7 elicited its effects on the actin cytoskeleton, we assayed for a number of signaling proteins that are known to act downstream of the BMP receptors. Namely we focused on Smad1, the major Smad protein signaling downstream of BMP receptors, and on the mitogen activated protein kinases (MAPK) p38 and Erk1/2, which are also well-established as signaling downstream of BMP [15]. Finally, we also assayed the impact of BMP-7 on the activation of Rho GTPases as these enzymes are the best upstream regulators of dynamic actin reorganization in various cell systems [3, 18].

Analysis of the events occurring during the first 4 h after BMP-7 stimulation revealed immediate-early, robust and sustained induction of phospho-Smad1 levels (Fig. 4A). The antibody used recognizes phosphorylation of the two Cterminal serine residues of Smad1 that are directly phosphorylated by the BMP type I receptor, and serves as measurement of direct receptor signaling activity. Peak levels of phospho-Smad1 were achieved as early as 15 min poststimulation with BMP-7 in this cell system. BMP-7 stimulation did not appreciable affect the total levels of Smad1 protein as expected (Fig. 4A).

BMP-7 also induced the phosphorylation of p38 MAPK with a peak of phosphorylated levels at 1 h poststimulation (Fig. 4A). In contrast, the phosphorylated Erk1/2 levels were high in Swiss3T3 cells, despite the starvation from serum and BMP-7 did not appreciable affect those at the immediate-early time periods (30 min), however, the levels of phospho- Erk1/2 decreased gradually after 1 h of stimulation, whereas the total levels of Erk1/2 proteins remained constant (Fig. 4A). We conclude that the time-dependent effects of BMP-7 on actin reorganization best correlate with the activation of Smad1 and also possibly with the activation of p38 MAPK and deactivation of Erk1/2 MAPKs in Swiss3T3 cells.

In addition to Smad1 and p38 MAPK, BMP-7 stimulation gave rise to immediate-early and robust levels of GTPloaded RhoA and RhoB (Fig. 4B). The elevated levels of RhoA- GTP were evident within 15 min, remained up to 1 h poststimulation and then gradually decreased. Interestingly, RhoB-GTP activation remained almost unchanged during shortterm BMP-7 stimulation then it was clearly elevated within 2 h post-stimulation and remained active for at least up to 4 h. In contrast, the related small GTPase Cdc42 exhibited strong GTP-loaded levels in control serum-starved and notstimulated cells, which were rapidly reduced in response to BMP-7 (Fig. 4B).

We have recently described a transcriptional mechanism based on which TGF-β signaling, via Smads induces expression of the RhoB, but not of the RhoA, gene [27, 28]. We were therefore interested in testing whether BMP-7 could affect in a similar manner expression of RhoA or RhoB mRNA. RT-PCR assays demonstrated that indeed BMP-7 could induce reproducible, albeit weak levels of RhoB mRNA during the early phase (1-4 h) of the time course (Fig. 4C). In contrast, BMP-7 had no effect on RhoA gene expression. The induction of RhoB mRNA by BMP-7 was weaker than that recorded after TGF-β1 stimulation [28], and also significantly weaker than the induction of a well-established target gene of BMP signaling [29], the inhibitory Smad6 (Fig. 4D). Finally, the total protein levels of RhoB did not change appreciably during the 4-hour time course (Fig. 4B), suggesting that the weak regulation at the mRNA level may not be translated at the protein level.

We conclude that BMP-7 initiates a signaling pathway that involves both Smad1 and p38 MAPK. In addition, it induces robust RhoA-GTP levels, which cannot be mediated via a transcriptional mechanism mediated by the Smad pathway. It is assumed that early RhoA activation by BMP-7 controls mainly the early actin reorganization. In parallel, RhoB-GTP activation may govern the long-term actin reorganization events. These findings corroborate the RhoA/B GTPase activation profile shown in Fig. 4B.

