

# Regulació de la migració cel·lular induïda per BMP-2



Cristina Gamell Fullà  
Barcelona, 2009





# **Regulació de la migració cel·lular induïda per BMP-2**

**Memòria de Tesi Doctoral**

**Cristina Gamell Fullà**

**Barcelona, 2009**



# **Regulació de la migració cel·lular induïda per BMP-2**

Memòria presentada per **Cristina Gamell Fullà** per optar  
al Grau de Doctor

Treball realitzat sota la direcció del Dr. Francesc Ventura Pujol a la  
Universitat de Barcelona (UB)

Tesi adscrita al Departament de Ciències Fisiològiques II, Facultat de  
Medicina, Universitat de Barcelona  
Programa de Biomedicina, bienni 2003-2005

**Francesc Ventura Pujol**

(Director de tesi)

**Cristina Gamell Fullà**

(Doctoranda)

Barcelona, 2009



Per l'avi Lluís,  
sempre tan a prop.





*Duda siempre de ti mismo,  
hasta que los datos no dejen lugar a dudas.*

Louis Pasteur



Increïble però cert, m'ha arribat el moment d'escriure els agraïments de la tesi! Després de sis anys a Bellvitge tinc tantes coses a agrair que no sé pas per on començar. Tota la tesi pensant que aquest seria l'apartat que primer escriuria i ves per on, haig de portar la tesi a imprimir d'aquí a menys d'una setmana i l'arxiu de word que porta per títol Agraïments encara no conté ni una línia. I és que ha estat una temporada amb tantes aventures i en tant bona companyia que faria falta una altra tesi sencera per agrair-vos-ho a tots i cada un de vosaltres tal i com us ho mereixeu.

Primer de tot li he d'agrair al Francesc que hagi estat el meu director de tesi. Com m'agrada sentir-te explicar el record que tens del meu primer dia a Bellvitge, jo tant calladeta i tímida...i després mira! Ha estat un honor aprendre al teu costat Francesc, moltes gràcies per tots els coneixements científics, per la paciència que sempre has demostrat, pels ànims quan les coses no sortien tal i com esperàvem, i sobretot per transmetre tant entusiasme per fer ciència. Milers de gràcies per la confiança i llibertat que des del primer dia m'has donat, doncs això m'ha permès créixer com a científica i com a persona. I sobretot, moltíssimes gràcies per ser tant proper en tot moment, fer formar part de les bromes del dia a dia, i per ensenyar-me la lliçó més important que m'emporto de Bellvitge...que la humilitat és una de les qualitats més important en un científic.

Y aunque como alguien decía todo jefe tiene un jefe, también quiero agradecer esta tesis de forma muy especial a mi "jefe" Nelson. Muchísimas gracias por tu eterna paciencia, por enseñarme a tener espíritu crítico, por darme el espacio para tomar decisiones, por contagiarme tu curiosidad, por escucharme y darme tan buenos consejos! En definitiva, agradecerte que aceptaras hacerte cargo de mí desde el primer momento, por dejar que descubriera las cosas por mi misma, por enseñarme a observar y por mostrarme que en la ciencia, como en todo, para que las cosas salgan bien se tienen que hacer con cariño. Me faltan palabras para agradecerte lo justo que has sido hasta el último momento...esta tesis también es un poco tuya.

També m'agradaria fer un agraïment especial al Francesc Viñals. Qui sap com haguessin anat les coses si hagués fet la tesi en un altre lloc...moltes gràcies per tants bons consells, però escoltar-me quan ho he necessitat, gràcies per ensenyar-me els secrets dels protocols quan no era la teva responsabilitat i per les xerrades científiques i no tant científiques.

I tot això no tindria sentit sense els nens i nenes del laboratori, que tinc la gran sort que més que companys de feina són amics! Són tantes les coses que us haig d'agrair que res del que pugui escriure aquí us faria justícia...Antonio, gracias por estar a mi lado desde el primer hasta el último día (y lo que nos queda!)...aún me acuerdo del día que te conocí, ese andaluz tan gracioso de eternos ojos azules...hemos vivido tantísimas cosas que mejor nos tomamos una cervecita y los recordamos juntos pero sobretodo gracias por escuchar mis explicaciones de Oz y por mostrarme lo mejorcito de la tierra andaluza y sus gentes! Y Maria José, la alicantina de sangre gitana, esa bocanada de aire fresco que ojalá hubiera llegado antes; Mari muchísimas gracias por tener siempre un ratito, por esas buenas sesiones de playa, esas charlas amenizadas con cervecita y millones de cosas más que tu ya sabes! Viva la Virgen de las Nieves! I a la Roser, la nina amb el cor més gran, moltíssimes gràcies per ser com ets moquet, per estar sempre quan ho he necessitat, per ser un tros de pa que es fa estimar, per compartir els bons i mals moments sempre amb aquesta mirada tant dolça. Vosaltres heu fet que el laboratori fos un lloc perfecte per créixer com a científica i com a persona, no cal que us digui que la nostra història no ha fet més que començar! I també hi ha l'Eddie, un remolí d'entusiasme que va arribar al laboratori quan més ho necessitàvem, moltes gràcies per l'alegria que aportes, perquè per molt que diguem...la teva passió per la ciència transmet molt bones vibracions, ànims i a menjar-se el món, que t'està esperant! Geniaaaaaa!

Volia agrair també a la resta de gent del departament que ha fet que el meu dia a dia fos especial. Al Santi i a la Júlia, per crear un ambient tant agradable. Als veïns del davant: al Dani; per ser-hi després de tants anys, per les converses a la terrassa i per fer-me riure cada vegada que et veig comprovant que has tancat bé la taquilla; i a les nenes que van arribar ara ja fa molt temps, la Mercè, per ensenyar-me els trucs per treballar amb PI3K, i l'Anna, per ser una caixa de sorpreses; i a la Diana, l'Alba i a la Camila, per l'alegria que despreneu. Als de can Bartrons: al Ramon, per tenir sempre un moment per fer-me riure i ser tant proper; a la Marta, la Nieves i l'Anna, per ser tant diferents però tant autèntiques i fer del vostre laboratori un lloc tant agradable! A l'Esther, que controla el cotarro i sempre té històries divertides per explicar; a la Laura, per ser tant dolça; y también a ti Miguel, porqué tu tranquilidad y buen humor consiguen alegrarle a una el día! I una mica més cap a la meitat del passadís, que són molts però una menció especial a l'Andy, perquè sense la teva ajuda informàtica no hagués pogut acabar aquesta tesi, infinites gràcies per la paciència que has tingut amb mi i per ajudar-me sempre amb un somriure; al José Carlos, que encara que a vegades aconsegueixi treure'm de

polleguera també em fa riure molt, gràcies per tenir un moment sempre que l'he necessitat! I a l'Àurea, una científica i mare estupenda, moltes gràcies per aportar el terme "cuquet de la ciència" que sempre ens puja l'ànim quan no obtenim els resultats que esperàvem. Al José Luís, per ajudar-me sempre i deixar-me remenar les carpetes de plasmidis i anticossos fins a trobar el que necessitava; i a l'Eduard, per les bromes a mig passadís, molts ànims amb la tesi que ja casi ho tenim això!

I també un agraïment especial a la resta de gent amb qui m'he creuat a Bellvitge i que ja han volat cap a altres llocs: a la Mercè, la noia de la rentadora que causa sensació allà on va, moltes gràcies per ser tant estupenda i per aquesta alegria tan sana que desprems; i al Joan, el poeta més tendre i divertit que existeix sobre la capa de la terra, moltes gràcies Joanet per totes les estones de riure, per les cançons amb les que ens alegres i els moments de confidències compartits; a la Bea, perquè més arte que la Amparo no lo tinene nadie; a l'Àlícia, per viure juntes la bogeria de les beques i per estar sempre disposada a fer sortides de nenes, et desitjo moltíssima sort Ali! A la Sílvia, per ser tant autèntica; i també al Ouadah, per cuinar el millor cuscus que mai he provat i per compartir aquella Feria amb tant bon humor! I molt especialment a la Eli, perquè encara que no vam coincidir mai a Bellvitge sense tu jo no hagués arribat mai a enviar aquell mail.

Agrair també al Benja i a l'Ester de l'SCT per ajudar-me en infinites ocasions i consentir el meu descontrol d'anades i vingudes; especialment al Benja, un mestre de la microscopia, moltíssimes gràcies per fer de la sala dels microscopis un lloc tant agradable, per tenir sempre temps per ajudar-me, per les sessions de l'in vivo, però sobretot per fer-me riure tant i per dedicar-me sempre una estoneta per fer la xerradeta...molts ànims amb la tesi super-papa!

And a special mention to Ora, to let me the opportunity to join her lab in St Vincent's Institute, to welcome me with open arms and to take care of me in every sense of the word! Thanks to make me feel so comfortable, I was so lucky to meet you in Oxford! I would also like to say thanks to Kevin, to introduce me to the "special seminars"; to Alice, for all the good moments inside and outside the lab; to Juliana, for the patience and to help me with the experiments; to Sheng, for the good moments, lots of fun and chats; to Rong to have always a moment to help me; and to Jiong, to allow me to listen "my favourite song" so many times. Hopefully I will be seeing all of you very soon! C-ya!

I si bé és cert que aquesta tesi és resultat d'hores al laboratori, tot plegat no hauria estat possible sense la gent de fora de Bellvitge que m'ha acompanyat durant aquests anys. A la colla de Gràcia, els amics de sempre, perquè sense dedicar-se a la ciència sempre m'han fet costat en les batalletes de laboratori. N'hem passat de tots colors i amb el temps ens hem convertit en una gran família. Un agraïment especial a les padrines, les millors amigues que un podria desitjar: a l'Aïna, gràcies per estar sempre a punt per tot amb un somriure encantador; a la Zori, per ensenyar-me que la valentia es pot demostrar de moltes maneres; a l'Alba, una artista amb una sensibilitat molt especial; a la Franki, per ser una curiosa insaciable i perquè per molt liada que vagis sempre hi ets quan més falta fas; a l'Anna, per tots els viatges que em fet juntes (i els que queden per fer!), només tu podies creuar mig món per 9 dies, moltíssimes gràcies amor; i molt especialment a la Paula, per estar sempre al meu costat...ara ja fa 28 anys...tita, necessitaria un altre tesi per agrair-te tots els moments que hem passat juntes, només dir-te que no hi ha honor més gran que ser la tieta Cris! I als nens: al Xavi, perquè m'has fet companyia en molts moments; al Quikupiku, per l'alegria i carinyo que transmetes, i sobretot per creure que un altra món és possible; al Bola, per estar lluny però sempre a prop, que arte mas grande tienes nene!; al Joselitorrrrrr, perquè tu lo vales mi amor; al Zappa, perquè al teu costat he après moltes coses; i al Willi, un músic entusiasta que d'aquí a ben poc temps estic segura que serà famós.

I a les nenes de la Facultat, bones amigues i més llestes que un pèsol totes elles, moltíssimes gràcies per tants soparets! A l'Ari, per ensenyar-me que treballar com una formigueta dóna els seus fruits i per ser el meu pal de paller en molts sentits, torna aviat que aquí se't troba a faltar; a la Xica, per fer-me riure sempre amb les seves històries i per la subtil manera de fer-me veure que un pot canviar la seva vida sempre que s'ho proposi; a la Barbis, perquè la imatge de tu ballant amb les ulleres penjades de la samarreta és la viva imatge de l'alegria!; i a l'Alba, per ser la princesa científica per definició!

I evidentment també un agraïment per...com ho diria?... als de Sants! A la Diana, la princesa du fesoà, el llucet de palangre més dolç i anarquista; a la Elenita, la gitana con el corazón mas grande, toda una artista del kohl, del baile flamenco y de millones de cosas más, te deseo lo más grande en Can Cisco; a Andres, maestro en el arte de coser y de contar historias, mi guapo coleccionista de souvenirs; i a l'Enric, per aguantar que expliqui milers de vegades la història de com et vaig conèixer a l'Institut!jiji!

I a la Serra, per ser al meu costat des de fa tants anys, sempre disposada a escoltar; al tarambana d'en Campeny, per ser el millor company de cine des de fa una eternitat; a la Cris, per aportar aire fresc al pis; a mi Mari Mònica, perquè tot i ser tant lluny sempre que vens tens un ratet per fer-me riure; a en Lina, per ser un amic en majúscules; to Arti, because beyond a shadow of a doubt you were "the key of Melbourne", I still laugh when I remember the definition of the king of the underground; and to Lauren, to be so cute with me in so many occasions.

I per últim, un agraïment molt especial a la meva família. A l'avi Lluís, enlloc s'està millor que "sota l'ala"; a la iaia Maria, perquè som pastades i coneixent-te a tu em conec més a mi mateixa; a la iaia Mercè, la millor padrina del món, perquè és tota dolçura; i a l'avi Miquel, perquè forma part del primer record que tinc d'infantesa, quan t'anava a esperar al camp de les Crostes quan tornaves de treballar...una imatge de pau. I a la tata, sense dubte la millor germana del mon mundial, només dir que...t'estimo fins a l'infinit i donant la volta! I a la nova adquisició a la nostre petita gran família, a l'Emili, per fer feliç a la tata i ser una persona encantadora en tots els sentits. I als meus pares, sense cap mena de dubte aquesta tesi ha estat possible gràcies a vosaltres, moltíssimes gràcies per confiar sempre en mi, per fer-me costat i animar-me a ser una millor persona.

Cris





# ABREVIATURES

<b>ALK</b> , <i>activin receptor-like kinase</i>	<b>E</b> , dia embrionari
<b>ATCC</b> , <i>American Type Culture Collection</i>	<b>EGF</b> , <i>epidermic growth factor</i>
<b>ATP</b> , adenosina 5'-trifosfat	<b>ES</b> , <i>standard desviation</i>
<b>AVE</b> , endoderm visceral anterior	<b>F-actina</b> , actina filamentosa
<b>BISC</b> , <i>BMP-induced signaling complexes</i>	<b>FBS</b> , <i>fetal bovine serum</i>
<b>BMPR</b> , <i>bone morphogenetic protein receptor</i>	<b>FGF</b> , <i>fibroblast growth factor</i>
<b>BSA</b> , <i>bovine serum albumine</i>	<b>G-actina</b> , actina globular
<b>Cdc42</b> , <i>cell division cycle-42</i>	<b>GAP</b> , <i>GTPase-activating protein</i>
<b>citoD</b> , citocalasina D	<b>GDF</b> , <i>growth differentiation factor</i>
<b>C-terminal</b> , extrem carboxi terminal	<b>GDI</b> , <i>guanine nucleotide dissociation inhibitor</i>
<b>Cto</b> , control	<b>GDP</b> , guanosina 5'-difosfat
<b>DMSO</b> , dimetilsulfòxid	<b>GEF</b> , <i>guanine nucleotide exchange factor</i>
<b>DTT</b> , ditionitritol	<b>GFP</b> , <i>green fluorescent protein</i>
<b>DVE</b> , extrem distal de l'endoderm visceral	<b>GPCR</b> , receptor acoblat a proteïna G
<b>GST</b> , <i>glutathione S-transferase</i>	<b>SARA</b> , <i>Smad anchor for receptors activation</i>
<b>GTP</b> , guanosina 5'-trifosfat	<b>SB</b> , inhibidor SB203580

**HA**, epítop HA (residus 98-106 de hemaglutinina del virus de la grip)

**HIS**, hexapèptid format per sis residus d'histidina

**HRP**, *horseradish peroxidase*

**I-Smad**, Smad inhibidora

**kDa**, *kilodalton*

**LIMK**, LIM quinasa

**LY**, inhibidor LY294002

**MAPK**, *mitogen-activated protein kinase*

**MTOC**, centre organitzador de microtúbuls

**Myc**, epítop myc (residus 408-439 de la proteïna p62<sup>c-myc</sup> humana)

**Ni-NTA**, àcid nitrilotriacètic amb ions Ni<sup>2+</sup> coordinats

**PAGE**, *polyacrylamide gel electrophoresis*

**PBS**, *phosphate-buffered saline*

**PFA**, *paraphormaldehyde*

**PFC**, *preformed hetero-oligomeric complexes*

**PI(3,4)P<sub>2</sub>**, fosfatidilinositol-(3,4)-bifosfat

**PI(3,4,5)P<sub>3</sub>**, **PIP<sub>3</sub>**, fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfat

**PI**, fosfatidilinositol

**PI3K**, fosfatidilinositol 3-quinasa

**PIP**, fosfatidilinositol

**PPH**, hipertensió pulmonar primària

**siRNA**, *small interference RNA*

**TBS**, *tris buffered saline*

**TBS-T**, *tris buffered saline-Tween-20*

**Tet**, tetraciclina

**TGFβ**, *transforming growth factor-β*

**Trb3**, *Tribbles-like protein 3*

**wt**, *wild type*

# ÍNDEX

## AGRAÏMENTS

## ABREVIATURES

## ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	1
1. Les proteïnes morfogèniques òssies (BMPs).....	1
1.1- Lligands BMPs i la seva regulació extracel·lular.....	1
1.2- Senyalització a través dels receptors de BMPs.....	4
1.3- La via de senyalització de les proteïnes Smads.....	7
1.4- Les vies de senyalització Smad-independent.....	10
2. BMPs i el control de la migració cel·lular durant l'embriogènesi.....	13
3. Hipertensió pulmonar primària i la regió C-terminal de BMPRII.....	17
4. Polarització cel·lular i migració quimiotàctica.....	24
4.1- Les petites GTPases de la família Rho.....	27
4.2- Efectors <i>downstream</i> de les Rho GTPases.....	30
Regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina.....	30
Regulació del citoesquelet de microtúbuls i la polaritat cel·lular.....	36
4.3- La família de proteïnes quinases lipídiques PI3K.....	40
Participació de les PI3Ks de classe I en la formació de protrusions.....	42
Participació de les PI3Ks de classe I en l'adhesió cel·lular.....	43

Participació de les PI3Ks de classe I en la migració coordinada d'un conjunt de cèl·lules.....	45
4.4- Les p38MAPKs.....	45
MATERIALS I MÈTODES .....	53
1. Tècniques de biologia molecular .....	53
1.1- Transformació de plasmidis de DNA .....	53
1.2- Purificació de DNA plasmídic .....	53
2. Tècniques de cultiu cel·lular .....	55
2.1- Cultiu cel·lular, transfecció i siRNA .....	55
2.2- Generació de clons estables induïbles.....	57
3. Tècniques de manipulació de proteïnes .....	58
3.1- Expressió en bacteries de proteïnes fusionades a GST .....	58
3.2- Preparació d'extractes cel·lulars.....	59
3.3- Purificació de proteïnes fusionades a GST .....	60
3.4- Immunoprecipitació .....	60
3.5- Purificació de proteïnes marcades amb His.....	61
3.6- Assaig quinasa .....	61
3.7- SDS-PAGE i <i>Western blot</i> .....	61
4. Tècniques citoquímiques: tinció de F-actina .....	64
5. Estudis funcionals.....	65
5.1-Assaigs de migració cel·lular .....	65
Assaig de migració quimiotàctica.....	65
Assaig de ferida .....	66
5.2- Assaig d'adhesió i <i>spreading</i> .....	67
6. Anàlisi estadístic.....	68
RESULTATS.....	69
1. BMP-2 estimula la migració cel·lular quimiotàctica .....	69
2. BMP-2 indueix canvis en l'ordenament del citoesquelet d'actina.....	75
3. Cdc42 participa en la regulació per part de BMP-2 de la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular .....	82

4. L'activitat PI3K és necessària en la regulació per part de BMP-2 de la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular .....	87
5. BMP-2 indueix l'activació de LIMK1 a través d'un mecanisme dependent de PI3K .....	93
6. BMP-2 estimula l'activitat Pak1 i Pak4 a través d'un mecanisme dependent de PI3K i de Cdc42 .....	95
7. Estudi de la rellevància funcional de la cua citoplasmàtica de BMPRII en els efectes de BMP-2 en la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.....	103
8. La via de senyalització de p38MAPK està implicada en els efectes de BMP-2 en la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.....	112
<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>123</b>
1. Impacte de BMP-2 en la dinàmica dels filaments d'actina i la migració cel·lular quimiotàctica .....	123
2. BMP-2 i els mecanismes moleculars involucrats en el control de la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular. ....	126
Participació de la GTPasa Cdc42 i de PI3K.....	126
Les proteïnes PAK, un mòdul integrador on convergeixen les senyals de Cdc42 i PI3K. ....	132
Rellevància funcional de la interacció de LIMK1 i la cua citoplasmàtica del BMPRII.....	134
Participació de la via de senyalització de p38MAPK .....	138
Relació entre les vies de senyalització PI3K/Cdc42-PAK-LIMK1 i p38-MK2	141
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>145</b>
<b>REFERÈNCIES.....</b>	<b>147</b>



# INTRODUCCIÓ

Les proteïnes morfogenètiques òssies (BMPs) estan involucrades en el control de múltiples processos cel·lulars com la proliferació, la determinació de llinatge, la diferenciació, la migració i la mort cel·lular. La seva expressió en un determinat context temporal i de manera específica en certs teixits, és responsable d'orquestrar processos que resulten claus durant el desenvolupament, l'homeòstasi i la reparació de teixits en l'organisme, des de *Drosophila* fins a humans. I el que resulta més interessant és que els efectes de les BMPs depenen en major proporció de la capacitat de resposta de les cèl·lules diana més que dels factors en si mateixos.

## **1. Les proteïnes morfogenètiques òssies (BMPs)**

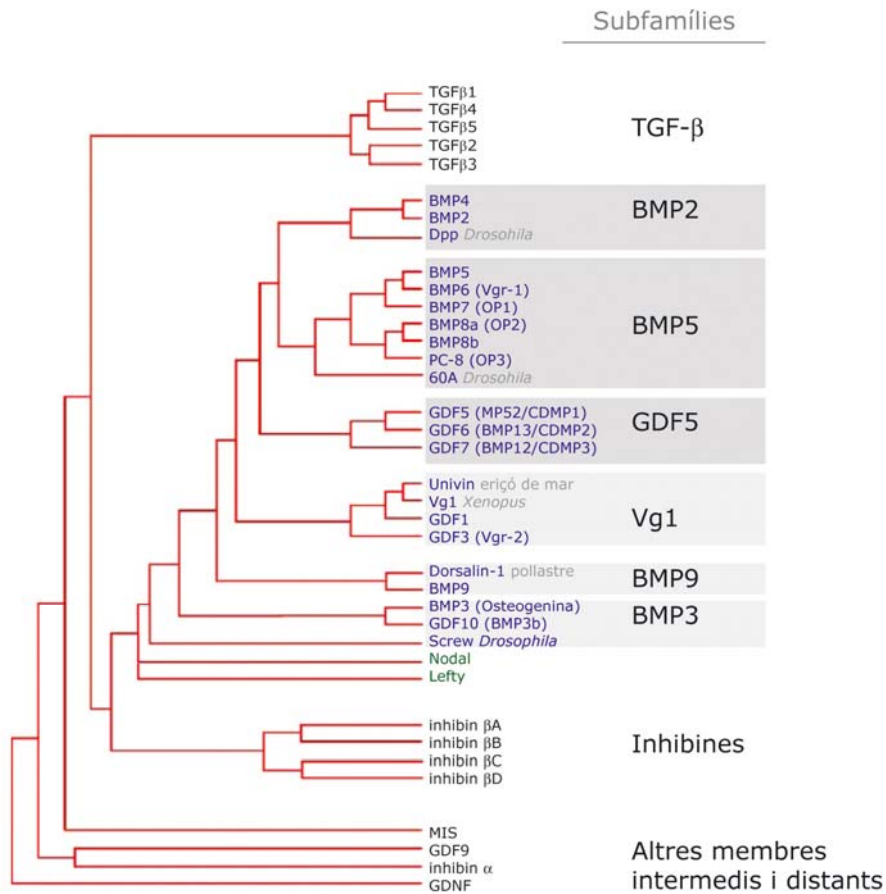
### **1.1- Lligands BMPs i la seva regulació extracel·lular**

Les proteïnes morfogenètiques òssies (BMPs) són factors de creixement que pertanyen a la superfamília de TGF- $\beta$ , una família de polipèptids secretats que inclouen 33 productes gènics diferents en humans, la majoria dels quals formen homodimers units per ponts disulfur. Els membres de la superfamília de TGF- $\beta$  han estat classificats en funció de la seva similitud estructural en diferents grups que inclouen TGF- $\beta$ s, BMPs, GDFs, activines, inhibines i la hormona anti-Müllerina (AMH). La subfamília de BMPs representa dos tercers parts de la superfamília de TGF- $\beta$  i conté més de 20 membres que s'han classificat en tres grups en funció de la similitud en la seva seqüència (Massague, 1998; Massague et al., 1994). BMP-2, BMP-4 i el producte gènic de *Drosophila melanogaster* (Dpp)

formen el grup BMP2; BMP-5, BMP-6, BMP-7 (també anomenat proteïna osteogènica 1, OP1), BMP-8 (OP2) i el producte gènic de *Drosophila* gbb-60A formen el grup BMP5; i GDF-5 (*growth differentiation factor-5*), GDF-6 i GDF-7 formen el grup GDF5. També formen part de la subfamília de BMPs altres membres com GDF-1 o BMP-3, no obstant la seva classificació no queda tant clara. A la Figura I1 es mostra la classificació dels membres de la superfamília de TGF- $\beta$  en funció de la seva homologia. Els membres de la subfamília de BMPs presenten diferents patrons d'expressió espaciotemporals i poden senyalitzar a través de diferents receptors de membrana, de tal manera que controlen nombrosos processos fisiològics durant l'embriogènesi i la formació d'òrgans així com en l'homeòstasi dels teixits en d'adult.

**Figura I1. La superfamília de TGF- $\beta$ .** Les BMPs (en color blau) són una gran subfamília dins de la superfamília de TGF- $\beta$ . Els mecanismes de senyalització de les BMPs han estat molt estudiats, en particular els de la família BMP2 i els de la família BMP5. Nodal i Lefty (en color verd) són membres distants de la subfamília de BMPs i senyalitzen per mecanismes que són similars als utilitzats per TGF- $\beta$  i activines. Adaptat de Kishigami and Mishina (2005).

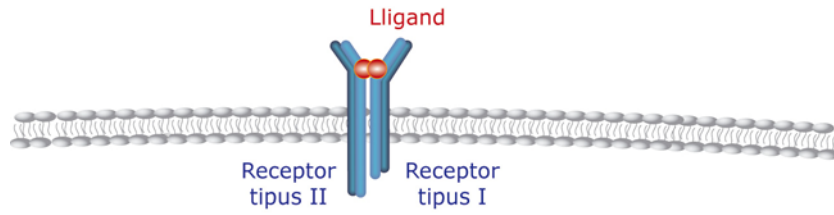




Les BMPs són secretades com a proteïnes precursors amb un domini hidrofòbic de 50-100 aminoàcids, de tal manera que les BMPs madures deriven de la regió C-terminal i s'obtenen per tall proteolític (Massague, 1990). Cada BMP conté set cisteïnes, sis de les quals formen un nòdul central crític per mantenir l'estructura tridimensional i la setena cisteïna intervé en la dimerització amb un segon monòmer (Wozney et al., 1988). Especialment durant l'embriogènesi, i possiblement també durant la homeòstasi tissular en adults, els membres de la superfamília de TGF- $\beta$  secretats viatgen certes distàncies des de les cèl·lules productores fins a les cèl·lules diana, formant d'aquesta manera gradients morfogènics (Gurdon and Bourillot, 2001; Lander, 2007). Aquests gradients de lligand són regulats per mecanismes complementaris com la secreció cel·lular específica a través del teixit, gradients de proteïnes extracel·lulars antagonistes que s'uneixen i inactiven els lligands i gradients de proteases que degraden els antagonistes extracel·lulars i alliberen dels seus lligands bioactius (De Robertis and Kuroda, 2004).

## 1.2- Senyalització a través dels receptors de BMPs

El membres de la superfamília de TGF- $\beta$  senyalitzen a través de la unió a un complex heterodimèric de receptors amb activitat serina/treonina quinasa anomenats de tipus I i de tipus II. La majoria de cèl·lules de mamífer expressen diferents membres d'aquests grups de receptors, alguns dels quals són compartits per diferents lligands de la superfamília de TGF- $\beta$  (Massague, 1998) (Figura I2). Tant els receptors tipus I com els tipus II són proteïnes transmembrana amb un domini extracel·lular d'unió a lligand ric en cisteïnes, un domini transmembrana  $\alpha$ -hèlice i un domini citoplasmàtic que clàssicament s'ha descrit que conté el domini quinasa i una seqüència proteica que conté dianes de fosforilació i actua com a *docking site* per a proteïnes adaptadores i de senyalització. S'han descrit fins al moment 7 receptors del tipus I (ALK1-ALK7) i 5 receptors del tipus II: els dos receptors activina/BMP ActRIIA i ActRIIB, el receptor de BMP (BMPRII), el receptor de TGF- $\beta$  (TGF $\beta$ RII) i el receptor de la hormona anti-Müllerina (AMHRII) (Feng and Derynck, 2005). Les BMPs senyalitzen a través de tres receptors del tipus I: ALK-2 (ActRIA), ALK-3 (BMPRI-IA) i ALK-6 (BMPRI-IB); i tres receptors del tipus II: BMPRII, ActRIIA i ActRIIB. La combinació de receptors al complex heterodimèric de membrana permet que s'hi uneixin certs lligands específicament o que tingui lloc una senyalització o una altra en resposta al mateix lligand (Feng and Derynck, 2005; Heldin et al., 1997; Shi and Massague, 2003) (Figura I2). Així, una combinació de receptors pot unir més d'un lligand, de tal manera que el patró d'expressió tant de lligands com de receptors és el que acaba definint quins receptors s'activeran. Per exemple, BMPRII es pot combinar amb tres receptors de tipus I, BMPRI-IA, BMPRI-IB i ActRIA per senyalitzar en resposta a diferents BMPs. En relació als receptors tipus I per a BMPs, BMPRI-IA i BMPRI-IB són estructuralment molt semblants entre elles, mentre que ActRIA presenta menys homologia en comparació amb els altres dos. BMP-2 i BMP-4 s'uneixen amb més afinitat a BMPRI-IA i BMPRI-IB, i els membres del grup BMP5 s'uneixen amb més afinitat a ActRIA i BMPRI-IB. Per altra banda, els membres del grup GDF5 s'uneixen únicament BMPRI-IB (Miyazono, 2002).



Lligand	Receptors Tipus II	Receptors Tipus I	R-Smad
BMP2	BMPRII	ALK-2 (ActRIA) ALK-3 (BMPRIA) ALK-6 (BMPRIB)	Smad1, Smad5, Smad8
BMP5	BMPRII ActRIIA	ALK-6 (BMPRIB) ALK-2 (ActRIA)	Smad1, Smad5, Smad8
GDF5	BMPRII ActRIIA	ALK-6 (BMPRIB)	Smad1, Smad5, Smad8
TGFβ	TGFβII	ALK-5 (TGFβRI) ALK-1	Smad2, Smad3 Smad1, Smad5, Smad8
Nodal	ActRIIA ? ActRIIB ?	ALK-4 (ActRIB) ALK-7	Smad2, Smad3
Activines	ActRIIA ActRIIB	ALK-2 (ActRIA) ALK-4 (ActRIB)	Smad2, Smad3
AMH	AMHRII	ALK-3 (BMPRIA)	Smad1, Smad8

**Figura I2. Receptors de la superfamília de TGF-β.** Els membres de la superfamília de TGF-β es poden unir a varies combinacions del receptors de tipus I i de tipus II, fet que defineix quin tipus de senyalització tindrà lloc. Al dibuix es representen les combinacions de lligands i receptors més freqüents. En color blau apareixen els lligands membres de la subfamília de BMPs i els receptors que utilitzen per senyalitzar. Adaptat de Massague et al. (2000) i Derynck and Zhang (2003).

L'acoblament del complex de receptors pels membres de les subfamílies de BMPs i TGF-β no té lloc de la mateixa manera. En el cas de TGF-β, el lligand s'uneix a TGFβRII i posteriorment es recluta ALK-5 (TGFβRI) al complex de forma cooperativa mitjançant contactes amb el

l·ligand i amb seqüències específiques de TGF $\beta$ RII, de tal manera que s'estabilitza el complex i s'activa TGF $\beta$ RI. La unió del l·ligand no incrementa l'estat de fosforilació dels receptors de tipus II ni la seva activitat quinasa *in vitro* (Attisano et al., 1996; Chen and Weinberg, 1995; Wrana et al., 1994), fet que suggereix que aquest grup de receptors són constitutivament actius i requereixen el l·ligand per interactuar amb els receptors de tipus I (Hogan, 1996a; Hogan, 1996b). En el cas de les BMPs, s'ha descrit que en general aquestes s'uneixen amb molta més afinitat als receptors de tipus I que als de tipus II, a excepció de GDF-9 que s'uneix a BMPRII amb alta afinitat (Vitt et al., 2002). S'ha proposat que l'especificitat de les accions estimulades per les BMPs s'aconsegueix, en part, per l'afinitat preferencial dels l·ligands per certs receptors (Rosenzweig et al., 1995; ten Dijke et al., 1994). Cada tipus cel·lular expressa una combinació de receptors específica, així com diferents molècules senyalitzadores que contribueixen a la diversitat de respostes de senyalització de les BMPs. Així, els receptors per a BMPs BMPRI-IA, BMPRI-IB i BMPRII es poden trobar a la superfície cel·lular formant complexos pre-formats hetero-oligomèrics o homo-oligomèrics (Gilboa et al., 2000). El grup de la Dra. Petra Knaus ha descrit un model mecànic segons el qual el tipus d'oligòmers que formen els receptors a la membrana determina la via de senyalització que s'activarà en resposta a la unió del l·ligand. Per exemple, en el cas de BMP-2, s'ha descrit que aquest: i) es pot unir amb gran afinitat als receptors de tipus I, BMPRI-IA i BMPRI-IB, i posteriorment reclutar BMPRII, induint així la formació d'un complex receptor hetero-oligomèric (*BMP-induced signaling complexes*, BISC) i activar la via de senyalització de p38; ii) o es pot unir directament a un complex receptor hetero-oligomèric pre-format (*preformed hetero-oligomeric complexes*, PFC) que consisteix en, com a mínim, un receptor del tipus I i un del tipus II. La unió de BMP-2 a aquest complex pre-format s'ha descrit que activa la via de senyalització de les proteïnes Smad (Hassel et al., 2003; Nohe et al., 2002; Nohe et al., 2003). Paral·lelament, també s'ha proposat que els receptors es poden localitzar en diferents dominis de membrana i que dita localització determina el tipus d'endocitosi mitjançant la qual seran processats, fet que també s'ha relacionat amb l'activació preferencial de rutes Smad-dependents o Smad-independents. En aquest context, Hartung et al. han demostrat que s'activa de manera preferencial la ruta de senyalització dependent de les Smads quan el complex receptor no es troba localitzat en dominis *rafts* o rics en caveoles, i que la senyalització iniciada als BISC és dependent de receptors localitzats a dominis *rafts* i dominis rics en caveoles (Hartung et al., 2006).

La unió de les BMPs al complex receptor permet que el receptor de tipus II trans-fosforili el domini ric en GS (glicina-serina) pròxim al domini

transmembrana del receptor de tipus I. Aquesta reacció de fosforilació canvia la conformació del receptor de tipus I i permet l'alliberament de xaperones, com és el cas de FKBP12, que actuen com a reguladors negatius, de tal manera que tenen lloc altres canvis conformacionals en el domini quinasa del receptor de tipus I que permeten la seva activació (Hogan, 1996a). Posteriorment, el receptor tipus I catalitza la fosforilació d'efectors de senyalització, com per exemple de les proteïnes Smad. Segons aquest model, la única funció dels receptors de tipus II és la fosforilació del receptor de tipus I, no obstant, en els últims anys s'ha descrit que aquests receptors regulen altres funcions com comentarem més endavant. Per altra banda, l'activitat dels membres de la superfamília de TGF- $\beta$  és regulada negativament per varies proteïnes solubles que prevenen la seva interacció amb els receptors de membrana. En el cas de les BMPs, aquestes molècules inhibidores són Noggin i Chordin i, malgrat que tenen una estructura primària molt diferent, les dues poden unir-se als BMPs i prevenir la seva interacció amb els receptors de membrana (Piccolo et al., 1996; Zimmerman et al., 1996).

### 1.3- La via de senyalització de les proteïnes Smad

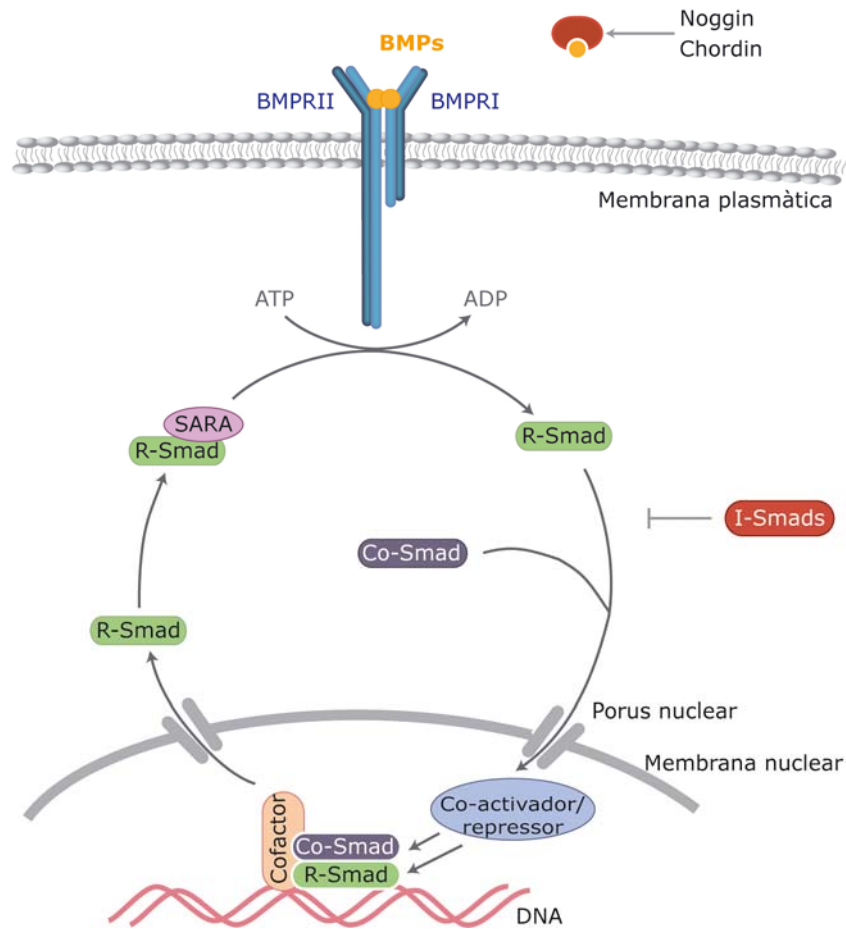
Les proteïnes de la família Smad van ser els primers substrats identificats dels receptors de tipus I de BMPs i juguen un paper central en la transducció de les senyals des dels receptors de membrana fins als gens diana al nucli. En base a la seva estructura i funció, les proteïnes Smad es classifiquen en tres grups: i) R-Smads, Smads que són directament fosforilades pels receptors tipus I de la superfamília de TGF- $\beta$ ; ii) Co-Smad, Smad que participa en la senyalització associant-se amb les R-Smads; iii) I-Smads, Smads que inhibeixen la funció senyalitzadora dels altres dos grups de Smads.

Els receptors de tipus I activats fosforilen directament un motiu de serines a la regió C-terminal de les R-Smads. Les R-Smads presenten diferent especificitat en la seva interacció amb els diferents receptors de tipus I. D'aquesta manera, les R-Smads Smad2 i Smad3 reconeixen preferencialment la regió *loop* L45 de ALK-4 (ActRIB), Alk-5 (TGF $\beta$ RI) i ALK-7 (receptors tipus I per TGF- $\beta$ , activines i alguns membres del grup GDF), mentre que les R-Smads Smad1, Smad5 i Smad8 presenten especificitat pel *loop* L45 de ALK-1, ALK-2 (ActRIA), ALK-3 (BMPRI-IA) i ALK-6 (BMPRI-IB) (receptors tipus I per BMPs, GDFs i AMH) (Chen et al., 1998; Feng and Derynck, 1997; Persson et al., 1998). La fosforilació de la regió C-terminal de les R-Smads dona lloc a un canvi conformacional de la proteïna, principalment al domini MH2 (*Mad-homology 2*), que es troba

altament conservat al llarg de l'evolució (Shi and Massague, 2003). Aquest canvi conformacional permet a la R-Smad fosforilada oligomeritzar amb ella mateixa o amb altres R-Smads juntament amb la Co-Smad, que es troba representada per un únic producte gènic en mamífers anomenat Smad4 (Figura I3). La Smad4 es caracteritza per no tenir el motiu de di-serines, de tal manera que no és fosforilada pels receptors de tipus I (ten Dijke, 2006). No obstant, Smad4 conté la resta del domini MH2 C-terminal altament conservat i interacciona amb la conformació activa dels dominis MH2 dels R-Smads fosforilats (Shi and Massague, 2003). Els hetero-oligòmers de R-Smads amb Co-Smads han estat cristal·litzats com a dímers i com a trímers. El model que s'ha proposat dels trímers consisteix en dos R-Smads fosforilades associades a una Smad4, ja que Smad4 reemplaça un de les R-Smads fosforilada en el R-Smad homo-trímer (Chacko et al., 2004). Les proteïnes Smad en estat basal són retingudes al citoplasma. En el cas de Smad2, aquesta retenció és manté per la interacció amb SARA (*Smad anchor for receptots activation*) ja que la unió amb SARA emmascara la senyal d'import nuclear de Smad2 (Figura I3). Així, la fosforilació de Smad2 per part del receptor no només augmenta l'afinitat de Smad2 per Smad4 sinó que també disminueix la seva afinitat per SARA, permetent que quedi exposada la senyal d'import nuclear i afavorint d'aquesta manera la ràpida acumulació de Smad2 activada al nucli (Tsukazaki et al., 1998). L'oligòmer Smad funciona posteriorment com una plataforma molecular per a l'organització i execució de reaccions nuclears que instrueixen a la cromatina de com ha de regular la transcripció de múltiples gens diana, diferents en funció del teixit i l'organisme (Figura I3). El tipus de resposta cel·lular que té lloc depèn del context cel·lular i per això és necessària la integració d'informació sobre l'estat de desenvolupament de la cèl·lula, fet que s'aconsegueix per varies modificacions post-traduccionals del complex Smad al nucli. La informació molecular és transmesa pel complex Smads a la cromatina de, com a mínim, tres maneres: i) unió al DNA; ii) interacció amb altres factors de transcripció units al DNA; iii) associació amb remodeladors de cromatina, co-activadors i co-repressors transcripcionals (Shi and Massague, 2003).

La via de senyalització de les Smads es complementa amb les Smads inhibidores I-Smads, Smad6 i Smad7. Smad6 és un inhibidor preferencial de la via de senyalització de BMPs (Imamura et al., 1997), i Smad7 actua com un inhibidor tant de la via de BMPs (Nakao et al., 1997) com de TGF- $\beta$  (Hayashi et al., 1997). Les I-Smads presenten en la regió N-terminal un domini MH1, domini implicat principalment en la unió a seqüències específiques de DNA, (Massague, 1998) amb un nivell d'homologia molt baix en relació amb els equivalents dominis MH1 de les

R-Smads, en canvi tenen el domini C-terminal MH2 altament conservat (Imamura et al., 1997; Nakao et al., 1997). Smad7 és la més ben estudiada de les dues I-Smads i s'ha descrit que els membres de la superfamília de TGF- $\beta$  a part d'induir-ne la seva transcripció també faciliten la seva translocació des del nucli al citoplasma (Itoh et al., 1998). Un mecanisme proposat per explicar els efectes inhibitoris de Smad6 i Smad7 es base en la observació que cada una d'aquests Smads poden unir-se a diversos receptors de la família de TGF- $\beta$  i interferir amb la fosforilació de les R-Smads (Nakao et al., 1997). S'ha descrit que la unió de Smad7 al receptor de tipus I ALK-5 (TGF $\beta$ I) recluta la fosfatasa PP1 $\alpha$  i aquesta defosforila al receptor de tipus I, reduint-ne així la seva activitat (Shi et al., 2004). També s'ha proposat que Smad7 pot interaccionar amb les ubiquitines lligases Smurf1 i Smurf2 i unir-se al complex de receptors, promovent així la ubiquitinació dels receptors i la seva posterior degradació (Di Guglielmo et al., 2003). Les I-Smad també poden modular la senyalització de les altres Smads per mecanismes que impliquen directament les proteïnes Smad ja que s'ha descrit que poden: i) formar complexos amb les altres proteïnes Smads, especialment amb Smad4, i dissociar el complex R-Smad/Co-Smad (Hata et al., 1998); ii) modular la ubiquitinació i degradació de les R-Smads i Co-Smads associats (Moren et al., 2005); iii) inhibir la via de senyalització de TGF- $\beta$  actuant al nucli, unint-se al complex Smad de control de la transcripció associat a la cromatina i bloquejant la transmissió al nucli de la senyalització (Zhang et al., 2007).



**Figura 13. Via de senyalització de les proteïnes Smad.** Les R-Smads fosforilades juntament amb la Co-Smad, Smad4, formen un complex regulador transcripcional. Les R-Smads es poden moure lliurement dins i fora del nucli i per a ser més accessibles pels receptors de membrana, són segrestades al citoplasma per proteïnes com SARA. L'activació dels receptors té lloc quan el lligand indueix la formació del complex heterodimèric de receptors, de tal manera que el receptor de tipus II fosforila el domini GS del receptor de tipus I, l'activa i catalitza la fosforilació de les R-Smads. La fosforilació de les R-Smads disminueix la seva afinitat per SARA i incrementa la seva afinitat per la Co-Smad. La regulació negativa de la via de senyalització dependent de Smads pot tenir lloc per part de les I-Smad i per proteïnes que segresten els lligands evitant que s'uneixin als seus receptors. El complex Smad format és lliure de moure's fins al nucli i associar-se amb co-activadors i co-repressors transcripcionals.

### 1.4- Les vies de senyalització Smad-independent

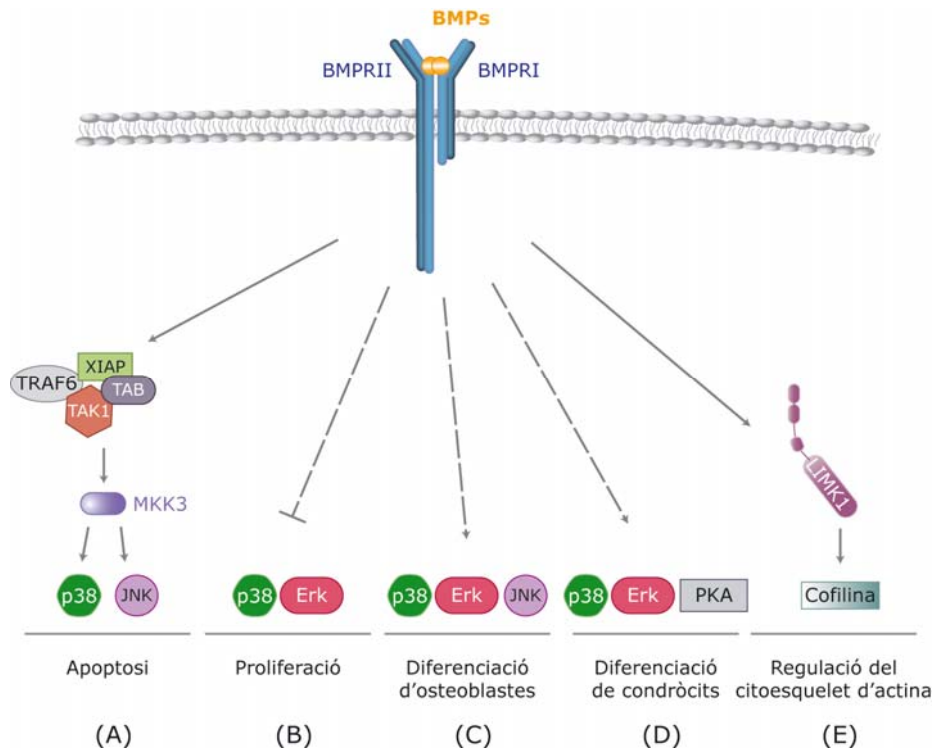
Les proteïnes Smad són els principals mediadors activats en resposta als membres de la superfamília de TGF- $\beta$  encarregats de transmetre les senyals iniciades als receptors de membrana fins al nucli.



No obstant, en els últims anys s'han publicat múltiples evidències experimentals que suggereixen que vies alternatives a les Smads regulen la senyalització en resposta a TGF- $\beta$  i BMPs. Les proteïnes de senyalització independents de les Smads es poden classificar en tres grups en funció del mecanisme pel qual contribueixen a la regulació de respostes fisiològiques que depenen de TGF- $\beta$  i BMPs: i) proteïnes no-Smads que directament modifiquen les Smads; ii) proteïnes senyalitzadores que són regulades directament per les proteïnes Smads, de tal manera que es transmeten les senyals iniciades a la membrana a rutes Smad-alternatives; iii) proteïnes no-Smads que interaccionen i/o són fosforilades directament pels receptors de la família TGF $\beta$ , iniciant així de manera paral·lela rutes de senyalització que cooperen o no amb la via de senyalització de les Smads en la regulació de respostes fisiològiques. En aquest treball es presenten resultats relacionats amb la regulació per part de BMP-2 de la migració cel·lular i la dinàmica del citoesquelet d'actina a través de vies de senyalització que no involucren les proteïnes Smad, de tal manera que a la present introducció ens centrarem en les rutes activades per membres de la superfamília de TGF- $\beta$  incloses al tercer grup de la classificació anterior, és a dir, rutes en les que no participen les Smads.

En la literatura apareixen varis exemples de funcions cel·lulars regulades per rutes Smad-independent en resposta a BMPs, no obstant, en molts casos no es coneix la connexió entre els receptors de membrana i la molècula efectora citoplasmàtica, si bé és cert que en la majoria dels casos solen ser proteïnes MAPK (Erk, JNK, p38) (Shi and Massague, 2003). A continuació es citen els exemples més destacats de funcions fisiològiques regulades per vies de senyalització independents de Smads en que es coneix, encara que sigui parcialment, quines són les proteïnes controlades pels receptors de membrana activats en resposta a BMPs (Figura I4). S'ha descrit que les BMPs regulen l'apoptosi en diferents tipus cel·lulars a través de la proteïna TAK1 (*TGF- $\beta$  activated kinase 1*), proteïna que forma complexos amb els receptors de BMPs juntament amb TAB1 i XIAP, proteïna inhibidora de les caspases apoptòtiques que funciona com a E3 ubiquitin lligasa (Kendall et al., 2005; Yamaguchi et al., 1999). S'ha proposat que TAK1 és activada en resposta a l'estimulació amb BMPs i regula l'apoptosi induïda per estrès cel·lular a través de l'activació de les vies de senyalització de p38 (Kimura et al., 2000) i JNK (Shirakabe et al., 1997). Les BMPs també s'han implicat en el control de la proliferació cel·lular i el manteniment de la pluripotencialitat de les cèl·lules mare embrionàries de ratolí. Concretament, BMP-4 induïx la renovació de cèl·lules mare embrionàries a través de la inhibició de rutes de senyalització, que inclouen Erk i p38, involucrades en la regulació de la

resposta transcripcional de gens específics durant l'embriogènesi (Qi et al., 2004). De fet, la regulació de l'expressió gènica per part de les BMPs s'associa en la majoria de casos estudiats a la diferenciació cel·lular. Els osteoblasts, per exemple, requereixen senyals de BMPs per diferenciar a partir de progenitors cel·lulars pluripotents, i les proteïnes Smads juntament amb certs factors de transcripció contribueixen a la regulació d'aquest procés (ten Dijke et al., 2003). En els últims anys s'han publicat evidències experimentals que indiquen la participació de les rutes de senyalització de p38, Erk i JNK en el control de la regulació transcripcional implicada en la diferenciació osteoblàstica en resposta a diferents membres de la família de les BMPs (Gallea et al., 2001; Guicheux et al., 2003; Lai and Cheng, 2002; Vinals et al., 2002). També s'ha descrit la implicació d'efectors com PKA, p38 i Erk en la regulació a nivell transcripcional del procés de diferenciació de condrocits (Lee and Chuong, 1997; Noth et al., 2003). Recentment, varis grups han descrit la participació de les BMPs en la reorganització del citoesquelet d'actina en el procés de morfogènesi de les dendrites neuronals a través de la proteïna LIMK1 i Cdc42 (Eaton and Davis, 2005; Foletta et al., 2003; Hocking et al., 2009; Lee-Hoeflich et al., 2004; Wen et al., 2007). Aquest últim punt el tractarem extensament més endavant.



**Figura 14. Senyalització de BMPs per rutes Smad-independent.** (A) Apoptosi cel·lular. Els receptors de BMPs s'uneixen a XIAP i als seus interactors TAB i TAK1 de tal manera que l'estimulació amb BMPs indueix l'activació de TAK1 i de MKK3, donant lloc a l'activació de JNK i p38, i a l'estimulació de l'apoptosi en varies línies cel·lulars. (B) Proliferació cel·lular. La unió de BMPs al complex de receptors indueix la fosforilació del receptor de tipus I, BMPRIA, que facilita la defosforilació (inactivació) de les MAPKs p38 i Erk per un mecanisme actualment desconegut. Aquesta inactivació allibera els efectes negatius de les MAPKs sobre la pluripotencialitat a nivell del control de l'expressió de certs gens. (C-D) Diferenciació cel·lular. Malgrat que les BMPs controlen la diferenciació de diferents llinatges cel·lulars principalment a través de la regulació transcripcional de gens claus, també s'ha descrit la participació de varies rutes de senyalització que impliquen diverses proteïnes quinases. (E) Regulació del citoesquelet d'actina. Les BMPs activen la LIMK1, i en conseqüència inactiven la cofilina, fet que resulta en la polimerització d'actina.