#### The kinase ROCK1 mediates actin reorganization downstream of BMP-7

GTP-loaded RhoA is best known to induce the enzymatic activity of the kinase ROCK1 [3]. We therefore reasoned that if BMP-7 had an immediate impact on RhoA-GTP levels, which had functional significance, then interfering with the activity of the ROCK1 kinase should block the effects of BMP-7 on the cytoskeleton.

Indeed co-treatment of serum-starved cells with BMP-7 and the ROCK1 low molecular weight inhibitor Y-26763, completely blocked the potential for central actin stress fiber formation (Fig. 5A) while the peripheral actin structures remained unaffected. This is in line with previously reported effects of Y-26763 on the actin cytoskeleton of human foreskin fibroblasts [30]. The inhibitory effect of Y-26763 was quantified using soluble to insoluble actin immunoblotting and proved significant inhibition (Fig. 5B). The effect of the ROCK1 inhibitor against BMP-7 signaling that targets the actin cytoskeleton, is in good correlation with the effect of the same inhibitor against TGF- $\beta$ 1 signaling [25].

The same ROCK1 inhibitor was also potent in blocking cell migration in response to BMP-7 in the wound healing assay (Fig. 5C). There is a smaller wound closure and also additionally a lower density of migratory cells in the wound area when cells were treated with ROCK1 inhibitor. Thus, the ROCK1 activity is critical for mediating signals to actin, which can physiologically be translated to the ability of the cell to be motile.

In control experiments, we verified that the ROCK1 inhibitor did not perturb the activity of the upstream signaling by the BMP receptor, as measured by activation of phosphorylated levels of Smad1, p38 and Erk1/2 (Fig. 6). Indeed, co-treatment of cells with Y- 27632 and BMP-7 had no measurable impact on the kinetics or accumulation of C-terminally phosphorylated Smad1, or on the profiles of phospho-p38 and phospho-Erk1/2 MAPKs, as expected. We conclude that the Y-27632 inhibitor acts downstream of the Smad1 and MAPK signaling proteins and probably acts in a specific manner by limiting the activity of the ROCK1 kinase.

#### BMP-7 induces rapid and sustained myosin light chain phosphorylation

Signaling downstream of ROCK1 can be directed towards various kinases, including members of the PAK and LIMK families and further downstream substrates such as cofilin or MLC [5-10]. In order to rationally discriminate between these parallel signaling pathways, we made use of the ROCK1 inhibitor and theorized that for a specific pathway to be of relevance BMP-7 had to induce its activity and the ROCK1 inhibitor should block its activity. Based on the previously established critical role of LIMK1 downstream of BMP signaling in neuronal, kidney and myoblastic cells [19, 20, 24], we first tested for LIMK1 (Fig. 7A). Using an in vitro kinase assay with radioactive ATP and immunoprecipitates of endogenous LIMK1 from the BMP-7-stimulated cells, we could measure that BMP-7 induced a significant (3.5- fold) increase of LIMK1 phosphorylation (Fig. 7A). Unexpectedly, co-treatment of the cells with the Y-26732 inhibitor dramatically enhanced both control and BMP-7-stimualted levels of phosphorylated LIMK1 (Fig. 7A). A time-course experiment also demonstrated that phosphorylation of LIMK1 was induced rapidly and sustained for up to 3 h post-BMP-7 stimulation (Fig. 7B). These experiments reproduce the previous observations from different cell types [19, 20, 24]. However, the ability of Y-26732 to enhance LIMK1 activation by BMP-7, suggested that LIMK1 may not be the critical regulator that mediates the positive effects on the actin cytoskeleton. For the above reason, and based on failed attempts to measure significant effects on PAK family kinases (data not shown), we directed our attention on phosphorylation of MLC, an event with critical functional impact on acto-myosin remodeling associated with cell motility [10]. BMP-7 induced a rapid and time-dependent activation of phosphorylated (on Ser 19) MLC levels that sustained up to 4 h (Fig. 7C). Co-treatment of the cells with BMP-7 and Y-27632 effectively blocked the BMP-7-indiced phospho-MLC levels (Fig. 7D). We therefore conclude that the BMP-7-RhoA-ROCK1 pathway may be responsible for the regulation of the MLC protein, during BMP-7-mediated actin reorganization.