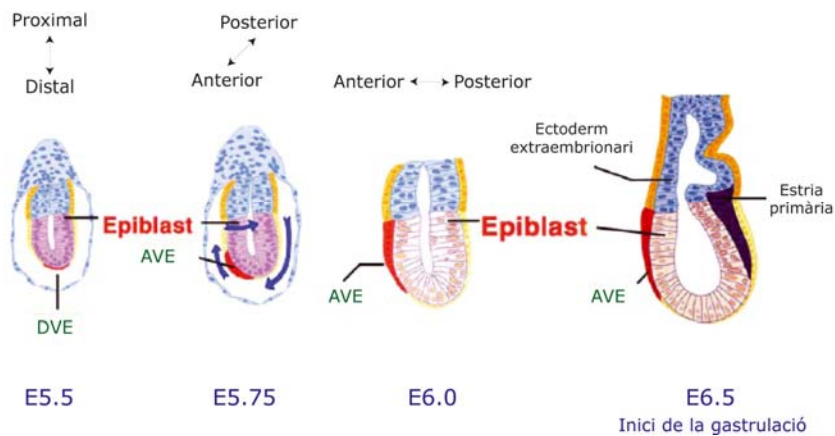
## 2. BMPs i el control de la migració cel·lular durant l'embriogènesi

Les proteïnes morfogèniques òssies van ser originàriament identificades com a proteïnes que induïen la formació ectòpica d'òs i, actualment, és àmpliament acceptat el paper de BMP-2, BMP-4 i BMP-7 en el desenvolupament ossi dels vertebrats (Wan and Cao, 2005). La formació de l'os té lloc a través d'una sèrie d'esdeveniments que s'inicien amb la quimiotaxis de cèl·lules mare mesenquimals a llocs concrets d'implantació,

fet que suggereix que les BMPs regulen la formació òssia a través del control de la migració cel·lular, entre d'altres múltiples processos. Les BMPs, a part d'induir la formació d'estructures òssies, participen en altres funcions durant l'embriogènesi, principalment en la formació de l'eix dorso-ventral i l'antero-posterior i en el procés de neurulació a través del control de la migració de grans grups de cèl·lules. La participació de les BMPs a través del control de la migració en les etapes primerenques de l'embriogènesi té lloc concretament en els processos de gastrulació i en la delaminació de les cèl·lules de la cresta neural. Durant la gastrulació, grans grups de cèl·lules migren col·lectivament per formar les tres capes principals de l'embrió i posteriorment, les cèl·lules migren des d'aquestes capes a certes localitzacions diana on es diferencien per formar cèl·lules especialitzades que donaran lloc als diferents teixits i òrgans (Kishigami and Mishina, 2005).

Just abans de la gastrulació (E5.5-6.0), un grup de cèl·lules de la punta distal de l'endoderm visceral (DVE) migren en una direcció concreta per formar el que serà el futur centre de senyalització anomenat endoderm visceral anterior (AVE) (Figura I5). Aquest moviment de cèl·lules asimètric en la regió extraembrionària suggereix que és necessari un *patterning* temprà en els teixits extraembrionaris perquè s'iniciï la gastrulació. S'ha demostrat que les cèl·lules del AVE senyalitzen a regions de l'epiblast per formar el neuroectoderm anterior (Thomas et al., 1998), i que les BMPs i les seves molècules de senyalització expressades en els teixits extraembrionaris juguen un paper clau en aquest *patterning* embrionari (Nagy and Rossant, 2001). La gastrulació comença a l'estadi E6.5, quan a l'epiteli posterior es forma una estructura mesodèrmica anomenada estria primària. A mida que avança el procés de gastrulació, es recluten cèl·lules i s'intercalen entre l'extrem proximal i distal de l'estria primària. Malgrat no es coneixen amb certesa els mecanismes moleculars que regulen el reclutament de les cèl·lules epiblastiques a l'estria primària, les BMPs es consideren elements essencials en aquest procés, de la mateixa manera que en els processos de migració cel·lular que conformen el *patterning* del mesoderm (Kishigami and Mishina, 2005) (Figura I5). Algunes de les evidències més rellevants que han permès arribar a aquesta conclusió són: i) BMP-4 s'expressa a l'ectoderm extraembrionari i a l'estria primària abans i durant la gastrulació (Lawson et al., 1999; Winnier et al., 1995; Ying et al., 2000) i BMP-2 comença a expressar-se a la regió extraembrionària al E6.0 (Ying and Zhao, 2001); ii) els embrions de ratolí mutants deficientes en el gen que codifica per BMP-2 duen a terme la gastrulació, no obstant mostren un desenvolupament anormal en les regions extraembrionàries (Zhang and Bradley, 1996) i, de la mateixa manera que els embrions

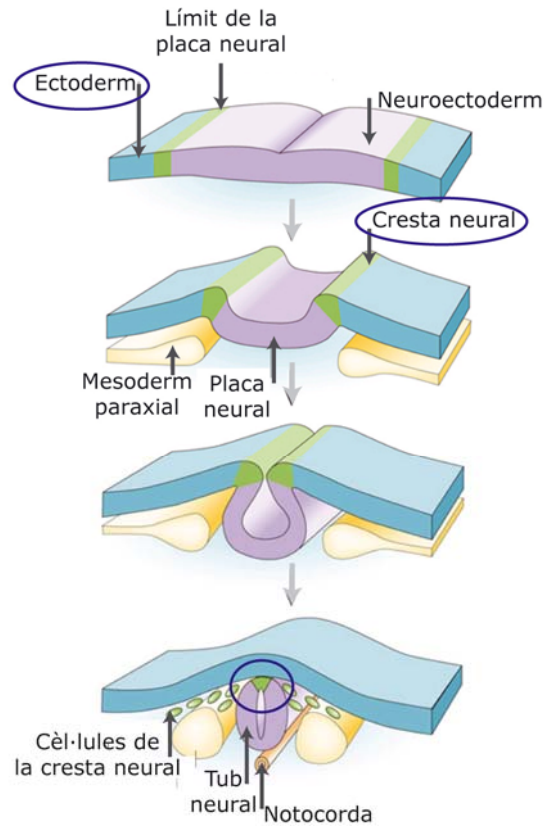
mutants deficientes en BMP-4, no sobreviuen més enllà de l'estadi E9.5; iii) l'absència de BMPRIA, que s'expressa de manera ubiqua en l'epiblast i les regions extraembrionàries durant l'estadi de gastrulació de l'embrió, causa la mort en estadis primerencs del desenvolupament de l'embrió sense que s'arribi a formar el mesoderm (Mishina et al., 1995); iv) la deleció en homozigosi de BMPRII causa la mort de l'embrió durant la gastrulació de manera molt semblant al que s'ha descrit pels embrions mutants per BMPRIA (Beppu et al., 2000). Aquestes evidències suggereixen que BMPRII i BMPRIA són els receptors encarregats de transduir les senyals de BMPs durant l'estadi de gastrulació en la regió extraembrionària i que la senyalització mitjançada per BMPs resulta indispensable perquè tingui lloc una gastrulació normal.



**Figura 15. Representació esquemàtica del desenvolupament temprà del ratolí.** Just després de l'implantació, s'estableix la polaritat pròximo-distal en els embrions de ratolí. L'epiblast (lila) està rodejat per l'endoderm visceral (groc clar). Un grup de cèl·lules en la punta distal de l'endoderm visceral (DVE) comença a moure's cap al que serà la futura part anterior per formar l'endoderm visceral anterior (AVE). Al E6.5, comença la gastrulació al costat oposat del AVE amb la formació de l'estria primària (negra). D'aquesta manera, la polaritat pròximo-distal és convertida en la polaritat antero-posterior. Aquest procés s'anomena rotació axial. Adaptat de Lu et al. (2001) i Kishigami and Mishina (2005).

Per altra banda, les BMPs també juguen un paper clau en la procés de la neurulació, concretament en la formació de la cresta neural i en la posterior delaminació de les cèl·lules de la cresta neural. La cresta neural és una estructura que es forma de manera transitòria en l'embrió dels vertebrats. Les cèl·lules que formen part de la cresta neural donen lloc a una gran varietat de tipus cel·lulars, des de les neurones perifèriques i les cèl·lules satèl·lit fins a cèl·lules encarregades de formar l'os, els tendons, el teixit connectiu i l'adipós, la dermis, els melanòcits i les cèl·lules

endocrines. Les cèl·lules de la cresta neural s'especifiquen en funció de la posició relativa que ocupen al llarg de l'eix rostr-caudal del cos embrionari. Posteriorment, els progenitors de la cresta neural es delaminen de tal manera que deixen de formar part del neuroepiteli i, ja com a cèl·lules mesenquimals, segueixen rutes migratòries específiques fins a arribar als seus destins embrionaris diana, on s'hi assenten i es diferencien (Wilson et al., 2004). En relació als mecanismes que dirigeixen la migració de les cèl·lules progenitores de la cresta neural, Sela-Donenfeld et al. van demostrar que l'activitat localitzada de les BMPs al tub neural dorsal resulta essencial (Sela-Donenfeld and Kalcheim, 1999). Malgrat no es coneixen amb profunditat els mecanismes moleculars mitjançant els quals les BMPs regulen aquest procés, s'ha demostrat la seva participació en la migració de cèl·lules de la cresta neural que donaran lloc a les neurones i a la glia que formaran el sistema nerviós entèric del tracte gastrointestinal (Goldstein et al., 2005) i a la generació d'estructures craniofacials (Dudas et al., 2004).



**Figura 16. Participació de les BMPs en el procés de neurulació.** Els límits de la placa neural (verd) s'especificuen en resposta a la senyalització que té lloc entre l'ectoderm (blau) i el neuroectoderm (lila). Posteriorment, els límits de la placa neural s'eleva formant la cresta neural i es forma el tub neural. Les cèl·lules de la cresta neural es delaminen de la part dorsal de la cresta neural i migren per donar lloc a les cèl·lules del sistema nerviós. Les BMPs participen en la formació de la cresta neural i en el control de la delaminació i migració de les cèl·lules progenitors de la cresta neural. En blau fosc estan encerclades les zones on s'expressen les BMPs. Adaptat de Gammill and Bronner-Fraser (2003).

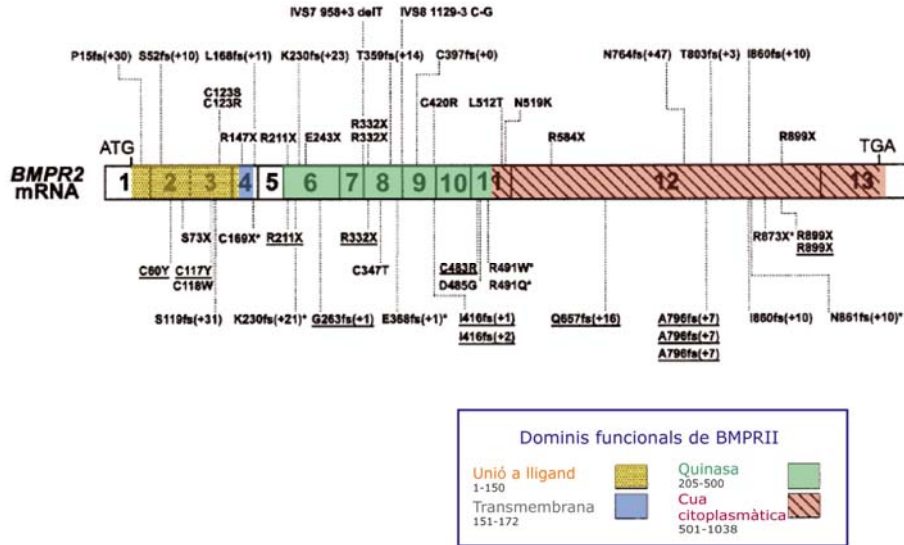
### 3. Hipertensió pulmonar primària i la regió C-terminal de BMPRII

Segons el paradigma de senyalització de BMPs la principal funció dels receptors de tipus II per a BMPs és l'activació dels receptors de tipus I. BMPRII, a diferència dels altres receptors de tipus II de la superfamília de TGF $\beta$ , conté una llarga cua citoplasmàtica C-terminal *downstream* del domini quinasa d'aproximadament 500 aminoàcids que representa el 50%

de la proteïna (Figura I7). Aquesta regió no és requerida per a la ruta de senyalització a través de Smads ni per la fosforilació de p38 induïda per BMPs (Nishihara et al., 2002; Nohe et al., 2002; Nohno et al., 1995). No obstant això, la llarga cua citoplasmàtica es troba conservada en els respectius homòlegs de BMPRII de *Drosophila* i *Xenopus laevis*, fet que suggereix que aquesta regió del receptor participa en alguna funció crítica per la cèl·lula.

S'han detectat mutacions que codifiquen en la llarga cua citoplasmàtica de BMPRII i altres zones de BMPRII en pacients amb la malaltia autosòmica dominant Hipertensió pulmonar primària (PPH), tant en casos familiars com esporàdics (De Caestecker and Meyrick, 2001; Lane et al., 2000; Waite and Eng, 2003) (Figura I7). La PPH es caracteritza per una proliferació excessiva de les cèl·lules endotelials i de múscul llis de les artèries pulmonars, fet que resulta en una oclusió dels vasos pulmonars i un augment de la pressió sanguínia que acaba desencadenant en la majoria dels casos una parada cardíaca (Morrell et al., 2001; Puri et al., 2007). La PPH és una malaltia rara, es diagnostiquen una mitjana de 1 o 2 casos nous per milió de persones cada any, amb predilecció per dones joves (la proporció dones:homes és de 2.3:1) i una mitjana d'edat de diagnòstic de 36.4 anys. En absència de tractament, els pacients de PPH presenten una mitjana de supervivència de 2.8 anys (Rich et al., 1987). Aproximadament un 58% de les mutacions descrites en BMPRII i associades a PPH prediuen la formació d'un transcrit truncat, i concretament un 12% de les mutacions patogèniques es localitzen a l'exó 12 i donen lloc a una isoforma de la proteïna sense la llarga cua citoplasmàtica (Machado et al., 2001). Altres mutacions tenen lloc per la substitució d'aminoàcids altament conservats en el domini extracel·lular d'unió a lligand, en el domini transmembrana o en el domini quinasa de BMPRII. Moltes de les mutacions identificades ocorren per sota del domini quinasa de BMPRII i són mutacions de pèrdua de la pauta de lectura o sense sentit que prediuen la formació de BMPRII amb una cua citoplasmàtica truncada (Lane et al., 2000; Machado et al., 2001; Thomson et al., 2000), observació que indica que la cua citoplasmàtica juga un paper rellevant en la funcionalitat de la cèl·lula (Figura I7).



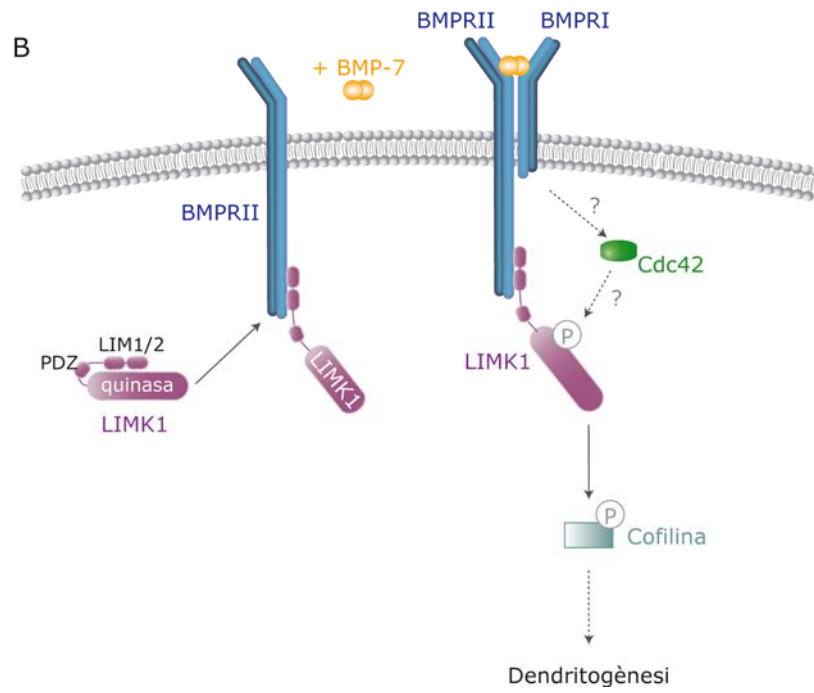
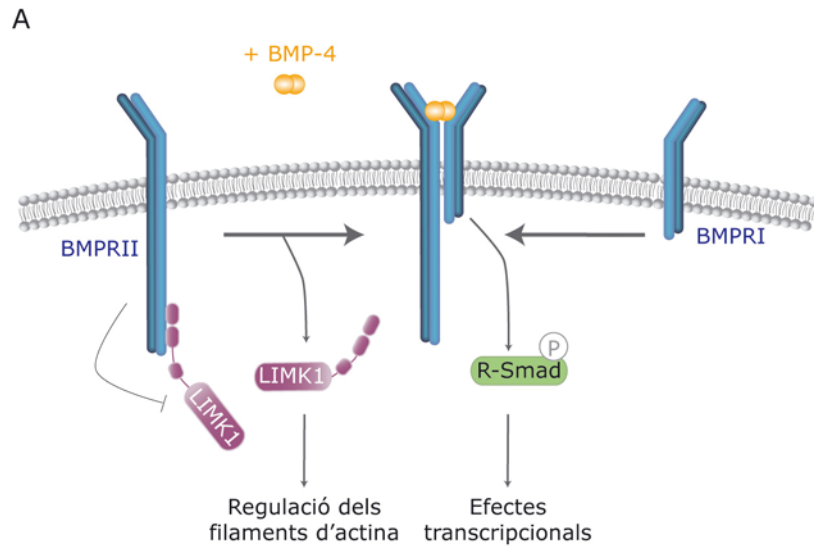


**Figura 17. cDNA de BMPRII i localització de les mutacions descrites associades a PPH.** Els números de l'1 al 13 indiquen els exons. Les mutacions subratllades han estat descrites en pacients amb PPH esporàdica. Les mutacions de canvi de lectura (*frameshift*, fs) s'indiquen amb l'abreviació de l'aminoàcid, el número de posició de l'aminoàcid al qual té lloc la mutació i a continuació el número d'aminoàcids que existeixen fins al següent codó stop. Adaptat de Machado et al. (2001).

En un intent d'elucidar la rellevància funcional de la cua C-terminal de BMPRII, varis grups s'han dedicat a la cerca de proteïnes intracel·lulars regulades per la interacció amb la regió citoplasmàtica *downstream* del domini quinasa de BMPRII. El primer treball en aquest sentit es va publicar l'any 2003, i en aquest es va demostrar, *in vitro*, que la cua citoplasmàtica de BMPRII interacciona amb la LIMK1, una proteïna clau en el control de la dinàmica del citoesquelet d'actina (Foletta et al., 2003). Foletta et al. van descriure que mutacions en la cua citoplasmàtica presents en pacients amb PPH impedeixen la unió de LIMK1. Al cap de pocs mesos, Lee-Hoeflich et al. van demostrar que la interacció de la regió C-terminal de BMPRII amb la LIMK1 resulta crítica en la reorganització del citoesquelet d'actina implicada en la dendritogènesi estimulada per BMPs (Lee-Hoeflich et al., 2004). Existeixen certes discrepàncies entre aquest dos treballs en relació a com la unió de la LIMK1 a BMPRII regula l'activitat LIMK1. En un dels treballs es postula que la unió de la LIMK1 a BMPRII inhibeix l'activitat de LIMK1, i que és l'addició de BMPs el que promou la dissociació de la LIMK1 i la seva conseqüent activació (Foletta et al., 2003). No obstant, segons el model proposat per Lee-Hoeflich et al., la unió de la LIMK1 al BMPRII manté la LIMK1 en una conformació activada i aquest efecte es pot veure potenciat

per l'estimulació amb BMPs a través de l'activació de Cdc42 que activa al seu torn la LIMK1 unida al receptor, promovent així un major nivell de l'activitat catalítica de la LIMK1 (Figura I8). Independentment d'aquestes diferències mecàniques, el que es desprèn d'aquests treballs és que BMPRII està implicat en processos relacionats amb la reorganització del citoesquelet d'actina. Recentment, altres grups han descrit la importància de la interacció de la cua citoplasmàtica de BMPRII amb LIMK1 en la dinàmica del citoesquelet d'actina implicada en processos de dendritogènesi en cèl·lules del llinatge neuronal de *Xenopus* (Hocking et al., 2009; Wen et al., 2007) i *Drosophila* (Eaton and Davis, 2005).

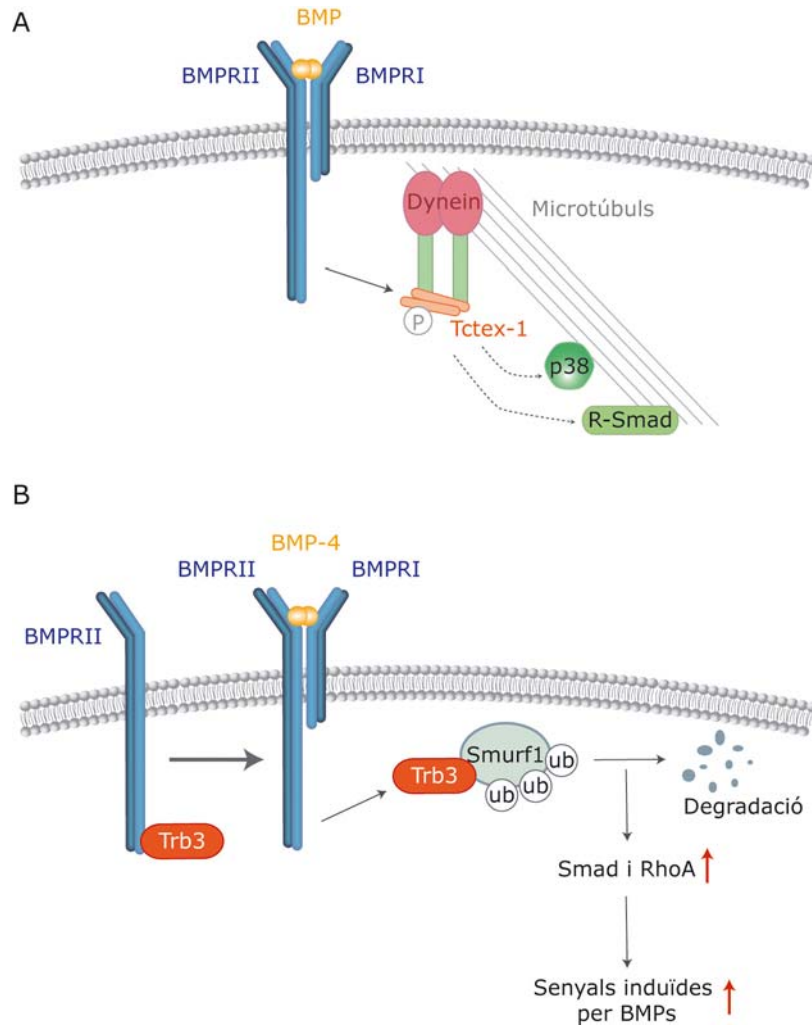
**Figura I8. Regulació de l'activitat de LIMK1 per part de BMPRII.** (A) Segons el model proposat per Folletta et al., en condicions basals, la cua C-terminal de BMPRII interacciona amb els dominis LIM de LIMK1 i inhibeix LIMK1. La unió de BMP-4 als seus receptors promou la dissociació de la LIMK1, induint així la seva activitat catalítica envers la cofilina i la consegüent regulació del citoesquelet d'actina. Adaptat de Folletta et al. (2003). (B) Segons el model proposat per Lee-Hoeflich et al., BMP-7 induïx l'activació de Cdc42 que coopera amb la unió de LIMK1 a la cua de BMPRII per aconseguir un nivell alt d'activació de LIMK1. Adaptat de Lee-Hoeflich et al. (2004).



Al cap de pocs mesos de la publicació del treball de Folleta et al., Machado et al. van demostrar que la cua citoplasmàtica de BMPRII interacciona amb la proteïna Tctex-1, una cadena lleugera del complex motor de la dynein (Machado et al., 2003). La dynein és una proteïna motora citoplasmàtica composta per dues cadenes pesades, dues cadenes intermèdies i un nombre variable de cadenes lleugeres, i és responsable del transport retrògrad de proteïnes *cargo* a través de la xarxa de microtúbuls (Sweeney and Holzbaaur, 1996). Els autors van demostrar, *in vitro*, que la Tctex-1 interacciona amb el domini citoplasmàtic de BMPRII, fet que permet que el receptor la fosforili i dits efectes es veuen alterats en mutacions que tenen lloc en el gen que codifica per BMPRII descrites en pacients amb PPH (Figura I9).

Després de dos anys de la identificació de la LIMK1 com la primera proteïna que interaccionava amb la cua citoplasmàtica de BMPRII, Wong et al. van descriure mitjançant l'assaig *two-hybrid* en llevats la interacció de la proteïna tirosina quinasa **c-Src** amb el la regió citoplasmàtica de BMPRII (Wong et al., 2005). La proteïna c-Src participa en múltiples vies de transducció implicades en el control de la proliferació cel·lular, la migració i l'apoptosi (Yeatman, 2004). L'activació aberrant de c-Src ha estat descrita en més d'un 50% de tumors de colon, fetge, pulmó, mama i pàncrees (Frame, 2002). Els autors demostren que l'estimulació amb BMPs disminueix l'activitat de c-Src i que aquesta resposta es veu compromesa en presència d'una forma de BMPRII amb algunes mutacions en el domini C-terminal associades a PPH .

Recentment, Chan et al. han identificat una altra proteïna que interacciona amb el domini C-terminal de BMPRII, *Tribbles-like protein 3* (**Trb3**), un homòleg en mamífers de Trb de *Drosophila* (Chan et al., 2007). Trb3 s'havia identificat prèviament com un regulador negatiu de varies proteïnes transductores de senyals com Akt, el factor de transcripció ATF4/CHOP i l'acetil-coenzim A carboxilasa (Du et al., 2003; Ohoka et al., 2005; Qi et al., 2006). L'estimulació amb BMPs afavoreix la dissociació de Trb3 del domini C-terminal de BMPRII, fet que permet que la Trb3 interaccionï amb Smurf1 i n'indueixi la seva degradació. La degradació de Smurf1 facilita la senyalització activada en resposta a BMPs ja que resulta en una estabilització de les respostes dependents de Smads (Figura I9).