#### Phosphorylation of MLC is a critical event during BMP-7-induced actin remodeling

In order to evaluate the functional impact of MLC phosphorylation downstream of BMP-7 we took two complementary approaches, inhibition of the kinase that phosphorylates MLC, MLC kinase (MLCK), and direct knock down of MLC using RNAi. The MLCK inhibitor ML-7 had no impact on the actin cytoskeleton integrity in control serum-

starved cells (Fig. 7E). In contrast, ML-7 completely blocked the actin reorganization induced by BMP-7, which was especially evident after 24 h stimulation (Fig. 7E).

As indicated for the ROCK inhibitor, we verified in control experiments that the ML-7 inhibitor did not influence the activity of the upstream signaling by the BMP receptor, as measured by activation of phosphorylated levels of Smad1, p38 and Erk1/2 (Fig. 6). From these findings we conclude that the ML-7 inhibitor acts downstream of the Smad1 and MAPK signaling proteins and probably acts in a specific manner by limiting the activity of the MLC kinase as expected.

In a similar manner, depleting NIH3T3 cells from endogenous MLC using a specific siRNA prohibited BMP-7 from inducing effects on the actin cytoskeleton (Fig. 8A). The efficiency of knock down of endogenous MLC in these experiments was better than 85% (Fig. 8B). Under control conditions without BMP-7 stimulation, the same siRNA targeting MLC had no obvious impact on cell viability or actin cytoskeleton during the prolonged starvation applied in all these experiments (Fig. 8A). The same experiment, when performed in Swiss3T3 cells gave much weaker efficiency of knock down (less than 30%) and for this reason the NIH3T3 cell system was analyzed.

The combined experiments of MLCK inhibition and MLC siRNA convincingly establish that regulation of MLC function is a critical downstream target of BMP-7 signaling during actin remodeling.

#### Discussion

We present a new signaling pathway that mediates effects of a prominent member of the TGF- $\beta$  family, BMP-7, on the actin cytoskeleton (Fig. 9). This pathway resembles to some extent a pathway that we previously established downstream of TGF- $\beta$ 1 in the same fibroblast system [25]. However, the BMP-7 pathway diverges significantly and emphasizes possible unique signaling outputs that are pathway-specific. Based on evidence where specific kinase inhibitors were combined with assays for measuring phosphorylated levels of kinases and target substrates, we propose that BMP-7 signaling via Rho GTPases and the ROCK1 kinase eventually targets the regulatory subunit of the myosin complex, MLC, functionally impacting on the assembly of the acto-myosin cytoskeleton.

Signaling by BMP receptors in regulation of actin dynamics has been examined by a few recent reports [19, 20, 24]. A common signaling intermediate established from these reports has been the kinase LIMK1, which directly phosphorylates cofilin and thus controls the dynamic polymerization of actin. While we were able to measure activation of LIMK1 kinase activity after BMP-7 stimulation (Fig. 7A), much to our surprise, the ROCK1 inhibitor that blocks all effects of BMP-7 on the acto-myosin system and on cell motility (Fig. 5), it enhanced LIMK1 kinase activity (Fig. 7A). This result led us disqualify LIMK1 as a functionally relevant kinase that mediates cytoskeletal reorganization in response to BMP-7 in Swiss3T3 cells. However, the establishment of LIMK1 in the BMP-2 and BMP-7 pathways studied in neurons, kidney epithelial cells and myoblasts [19, 20, 24], does not all allow us to consider LIMK4 as a signaling mediator of lesser impact. However, it must be noted that the previous studies failed to establish a functional role of LIMK1 in cytoskeletal reorganization per se. LIMK1 was shown to be critical for dendritogenesis in cells in culture [20], while in vivo studies in *Xenopus* have demonstrated that LIMK1 is important for axonogenesis and not for dendritogenesis [23], introducing the complexity of functions a single protein, such as LIMK1 may exhibit in different cell types. The only direct demonstration of the role of a LIMK member downstream of a member of the TGF- $\beta$ /BMP family and affecting directly actin reorganization has been for LIMK2, which mediates signals downstream of TGF- $\beta$  [25]. Thus, the precise role of LIMK1 downstream of BMP receptors leading to actin remodeling requires further detailed analysis.

This study emphasizes regulation at the level of MLC phosphorylation downstream of BMP-7 (Fig. 7C). While MLC phosphorylation by MLCK is a widely established mechanism that controls the assembly of the acto-myosin filaments in muscle and non-muscle cell types [10, 31], its functional role during physiological events driven by TGF- $\beta$ /BMP family signaling has not been previously addressed. Although, we did not measure directly kinase activity of MLCK downstream of BMP-7 signaling, the evidence based on the MLCK inhibitor ML-7 and the RNAi experiments targeting MLC (Fig. 7E, 8), convincingly place this kinase and its substrate MLC as functionally important regulators of acto-myosin remodeling in fibroblasts responding to BMP-7.

Based on several experiments of pharmacologic inhibition of ROCK1 kinase (Fig. 5A,C, 6D), we place for the first time ROCK1 as the upstream kinase that mediates the effects of Rho GTPase activation in response to BMP-7. ROCK1 could be equally well activated by RhoA-GTP and RhoB-GTP [3, 5], and we found both of these small GTPases activated in

response to BMP-7 (Fig. 4B). However, we have not determined whether these two small GTPases play redundant roles in the process of actin reorganization. The possibility that these two small GTPases might function during distinct phases of the BMP-7 response deserves further detailed analysis. In addition, we failed to measure positive activation of Cdc42 by BMP-7 in the fibroblasts, whereas BMP-2 has been shown to induce this small GTPase in neurons and myoblasts [20, 24]. Whether the difference is based on the cell type or the specific ligand that activates the BMP receptors remains unknown.

Finally, as all previous studies primarily monitored Smad1 activation by BMP receptors during mobilization of the Rho GTPase/LIMK pathway [19, 20, 24], we also monitored the classical, so-called, non-Smad pathways of various MAPKs that are usually rapidly activated by TGF- $\beta$  family receptors (Fig. 4A). In addition to C-terminally phosphorylated Smad1, BMP-7 induces rapidly phosphorylation of p38 MAPK and dephosphorylation of Erk1/2 MAPK (Fig. 4A). The impact of these kinases in mediating activation of Rho GTPases remains unexplored. In fact, this is one of the least understood steps in the cascade of signaling events that link TGF- $\beta$  family receptors to the regulation of actin dynamics. In other words, we do not understand whether small GTPases of the Rho family become directly activated by the TGF- $\beta$ /BMP receptors or via the Smads or any of the rapidly induced MAPKs [18]. In addition, the phospho-inositide 3'-kinase has been implicated in the regulation of the actin cytoskeleton by BMP-2 [24]. However, the mechanism by which BMP receptors activate the phospholipid kinase or by which this kinase regulates Rho GTPases downstream of BMP remains unclear. This is an important area for future investigations.

In summary, we present novel evidence that links for the first time two well-established regulators of actomyosin assembly to the BMP pathway. One is the ROCK1 kinase acting downstream of Rho GTPases, and the other is MLCK and its substrate MLC, that regulate myosin function in the acto-myosin contractile fibril.

## Acknowledgements

The work was supported by the Greek Secretariat for Research and Technology (PENED Program  $03E\Delta 688$ ), the Ludwig Institute for Cancer Research and the Swedish Research Council grant K2007- 66X-14936-04-3. The authors declare no competing interests. We thank Drs. D. Kardassis and K. Sampath for valuable reagents.