**Figura 19. Tctex-1 i Trb3 interaccionen amb el domini C-terminal de BMPRII.** (A) La cua citoplasmàtica de BMPRII interacciona amb la proteïna Tctex-1, la cadena lleugera del complex motor de la dynein. Segons el model proposat per Machado et al. dita interacció facilita la fosforilació de Tctex-1, que forma part d'un complex proteic situat als microtúbuls. La Tctex-1 activada es mou a través dels microtúbuls i interacciona amb proteïnes transductores de la via de senyalització de BMPs com Smad1 i p38. Mutacions en BMPRII associades a PPH prevenen la fosforilació de Tctex-1. Adaptat de Machado et al. (2003). (B) Esquema del mecanisme de regulació de la via de senyalització de BMPs per part de Trb3. L'estimulació amb BMP-4 induïx l'alliberament de Trb3 de l'ancoratge amb la cua citoplasmàtica de BMPRII, de tal manera que Trb3 interacciona amb Smurf1 i n'indueix la seva degradació. Com a conseqüència de la disminució dels nivells de proteïna Smurf1 s'estabilitzen les seves proteïnes diana Smad1 i RhoA i s'activa la ruta de senyalització de BMPs. Adaptat de Chan et al. (2007).

En últim lloc, fa escassos mesos, Schwappacher et al. van descriure que la proteïna quinasa dependent de cGMP (**cGKI**) interacciona amb la

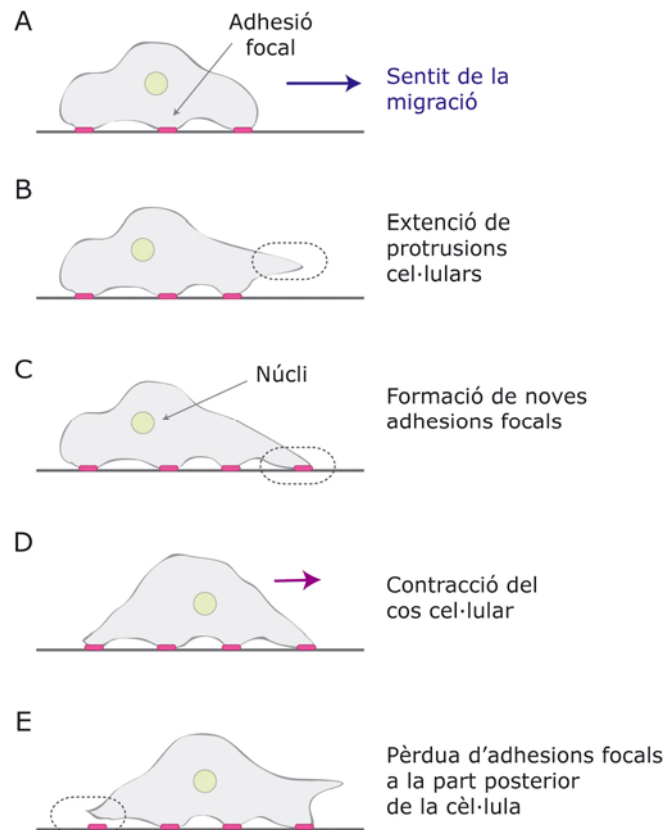
cua citoplasmàtica de BMPRII (Schwappacher et al., 2009). La proteïna cGKI és una Ser/Thr quinasa involucrada en la via de transducció de senyals de l'òxid nítric (NO)/cGMP. S'ha descrit que participa en múltiples funcions cel·lulars com el control del to vascular, l'activació de plaquetes i la plasticitat sinàptica. Els seus nivells d'expressió són molt alts en les cèl·lules de múscul llis de les artèries pulmonars, on regula l'expressió gènica, la morfologia cel·lular i la proliferació (Feil et al., 2005; Schlossmann et al., 2005). Els autors del treball demostren que cGKI interacciona i fosforila el domini C-terminal de BMPRII. En resposta a BMPs, cGKI es dissocia del complex de receptors i s'uneix a les R-Smad activades i a Smad4. El complex cGKI/Smad transloca al nucli, recluta el factor de transcripció TFII-I i s'uneix als promotors dels gens diana de BMPs com Id1.

En resum, tots aquests treballs proposen noves funcions de BMPRII i demostren funcions discretes de la regió C-terminal. Les proteïnes identificades que interaccionen amb la cua citoplasmàtica de BMPRII participen en processos vitals per a la cèl·lula, i per tant caldrà realitzar estudis futurs per determinar com la disrupció de la unió d'elles amb BMPRII contribueix a la patogènesi de la PPH.

#### **4. Polarització cel·lular i migració quimiotàctica**

La migració cel·lular és un procés essencial en tots els organismes multicel·lulars i és important tant durant el desenvolupament embrionari com en l'adult. La migració cel·lular és dirigida per senyals extracel·lulars que actuen com a atractants o repel·lents. Aquestes senyals poden ser factors solubles que actuen a distància o senyals locals de les cèl·lules veïnes o de la matriu extracel·lular, i senyalitzen activant una gran varietat de respostes intracel·lulars que inclouen canvis en la organització del citoesquelet d'actina i de microtúbuls, l'alteració de les vies de transport de vesícules i la regulació de la transcripció gènica (Charest and Firtel, 2007).

Els mecanismes de migració cel·lular han estat estudiats principalment en cèl·lules en cultiu, on l'ambient cel·lular és controlable i fàcilment manipulable. Actualment, s'accepta que la migració cel·lular és el resultat d'un conjunt d'esdeveniments coordinats que inclouen l'extensió d'un front d'avanç en forma de protrusió, l'establiment de nous punts d'adhesió, la contracció del cos cel·lular i finalment la pèrdua de les adhesions a la part posterior de la cèl·lula (Figura I10).



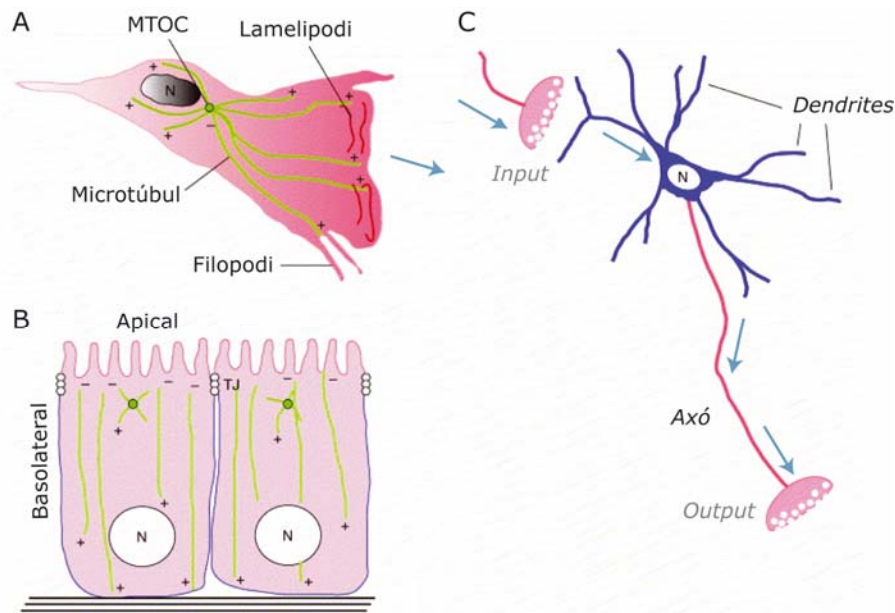
**Figura I10. Esquema dels esdeveniments que tenen lloc durant la migració cel·lular.** (A) Les cèl·lules que no estan migrant romanen unides a la matriu extracel·lular, principalment a través d'integrines. (B) Quan les cèl·lules són exposades al gradient d'un factor de creixement o citoquina, el factor s'uneix i activa receptors de membrana i vies de senyalització intracel·lulars que indueixen la polimerització d'actina localitzada donant lloc a la formació de protrusions de membrana en la direcció del gradient. L'establiment de la protrusió de membrana en el sentit de la migració i la formació d'un domini diferenciat a la part posterior de la cèl·lula és el primer senyal de la morfologia polaritzada. (C) Les extensions de membrana al front cel·lular s'estabilitzen creant noves adhesions focals que indueixen la senyalització necessària per mantenir la migració i evitar la retracció del cos cel·lular. (D) Un cop la cèl·lula ha establitzat les noves adhesions, té lloc la retracció del cos cel·lular. (E) L'últim pas de la migració consisteix en la pèrdua de les unions amb la matriu extracel·lular a la part posterior de la cèl·lula. La migració es manté perquè la cèl·lula repeteix cicles d'extensió de membrana al front cel·lular i retracció de la part posterior.

Una de les característiques principals de la migració és doncs la polarització dinàmica de la cèl·lula i l'extensió de protrusions en la direcció de la migració. Aquestes protrusions poden ser en forma de lamelipodis o *spike-like* filopodis. El manteniment del fenotip polaritzat requereix la distribució asimètrica de molècules de senyalització, proteïnes d'adhesió,

proteïnes del citoesquelet i molècules implicades en el tràfic a través de la membrana. La polarització que té lloc en les cèl·lules de fenotip fibroblàstic es caracteritza per l'extensió de protrusions al front cel·lular, la reorganització del centre organitzador de microtúbuls (MTOC) i l'aparell de Golgi en el sentit de la migració, i l'estabilització temporal del sistema de microtúbuls al front d'avanç, fet que permet que les proteïnes motores com la dynein regulin el tràfic de membrana de manera dirigida (Kupfer et al., 1982). Encara que cada un d'aquests processos s'iniciïn de manera independent, resulta crític que tots ells funcionin de manera conjunta. El procés de polarització cel·lular també resulta crític en altres processos a part de la migració, com per exemple en l'establiment de polaritat apico-basolateral en cèl·lules epitelials i durant l'especificació dels exons en les cèl·lules neuronals (Figura I11).

Un gran conjunt de molècules de senyalització intracel·lular s'han implicat en la polarització cel·lular i la migració en resposta als estímuls extracel·lulars, incloent rutes de MAPK, lípid quinases, Ser/Thr i Tyr quinases i proteïnes *scaffold*. A continuació es resumeixen breument les principals proteïnes involucrades en el control de la dinàmica del citoesquelet d'actina.



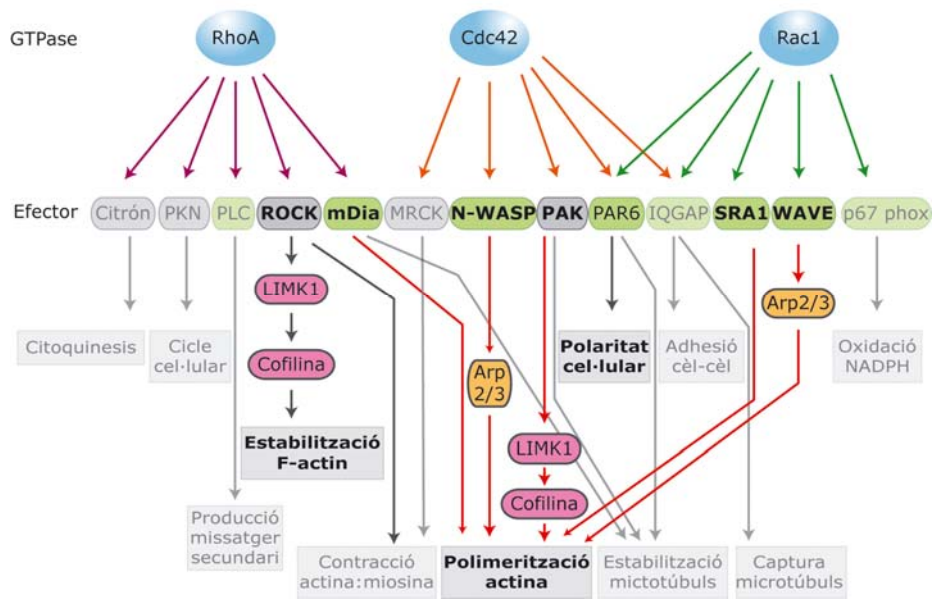


**Figura I11. Exemples de polarització cel·lular.** (A) Els fibroblasts en migració tenen una forma polaritzada amb protrusions en forma de *ruffles* i filopodis. La fletxa indica la direcció de la migració. (B) Les cèl·lules epitelials tenen una estructura polaritzada ja que presenten una zona apical i una zona basolateral diferenciades. Les unions estretes funcionen com a barreres per la difusió de les proteïnes de membrana entre el domini apical i el basolateral. (C) Les neurones són cèl·lules altament polaritzades que contenen dos tipus d'extensions, les dendrites i els axons, que els permeten rebre, processar i transmetre informació. Les fletxes blaves indiquen la direcció de la senyalització. Adaptat de Fukata et al. (2003).

#### 4.1- Les petites GTPases de la família Rho

Les *Rho family small guanosine triphosphate (GTP)-binding proteins* GTPases (petites GTPases de la família Rho o Rho GTPases) constitueixen un subgrup dins de la superfamília de proteïnes Ras que inclouen més de 20 membres, entre els que es troben Cdc42, Rac1 i RhoA (Jaffe and Hall, 2005). Són proteïnes expressades de manera ubiqüa i la seva activitat és regulada per unió a GTP o GDP. Quan estan unides a GTP, es troben en una conformació activada, fet que els hi permet interaccionar i activar les seves proteïnes diana i induir una gran varietat de respostes intracel·lulars, la majoria relacionades amb la regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina (Bishop and Hall, 2000). Moltes d'aquestes proteïnes efectores són quinases o proteïnes *scaffold* que acoblen l'activació de les Rho GTPases amb vies de senyalització *downstream* (Figura I12). A més a més, les Rho

GTPases es poden regular les unes a les altres; per exemple, s'ha demostrat que Cdc42 pot activar Rac1 (Nobes and Hall, 1995) i que Rac1 alhora pot regular negativament d'activitat de RhoA (Nimnual et al., 2003; Sander et al., 1999). El balanç de l'activació de les Rho GTPases en el temps i l'espai resulta crucial per múltiples processos cel·lulars (Jaffe and Hall, 2005). A dia d'avui s'han descrit més de 40 proteïnes efectores de les RhoGTPases, així que tenint en compte la complexitat d'aquesta àrea, en la present introducció ens centrarem únicament en aquelles proteïnes que han estat relacionades amb la polarització i la migració cel·lular.

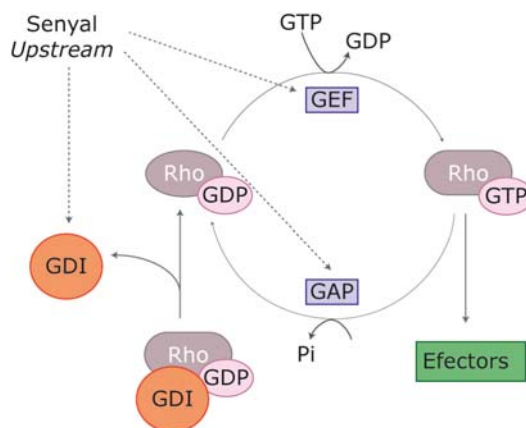


**Figura I12. Proteïnes efectores de les Rho GTPases.** Les petites GTPases de la família Rho regulen múltiples processos cel·lulars, incloent l'organització del citoesquelet d'actina, la proliferació i l'expressió gènica. Les Rho GTPases més ben caracteritzades són RhoA, Cdc42 i Rac1. En gris estan representades les proteïnes efectores que tenen activitat quinasa. Adaptat de Iden and Collard (2008) i Raftopoulou and Hall (2004).

En relació a la participació de les Rho GTPases en la regulació de la polimerització del citoesquelet d'actina, múltiples estudis demostren que, en general, Rho regula l'acoblament dels filaments d'actina-miosina, mentre que Cdc42 i Rac regulen la polarització dels filaments d'actina per formar filopodis i lamelipodis, respectivament, a la perifèria cel·lular (Nobes and Hall, 1995; Ridley and Hall, 1992). Així, les forces contràctils induïdes per RhoA són antagonitzades per les forces d'adhesió induïdes per Rac1 i

Cdc42. Tant Rac com Cdc42 es localitzen al front de les cèl·lules en migració. La funció primària de Rac consisteix en generar la força propulsiva a través de la polimerització d'actina localitzada. Cdc42 també està implicat en la polimerització d'actina, concretament en la generació de filopodis al front de les cèl·lules que estan migrant (Nobes and Hall, 1995). No obstant el paper que juguen els filopodis no està del tot clar, s'ha proposat que participen en l'exploració de l'entorn extracel·lular, i si bé no sembla que siguin indispensables per la migració *per se*, juguen un paper clau en el procés de quimiotaxi. Estudis en *Drosophila* mostren que mutacions que codifiquen per una forma de Cdc42 inactiva no afecten la migració de cèl·lules de la glia perifèrica (Sepp and Auld, 2003). Però, per altra banda, s'ha descrit que la generació de filopodis dependent de Cdc42 en cèl·lules de mamífer participa en la determinació de la direcció de l'extensió del conus de creixement en neurones (Gallo and Letourneau, 2002; Ridley et al., 2003) i que Cdc42 juga un paper crític al front cel·lular controlant la direcció de la migració, ja que l'eliminació de Cdc42 fa que el moviment direccional esdevingui aleatori (Allen et al., 1998).

El cicle d'activació i inactivació de les Rho GTPases es troba regulat per tres grups de proteïnes (Figura I13): i) *Guanine nucleotide exchange factors* (GEFs), que promouen l'activació de les GTPases ja que afavoreixen l'intercanvi de GDP per GTP; ii) *GTPase-activating proteins* (GAPs), que regulen negativament les GTPases; iii) *guanine nucleotide dissociation inhibitors* (DGI), que bloquegen el cicle de les GTPases a través del segrest de la forma unida a GDP (Moon and Zheng, 2003; Schmidt and Hall, 2002). Les senyals extracel·lulars poden regular l'activitat de les GTPases a través de la modificació de les proteïnes d'algun d'aquests grups nombrats, no obstant fins al moment sembla que actuen principalment a través de la regulació de les proteïnes GEFs.



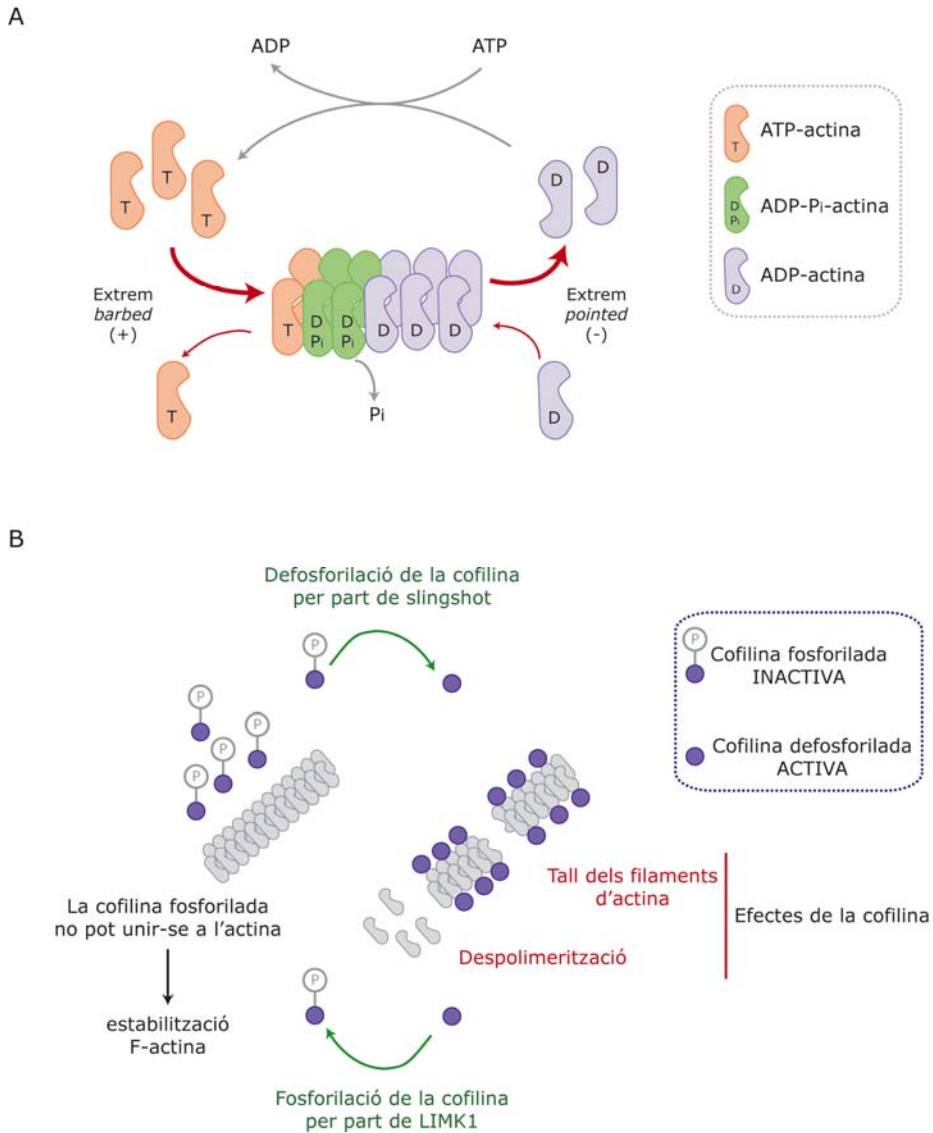
**Figura I13. El cicle d'activació de les petites GTPases de la família Rho.** Les Rho GTPases cicle entre una forma activada unida a GTP i una d'inactivada unida a GDP. Aquest cicle és regulat principalment per proteïnes GEFs, GAPs i GDIs. Quan es troben en la seva forma activa, les Rho GTPases s'uneixen a molècules efectores, que poden ser proteïnes quinases i proteïnes *scaffold*.

## 4.2- Efectors *downstream* de les Rho GTPases.

### Regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina

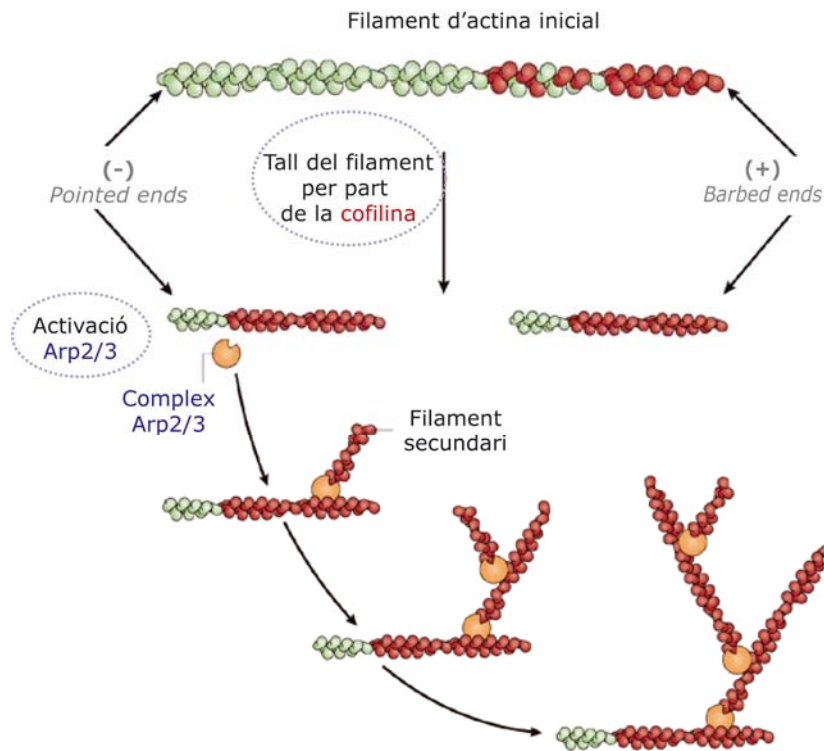
Les proteïnes diana de Rac i Cdc42 que promouen canvis en el citoesquelet d'actina han estat motiu d'extensos estudis en la última dècada. La Ser/Thr quinasa p65PAK (**PAK**) és una de les principals proteïnes activades tant per Rac com per Cdc42 en el control de la dinàmica dels filaments d'actina i l'adhesió cel·lular en la migració cel·lular (Bokoch, 2003). En el procés de migració es requereix l'adhesió de la cèl·lula a la matriu extracel·lular, procés regulat principalment per integrines, per generar les forces de tracció necessàries al front i al cos cel·lular. La formació d'aquests complexos d'adhesió ha de ser dinàmica, ja que s'han de crear noves adhesions al front d'avanç i desacoblar d'altres a la part posterior de la cèl·lula per permetre que la cèl·lula avanci. Les proteïnes PAK regulen el *turnover* de les adhesions focals, juntament amb les proteïnes PIX i GIT1, per un mecanisme que actualment resulta desconegut (Manabe et al., 2002; Obermeier et al., 1998). Per altra banda, les PAKs també fosforilen i activen les proteïnes LIM quinases (**LIMKs**), proteïnes que regulen la polimerització d'actina i l'acoblament dels microtúbuls (Bernard, 2007) a través del control de la cofilina. La cofilina forma part de la família ADF/cofilin, un conjunt de proteïnes implicades en

la reorganització del citoesquelet d'actina a través de la interacció directa amb l'actina monomèrica (G-actina) i l'actina en forma de filaments (F-actina). L'activitat de la cofilina és regulada reversiblement per fosforilació en el residu Ser3 (Arber et al., 1998; Stanyon and Bernard, 1999). Les LIMKs són responsables de la fosforilació de la cofilina en aquest residu i de la seva conseqüent inactivació ja que la cofilina fosforilada no pot unir-se a l'actina; mentre que certes fosfatases, com per exemple slingshot (Niwa et al., 2002), activen la cofilina defosforilant el residu Ser3 (Figura I14 B). La cofilina activada (defosforilada) promou; i) un increment en la velocitat de dissociació dels monòmers d'actina de l'extrem *pointed* (-) dels filaments i, per tant, afavoreix l'escurçament dels filaments d'actina i augmenta la quantitat de G-actina a la cèl·lula; ii) el tall dels filaments d'actina, de tal manera que augmenta el número d'extrems *pointed* i *barbed*, efecte que pot traduir-se en un augment de la polimerització neta ja que suposa un augment del número d'extrems que poden polimeritzar (o en una despolimerització dels filaments en el cas que hi hagi proteïnes *cap-binding* que evitin la polimerització d'aquests nous extrems creats) (Bamburg and Wiggan, 2002; Carlier et al., 1999; Edwards et al., 1999; Pavlov et al., 2007) (Figura I14 B). L'activació localitzada de la LIMK1, i la conseqüent inactivació de la cofilina, per part de factors quimiotàctics inhibeix la despolimerització dels filaments d'actina, afavorint l'estabilització i l'augment de la xarxa de filaments que dirigeixen les protrusions de membrana. Diversos estudis realitzats en una gran varietat de tipus cel·lulars han demostrat que l'alteració dels nivells d'activació de les quinases i fosfatases que regulen la cofilina donen lloc a la reorganització del citoesquelet d'actina necessària perquè tingui lloc la migració cel·lular. No obstant s'han obtingut resultats contradictoris en relació a com els canvis a nivell de l'activitat de la cofilina regulen el procés de migració (Huang et al., 2006; Scott and Olson, 2007; Wang et al., 2007), el que queda clar és que és la *ratio* del recanvi de la fosforilació de cofilina el que resulta crucial en el control dels canvis ràpids del citoesquelet d'actina en la formació de protrusions de membrana.