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

# References

- 1 Papakonstanti EA, Stournaras C: Cell responses regulated by early reorganization of actin cytoskeleton. FEBS Lett 2008;582:2120-2127.
- 2 Pollard TD, Cooper JA: Actin, a central player in cell shape and movement. Science 2009;326:1208-1212.
- 3 Heasman SJ, Ridley AJ: Mammalian rho gtpases: New insights into their functions from in vivo studies. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;9:690-701.
- 4 Rossman KL, Der CJ, Sondek J: Gef means go: Turning on rho gtpases with guanine nucleotide-exchange factors. Nat Rev Mol Cell Biol 2005;6:167-180.
- 5 Narumiya S, Tanji M, Ishizaki T: Rho signaling, rock and mdia1, in transformation, metastasis and invasion. Cancer Metastasis Rev 2009;28:65-76.
- 6 Parrini MC, Matsuda M, de Gunzburg J: Spatiotemporal regulation of the pak1 kinase. Biochem Soc Trans 2005;33:646-648.
- 7 Bernard 0: Lim kinases, regulators of actin dynamics. Int J Biochem Cell Biol 2007;39:1071-1076.
- 8 Oser M, Condeelis J: The cofilin activity cycle in lamellipodia and invadopodia. J Cell Biochem 2009;108:1252-1262.
- 9 Bernstein BW, Bamburg JR: Adf/cofilin: A functional node in cell biology. Trends Cell Biol 2010;20:187-195.
- 10 Takashima S: Phosphorylation of myosin regulatory light chain by myosin light chain kinase, and muscle contraction. Circ J 2009;73:208-213.

- 11 Moustakas A, Heldin C-H: The regulation of  $tgf\beta$  signal transduction. Development 2009;136:3699-3714.
- 12 Gordon KJ, Blobe GC: Role of transforming growth factor-β superfamily signaling pathways in human disease. Biochim Biophys Acta 2008;1782:197-228.
- 13 Massagué J: Tgfβ in cancer. Cell 2008;134:215-230.
- 14 Miyazono K, Maeda S, Imamura T: Bmp receptor signaling: Transcriptional targets, regulation of signals, and signaling cross-talk. Cytokine Growth Factor Rev 2005;16:251-263.
- 15 Heldin C-H, Landström M, Moustakas A: Mechanism of tgf-β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelialmesenchymal transition. Curr Opin Cell Biol 2009;21:166-176.
- 16 Moustakas A, Heldin C-H: Dynamic control of tgf-β signaling and its links to the cytoskeleton. FEBS Lett 2008;582:2051-2065.
- 17 Padua D, Massagué J: Roles of tgfβ in metastasis. Cell Res 2009;19:89-102.
- 18 Kardassis D, Murphy C, Fotsis T, Moustakas A, Stournaras C: Control of transforming growth factor β signal transduction by small gtpases. FEBS J 2009;276:2947-2965.
- 19 Foletta VC, Lim MA, Soosairajah J, Kelly AP, Stanley EG, Shannon M, He W, Das S, Massagué J, Bernard O: Direct signaling by the bmp type ii receptor via the cytoskeletal regulator limk1. J Cell Biol 2003;162:1089-1098.
- 20 Lee-Hoeflich ST, Causing CG, Podkowa M, Zhao X, Wrana JL, Attisano L: Activation of limk1 by binding to the bmp receptor, bmprii, regulates bmp-dependent dendritogenesis. EMBO J 2004;23:4792-4801.
- 21 Podkowa M, Zhao X, Chow CW, Coffey ET, Davis RJ, Attisano L: Microtubule stabilization by bone morphogenetic protein receptor-mediated scaffolding of c-jun n-terminal kinase promotes dendrite formation. Mol Cell Biol 2010;30:2241-2250.
- 22 Eaton BA, Davis GW: Lim kinase1 controls synaptic stability downstream of the type ii bmp receptor. Neuron 2005;47:695-708.
- 23 Hocking JC, Hehr CL, Bertolesi G, Funakoshi H, Nakamura T, McFarlane S: Limk1 acts downstream of bmp signaling in developing retinal ganglion cell axons but not dendrites. Dev Biol 2009;330:273-285.
- 24 Gamell C, Osses N, Bartrons R, Ruckle T, Camps M, Rosa JL, Ventura F: Bmp2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires pi3-kinase and cdc42 activity. J Cell Sci 2008;121:3960-3970.
- 25 Vardouli L, Moustakas A, Stournaras C: Lim-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-β. J Biol Chem 2005;280:11448-11457.
- 26 Papakonstanti EA, Stournaras C: Actin cytoskeleton architecture and signaling in osmosensing. Methods Enzymol 2007;428:227-240.
- 27 Vardouli L, Vasilaki E, Papadimitriou E, Kardassis D, Stournaras C: A novel mechanism of tgfβ-induced actin reorganization mediated by smad proteins and rho gtpases. FEBS J 2008;275:4074-4087.
- 28 Vasilaki E, Papadimitriou E, Tajadura V, Ridley AJ, Stournaras C, Kardassis D: Transcriptional regulation of the small gtpase rhob gene by tgfβ-induced signaling pathways. FASEB J 2010;24:891-905.
- 29 Ishida W, Hamamoto T, Kusanagi K, Yagi K, Kawabata M, Takehara K, Sampath TK, Kato M, Miyazono K: Smad6 is a smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse smad6 promoter. J Biol Chem 2000;275:6075-6079.
- 30 Katoh K, Kano Y, Amano M, Kaibuchi K, Fujiwara K: Stress fiber organization regulated by mlck and rho-kinase in cultured human fibroblasts. Am J Physiol Cell Physiol 2001;280:C1669-1679.
- 31 Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K: Rho-rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. Trends Pharmacol Sci 2001;22:32-39.

# Table 1

Primer	Sequence
mRhoA sense	5' CCAGACTAGATGTAGTATTTTTTG 3'
mRhoA antisense	5' GAGCCAGACCCTGCAGTCCAG 3'
mRhoB sense	5' CCCACCGTCTTCGAGAACTA 3'
mRhoB antisense	5' CTTCCTTGGTCTTGGCAGAG 3'
GAPDH forward	5' ACCACAGTCCATGCCATCAC 3'
GAPDH reverse	5' TCCACCACCCTGTTGCTGTA 3'

Table 1. Primers that were used to amplify the transcripts of RhoA, RhoB, Smad6 and Gapdh genes.



**Fig. 1.** TGF- $\beta$ 1 and BMP-7 induce rapid and sustained reorganization of actin cytoskeleton in Swiss3T3 fibroblasts. A. Swiss3T3 fibroblasts serum-starved for 24 h were stimulated with 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 or 30 ng/mL BMP-7 for the indicated time periods. Cells were then fixed and direct fluorescence labeling with rhodamine-phalloidin and DAPI was carried out. A bar represents 10 µm. B. The ratios presented in bar graphs are showing mean values ± S.E. of Ts/Total of three distinct experiments (\*, p<0.05 and \*\*, p<0.01). The same ratios are also indicated within the microphotographs (low right corner).



**Fig. 2.** TGF-β1 and BMP-7 affect the distribution of vinculin in Swiss3T3 fibroblasts. Swiss3T3 fibroblasts were serumstarved for 24 h, then stimulated for 24 h and 48 h with 5 ng/mL TGF-β1 or 30 ng/mL BMP-7. Cells were then fixed and direct fluorescence labeling with rhodamine-phalloidin (red) and DAPI (blue) and immunofluorescence labeling with anti- vinculin (green) was carried out. There is extensive localization of vinculin at the ends of actin filaments (yellow spots) after 24 h and 48 h TGF-β1 and BMP-7 stimulation. A bar represents 20 μm.