**Figura I14. Els filaments d'actina i la cofilina.** (A) En estat basal, els filaments d'actina tenen una llargada estable perquè es manté una proporció entre l'ensamblatge de subunitats de G-actina a l'extrem *barbed* (+) i el desensamblatge a l'extrem *pointed* (-). Els extrems (+) dels filaments d'actina tenen més afinitat pels monòmers d'actina que els extrems (-) i per això tendeixen a polimeritzar més ràpid. La hidròlisi de l'ATP unit a l'actina globular es dona als filaments d'actina, fet que resulta en que en els filaments es poden trobar subunitats que contenen ADP (lila) i subunitats que contenen ATP (taronja). Així, hi ha un flux de subunitats a través del filament encara que no hi hagi un creixement net del filament. Aquest procés es coneix amb el nom de *treadmilling*. (B) Esquema del cicle de fosforilació de la cofilina. La fosforilació de la cofilina en Ser3 per part de LIMK1, entre d'altres quinases, inhibeix la seva capacitat d'unir-se a F-actina, donant lloc a l'estabilització de la F-actina. La defosforilació de la cofilina per part de fosfatases com slingshot estimula la despolimerització i el tall de F-actina. Adaptat de Huang et al. (2006).

Les Rho GTPases també modulen directament als membres de la família WASP/SCAR/WAVE, proteïnes *scaffold* que funcionen com a reguladors de la polimerització d'actina (Takenawa and Miki, 2001). En el seu estat activat, aquestes proteïnes estimulen el complex Arp2/3, que estimula, juntament amb la cofilina, la polimerització d'actina tant *de novo* com a partir dels extrems *barbed* (+) o de les branques laterals dels filaments preexistents (Figura I15). S'ha proposat que el complex Arp2/3 resulta crític en la formació de la morfologia dendrítica de l'actina als lamelipodis (Weaver et al., 2003). WASP/WAVE també es poden unir a profilina, que actua sinèrgicament amb Arp2/3 per incrementar la velocitat de la polimerització d'actina (Bokoch, 2003; Yang et al., 2000). Cdc42 activa WASP i N-WASP directament, i aquest procés requereix com a cofactor el lípid PI(4,5)P<sub>2</sub> (Rohatgi et al., 1999; Rohatgi et al., 2001). Rac activa indirectament, a través d'un mecanisme en el que participa el complex adaptador Nck, la família de proteïnes formada per Scar/WAVE (Eden et al., 2002; Rohatgi et al., 2001).



**Figura I15. Esquema de la polimerització de F-actina.** Durant el procés de polimerització dels filaments d'actina, les subunitats de G-actina amb ATP s'uneixen amb més preferència a l'extrem *barbed* (+) ja que aquest extrem és de ràpid creixement. Les subunitats d'actina dibuixades de color verd indiquen ATP-actina i les de color vermell ADP-actina. La cofilina pot induir la polimerització dels filaments d'actina a través del tall dels filaments preexistents, de tal manera que incrementa el número d'extrems lliures, fet que resulta en un augment de la polimerització de la fibra d'actina. El complex Arp2/3 activat s'uneix al lateral dels filaments d'actina i inicia la nucleació d'un nou filament. El complex Arp2/3 s'uneix amb més afinitat a llocs del filament inicial que s'acaben de polimeritzar a partir de l'actina globular que conté ATP (verd), i la cofilina posa a disposició aquests nous filaments induint un tall dels filaments perquè es formin nous extrems *barbed* que potencien la polimerització. Adaptat de Wang et al. (2007).

La funció de Rho en les cèl·lules en migració està relacionada amb la formació de les adhesions focals i la contractilitat cel·lular, de tal manera que Rho és la principal responsable de la contracció del cos cel·lular i de la retracció de la part posterior de la cèl·lula. Una de les proteïnes diana de Rho en l'estimulació de l'acoblament dels filaments d'actina-miosina, i per tant, de la contractilitat és la Ser/Thr quinasa p160ROCK (ROCK) (Figura



I12). Rho i ROCK han estat implicades en el despreniment de la part posterior de la cèl·lula durant la migració de cèl·lules aïllades com els leucòcits i els macròfags; no obstant, alguns autors han proposat que no participen en la migració de cèl·lules que es mouen conjuntament (Ablas et al., 2001; Nobes and Hall, 1999). ROCK en el seu estat activat, de la mateixa manera que PAK, pot fosforilar i activar la LIMK1, que alhora fosforila i inactiva la cofilina (Maekawa et al., 1999; Sumi et al., 2001). També s'ha proposat que ROCK fosforila la fosfatasa de la miosina de tal manera que la inactiva (Mitchison and Cramer, 1996), fet que dóna lloc a un increment dels nivells de fosforilació de la miosina, permetent que aquesta s'uneixi als filaments d'actina i es generi força contràctil a la part posterior de la cèl·lula en migració (Kawano et al., 1999), promovent així el moviment del cos cel·lular i facilitant el despreniment de la part posterior (Mitchison and Cramer, 1996).

L'activitat de Rho al front de la cèl·lula en migració és incompatible amb la formació de protrusions de membrana i, per tant, existeixen mecanismes que inhibeixen la seva activitat al front d'avanç. Un dels mecanismes proposats és a través de Rac, doncs s'ha demostrat en múltiples línies cel·lulars que la sobreexpressió d'una forma mutant constitutivament activada de Rac inhibeix la funció de Rho (Sander et al., 1999). Els mecanismes moleculars implicats en aquest procés no es coneixen amb certesa, no obstant alguns autors han suggerit que és Rac, a través de PAK, qui inactiva la quinasa encarregada de fosforilar la cadena lleugera de la miosina (**MRCK**), fet que dóna lloc a la disminució dels nivells de fosforilació de la miosina i a la retracció de la part posterior de la cèl·lula (Kiosses et al., 1999; Sanders et al., 1999) (Figura I12). Altres autors han demostrat que PAK pot fosforilar la cadena lleugera de la miosina directament (Sells, 1999).

Una altra proteïna diana de Rho que cal destacar és la proteïna *scaffold* **mDia**. mDia pertany a la família de proteïnes que tenen homologia amb la proteïna formina, i ha estat implicada en la nucleació i la polimerització dels filaments d'actina tant en *Drosophila* com en llevats (Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002) (Figura I12). La unió de Rho-GTP a mDia canvia la conformació de mDia i l'activa. mDia coopera amb ROCK en l'acoblament dels filaments d'actina-miosina, no obstant no es coneixen amb profunditat els mecanismes moleculars implicats en aquesta acció (Narumiya et al., 2009).

El control de la dinàmica del citoesquelet d'actina per part les Rho GTPases també regula altres funcions cel·lulars a part de la migració com són la proliferació cel·lular i la transcripció gènica (Etienne-Manneville and

Hall, 2002). Breument, en relació a la participació de les Rho GTPases en el control de la proliferació cel·lular s'ha descrit que RhoA, Rac1 i Cdc42 regulen processos mitogènics promovent l'avanç de les cèl·lules a través de la fase G1 del cicle cel·lular (Olson et al., 1995; Roovers and Assoian, 2003). Cdc42 intervé també en l'establiment de la orientació del fus mitòtic i estabilitza la unió del cinetocor a través de l'activació de la proteïna efectora mDia. D'aquesta manera assegura l'alineament dels cromosomes a la placa metafàsica (Castrillon and Wasserman, 1994; Watanabe et al., 1997). També s'ha descrit que les GTPases RhoA i RhoD juguen un paper clau durant el procés de la citocinesis (Takaishi et al., 1995; Yoshizaki et al., 2003). En el cas de RhoA aquest procés està mediat per tres proteïnes efectores: ROCK, citron i mDia. ROCK fosforila i activa la cadena lleugera de la miosina, directament i/o a través de la inhibició de la fosfatasa de la cadena lleugera de la miosina (Amano et al., 1996; Kosako et al., 1999). Citron també fosforila la cadena lleugera de la miosina, mentre que mDia promou la nucleació i polimerització de l'actina al solc mitòtic (Li and Higgs, 2003; Watanabe and Higashida, 2004; Watanabe et al., 1997) (Figura I12). Com a conseqüència de l'acció d'aquests efectors, es produeix un increment de la contractilitat de les fibres d'actina-miosina en el solc mitòtic, fet que permet que es separin les cèl·lules filles. Per altra banda, en relació a la participació de les Rho GTPases en la regulació de la transcripció gènica, s'ha descrit que la sobreexpressió de formes activades de RhoA, Rac1 i Cdc42 dóna lloc a l'activació de vies de senyalització de quinases que indueixen l'activació de JNK, de tal manera que es regula l'activitat del factor de transcripció c-Jun de manera específica en funció del tipus cel·lular (Coso et al., 1995). Les Rho GTPases també regulen la transcripció regulada pels factors SRF (Hill et al., 1995), NK-k (Perona et al., 1997) (Montaner et al., 1998) i c-Myc (Chiariello et al., 2001). Els patrons globals d'expressió gènica induïts per les formes activades de les Rho GTPases han estat analitzats mitjançant l'ús de *microarrays* (Teramoto et al., 2003) i s'ha demostrat que les formes sobre-activades de Rac1 i Cdc42 regulen positivament la transcripció de gens que codifiquen per proteïnes d'adhesió cel·lular i components de la matriu extracel·lular; en canvi, la sobreexpressió d'una forma constitutivament activada de RhoA incrementa la transcripció de gens relacionats amb el cicle cel·lular i de factors promotors del creixement.

### **Regulació del citoesquelet de microtúbuls i la polaritat cel·lular**

Els efectes de les Rho GTPases en el control de la dinàmica del citoesquelet d'actina ha aclaparat gran part de l'atenció en els últims anys,

no obstant avui en dia està totalment consolidat el paper de les Rho GTPases en la regulació del citoesquelet de microtúbuls (Siegrist and Doe, 2007; Wittmann and Waterman-Storer, 2001). S'ha suggerit que el citoesquelet de microtúbuls no juga un paper essencial en la quimiotaxis a distàncies curtes; no obstant, sí que resulta imprescindible per a la migració eficient i persistent ja que en aquesta es requereix l'estabilització de la polaritat cel·lular, i que depèn de la reorganització del citoesquelet de microtúbuls.

En els fibroblasts, els extrems (-) dels microtúbuls estan ancorats al MTOC, mentre que els extrems (+) estan dirigits a la perifèria cel·lular i contínuament alternen entre dos fases, elongació i disminució, procés que es coneix amb el nom d'instabilitat dinàmica. La instabilitat dinàmica és la responsable de permetre que els microtúbuls s'extenguin fins a dominis concrets de la perifèria cel·lular (Desai and Mitchison, 1997). En cèl·lules que presenten una morfologia polaritzada, els extrems (+) dels microtúbuls són capturats i estabilitzats al front d'avanç, on participen en el transport direccional de proteïnes específiques necessàries per a mantenir la polarització. Així, l'estabilització temporal i localitzada dels microtúbuls juga un paper crític en la polarització cel·lular.

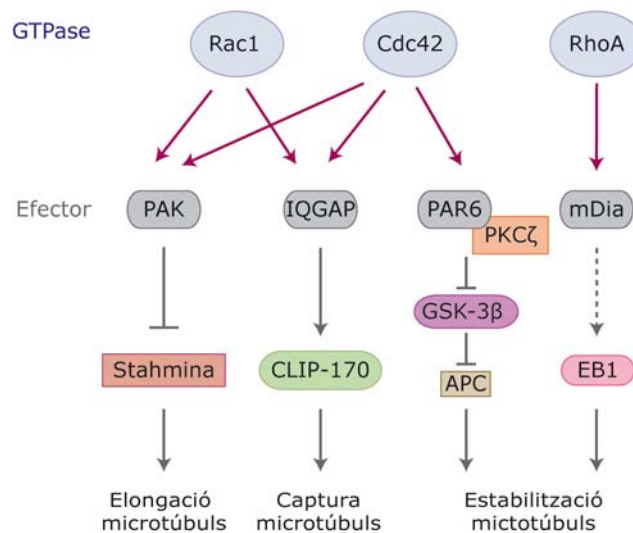
Múltiples evidències indiquen que les Rho GTPases regulen la dinàmica dels microtúbuls i, per tant, participen en l'establiment de la polaritat cel·lular. Rho participa en l'estabilització dels microtúbuls a través de la regulació de la proteïna mDia, que s'uneix directament als microtúbuls i en promou el *capping* (Palazzo et al., 2001). A més a més, Ishizati et al. van descriure que la forma activa de mDia indueix l'alineació longitudinal dels microtúbuls en paral·lel amb els filaments d'actina al llarg de l'eix longitudinal de la cèl·lula (Ishizaki et al., 2001). Rac promou l'elongació i estabilització dels microtúbuls a través PAK, que fosforila i inactiva la proteïna desestabilitzadora de microtúbuls stathmina (Daub et al., 2001; Kuntziger et al., 2001) (Figura I16).

La Rho GTPasa que clàssicament s'ha proposat com a element clau en la definició i manteniment de la polaritat cel·lular en resposta a factors extracel·lulars és Cdc42 (Ridley, 2006). S'ha descrit, per exemple, que la inhibició de Cdc42 en macròfags bloqueja la seva habilitat per induir quimiotaxi a favor del gradient del factor CSF-1, encara que no n'inhibeix la migració (Ridley, 2001). Estudis realitzats en neutròfils suggereixen que el procés d'establiment de l'asimetria i la polaritat cel·lular està regulat per un *feedback loop* que involucra Rac i PIP<sub>3</sub>, i que es tracte d'un mecanisme controlat per Cdc42 (Wang et al., 2002). Cdc42 també s'ha descrit que juga un paper clau en la migració polaritzada a través del control de la

reorganització del citoesquelet de microtúbuls i del centrosoma en la direcció de migració, fet que facilita la migració cel·lular a través del direccionament de les vies encarregades del transport cap al front d'avanç (Ma and Chisholm, 2002). Cdc42 també regula la polarització cel·lular a través de la regulació de la proteïna *scaffold* Par6, la proteïna quinasa C atípica PKC $\zeta$ , GSK-3 $\beta$  i APC (Figura I16). Par6-PKC $\zeta$  funcionen com un complex proteic implicat en la polarització cel·lular que es troba conservat al llarg de l'evolució de tal manera que Cdc42 activa PKC $\zeta$  a través de Par6 (Etienne-Manneville et al., 2005; Ohno, 2001). GSK-3 $\beta$  i APC es van descriure inicialment com els components involucrats en la degradació de la  $\beta$ -catenina, no obstant actualment es coneix que estan involucrats en la regulació de l'estabilitat dels microtúbuls ja que s'ha descrit que APC s'acumula als extrems dels microtúbuls i s'estén a regions de migració activada (Nathke et al., 1996), de tal manera que la fosforilació de APC per part de GSK-3 $\beta$  disminueix la unió de APC als microtúbuls (Zumbrunn et al., 2001). Etienne-Manneville and Hall van demostrar que aquestes dues vies de senyalització (Cdc42-Par6- PKC $\zeta$  i GSK-3-APC) estan relacionades, així: Cdc42 activa PKC $\zeta$  a través de Par6 donant lloc a la fosforilació i inactivació de GSK-3 $\beta$  al front d'avanç de les cèl·lules en migració i GSK-3 $\beta$  inactivat permet que APC estabilitzi els microtúbuls al front d'avanç (Etienne-Manneville and Hall, 2003; Etienne-Manneville et al., 2005). Aquesta via de senyalització s'ha demostrat que està involucrada en la regulació de la polarització dels microtúbuls i la reorientació del MTOC en la direcció de la migració. Tenint en compte el fet que la inactivació de GSK-3 $\beta$  es manté aproximadament durant 12 h, s'ha suggerit que la via de senyalització Cdc42-Par6-PKC $\zeta$ -GSK3 $\beta$ -APC és important en el manteniment a llarg termini de la polaritat cel·lular. Alhora, APC interacciona amb la proteïna Asef, un GEF específic de Rac, fet que suggereix la cooperació entre Rac i Cdc42 al front d'avanç (Kawasaki et al., 2000). També hi han evidències que demostren que APC es pot moure al llarg dels microtúbuls, possiblement a través de la seva unió a la proteïna associada als microtúbuls EB1 i el complex motor kinesina/KAP3 (Gundersen, 2002; Jimbo et al., 2002; Nakamura et al., 2001). El moviment de APC en el sentit de l'extrem (+) dels microtúbuls en les cèl·lules en migració s'ha suggerit que pot servir per localitzar Asef a zones concretes on té lloc la polimerització d'actina dependent de Rac (Bienz, 2002; Jimbo et al., 2002). Les proteïnes Par s'han associat principalment a Cdc42, no obstant això, Par3 regula l'activitat de Rac a través de la unió al RacGEF Tiam1, i Par6-PKC $\zeta$  inhibeix l'activitat RhoA a través de p190RhoGAP (Goldstein and Macara, 2007). El complex Par3-PKC $\zeta$  juntament amb Tiam1 està implicat amb el manteniment de la polaritat cel·lular durant la quimiotaxi de

queratinòcits, localitzant-se al front d'avanç on actua establint els microtúbuls (Pegtel et al., 2007).

Les Rho GTPases necessiten reconèixer els microtúbuls i unir-s'hi per poder-ne regular l'estabilització. Les proteïnes CLIP-170, EB1 i el complex dyneina-dynactina participen en la detecció d'emplaçaments per als microtúbuls a la regió cortical. CLIP-170 s'ha descrit que s'acumula als extrems (+) dels microtúbuls i participa en el reconeixement entre els endosomes i els microtúbuls (Pierre et al., 1992). A més a més, CLIP-170 interacciona amb IQGAP1, una proteïna efectora de la senyalització de Cdc42 i Rac que s'uneix a l'actina (Fukata et al., 2002). *In vitro*, s'ha demostrat que IQGAP1 s'associa als microtúbuls a través de CLIP-170 (Figura I16). Les formes activades de Rac1 i Cdc42 poden formar un complex proteic juntament amb IQGAP1 i CLIP-170, de tal manera que es potencia la interacció de IQGAP1 amb CLIP-170 al front d'avanç. S'ha proposat que Rac1 i Cdc42 marquen dominis específics a zona cortical on són dirigits IQGAP1 i CLIP-170, donant lloc a la polarització dels microtúbuls i a la conseqüent polarització cel·lular (Fukata et al., 2003).



**Figura I16. Les Rho GTPases regulen la polarització cel·lular.** Rac activa PAK i aquesta fosforila i inactiva stathmina, una proteïna desestabilitzadora de microtúbuls. A més a més, Rac i Cdc42 regulen la unió inicial als microtúbuls a través de IQGAP1 i CLIP-170. Cdc42 participa en la polarització del centrosoma i la dinàmica dels microtúbuls a través de l'activació del complex Par6-PKCζ, que dona lloc a la inhibició de GSK-3β i afavoreix l'associació de APC amb els extrems (+) dels microtúbuls. L'activació de Rho induïx l'estabilització dels microtúbuls a través de mDia per un mecanisme molecular encara desconegut. Adaptat de Fukata et al. (2003).

### 4.3- La família de proteïnes quinases lipídiques PI3K

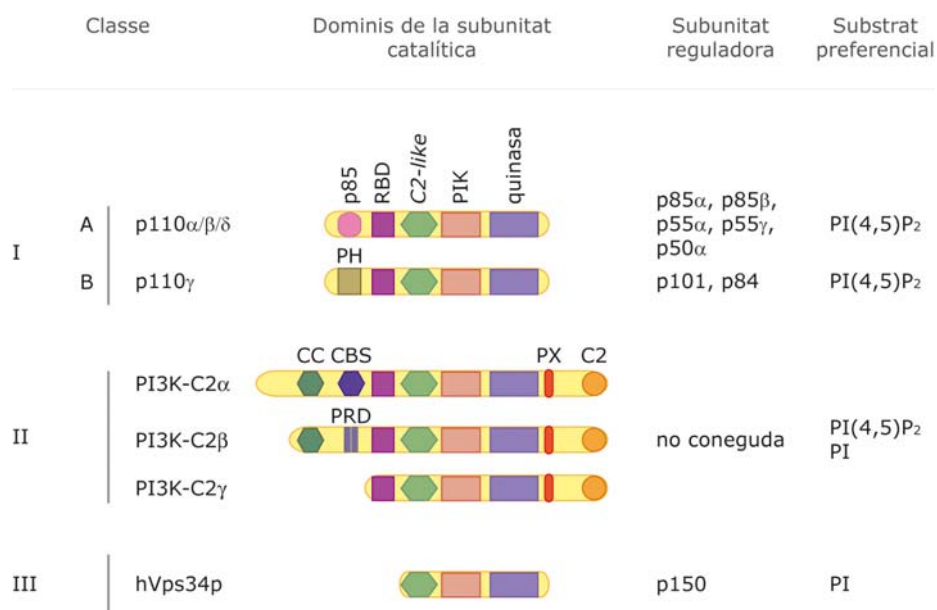
La família de proteïnes quinases lipídiques *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) i els seus productes lipídics regulen la migració de múltiples tipus cel·lulars a través del reclutament de proteïnes amb dominis PH a regions concretes de membrana i indirectament a través de la interrelació amb altres vies de senyalització, com és el cas de les Rho GTPases. Les PI3Ks regulen processos com el manteniment de la polaritat cel·lular i la definició del front d'avanç cel·lular. S'ha proposat que té lloc un *feedback loop* positiu entre la ruta de senyalització de les Rho GTPases i la de PI3K que integren i amplifiquen la senyalització cel·lular necessària perquè es dugui a terme una migració cel·lular eficient (Fenteany and Glogauer, 2004).

Les PI3Ks regulen múltiples processos com la supervivència, la proliferació cel·lular i la migració. Les proteïnes de la família PI3K es classifiquen en tres subgrups en base a l'especificitat dels seus substrats i a l'homologia en la seva seqüència: classe I (A i B), classe II i classe III (Vanhaesebroeck et al., 2001) (Figura I17). Les PI3K catalitzen la fosforilació de lípids a l'anell d'inositol en posició 3' i actuen com a missatgers secundaris, de tal manera que els efectes de PI3K es transmeten a través de la unió i regulació d'aquests productes lipídics a una gran varietat de proteïnes efectores.

Les proteïnes PI3K de classe IA i IB presenten una gran homologia estructural i les proteïnes d'ambdós grups formen heterodimers estables compostats per una subunitat catalítica de 110 kDa i una subunitat reguladora més petita i utilitzen preferentment *in vivo* el substrat PI(4,5)P<sub>2</sub>. Les PI3K de classe IA s'activen en resposta a receptors tirosina quinasa i a la senyalització regulada per Ras. S'han descrit tres isoformes de la subunitat catalítica de les PI3K de classe IA:  $\alpha$  i  $\beta$ , que tenen una distribució ubiqua, i la  $\delta$ , que presenta un patró d'expressió més restringit. Les tres isoformes senyalitzen associades a una de les cinc subunitats reguladores descrites (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55 $\alpha$ , p55 $\gamma$ , p50 $\alpha$ ) (Figura I17). El grup de PI3K de classe IB està format per una única isoforma catalítica, p110 $\gamma$ , que es pot unir a les subunitats reguladores p101 o p84 (Suire et al., 2005), i és activada en resposta a senyals dependents de receptors acoblats a proteïna G (GPCR) i Ras. Les proteïnes de les classes IA i IB són els membres de la família de PI3K que s'han estudiat amb més profunditat i juntament amb el seu producte lipídic PI(3,4,5)P<sub>3</sub> han estat implicades en el control de la migració i la polaritat en múltiples línies cel·lulars (Cain and Ridley, 2009).

El subgrup de PI3Ks de classe II està format per tres isoformes en mamífers (PI3K-C2 $\alpha$ , PI3K-C2 $\beta$ , PI3K-C2 $\gamma$ ) que es troben associades a membranes i s'ha proposat que no requereixen una subunitat reguladora per senyalitzar, si bé si poden formar part de complexos multiproteics (Fry, 2001). Les proteïnes d'aquesta classe presenten motius d'hèlix superenrotllada i motius rics en prolines prop de l'extrem N-terminal que s'ha suggerit que poden participar en la mediació d'interaccions proteïna-proteïna encara per identificar (Foster et al., 2003). Els membres de la classe II de PI3Ks s'han implicat en la regulació de l'adhesió cel·lular i la reorganització del citoesquelet d'actina durant la migració cel·lular en diferents tipus cel·lulars (Domin et al., 2005; Maffucci et al., 2005), no obstant és probable que la seva importància s'hagi subestimat a conseqüència de la insuficient i limitada acció de les eines farmacològiques que existeixen contra aquestes isoformes (Domin et al., 1997; Virbasius et al., 1996).

El subgrup de classe III està compost per un sol membre, Vps34, i aquest requereix la subunitat reguladora p150 per a la seva activitat. Vps34 està involucrat en múltiples passos del tràfic de membrana però fins al moment no s'he li ha adjudicat cap funció específica en el procés de migració cel·lular (Backer, 2008). En la majoria d'estudis realitzats en relació a la participació de PI3K en la migració cel·lular s'han utilitzat inhibidors de PI3K d'ampli espectre com és el cas de la wortmanina i LY294002. Recentment, s'han desenvolupat inhibidors específics de les isoformes de la classe I de PI3K que han permès estudiar la contribució de cada una de les isoformes en diferents processos cel·lulars (Bilancio et al., 2006; Knight et al., 2006).



**Figura I17. Les proteïnes de la família de PI3K.** Representació esquemàtica dels dominis de les subunitats catalítiques de les diferents isoformes de PI3K i informació relativa a la subunitat reguladora amb la qual dimeritzen per senyalitzar i el substrats que utilitzen preferencialment *in vivo*. CBS, clathrin-binding site; CC, domini coiled-coil; p85, domini d'unió a p85; PRD, proline-rich domain; PX, phox domain; RBD, Ras-binding domain. Adaptat de Cain and Ridley (2009).

El paper de les proteïnes de la classe IA i IB de PI3K en la polarització cel·lular, la formació de protrusions, l'adhesió i la migració han estat motiu d'estudis extensos, a continuació es presenten els aspectes més rellevants.