**Fig. 3.** Regulation of cell migration and proliferation. A. BMP-7 induces migration in Swiss3T3 fibroblasts. 100% confluent Swiss3T3 fibroblasts serum-starved for 24 h scratched and stimulated with 30 ng/mL BMP-7 for 24 h showed induced migration activity. A bar represents 25  $\mu$ m. B. BMP-7 does not induce proliferation in Swiss3T3 fibroblasts. Swiss3T3 fibroblasts serum-starved for 24 h were stimulated with 5 ng/mL TGF- $\beta$ 1 and 30

ng/mL BMP-7 for 20 h. Then cells were incubated for 4 h with MTT reagent and the color intensity was recorded on a plate reader. TGF- $\beta$ 1 treatment induces proliferation of Swiss3T3 fibroblasts, however BMP-7 has a more moderate effect in proliferation. The bar graphs are showing mean values ± S.E. of fold increase proliferation of six distinct experiments (\*\*, p<0.01).



Fig. 4. Signaling pathways and gene regulation induced by BMP-7. A. BMP-7 affects the phosphorylation of Smad1 and MAPK in Swiss3T3 fibroblasts. Representative blots are showing the amount of Smad1, p38 and p44/p42 MAPK (Erk1/2) phosphorylation from 24 h-serum-starved non- stimulated (Control) and BMP-7-stimulated (30 ng/mL) Swiss3T3 fibroblasts for the indicated time periods. B. BMP-7 induces rapid GTP loading of RhoA and RhoB and GTP loss of Cdc42. Representative blots are showing the amount of active GTP-bound RhoA, RhoB and Cdc42, determined by a GST pulldown assay, from 24 h-serum-starved non- stimulated (Control) or BMP-7-stimulated (30 ng/mL) Swiss3T3 fibroblasts for the indicated time periods. BMP-7 stimulation for 15 min led to GTP loading of RhoA and RhoB. The most extensive GTP-loading occurs at 1 h of BMP-7 stimulation for RhoA and at 2 and 4 h for RhoB. Interestingly, there is GTP loss of Cdc42 at 15 and 30 min of BMP-7 stimulation. Numerical values between the immunoblots indicate densitometric fold change measurements of GTP-loaded band intensity normalized to the corresponding total protein band intensity. C and D. Representative RT-PCR experiments showing the amount of mRNA levels of RhoA, RhoB and Smad6 from nonstimulated (Control) and BMP-7-stimulated (30 ng/mL) Swiss3T3 fibroblasts for the indicated time periods. The ratios of band intensity of the specific cDNA normalized to the Gapdh cDNA are presented in bar graphs as mean values ± S.E. of the expressed RhoA, RhoB and Smad6 of three distinct experiments (\*, p<0.05 and \*\*, p<0.01) and are shown below each set of DNA gels. Although BMP-7 does not induce significant increase of RhoA mRNA levels, it does induce increased mRNA levels of RhoB (1-4 h treatment) and Smad6 (1-24 h treatment).



**Fig. 5.** The ROCK inhibitor Y-27632 blocks BMP-7-mediated actin reorganization. A. Swiss3T3 fibroblasts serum-starved for 24 h were stimulated with 30 ng/mL BMP-7 for the indicated time periods after pretreatment with 10  $\mu$ M Y-27632 for 45 min. Cells were fixed and stained with rhodamine-phalloidin and DAPI. A bar represents 10  $\mu$ m. B. The ratios presented in bar graphs are showing mean values ± S.E. of Ts/Total of three distinct experiments of BMP-7-stimulated (30 ng/mL) Swiss3T3 fibroblasts for 24 h (\*, p<0.05 and \*\*, p<0.01). C. The ROCK inhibitor Y-27632 affects BMP-7-induced migration in Swiss3T3 fibroblasts. 100% confluent Swiss3T3 fibroblasts serum-starved for 24 h were scratched and then were stimulated with 30 ng/mL BMP-7 for 24 h after pretreatment with 10  $\mu$ M Y-27632 for 45 min. Photos were taken for the indicated time periods. Y-27632-treated cells show much lower density at the healed area of the wound. The percentages under the low right corner of last line of the microphotographs are showing mean values ± S.E. of the wound closure of three distinct experiments. (\*, p<0.05 and \*\*, p<0.01). # represents the statistical analysis comparison between BMP-7 and BMP-7/Y-27632-induced closure of the wound (#, p<0.05). A bar represents 25  $\mu$ m.