**Participació de les PI3Ks de classe I en la formació de protrusions**

Com ja hem comentat anteriorment, perquè tingui lloc la migració eficient en resposta a l'estimulació amb un factor quimiotàctic les cèl·lules s'han de polaritzar i estendre protrusions de manera persistent en la direcció del moviment. Les protrusions es formen al front d'avanç de la cèl·lula i es componen normalment de lamelipodis, encara que en alguns tipus cel·lulars també s'ha demostrat que els filopodis contribueixen a la migració (Govek et al., 2005). En l'estudi de les senyals que regulen la formació de les protrusions s'ha utilitzat clàssicament el model cel·lular de fibroblasts en resposta a l'estimulació amb factors de creixement. En aquest sentit, la isoforma p110 $\alpha$  s'ha implicat en la formació de protrusions en cèl·lules estimulades amb EGF, mentre que la sobreexpressió de p110 $\beta$ ,



però no la p110 $\alpha$ , s'ha vist que inhibeix la formació de protrusions (Yip et al., 2007), fet que suggereix que les diferents isoformes de PI3K tenen diferents funcions en la resposta a factors de creixement. S'ha proposat que la formació de protrusions de membrana és en molts casos dependent de l'activitat de Ras, ja que la cinètica d'activació de Ras coincideix amb l'acumulació de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> al front d'avanç, i en experiments realitzats amb siRNAs contra K-Ras s'ha observat que s'aboleix la formació de protrusions dependent de EGF. No obstant, cèl·lules transfectades amb siRNAs contra Rac1 també presenten una motilitat reduïda, fet que s'ha proposat que és deguda a la inhibició de la formació d'adhesions regulades per integrines. Aquestes evidències experimentals suggereix que els membres de la família de PI3K regulen tant la formació de protrusions com d'adhesions, i que això ho fan a través de vies de senyalització que impliquen Ras i Rac (Yip et al., 2007). També s'ha suggerit que les PI3Ks regulen la formació de protrusions a través del control de la proteïna WAVE, ja que p85, una de les subunitats reguladores dels membres de PI3K de classe IA, interacciona amb WAVE3, proteïna implicada en la formació de lamelipodis en resposta a PDGF (Sossey-Alaoui et al., 2005).

### **Participació de les PI3Ks de classe I en l'adhesió cel·lular**

L'adhesió cel·lular és essencial en el procés de migració, en particular per l'estabilització de les protrusions a través de la unió al substrat. S'ha descrit la contribució de diferents receptors de superfície en el procés d'adhesió que té lloc durant la migració cel·lular i els més ben caracteritzats són les integrines (Ridley et al., 2003). Les PI3Ks participen en la regulació de l'activitat de les integrines (senyalització *inside-out*) i, alhora, l'activitat de les PI3Ks també poden ser regulada per part de les integrines (senyalització *outside-in*) (Ginsberg et al., 2005). En la senyalització *outside-in*, la unió del lligand al domini extracel·lular de les integrines causa un canvi conformacional en el domini citoplasmàtic d'aquestes que permet que s'hi uneixin certes proteïnes. En els fibroblasts, l'activació de les integrines dóna lloc a la formació d'adhesions focals (Worth and Parsons, 2008). En aquest sentit s'ha descrit que la proteïna FAK és activada per unió a la regió citoplasmàtica d'algunes integrines, fet que dóna lloc a l'activació de la tirosina quinasa Src que al seu torn estimula Rac, a través del GEF per a Rac DOCK180, i PI3K a través de la via de senyalització de Ras (Cote and Vuori, 2007). En relació a la senyalització *inside-out*, la senyalització rebuda per certs receptors de membrana activa vies de senyalització que modifiquen el domini citoplasmàtic de les integrines, regulant d'aquesta manera la capacitat d'unio del lligand del domini extracel·lular. L'activació *inside-out* de les

integrines s'ha descrit que és regulada sinèrgicament per varies vies de senyalització (Ginsberg et al., 2005) com per exemple per PKC, Rap1 i PI3K (Somanath et al., 2007; Tadokoro et al., 2003; Wegener et al., 2007). Les PI3Ks participen en la migració cel·lular dependent d'integrines a través de la modulació de la resposta de les GTPases (Han et al., 1998; Welch et al., 2003). I a la inversa, en certes circumstàncies, l'activació de Rac dóna lloc a la formació de complexos d'integrines al front d'avanç (Kiosses et al., 2001), incrementant d'aquesta manera la intensitat de la resposta. Aquests resultats suggereixen que té lloc una situació de *feedback positiu*, ja que el reclutament addicional d'integrines i la formació de noves adhesions promou, al seu torn, un major nivell d'activitat de Rac. Les evidències que demostren funcions específiques de les PI3Ks en la senyalització *inside-out* s'han aconseguit amb estudis realitzats en leucòcits on s'ha descrit que les isoformes  $\delta$  i  $\gamma$  de la classe I de PI3K regulen l'adhesió cel·lular i *spreading* en diferents tipus de leucòcits com macròfags i monòcits (Constantin et al., 2000; Gerszten et al., 2001; Lian et al., 2005; Sadhu et al., 2003). No obstant, sembla que les efectes de les PI3Ks són específics del tipus cel·lular ja que en neutròfils, per exemple, s'ha descrit que la inhibició farmacològica de PI3K no té cap efecte en adhesió ni en *spreading* (Sadhu et al., 2003).

A mida que la cèl·lula es mou endavant, té lloc la desestructuració de les adhesions focals de la part posterior de la cèl·lula. En cèl·lules de mamífers, aquests procés depèn de l'activació localitzada de Rho a la part posterior de la cèl·lula, que causa la retracció a través de la regulació de la miosina (Ridley et al., 2003), no obstant en certes circumstàncies s'ha vist que Rac1 també està implicat en la retracció de la part posterior (Gardiner et al., 2002). Les PI3Ks regulen l'activitat de RhoA en la retracció de la cua ja que cèl·lules endotelials on s'ha reduït l'activitat de PI3K $\alpha$ , a diferència del que passa amb PI3K $\beta$ , tenen defectes en la migració i presenten una cua llarga semblant a una protrusió a la part posterior de la cèl·lula, fet que es correlaciona amb nivells baixos de RhoA (Graupera et al., 2008).

Un cop s'han desestructurat les adhesions regulades per integrines a la part posterior de la cèl·lula, aquestes integrines són internalitzades a través de vesícules d'endocitosi i són transportades al front d'avanç mitjançant un procés regulat per les petites GTPases de la família Rab (Jones et al., 2006). La subunitat catalítica de la classe I p110 $\beta$  i la subunitat reguladora p85 $\alpha$  s'associen a Rab5, proteïna implicada en la regulació de l'endocitosi (Zerial and McBride, 2001). A més a més, també s'ha descrit que la subunitat p85 regula negativament Rab5 a través de la seva activitat GAP intrínseca (Chamberlain et al., 2004), fet que implica

que els membres de la classe I de PI3K afecten directament l'endocitosi de receptors. En fibroblasts, el reciclatge d'integrines des de la part posterior de la cèl·lula al front d'avanç s'ha descrit que també és regulat per Akt, una de les dianes principals de la via de senyalització de PI3K (Ridley et al., 2003).

### **Participació de les PI3Ks de classe I en la migració coordinada d'un conjunt de cèl·lules**

La migració coordinada d'un conjunt de cèl·lules té lloc principalment durant la morfogènesi de l'embrió en processos com la gastrulació i l'organogènesi. No obstant, també s'ha descrit que tenen lloc processos que impliquen la migració cel·lular col·lectiva en l'individu adult, concretament en respostes relacionades amb la reparació de teixits i la cicatrització de ferides (Friedl et al., 2004). L'eficiència de la migració col·lectiva depèn dels contactes cèl·lula-cèl·lula, procés que involucra la PI3K. S'ha descrit que les PI3Ks són reclutades a zones de contactes cel·lulars durant la formació de les unions epitelials (Pece et al., 1999), on regulen la funció de la cadherina a través de l'activació de vies de senyalització de Src, i que tenen un impacte directe en la força de les adhesions cèl·lula-cèl·lula (Gavard et al., 2004; Kovacs et al., 2002; McLachlan et al., 2007). Aquest procés s'ha suggerit que involucra l'activació de Rac per part de PI3K, ja que la reorganització del citoesquelet d'actina estimulada per E-cadherina depèn de l'activació de Rac i del seu GEF Tiam1, que és activat per part dels PI(3,4,5)P<sub>3</sub> (Kraemer et al., 2007; McLachlan et al., 2007).

En vista de les evidències presentades, podem afirmar que les diferents isoformes de PI3K participen en múltiples processos relacionats amb la migració cel·lular en diferents tipus cel·lulars, i cada vegada queda més clar que la contribució relativa de les PI3Ks en els diferents passos que tenen lloc durant la migració depenen de l'estat de la cèl·lula i de la combinació d'estímuls a la que es troba exposada. Fins al moment, la majoria d'estudis realitzats *in vivo* s'han concentrat en les isoformes de classe I, així que la futura generació d'inhibidors i ratolins *knock-out* per les isoformes de classe II esperem que permetran obtenir important informació sobre la contribució d'aquests membres en la migració cel·lular.

### **4.4- Les p38MAPKs**

Les p38MAPKs són una família de proteïnes activades en resposta a una gran varietat de processos, principalment en aquells relacionats amb l'estrès cel·lular i en la resposta a citoquines inflammatòries. El grup de

p38MAPKs està format per quatre membres: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\delta$  i p38 $\gamma$ . De totes ells, p38 $\alpha$  n'és el més ben caracteritzat. La isoforma p38 $\alpha$  va ser identificada en paral·lel per dos grups independents com una quinasa activada en resposta a estrès cel·lular (Rouse et al., 1994) i a IL-1 (Freshney et al., 1994) que podia fosforilar directament i activar la quinasa *MAPK-activated protein kinase 2* (MAPKAP-2 o MK2), proteïna responsable de la fosforilació de la *heat shock protein* Hsp27 (Stokoe et al., 1992). Les quatre isoformes de p38 s'expressen en la majoria de teixits, no obstant p38 $\gamma$  es troba abundantment expressada en múscul i p38 $\delta$  en testicle, pàncrees, intestí prim i ronyó (Goedert et al., 1997).

Clàssicament les proteïnes de la família de p38 s'han dividit en dos grups, en funció de les seves característiques,: un grup està format per p38 $\alpha$  i p38 $\beta$ , i l'altra per p38 $\delta$  i p38 $\gamma$ . p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  presenten una similitud en la seqüència aminoacídica del 75%, mentre que p38 $\delta$  i p38 $\gamma$  són un 62% i un 61% idèntiques a p38 $\alpha$  respectivament (p38 $\delta$  i p38 $\gamma$  presenten una homologia entre elles del 70% aproximadament). Els dos grups presenten diferències en la susceptibilitat a la inhibició per SB203580. Evidències experimentals *in vivo* i *in vitro* han demostrat que de les quatre isoformes, únicament p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  són inhibides per aquest compost (Cuenda et al., 1997). La base d'aquesta inhibició selectiva s'explica per la presència, en p38 $\alpha$  i p38 $\beta$ , d'un residu de Thr (Thr106) en el lloc d'unió a l'ATP que pot interaccionar amb un àtom de fluor de SB203580 i orientar l'inhibidor de tal manera que bloqueja l'entrada de l'ATP (Eyers et al., 1998; Gum et al., 1998). p38 $\delta$  i p38 $\gamma$  presenten un residu de Met, que conté una llarga cadena lateral, en la posició equivalent a Thr106, fet que evita que l'inhibidor es pugui unir al lloc d'unió a l'ATP. La tercera diferència entre aquests dos grups de MAPKs és en relació a l'especificitat pels substrats. S'ha descrit que, per exemple, les proteïnes Tau (Feijoo et al., 2005),  $\alpha$ 1-syntrophin (Hasegawa et al., 1999), SAP90/PSD95 (Sabio et al., 2004) i SAP97/hDlg (Sabio et al., 2005) són substrats preferencials *in vitro* de p38 $\delta$  i p38 $\gamma$ ; mentre que les proteïnes MK2 (Goedert et al., 1997), MK3 (Cuenda et al., 1997) i glicogen sintasa (Kuma et al., 2004) són fosforilades més eficientment per p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ .

La ruta de senyalització canònica de les MAPKs consisteix en una cascada de proteïnes quinases que s'activen de manera seqüencial en resposta a un factor extracel·lular i que acaben amb l'activació per fosforilació d'un factor de transcripció nuclear (Chang and Karin, 2001). La proteïna p38 representa el tercer nivell de la cascada de quinases, és activada directament per MKK3 i MKK6 (Kyriakis and Avruch, 2001), quinases que alhora són activades per les diferents MKKKs en funció del

tipus cel·lular i de l'estímul (Gallo and Johnson, 2002), entre les quals s'inclou TAK1 (Cheung et al., 2003). En el cas de les BMPs no es coneix amb profunditat el mecanisme molecular d'activació de p38, no obstant recentment Yamashita et al. han descrit el mecanisme mitjançant el qual els receptors de TGF $\beta$  activen la cascada de quinases (Yamashita et al., 2008). Els autors proposen que la proteïna TRAF6 interacciona amb els receptors de TGF $\beta$  a través del seu domini C-terminal homòleg a TRAF, fet que promou l'associació de TRAF6 amb TAK1, permetent d'aquesta manera la ubiquitinació i activació de TAK1 per part de TRAF6 i l'activació de la cascada de quinases de p38.

Una de les funcions de p38 identificades gràcies a l'ús de l'inhibidor SB203580 és la seva participació en la migració cel·lular quimiotàctica. La primera evidència experimental al respecte va ser publicada per Rousseau et al. i descrivia que SB203580 inhibeix la migració de cèl·lules endotelials estimulades amb VEGF (Rousseau et al., 1997). Posteriorment, s'ha demostrat que p38 $\alpha$  transmet senyals quimiotàctiques en una gran varietat de tipus cel·lulars: la migració de neutròfils en resposta a fMLP i C5a (Heit et al., 2002; Heuertz et al., 1999), la migració de cèl·lules de múscul llis vasculars estimulades amb PDGF, TGF $\beta$  i IL-1 $\beta$  (Hedges et al., 1999; Kotlyarov et al., 2002), mastòcits tractats amb factors de cèl·lules mare (Ishizuka et al., 2001) i cèl·lules epitelials estimulades amb CXCL12/SDF1 $\alpha$ , EGF, HGF, PDGF i TGF $\beta$  (Klekotka et al., 2001; Rousseau et al., 2006). La participació de les isoformes de p38 en la transducció de senyals quimiotàctiques s'han avaluat utilitzant cèl·lules derivades dels ratolins *knock-out* per les diferents isoformes i els resultats demostren que únicament p38 $\alpha$  està involucrada en la regulació de la migració cel·lular (Rousseau et al., 2006). El ratolí deficient per a p38 $\alpha$  mor durant l'embriogènesi per problemes en la formació de la placenta (Adams et al., 2000; Mudgett et al., 2000). S'ha proposat que té lloc un defecte en la invasió del mesènquima de l'al·lantoide a causa d'una alteració de la migració cel·lular que, en part, pot ser deguda a la pèrdua parcial de senyalització pro-angiogènica en resposta a VEGF i HGF (Mudgett et al., 2000). De fet, p38 $\alpha$  s'activa en situacions d'hipòxia, una condició que indueix l'expressió de VEGF, que podria contribuir al defecte en la senyalització angiogènica descrit en el ratolí *knock-out* per a p38 $\alpha$  (Pages et al., 2000).

En relació a les dianes de p38 $\alpha$  en el control de la migració cel·lular, els primers treballs publicats descriuen que l'activitat de p38 $\alpha$  a través de la fosforilació de hsp27 per part de MK2 està involucrada en reorganització del citoesquelet d'actina necessari per a la migració cel·lular

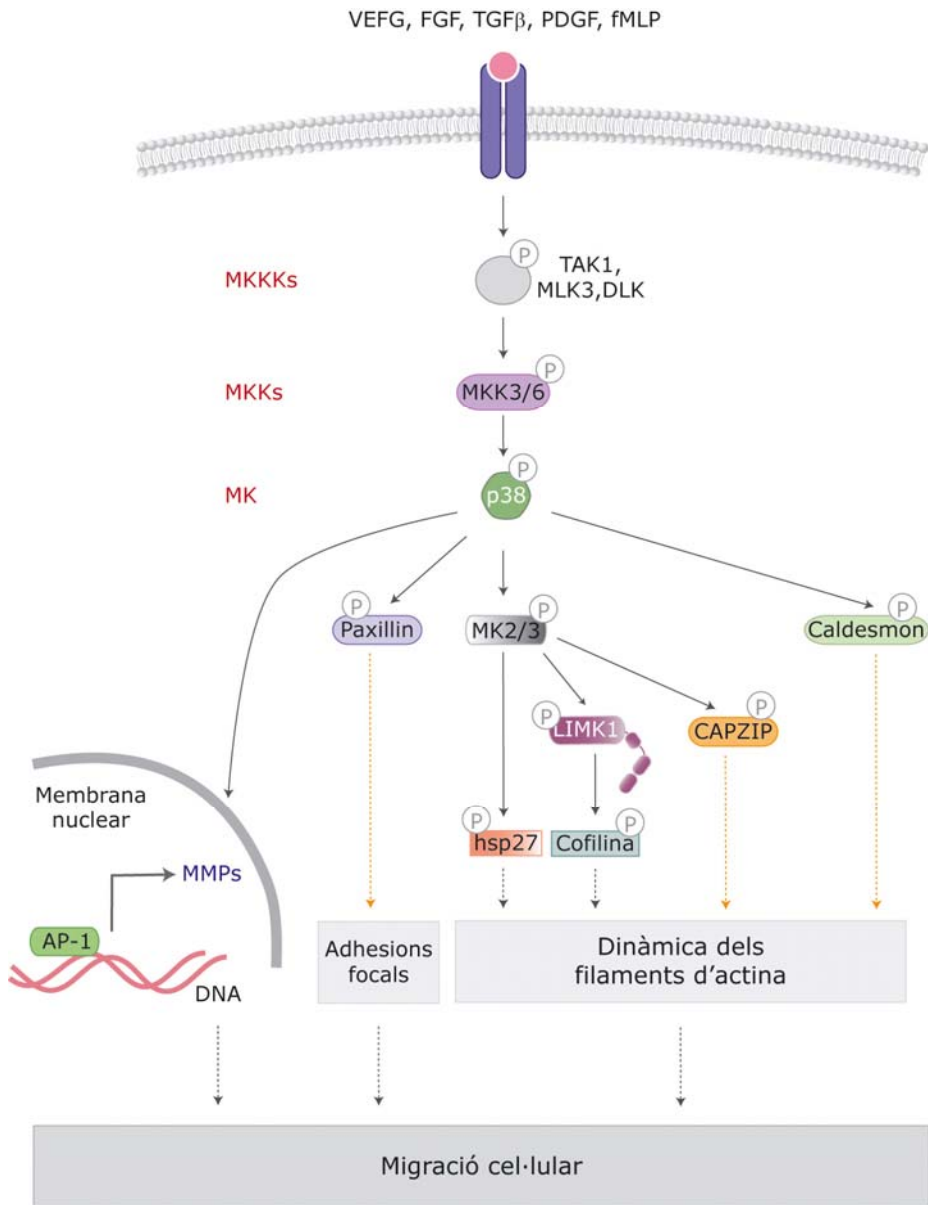
(Hedges et al., 1999; Piotrowicz et al., 1998; Rousseau et al., 1997). El paper de MK2 en aquesta via de senyalització es va confirmar amb resultats obtinguts amb cèl·lules derivades del ratolí *knock-out* per a MK2, on es va demostrar que la migració de cèl·lules de múscul llis vasculars, fibroblasts i macròfags es trobava compromesa (Kotlyarov et al., 2002; Rousseau et al., 2006). Experiments amb els ratolins *knock-out* per a MSK1 i MSK2, que també són proteïnes quinasa diana de p38 $\alpha$ , demostren que aquestes no estan implicades en la migració cel·lular (Rousseau et al., 2006). En la majoria de models estudiats, MK2 regula la dinàmica del citoesquelet d'actina a través de la fosforilació i inactivació de hsp27, una proteïna *cap-binding* dels filaments d'actina (Benndorf et al., 1994; Miron et al., 1991). La proteïna MK2 també regula la polimerització dels filaments d'actina a través de la modulació de dos altres substrats: CAPZIP i LIMK1. CAPZIP interacciona amb la proteïna cap-binding CapZ i és fosforilada per MK2 i, encara que fins al moment encara no s'ha demostrat la participació de CAPZIP en la migració cel·lular, s'ha proposat que en el seu estat fosforilat, CAPZIP regula la funció de CapZ en la polimerització de les fibres d'actina (Eyers et al., 2005). Recentment s'ha descrit que la LIMK1 és fosforilada per MK2 en resposta a VEGF en cèl·lules endotelials (Kobayashi et al., 2006).

La proteïna p38 $\alpha$  també regula la migració cel·lular a través de la proteïna caldesmon, proteïna involucrada en l'acoblament dels filaments d'actina a través de la unió a actina i miosina. S'ha descrit que caldesmon és fosforilada *downstream* de p38 $\alpha$  en cèl·lules de múscul llis estimulades amb uPa i que la seva activitat resulta crítica en la migració de cèl·lules endotelials (Mirzapoiiazova et al., 2005). Per altra banda, també s'ha proposat que p38 $\alpha$  controla la migració a través de la regulació de paxillin, proteïna integrant de les adhesions focals. S'ha descrit que paxillin és fosforilada en el residu Ser83 per part de p38 $\alpha$  en cèl·lules PC12 estimulades amb NGF (Huang et al., 2004) i, malgrat que encara no s'ha demostrat que la fosforilació de paxillin en Ser83 sigui essencial en la migració cel·lular, s'ha suggerit que aquest podria ser un mecanisme pel qual p38 $\alpha$  regula la migració.

Per altra banda, p38 $\alpha$  regula l'angiogènesi, la invasió i la motilitat cel·lular a través de la regulació a nivell transcripcional de les metaloproteases de matriu MMPs. La inhibició de l'activitat de p38 $\alpha$  bloqueja l'expressió de MMP-9 per un mecanisme dependent del factor de transcripció AP-1 en cèl·lules de carcinoma humà escumós estimulades amb PMA (Simon et al., 1998). En cèl·lules implicades en l'angiogènesi, com cèl·lules endotelials i macròfags, s'ha proposat que p38 $\alpha$  juga un

paper similar. En macròfags RAW estimulats amb LPS, p38 $\alpha$  activa AP-1 i aquest regula l'expressió de MMP-9 (Woo et al., 2004), procés que també s'ha demostrat en monòcits estimulats amb TNF- $\alpha$  (Nguyen et al., 2006). En cèl·lules endotelials, l'estrès mecànic indueix l'expressió de MMP-9 de manera dependent de p38 $\alpha$  i Erk1/2 (Sun et al., 2007). Resulta interessant que l'expressió de MMP-9 es correlaciona amb el grau de severitat de l'aterosclerosi (Rugina et al., 2007), fet que augmenta l'interès clínic d'aquest mecanisme d'acció de p38. Contràriament al que passa amb MMP-9, la regulació de MMP-2 en cèl·lules endotelials sembla ser més dependent de Erk1/2 que no pas de p38 (Boyd et al., 2005; Werle et al., 2002).

Múltiples estudis doncs demostren la importància de p38 $\alpha$  en la transmissió de senyals quimiotàctiques en processos fisiològics com la migració o l'angiogènesi. A més a més, el coneixement en aquesta àrea planteja la possibilitat de controlar l'activitat de p38 $\alpha$  i els seus substrats en situacions on l'alteració de la motilitat dóna lloc al desenvolupament d'una patologia, com és el cas del creixement tumoral (degut a una alteració de l'angiogènesi), la invasió i la metàstasi.



**Figura I18. Vies de senyalització dependents de p38 involucrades en la migració cel·lular.** Alguns factors quimiotàctics i de creixement activen MKK3/6 a través de la fosforilació de varies possibles MKKKs, com TAK1. MKK3/6 activades fosforilen p38, que al seu torn activa MK2/3 i indueix la fosforilació de hsp27, fet que resulta en la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular. MK2/3 també pot fosforilar LIMK1, i p38 pot activar paxillin, caldesmon, CAPZIP i estimular l'expressió de varies MMPs. Les línies de color taronja indiquen vies de senyalització que s'han suggerit però que falten evidències experimentals que demostrin que l'activació de les proteïnes en qüestió afecta directament la migració cel·lular.



# HIPÒTESI I OBJECTIUS

L'objectiu principal d'aquest projecte de Tesi Doctoral és definir i caracteritzar noves funcions cel·lulars regulades per BMP-2, així com identificar els mecanismes moleculars implicats en aquest procés.

La nostra hipòtesi de treball és que BMP-2 afavoreix la migració cel·lular a partir de la inducció de la polarització dinàmica de les cèl·lules a través d'un mecanisme molecular implicat en la reorganització del citoesquelet d'actina.

La línia cel·lular mioblàstica C2C12 s'han utilitzat com a model cel·lular per estudiar la hipòtesi plantejada. Els objectius específics es detallen a continuació; alguns d'ells van ser formulats durant el procés de treball d'acord amb les dades obtingudes i als resultats publicats per altres grups.

- i) Definir la participació de BMP-2 en la regulació de la migració cel·lular.
- ii) Analitzar els canvis en l'ordenament del citoesquelet d'actina de cèl·lules estimulades amb BMP-2.
- iii) Identificar els mecanismes moleculars implicats en els efectes de BMP-2 en la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.



# MATERIALS I MÈTODES

## 1. Tècniques de biologia molecular

### 1.1- Transformació de plasmidis de DNA

Per preparar cèl·lules competents es va utilitzar el mètode descrit per Cohen (Cohen et al., 1972). Les bactèries competents utilitzades foren de la soca JM109 de *Escherichia coli*.

Les cèl·lules competents es descongelen en gel, es va afegir 50 ng de DNA a 100µl de cèl·lules i es mantingué en gel 20 min. Les cèl·lules s'incubaren 90 seg a 42°C, es posaren en gel 5 min, i després de resuspendre-les en 300 µl de medi LB (Luria-Berani) sense antibiòtic es van deixar en agitació 45 min a 37°C. Finalment, les cèl·lules es sembraren en plaques de medi LB-agarosa amb l'antibiòtic adient (ampicil·lina 100 µg/ml o kanamicina 30 µg/ml) i es van cultivar durant tota la nit a 37°C.

Els estocs glicerol de les bactèries transformades es van preparar afegint glicerol a una concentració final del 15% al cultiu bacterià i es van congelar immediatament a -80°C.

### 1.2- Purificació de DNA plasmídic

El DNA es va obtenir i purificar dels cultius bacterians seguint les indicacions del proveïdor utilitzant *Wizard<sup>R</sup> Plus Miniprep DNA Purification System* (Promega) per purificacions a petita escala i *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) per purificacions a gran escala. El DNA purificat es va mantenir en TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5-8.0) per a ser utilitzat en experiments de transfecció de cèl·lules en cultiu.

**Taula 1. Llista de plasmidis d'expressió utilitzats**

Plasmidi	Descripció	Referència
pCdc42N17-GFP	Cdc42 T17N, forma dominant negativa	
pCdc42N7	Cdc42 T17N, forma dominant negativa	Dr. X. R. Bustelo IBMCC, Salamanca
pCdc42QL	Cdc42 Q61L, forma constitutivament activa	
pCdc42wt	Cdc42 natiu	
pCdc42wt-GFP	Cdc42 natiu	
pEGFP	<i>Enhanced GFP</i>	BD Biosciences
pGEX-cofilina-GST	per produir proteïna en bacteries	Dra. O. Bernard SVI, Melbourne
pGEX-PAK1-BD-GST	per produir proteïna en bacteries	Dr. X. R. Bustelo IBMCC, Salamanca
phsp27-AA	forma no fosforilable	Dr. J. Landry Centre de recherche en cancérologie de l'Université Laval, Québec
phsp27-EE	forma constitutivament activa	
pmyc-Pak1-HL	Pak1-H83,86L, forma constitutivament activa	Dr. G. Bokoch The Scripps Research Institute, La Jolla, CA
pmyc-Pak1-PID	PID(aa83-149), forma dominant negativa per competició	
pRacQL	Rac Q61L, forma constitutivament activa	Dr X. R. Bustelo IBMCC, Salamanca
pRacwt	Rac natiu	

Els plasmidis dels que no s'indica referència van ser produïts al propi laboratori.

## 2. Tècniques de cultiu cel·lular

### 2.1- Cultiu cel·lular, transfecció i siRNA

Les cèl·lules es van créixer a 37°C, en una atmosfera al 5% de CO<sub>2</sub> i una humitat relativa del 70-80%. S'utilitzà el medi de cultiu *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Biological Industries) complementat amb L-glutamina (2 mM), antibiòtics (penicil·lina 100 U/ml i estreptomicina 100 µg/ml) i sèrum fetal boví (FBS, Live Technologies) al 10%. Les línies cel·lulars utilitzades es mostren a la Taula 2:

**Taula 2. Llista de línies cel·lulars utilitzades**

Línea cel·lular	Tipus cel·lular	Procedència	Referència
C2C12	mioblasts	embrió de ratolí	ATCC
COS-1	ronyó	mono	ATCC
HeLa	epitelial derivada de carcinoma de cèrvix	humà	ATCC
Swiss 3T3	fibroblasts	embrió de ratolí	ATCC
HCT116 i HCT 5-18	carcinoma de colon	humà	Dr. B. Vogelstein The John Hopkins Medical Institutions, Baltimor, MA
MEFs p38α <sup>-/-</sup> i MEFs wt	fibroblasts	embrió de ratolí	Dr. A. Nebreda CSIC, Madrid
MEFs MK2 <sup>-/-</sup> i MEFs wt	fibroblasts d'embrió	embrió de ratolí	Dr. M. Gaestel Institut für Physiologische Chemie, Hannover

Les línies cel·lulars HeLa i COS-1 es van utilitzar perquè presenten una eficiència de transfecció molt alta i perquè permeten la replicació episòmica dels plasmidis transfectats, incrementant així l'expressió de les proteïnes d'interès. Aquestes línies cel·lulars es van transfectar de forma transitòria utilitzant PEI (polietilenimina). Les cèl·lules es van sembrar un dia abans de la transfecció en plaques de 6 pous. Es va diluir el DNA en

NaCl 150 mM i es va afegir la mescla al PEI diluït en NaCl 150 mM, es va incubar durant 10 min a temperatura ambient i posteriorment es va afegir a les cèl·lules, a les quals prèviament havíem substituït el medi de cultiu estàndard per medi *OPTIMEM* (Invitrogen). Després de 4 h, es va afegir FBS a una concentració final del 10%.

La línia cel·lular C2C12 es va transfectar de forma transitòria utilitzant *Lipofectamine LTX* (Invitrogen), un mètode basat en liposomes, seguint les instruccions del proveïdor. Les cèl·lules es van sembrar un dia abans de la transfecció. Els complexos lípid-DNA es van incubar 20 min a temperatura ambient i posteriorment es va afegir a les cèl·lules, a les quals prèviament havíem substituït el medi de cultiu estàndard per medi *OPTIMEM* (Invitrogen). Després de 6 h, es va substituir el medi per DMEM-10%FBS.

Tots els experiments realitzats amb cèl·lules transfectades es van realitzar 24 h post-transfecció si no s'especifica una altra cosa.

Per a eliminar l'expressió de BMPRII es van utilitzar dos siRNA duplex contra l'RNA missatger de BMPRII (Dharmacon, Lafayette, CO), l'eficiència dels quals ja havia estat comprovada anteriorment per altres grups (Yu et al., 2005). Les seqüències nucleotídiques utilitzades foren (5' a 3'):

BMPRII siRNA 1: GCACAUAGGUCCCAAGAAAtt

BMPRII siRNA 2: GGGAGCACGUGUUAUGGUctt

Per a transfectar el siRNA es va utilitzar *Lipofectamine 2000* (Invitrogen), un mètode basat en liposomes, seguint les instruccions del proveïdor. Cèl·lules C2C12 es van sembrar un dia abans de la transfecció en plaques de 24 pous. 40 pmol de siRNA en forma dúplex (juntament amb un plasmidi que codifica per GFP per a controlar l'eficiència de transfecció) es van incubar juntament amb els lípids durant 20 min a temperatura ambient i posteriorment es va afegir a les cèl·lules, a les quals prèviament havíem substituït el medi de cultiu estàndard per medi *OPTIMEM* (Invitrogen). Després de 6 h, es va substituir el medi per DMEM-10%FBS.

Els assaigs per mesurar els nivells de BMPRII es van realitzar 48 h post-transfecció. Els assaigs per mesurar la migració i els canvis en la dinàmica del citoesquelet d'actina induïts per BMP-2 es van realitzar 72 h post-transfecció, ja que 48 h després de la transfecció es van depleccionar les cèl·lules de FBS durant 16 h.

**Taula 3. Inhibidors i productes específics utilitzats**

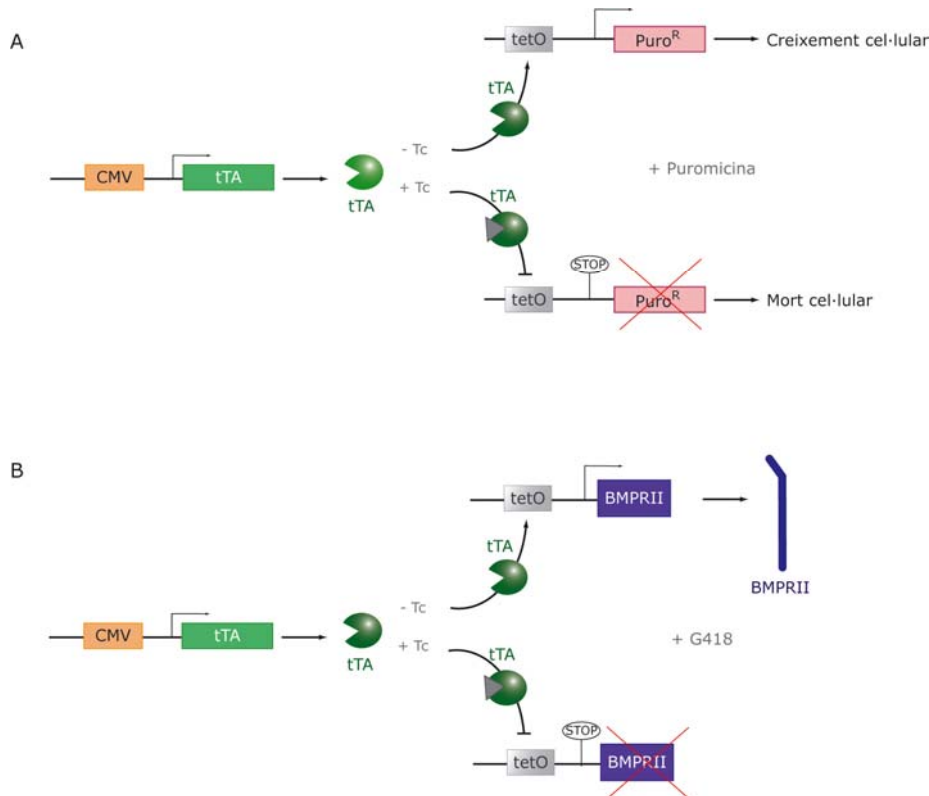
Producte	Concentració	Descripció	Proveïdor
LY294002	10 $\mu$ M-15 $\mu$ M	Inhibidor de l'activitat PI3K	Calbiochem
AS702630	1 $\mu$ M	Inhibidor específic de PI3K $\alpha$	Merck-Serono (Ruckle et al., 2004)
TGX-155	1 $\mu$ M	Inhibidor específic de PI3K $\beta$	Merck-Serono (Jackson et al., 2005)
IC87114	1 $\mu$ M	Inhibidor específic de PI3K $\delta$	Merck-Serono (Billottet et al., 2006; Sadhu et al., 2003)
AS252424	1 $\mu$ M	Inhibidor específic de PI3K $\gamma$	Merck-Serono (Pomel et al., 2006)
SB203580	5 $\mu$ M -10 $\mu$ M	Inhibidor de l'activitat p38	Calbiochem
BMP-2*	3 nM (30 pM en l'assaig de migració quimiotàctica)	Proteïnes Morfogenètica Òssia 2	R&D Systems i Wyeth
BMP-7*	3 nM (30 pM en l'assaig de migració quimiotàctica)	Proteïnes Morfogenètica Òssia 7	R&D Systems
Noggin	0.6 $\mu$ g/ml	Inhibidor de BMPs	R&D Systems
EGF*	20 ng/ml	Factor de creixement epitelial	R&D Systems

(\*) En tots els casos en que es va estimular les cèl·lules amb BMP-2, BMP-7 i EGF, les cèl·lules es van depleccionar prèviament de FBS 16 h si no s'especifica el contrari.

## 2.2- Generació de clons estables induïbles

Es van generar clons de cèl·lules C2C12 que expressaven de forma induïble (per tractament amb tetraciclina) BMPRIIwt o la forma truncada BMPRII (T803fs) amb l'epítip de 6XHis.

La línia cel·lular C2C12-tTA es va obtenir transfectant de forma estable el plasmidi tTA en cèl·lules C2C12 i els clons es van aïllar seleccionant amb 2.5  $\mu$ g/ml puromicina (Sigma) seguint el protocol Tet-Off descrit per Chambard i Pognec (Chambard and Pognonec, 1998). Posteriorment, aquests clons es van transfectar amb pTISN-BMPRII o pTISN-BMPRII(T803fs) i es van obtenir nous clons seleccionant amb 800  $\mu$ g/ml G418 (Sigma). La concentració de tetraciclina utilitzada en tots els experiments va ser de 100 ng/ml.



**Figura M&M1. Esquema del mètode d'obtenció de clons estables.** (A) Estratègia de selecció de la línia cel·lular primària. El promotor que respon a tetraciclina regula l'expressió d'un casset de resistència a puromicina, fet que permet a les cèl·lules créixer en absència de tetraciclina i presència de puromicina. (B) Construcció utilitzada per la selecció de la línia cel·lular secundària. El gen d'interès (BMPRIIwt o BMPRII(T803fs)) està clonat en un plasmidi que conté un casset de resistència a G418 i un promotor que respon a tetraciclina. Adaptat de Chambard and Pognonec (1998).

### 3. Tècniques de manipulació de proteïnes

#### 3.1- Expressió en bacteries de proteïnes fusionades a GST

El plasmidi pGEX-PAK1-BD-GST es va utilitzar per produir la proteïna PAK1-BD-GST, que es va utilitzar en assajos de GST-pull down per a avaluar els nivells de Cdc42 activat (GTP-Cdc42). El plasmidi pGEX-cofilina-GST es va utilitzar per produir proteïna cofilina-GST, que es va utilitzar com a proteïna substrat en els assajos quinasa *in vitro* per estudiar l'activitat LIMK1.



Els plasmidis d'expressió pGEX van ser transformats en la soca JM109 de *Escherichia coli*. Aquest protocol es base en el fet que els vectors d'expressió de la sèrie pGEX tenen un promotor induïble que controla l'expressió de la proteïna d'interès quan s'addiciona isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) al medi de cultiu bacterià. La inducció amb 0.3 mM IPTG es va realitzar durant 3h a 37°C. Els pelets bacterians es van resuspendre en solució de lisis (0.1% Tritó X-100 en PBS, 1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml pepstatina, 5  $\mu$ g/ml leupeptina, 2  $\mu$ g/ml aprotinina, 100  $\mu$ g/ml benzamidina) i es van sonicar realitzant 3 polsos de 10 seg. Els lisats cel·lulars es van centrifugar 15 min a 15,000xg a 4°C. Posteriorment les proteïnes expressades es van purificar per afinitat d'unió a *glutathione-Sepharose™ 4B beads* (Amersham) durant 1 h en rotació orbital a 4°C i posteriorment van ser eluïdes utilitzant 20 mM glutatió reduït en 50 mM Tris-HCl pH 7.5. Les proteïnes purificades van ser dialitzades en agitació a 4°C tota la nit en una solució de PBS i 10% glicerol. La concentració de la proteïna obtinguda es va determinar per tinció amb solució Blau de Coomassie (0.25% Brillant Blue R (Sigma), 45% metanol, 10% àcid acètic) dels gels SDS-PAGE comparant amb una corba patró de concentració de BSA.

### 3.2- Preparació d'extractes cel·lulars

Per a preparar extractes cel·lulars totals i extractes cel·lulars per immunoprecipitació, les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS fred i es van lisar en gel amb solució de lisis NP-40 (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% NP-40, 10% glicerol, 10 mM NaF, 10 mM  $\beta$ -glicerol fosfat, 200  $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml pepstatina, 5  $\mu$ g/ml leupeptina, 2  $\mu$ g/ml aprotinina, 100  $\mu$ g/ml benzamidina). Els volums de solució de lisis utilitzats foren 100  $\mu$ l i 500  $\mu$ l per pou de placa de MW6 i per placa de 100-mm de diàmetre, respectivament. Immediatament després, es van escrapejar les cèl·lules i els extractes cel·lulars crus es van clarificar centrifugant 10 min a 15,000xg a 4°C.

Per preparar extractes cel·lulars per a experiments de purificació de proteïnes amb l'epítot GST, es van lisar les cèl·lules amb solució MLB, *Mg<sup>2+</sup> lysis wash buffer*, (25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM EDTA, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), es van escrapejar les cèl·lules i posteriorment es van clarificar centrifugant 10 min a 15,000xg a 4°C.

Per preparar extractes cel·lulars per a experiments de purificació de proteïnes amb l'epítot 6Xhis, es van lisar les cèl·lules amb solució *Ni<sup>2+</sup>*

*beads pull down* que contenia 10 mM imidazol (que competia amb l'anell d'histidina), 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5% NP-40, 10 mM NaF, 10 mM  $\beta$ -glicerol fosfat, 200 $\mu$ M  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 mM PMSF, 5  $\mu$ g/ml pepstatina, 5  $\mu$ g/ml leupeptina, 2  $\mu$ g/ml aprotinina, 100  $\mu$ g/ml benzamidina. Es van escrapejar les cèl·lules i posteriorment es van clarificar centrifugant 10 min a 15,000xg a 4°C.

La concentració de proteïna es va determinar utilitzant un assaig colorimètric (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce) seguint les instruccions del proveïdor.

### 3.3- Purificació de proteïnes fusionades a GST

Per a realitzar els assaigs de GST *pull-down* en cèl·lules COS-1 transfectades amb els plasmidis que codifiquen per les diferents formes de Cdc42 i Rac es va partir d'una placa de 100-mm de diàmetre confluent per cada condició i es va realitzar l'experiment 24 h post-transfecció. En els casos en que s'indica estimulació amb BMP-2, les cèl·lules es van depleccionar 16 h de FBS prèviament a l'addició del 3 nM BMP-2 durant els temps indicats.

En els assajos de GST *pull-down* utilitzant cèl·lules C2C12 per detectar els nivells endògens de Cdc42 i Rac activat es va partir de dues plaques de 100-mm confluents per cada condició. Després de depleccionar 16 h de FBS les cèl·lules, es va procedir a estimular-les amb BMP-2 3 nM els temps indicats.

Els extractes cel·lulars clarificats es van incubar amb 20  $\mu$ g de la proteïna de fusió produïda en bacteries PAK1-PBD-GST. Les proteïnes unides es van purificar incubant les mostres amb *glutathione-Sepharose<sup>TM</sup> 4B beads* (Amersham) durant 1 h en rotació orbital a 4°C i es van rentar 4 vegades amb solució MLB freda. Les mostres es van resoldre en gels SDS-PAGE i es van analitzar per immunoblot.

### 3.4- Immunoprecipitació

Després de clarificar els extractes cel·lulars, es van incubar quantitats equivalents de proteïna (500-700  $\mu$ g) juntament amb 1  $\mu$ g d'anticòs específic durant 16 h a 4°C. Posteriorment els immuno-complexes es van incubar amb proteïna A unida a sefarosa i proteïna G unida a sefarosa (Amersham) durant 2 h en rotació orbital a 4°C i es van rentar 4

vegades amb solució de lisis NP-40. Les mostres es van resoldre en gels SDS-PAGE i es van analitzar per immunoblot.

### 3.5- Purificació de proteïnes marcades amb His

Després de clarificar els extractes cel·lulars, es va afegir al sobrenedant un 10% de resina d'afinitat de Niquel-agarosa, prèviament equilibrada amb solució de lisis, i es va incubar durant 2 h en rotació orbital a 4°C. Posteriorment les proteïnes amb l'epítot 6Xhis unides a la resina es van rentar 4 vegades amb solució de lisis. Les mostres es van resoldre en gels SDS-PAGE i es van analitzar per immunoblot.

### 3.6- Assaig quinasa

Per a realitzar els assaigs quinasa, en primer lloc es va immunoprecipitar la proteïna endògena l'activitat de la qual es volia estudiar amb l'anticòs adequat tal i com s'explica a l'apartat d'immunoprecipitació. Després d'incubar els immuno-complexes amb proteïna A unida a sefarosa i proteïna G unida a sefarosa (Amersham) i rentar-los quatre vegades amb la solució de lisis NP-40, es van fer dos rentats amb solució quinasa (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5% glicerol, 1 mM DTT, 1 mM PMSF) abans d'incubar el pelet amb 50 µl de solució quinasa que contenia 5 µM ATP, 5 µCi [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP i 5 µg *myelin basic protein* (MBP) (Sigma) pels assajos d'activitat de la Pak 1 i Pak 4 endògenes o GST-cofilina produïda en bacterïes pels assaigs d'activitat de la LIMK1 endògena. Després de 20 min a 30°C, les reaccions es van aturar afegint solució Laemmli 4X (0.3 M SDS, 0.25 M Tris-HCl pH 6.8, 40% glicerol, 0.06% blau de bromofenol, 0.1%  $\beta$ -mercaptoetanol) i bullint les mostres 10 min a 95°C. Les mostres es van resoldre en gels SDS-PAGE i es van transferir a membrana. La incorporació de <sup>32</sup>P es va detectar per autoradiografia de les membranes i les quantificacions es van fer utilitzant el *Bio-Rad Molecular Imager software*. Posteriorment les membranes van ser analitzades per immunoblot.

### 3.7- SDS-PAGE i Western blot

Els extractes proteïcs es van tractar en condicions reductores i desnaturalitzants amb solució Laemmli 4X, bullir a 95°C durant 10 min i resoldre en gels SDS-PAGE de diferent percentatge d'acrilamida en funció

del pes molecular de la proteïna a detectar a 40 mA en solució d'electroforesi (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 M glicina, 0.1% SDS). Les proteïnes es van transferir a una membrana (PVDF, Millipore) a 400 mA durant 1 h a 4°C en solució de transferència (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2 M glicina, 20% metanol). Les membranes transferides es van bloquejar durant 2 h a temperatura ambient amb 5% llet desnatada en TBS-T. Després de fer tres rentats de 10 min amb TBS-T, les membranes es van incubar 1 h amb l'anticòs secundari adequat conjugat a peroxidasa de rave picant (1:3,000-1:5,000; Amersham) diluït en 5% llet desnatada en TBS-T. Després de quatre rentats de 10 min amb TBS-T, les proteïnes es van detectar per electroquimioluminiscència utilitzant el kit *ECL<sup>TM</sup> Western blotting detection reagents* (Amersham). El revelat es va dur a terme contactant les membranes amb pel·lícules fotogràfiques (Kodak) i utilitzant líquids tradicionals de revelat i fixat.

L'estimació quantitativa de les proteïnes es va realitzar per anàlisi densitomètric dels films mitjançant el programa *Quantity One*. Els resultats són sempre expressats com a unitats arbitràries (relació entre la intensitat ajustada de la banda corresponent a la proteïna d'estudi i de la proteïna normalitzadora).

**Taula 4. Llista d'anticossos primaris utilitzats.**

Anticòs	Dilució	Mida banda (kDa)	Origen	Proveïdor
Akt	1:1000	60	conill	Sigma
Akt-P(Ser473)	1:1000	60	conill	Cell Signaling
BMPRII	1:200	120	cabra	Santa Cruz Biotechnology
Cdc42	1:250	22	ratolí	BD Transduccional Laboratories
GFP	1:1000	27	ratolí	Molecular Probes
hsp27-P(Ser86)	1:1000	25	conill	Invitrogen
LIMK1	1:1000	70	conill	Cell Signaling
LIMK1- P(Thr508)/LIMK2(Thr505)	1:1000	72	conill	Cell Signaling
MK2	1:1000	47/49(P)	conill	Cell Signaling
MK2-P(Thr334)	1:1000	49	conill	Cell Signaling
p38 $\alpha$	1:1000	43	conill	Cell Signaling
p38 $\gamma$	1:1000	46	conill	Cell Signaling
P38 $\beta$	1:1000	38	cabra	Santa Cruz Biotechnology
P38 $\delta$	1:1000	43	conill	Cell Signaling
p38-P(Thr180/Tyr182)	1:1000	40	conill	Cell Signaling
Pak 1	1:1000	68	conill	Cell Signaling
Pak1-P(Thr423)/ Pak2- P(Thr402)	1:1000	61-67(Pak1) 68-74(Pak2)	conill	Cell Signaling
Pak 4	1:1000	72	conill	Cell Signaling
Pak4-P(Ser474)/ Pak5- P(Ser602) / Pak6- P(Ser560)	1:1000	72(Pak4) 82(Pak5) 90(Pak6)	conill	Cell Signaling
Rac1	1:1000	22	conill	Upstate Biotechnology
Smad1-P(Ser463/465)	1:1000	60	conill	Cell Signaling
Tubulina	1:1000		ratolí	Sigma

Els anticossos es mantenen diluïts en 5% (w/v) BSA en TBS-T a 4°C.

#### 4. Tècniques citoquímiques: tinció de F-actina

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 12 pous sobre cobreobjectes de 12-mm de diàmetre (Marienfeld). Després de fer els tractaments cel·lulars adequats, les cèl·lules es van fixar amb 4% PFA en PBS 30 min, es van fer dos rentats amb PBS, es van permeabilitzar amb 0.2% Tritó X-100 en PBS 4 min i es van bloquejar amb 2% BSA en PBS 45 min. Per visualitzar els filaments d'actina, les cèl·lules es van incubar amb 1µg/µl fal·loïdina, una toxina que s'uneix a l'actina organitzada en filaments, conjugada a TRITC (Sigma) durant 20 min protegit de la llum i després de fer tres rentats amb PBS i un últim rentat amb H<sub>2</sub>O miliQ, les mostres es van muntar sobre portaobjectes utilitzant medi de muntatge *mowiol* i les mostres es van analitzar entre 12 i 24 h després.

En les experiments de visualització del citoesquelet d'actina en cèl·lules transfectades amb les diferents formes de Cdc42 i en els experiments amb els siRNAs de BMPRII, les cèl·lules es van co-transfectar amb un plasmidi que codificava per la proteïna GFP per poder identificar les cèl·lules transfectades.

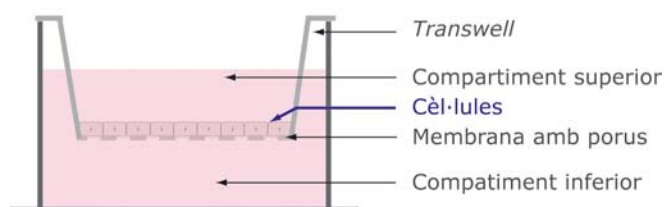
Per a realitzar els experiments de desestructuració del citoesquelet d'actina es va utilitzar la Citocalasina D (citoD), un metabòlit d'origen fúngic capaç d'unir-se als filaments d'actina i impedir-ne la seva polimerització i elongació. Després de depleccionar les cèl·lules de FBS 16 h, es van incubar amb 2 µM CitoD (Sigma) durant 20 min, es van fer cinc rentats amb medi sense FBS per eliminar la CitoD i les cèl·lules es van deixar recuperar en presència o absència del factor motiu d'estudi segons està indicat al peu de les figures corresponents. Les preparacions es van analitzar als Serveis Científic-Tècnics de la Unitat de Biologia del Campus de Bellvitge, Universitat de Barcelona. Les imatges d'epifluorescència es van visualitzar utilitzant el microscopi Confocal Espectral Leica, model TCS-SL. Per a realitzar les quantificacions del percentatge de cèl·lules que presentaven fibres d'estrès, així com les que presentaven acumulacions d'actina cortical, es van prendre fotos amb l'objectiu 20x i posteriorment les imatges es van analitzar amb el programa Irfan View. Es van quantificar un mínim de 8 camps de cada mostra de tres experiments independents.

## 5. Estudis funcionals

### 5.1-Assaigs de migració cel·lular

#### Assaig de migració quimiotàctica

Per a analitzar la funció de BMP-2 com a agent inductor de la migració quimiotàctica es va realitzar l'assaig de migració quimiotàctica utilitzant el sistema de Càmera de Boyden. El sistema consisteix en un *transwell* que conté dos compartiments separats per una membrana amb porus. Les cèl·lules es sembren al compartiment superior i el factor quimiotàctic motiu d'estudi es dilueix al medi del compartiment inferior de tal manera que es crea un gradient de concentració a través de la membrana. El moviment cel·lular direccional a través del filtre es mesura després d'un període d'incubació menor que el temps que tarda el gradient a desaparèixer.



**Figura M&M2. Representació esquemàtica del sistema de la Càmera de Boyden.** El sistema consisteix en dos compartiments separats per una membrana de porus a través dels quals poden migrar les cèl·lules (*transwell*). El compartiment inferior conté una solució amb el factor quimioatrant, de tal manera que es crea un gradient per difusió al compartiment superior que conté les cèl·lules. El gradient que es genera indueix la migració de les cèl·lules a través dels porus de la membrana fins al compartiment inferior.