**Fig. 6.** The ROCK inhibitor Y-27632 and MLCK inhibitor ML-7 do not affect the BMP-7-induced phosphorylation of Smad1 and MAPK in Swiss3T3 fibroblasts. A. Representative blots are showing the amount of Smad1, p38 and p44/p42 MAPK (Erk1/2) phosphorylation from 24 h-serum-starved non-stimulated (Control) and BMP-7-stimulated (30 ng/mL) Swiss3T3 fibroblasts for the indicated time periods after pretreatment with 10  $\mu$ M Y-27632 and 5  $\mu$ M ML-7 for 45 min. Total protein levels for Smad1, p38, Erk1/2 and actin are also shown. B. The ratios presented in bar graphs are showing the band intensity of pSmad1 normalized to the total Smad1 of untreated or Y-27632 and ML-7-co-treated fibroblasts as mean values ± S.E. of three distinct experiments. The kinetics of Smad1 phosphorylation of untreated or Y-27632 and ML-7-co-treated fibroblasts follows the same pattern.



**Fig. 7.** BMP-7 induces rapid and sustained LIMK and MLC phosphorylation in Swiss3T3 fibroblasts. A-D. ROCK inhibitor Y-27632 unexpectedly leads to an induction of LIMK1 phosphorylation and to a dramatic reduction of BMP-7-induced MLC phosphorylation. Representative experiment showing the amount of proteins from 24 h-serum-starved non-stimulated (Control) and BMP-7-stimulated (30 ng/mL) Swiss3T3 fibroblasts for the indicated time periods. Protein levels were determined by autoradiography (A: [32P]- $\gamma$ ATP in vitro kinase assay) and immunoblotting (B-D) with antibodies specific for phospho-LIMK1/2 (T508/505) and phospho-MLC (S19) (upper panels). The blots were analyzed by densitometry, and the intensity of the protein bands was normalized to the intensity of the corresponding actin band (lower panels B-D) and reported between the blots. E. MLCK inhibitor ML-7 blocks 24 h-BMP-7-mediated actin reorganization. Swiss3T3 fibroblasts serum-starved for 24 h were stimulated with 30 ng/mL BMP-7 for the indicated time periods after pretreatment with 5  $\mu$ M ML-7 for 45 min. Cells were fixed and stained with rhodamine- phalloidin and DAPI. A bar represents 10  $\mu$ m.



**Fig. 8.** Depletion of endogenous MLC using siRNA inhibits the actin reorganization induced by BMP-7. A. NIH3T3 fibroblasts were left untreated (Control) or transiently transfected with specific siMLC or negative control siRNAs for 24 h, then serum-starved for another 24 h and finally were stimulated with 30 ng/mL BMP-7 or not (-) for a final 24 h. Cells were fixed and stained with rhodamine-phalloidin and DAPI. A bar represents 10 µm. B. Corresponding immunoblot from the same cells treated as in panel A, for the MLC and control actin proteins.



**Fig. 9.** Schematic representation of proposed mechanisms regulating protein phosphorylation and expression, actin cytoskeleton reorganization and migration in Swiss3T3 fibroblasts following BMP-7 stimulation. Solid arrows indicate experimentally confirmed pathways. Dotted arrows indicate experimentally verified signaling steps with unknown intermediate components. The dotted arrow leading to RhoB mRNA expression signifies the verified, albeit weak, effects of BMP-7 signaling on RhoB mRNA accumulation. The action points of the pharmacological inhibitors used are also indicated.