Es van utilitzar plaques de 24 pous amb *transwells* que contenien una membrana de policarbonat de 6.5 mm de diàmetre amb porus de 8  $\mu\text{m}$  (Corning, Cultek, ref. 15-3422). Les membranes es van recobrir amb 0.5% gelatina en PBS (*Gelatin from porcine skin, Type A, Sigma*) durant 2 h a l'incubador de línies cel·lulars, es van rentar amb abundant PBS i es van bloquejar amb 5% BSA en PBS durant 16 h a 4°C. Una alíquota de  $5 \times 10^4$  cèl·lules C2C12 depleccionades 16 h de FBS es van tripsinitzar i homogeneïtzar amb una agulla d'1 ml (25 Gauge), es ven resuspendre en 100  $\mu\text{l}$ , es van sembrar al compartiment superior del *transwell* i es van deixar adherir durant 2 h a l'incubador. En els experiments en que es va fer

l'assaig amb cèl·lules transfectades, les cèl·lules es van sembrar a la membrana 24 h post-transfecció. Per identificar les cèl·lules transfectades, es van cotransfectar plasmidis que codificava per la proteïna motiu d'estudi fusionada a GFP i en aquells casos en que no es disposava de la construcció fusionada amb GFP es va cotransfectar juntament amb el plasmidi d'interès petites quantitats d'un plasmidi que codifica per la proteïna GFP. Seguidament es va afegir el compartiment inferior 620 µl de 1% BSA en DMEM sense FBS amb 30 pM BMP-2 o 30 pM BMP-7 en funció de l'experiment. Després de 2 h a l'incubador es va eliminar el medi del *transwell*, es va rentar la membrana amb PBS i es van fixar les cèl·lules amb 4% PFA en PBS durant 30 min. Es van retirar les cèl·lules que no havien migrat passant per la cara superior de la membrana un palet de les orelles humitejat amb PBS. Per a poder visualitzar les cèl·lules que havien migrat es va tenyir la membrana amb 5 µg/ml de iodur de propidi en PBS 5 min. Després de rentar la membrana amb abundant PBS es van prendre imatges al microscopi de fluorescència invertit Leica DM IRB2 amb una càmera acoblada Olympus DP70 (amb el *software* Viewfinder 1.0). La migració cel·lular es va analitzar contant el número de cèl·lules totals en 8 camps escollits a l'atzar per a cada mostra amb l'objectiu 100x.

### **Assaig de ferida**

Per a analitzar la funció de BMP-2 com a agent inductor de la migració varem realitzar l'assaig de ferida. Les cèl·lules es van créixer fins a arribar a confluència en plaques de 24 pous, es van mantenir 16 h en 0.1% FBS en DMEM i es van incubar amb 10 µg/ml mitomicina C (Sigma) durant 2 h per tal d'eliminar el possible efecte de la proliferació. En aquells experiments en que es va realitzar la ferida en presència de cicloheximida, aquesta es va afegir 30 min abans de realitzar la ferida a una concentració de 1 µg/ml i es va mantenir durant tot l'experiment.

Per a fer la ferida a la monocapa de cèl·lules confluents es va eliminar el medi dels pous i es va traçar una línia amb una punta de plàstic per a micropipeta de tal manera que quedava una zona depleccionada de cèl·lules. Es va rentar les cèl·lules amb DMEM sense FBS per eliminar les cèl·lules desenganxades i la ferida es va deixar recuperar a l'incubador en presència de diferents factors segons l'experiment en medi 1%BSA en DMEM. Per analitzar l'evolució de la ferida es van prendre fotos a diferents temps amb el microscopi invertit de contrast de fase *Leica DM IRB2* amb una càmera acoblada Olympus DP70. En aquells casos en que es va realitzar l'assaig amb cèl·lules transfectades, l'experiment es va realitzar



mínim 24 h post-transfecció i en tots els casos es va transfectar un plasmidi que codificava per GFP per identificar les cèl·lules transfectades o es va utilitzar una construcció que codifica per la proteïna d'interès fusionada a GFP.

Els resultats es mostren com el percentatge de l'àrea envaïda i es va mesurar com el percentatge d'àrea envaïda en relació a l'àrea inicial de la ferida. El tractament de les imatges per a mesurar les àrees es va realitzar amb el programa *Image J*.

Els experiments d'assaig de ferida *time-lapse* es van realitzar amb el Confocal Espectral Leica model TCS-SL acoblat a la càmera marca PeCon amb control de temperatura i CO<sub>2</sub>.

## 5.2- Assaig d'adhesió i *spreading*

Per a realitzar els assaigs d'adhesió i *spreading*, cèl·lules C2C12 es van depleccionar de FBS 16 h, es van tripsinitzar i es va eliminar la tripsina fent dos rentats per centrifugació de 2 min a 1,000xrpm. Posteriorment es van mantenir les cèl·lules en suspensió durant 1 h a 37°C en 1% BSA en DMEM. Es van sembrar 38,000 cèl·lules per pou en plaques de 12 pous que contenien cobreobjectes de 12-mm de diàmetre (Marienfeld) que prèviament s'havien gelatinitzat submergint-los en 1% gelatina en PBS durant 2 h a 37°C. Les cèl·lules es van deixar adherir en presència o absència de 3nM BMP-2 durant diferents temps. Finalment es va rentar vigorosament els cobreobjectes per eliminar aquelles cèl·lules que no s'haguessin adherit, es van tenyir les cèl·lules amb fal·loïdina acoblada a TRITC i es van muntar les preparacions tal i com s'ha explicat anteriorment. Les mostres es van analitzar al microscopi de fluorescència NIKON Eclipse 800 i les imatges es van prendre amb la càmera Diagnostic Instruments model SPOT JR (amb el *software* Spot Advanced). Per mesurar l'adhesió cel·lular, es va quantificar el número de cèl·lules totals en 8 camps per a cada mostra escollits a l'atzar amb l'objectiu 20x. Per examinar el procés de *spreading*, es va quantificar el percentatge de cèl·lules *spread* visualitzades amb la fal·loïdina en 8 camps per a cada mostra escollits a l'atzar amb l'objectiu 40x.

## **6. Anàlisi estadístic**

Els resultats estan presentats com la mitja  $\pm$  error estàndard (ES).  
Les diferències es van considerar significatives a valors de  $p < 0.05$ :  
\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.001$  i \*\*\* $p < 0.0001$ .

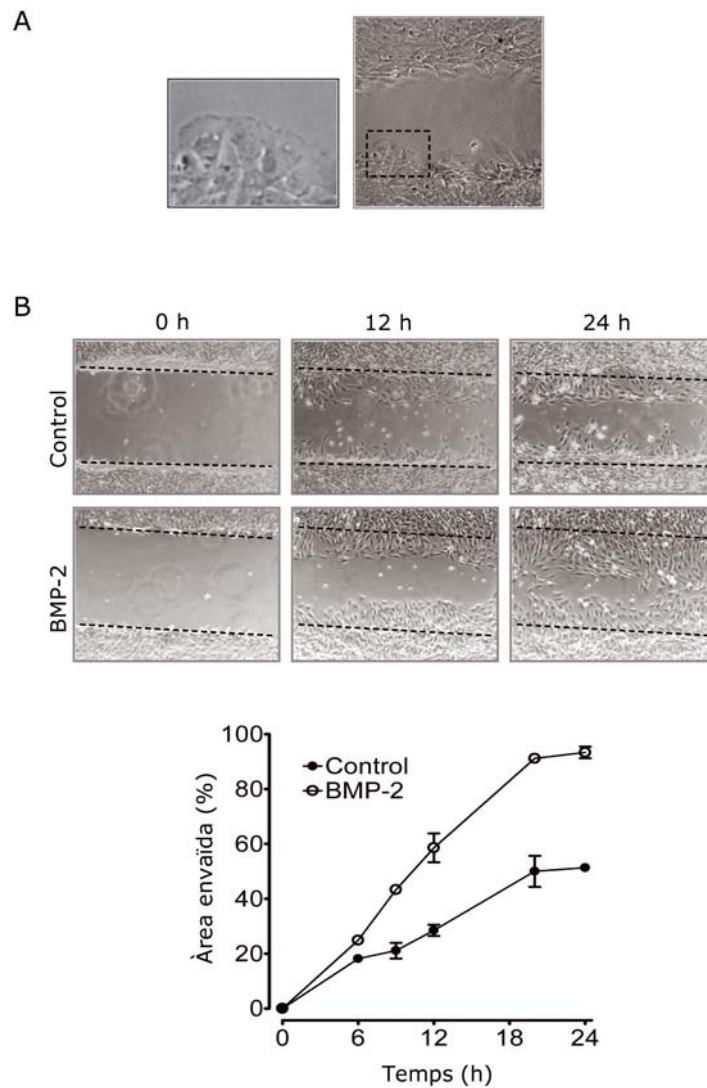
# RESULTATS

## **1. BMP-2 estimula la migració cel·lular quimiotàctica**

Les BMPs juguen un paper clau en la regulació de la migració cel·lular durant la morfogènesis embrionària (Dudas et al., 2004; Goldstein et al., 2005; Kishigami and Mishina, 2005). Malgrat s'han publicat alguns treballs en relació a la participació de BMPs en la regulació de la migració de progenitors mesenquimals i osteoblasts (Fiedler et al., 2002; Lind et al., 1996; Sotobori et al., 2006), els mecanismes moleculars mitjançant els quals les BMPs regulen aquests processos són poc coneguts. Tenint en compte aquests precedents, ens varem proposar estudiar la participació de BMP-2 en la regulació de la migració de les cèl·lules mioblàstiques C2C12.

Per a assolir aquest objectiu es van analitzar en primer lloc els efectes de BMP-2 en la migració cel·lular mitjançant l'assaig de ferida. Aquest assaig consisteix en realitzar una ferida en una monocapa de cèl·lules confluents de tal manera que es deplecciona de cèl·lules una zona i s'analitza si en presència del factor motiu d'estudi dita zona és repoblada més eficientment en comparació amb la situació control en absència del factor. Es van depleccionar les cèl·lules C2C12 de FBS, es van fer les ferides, i aquestes es van deixar recuperar en absència o presència de BMP-2. Per a seguir l'evolució del tancament de les ferides, es van prendre imatges periòdicament fins a 24 h. L'anàlisi en detall de les imatges preses a temps curts mostraven com, tant en presència com en absència de BMP-2, al cap de 30 min de fer la ferida les cèl·lules del límit de la ferida, que inicialment presentaven un aspecte arrodonit i retret, adoptaven una morfologia polaritzada i 1 h després ja es podia diferenciar clarament un front cel·lular d'avanç organitzat. Aquestes observacions indiquen que la línia cel·lular C2C12 presenta la capacitat d'adoptar un fenotip polaritzat

molt evident, fet que la fa una línia cel·lular idònia per a ser utilitzada en aquest tipus d'assaig (Figura R1 A). L'anàlisi de l'evolució de la ferida a temps més llargs mostra que en presència de BMP-2 la ferida era repoblada més eficientment, suggerint que BMP-2 estimula la migració cel·lular (Figura R1 B). Per a quantificar l'efecte observat, es va determinar el percentatge d'àrea envaïda en relació a l'àrea inicial de la ferida a partir de les imatges preses als diferents temps. La quantificació va confirmar el que ja s'intuïa qualitativament a partir de la observació de les imatges, en presència de BMP-2 la ferida es tancava més ràpid (Figura R1 B gràfica), resultat que suggereix que BMP-2 actua com a agent inductor de la migració cel·lular.

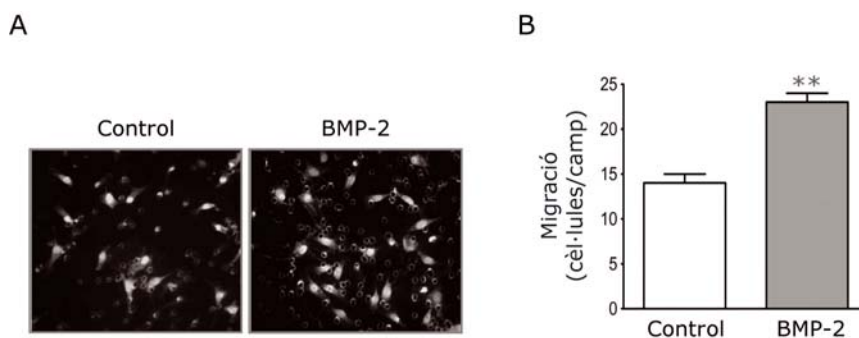


**Figura R1. BMP-2 induïx la migració de les cèl·lules C2C12.** (A) Imatge representativa del fenotip polaritzat i la formació del front de migració que mostren les cèl·lules C2C12 1 h després d'haver realitzat la ferida a una monocapa cel·lular confluent. (B) Imatges representatives de contrast de fase de monocapes confluents de cèl·lules C2C12 on s'ha realitzat la ferida i s'ha deixat recuperar les cèl·lules en presència o absència de BMP-2. L'anàlisi quantitatiu de l'àrea envaïda es va obtenir de mínim tres camps fotogràfiats obtinguts d'un mínim de quatre experiments independents i representen la mitja  $\pm$  ES.

En un primer intent de caracteritzar els mecanismes mitjançant els quals BMP-2 induïx la migració cel·lular observada, es va realitzar l'assaig de ferida en presència de cicloheximida, un inhibidor de la síntesi proteica, i no es van observar canvis en la capacitat de BMP-2 d'induir un increment

de la migració cel·lular en comparació amb la situació control (resultats no mostrats). Aquest resultat suggereix que l'efecte de BMP-2 observat és independent de la transcripció i, per tant, de la síntesis proteica *de novo*. De la mateixa manera, es van tractar les cèl·lules amb mitomicina C, un inhibidor irreversible de la síntesis de DNA, i no es van observar canvis en la capacitat de BMP-2 d'accelerar el tancament de la ferida, indicant que l'augment de la migració cel·lular induït per BMP-2 no era degut a un efecte del BMP-2 en la regulació de la proliferació cel·lular (resultats no mostrats).

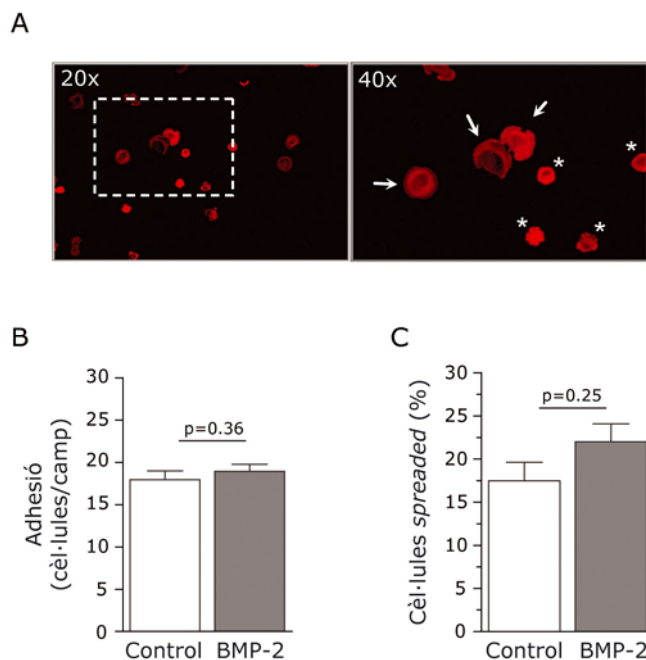
Per tal d'aprofundir en la descripció de la migració cel·lular induïda per BMP-2, es va analitzar si la migració observada tenia caràcter quimiotàctic. Per això es va realitzar l'assaig de migració quimiotàctic *in vitro* utilitzant el sistema de la Càmera de Boyden, una aproximació experimental que permet estudiar la capacitat d'un factor d'induir el moviment cel·lular unidireccional en el sentit del gradient de concentració del factor. La quantificació del número de cèl·lules que havien migrat a través de la membrana de porus cap al compartiment inferior, revelava que en presència de BMP-2 migraven un 70% més cèl·lules en comparació amb la situació control (Figura R2). Aquest resultat demostra que BMP-2 té la capacitat d'induir la migració cel·lular direccional en la línia cel·lular C2C12, confirmant així el resultat obtingut en l'assaig de ferida, i a més a més aporta nova informació sobre el tipus de migració induïda, tractant-se d'una migració quimiotàctica a favor de gradient de concentració.



**Figura R2. BMP-2 indueix la migració quimiotàctica de les cèl·lules C2C12.**

(A) Cèl·lules C2C12 depleccionades de FBS 16 h es van sembrar al compartiment superior dels *transwells*, la membrana dels quals havia estat prèviament gelatinitzada. Es van deixar adherir les cèl·lules 2 h, es va afegir el medi DMEM-1%BSA amb o sense BMP-2 al compartiment inferior i es van deixar migrar les cèl·lules durant 2 h. Posteriorment es van retirar les cèl·lules que no havien migrat i es van fixar i tenyir amb iodur de propidi les cèl·lules que havien migrat a través de la membrana de porus. Es mostren imatges representatives de les cèl·lules que havien migrat. (B) Anàlisi quantitatiu de la migració en vuit camps triats a l'atzar en tres experiments independents. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES (\* $p$ <0.001, test t de Student)

Basant-nos en els evidents canvis observats en la morfologia de les cèl·lules estimulades amb BMP-2 en l'assaig de ferida, es va analitzar la possible participació de BMP-2 en processos que depenen de la mobilització dels citoesquelet d'actina tals com l'adhesió cel·lular i el *spreading*. Per a avaluar la participació de BMP-2 en el procés d'adhesió cel·lular, es van tripsinitzar cèl·lules C2C12 depleccionades de FBS, es van contar i sembrar en cobreobjectes gelatinitzats. Després de deixar adherir les cèl·lules en presència o absència de BMP-2 durant diferents períodes, les cèl·lules no adherides es van eliminar. Es va contar el número de cèl·lules adherides en les diferents condicions i, paral·lelament, es va analitzar el percentatge de cèl·lules adherides que presentaven una morfologia estesa, procés que es coneix amb el nom de *spreading*. Es va considerar que les cèl·lules arrodonides i refringents eren cèl·lules adherides que encara no havien iniciat el procés de *spreading*, mentre que es van considerar cèl·lules *spread* aquelles que no tenien caràcter refringent i presentaven una forma irregular i/o protrusions de la membrana cel·lular (Figura R3 A). A la Figura R3 B es mostra el número relatiu de cèl·lules adherides 30 min després d'haver-les sembrat en presència de BMP-2 i en la condició control. Després de 30 min, de la mateixa manera que en la resta de temps estudiats, no es van detectar diferències en el número de cèl·lules adherides. En relació a la participació de BMP-2 en el procés de *spreading* cel·lular, tampoc s'observen diferències significatives als temps estudiats. No obstant, tal i com es mostra a la Figura R3 C, després de deixar adherir les cèl·lules durant 30 min, en presència de BMP-2 s'intueix un lleuger augment del percentatge de cèl·lules fent *spreading*, malgrat no és estadísticament significatiu.



**Figura R3. BMP-2 no participa en els processos d'adhesió i *spreading* en cèl·lules C2C12.** (A) Imatge representativa de l'aspecte que presentaven les cèl·lules incubades amb fal·loïdina acoblada a TRITC analitzades amb l'objectiu 20x, per contar el número de cèl·lules adherides, i amb l'objectiu 40x, per a analitzar el percentatge de cèl·lules *spread*. Els asteriscs marquen cèl·lules adherides no *spread* i les fletxes senyalen cèl·lules *spread*. (B) Histograma que mostra el número de cèl·lules C2C12 adherides després de 30 min de ser sembrades en presència o absència de BMP-2 en vuit camps escollits a l'atzar de tres experiments independents amb l'objectiu 20x. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES ( $p=0.36$ , test t de Student). (C) Anàlisi quantitatiu del percentatge de cèl·lules *spread* 30 min després de ser sembrades en presència o absència de BMP-2 en vuit camps escollits a l'atzar de tres experiments independents amb l'objectiu 40x. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES ( $p=0.25$ , test t de Student).

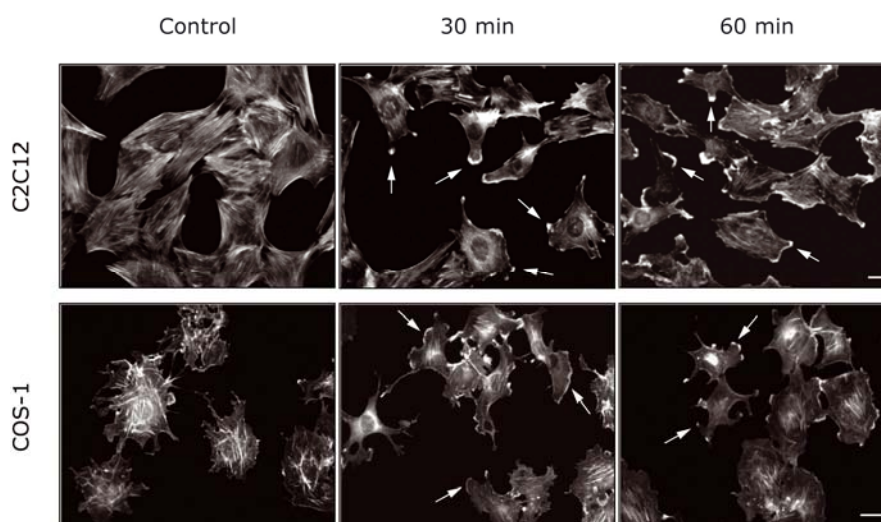
Els resultats mostrats indiquen que BMP-2 indueix la migració cel·lular quimiotàctica, no obstant no quedaven clars els mecanismes mitjançant els quals BMP-2 exerceix dits efectes doncs no s'han observat diferències en els primers estudis realitzats en relació a processos que impliquen mobilització del citoesquelet d'actina com són l'adhesió i el *spreading*.



## **2. BMP-2 indueix canvis en l'ordenament del citoesquelet d'actina**

La migració cel·lular és un procés altament regulat que involucra la mobilització del citoesquelet d'actina (Ridley et al., 2003). La resposta inicial de la cèl·lula a un agent quimiotàctic consisteix en la polarització i extensió de protrusions en la direcció de la migració. En l'assaig de ferida havíem observat que les cèl·lules estenien protrusions cap a l'espai obert, fet que ens va dur a profunditzar en l'estudi dels canvis que tenien lloc en l'ordenament del citoesquelet d'actina de les cèl·lules estimulades amb BMP-2.

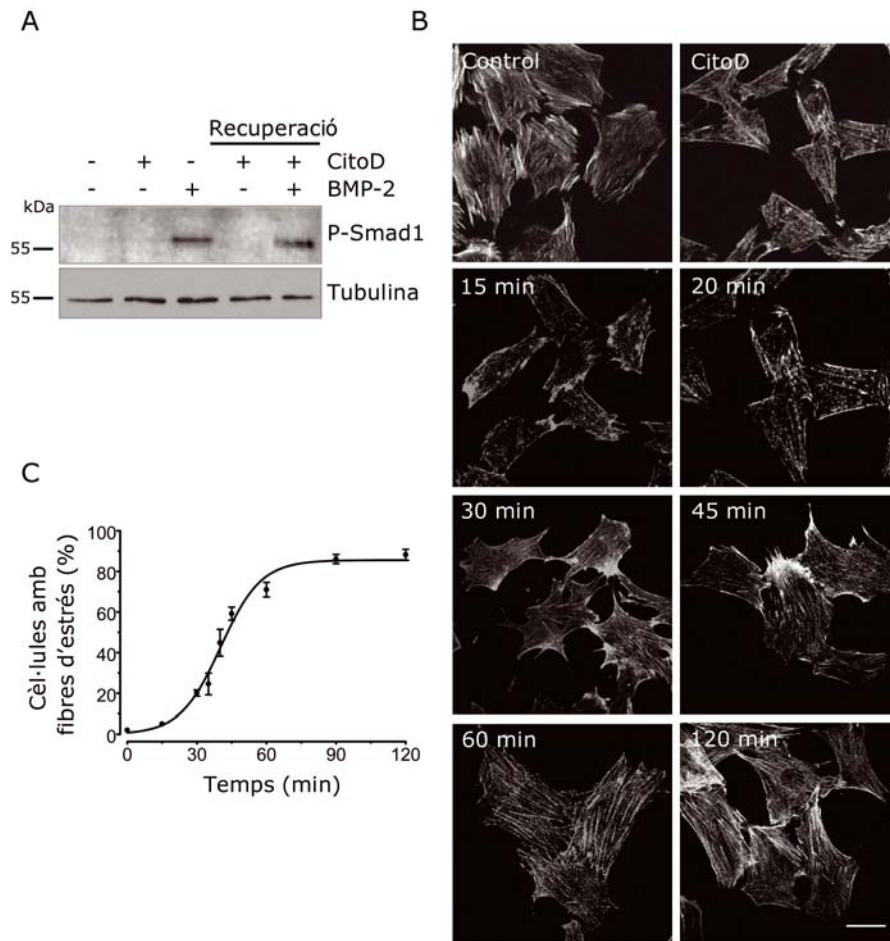
Les cèl·lules C2C12 en estat basal presenten abundants filaments d'actina organitzats en fibres d'estrès que resulten visibles quan es tenyeixen les cèl·lules amb fal·loïdina associada a un fluorocrom i es visualitzen utilitzant un microscopi de fluorescència. Per a estudiar si BMP-2 estava modulant l'organització del citoesquelet d'actina es van estimular cèl·lules C2C12 amb BMP-2 i es va analitzar la organització dels filaments d'actina. Tal i com s'observa a la fila superior de la Figura R4, BMP-2 indueix una ràpida mobilització del citoesquelet d'actina. Després de 30 min d'estimulació amb BMP-2 s'observava l'aparició d'acumulacions d'actina cortical a la perifèria de les cèl·lules, característica que resultava més evident al cap de 60 min. Paral·lelament, es va analitzar si BMP-2 induïa un efecte similar a la línia cel·lular COS-1, cèl·lules que presenten una distribució basal dels filaments d'actina molt diferent a les abundants fibres d'estrès de les C2C12. L'estudi utilitzant les cèl·lules COS-1, mostrava que BMP-2 induïa en aquesta línia cel·lular la formació d'acumulacions d'actina cortical d'un aspecte molt similar a l'observat en les C2C12 (Figura R4 fila inferior). Aquests resultats indiquen que BMP-2 modula l'ordenament dels filaments d'actina de diferents tipus cel·lulars i independentment de la organització basal que presenten.



**Figura R4. BMP-2 induïx canvis en la organització dels filaments d'actina.**

Cèl·lules C2C12 i COS-1 van ser estimulades amb BMP-2 els temps indicats. Els filaments d'actina van ser visualitzats amb fal·loïdina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. Les fletxes senyalen protrusions d'actina. La barra correspon a 20  $\mu\text{m}$ .

Amb el propòsit d'analitzar amb més profunditat els efectes de BMP-2 en la dinàmica del citoesquelet d'actina, es va dissenyar una metodologia per a que resultessin més evidents els canvis induïts per BMP-2. Aquesta és basada en la observació que el citoesquelet d'actina de les C2C12 està organitzat formant robustes fibres d'estrès, fet que dificultava l'estudi dels canvis en l'organització dels filaments d'actina. La idea era desestructurar de forma transitòria el citoesquelet d'actina utilitzant citocalasina D (citoD), i posteriorment deixar recuperar les cèl·lules en presència de BMP-2. En primer lloc es va avaluar si la disrupció dels filaments d'actina afectava la senyalització mitjançada per BMP-2 mitjançant l'anàlisi de l'estat de fosforilació de la proteïna Smad1 en cèl·lules tractades amb citoD, i tal i com es mostra a la Figura R5 A no es van observar canvis significatius, fet que demostrava que el tractament amb citoD no alterava la capacitat de BMP-2 d'activar rutes de senyalització. Com es pot observar a la Figura R5 BiC, els estudis citoquímics mostraven que el tractament amb citoD modifica completament la distribució dels filaments d'actina característica de les C2C12 en forma d'abundants fibres d'estrès, estructures que es recuperaven quasi completament al cap de 90 min, moment en que les cèl·lules presentaven un aspecte molt semblant al seu estat basal.

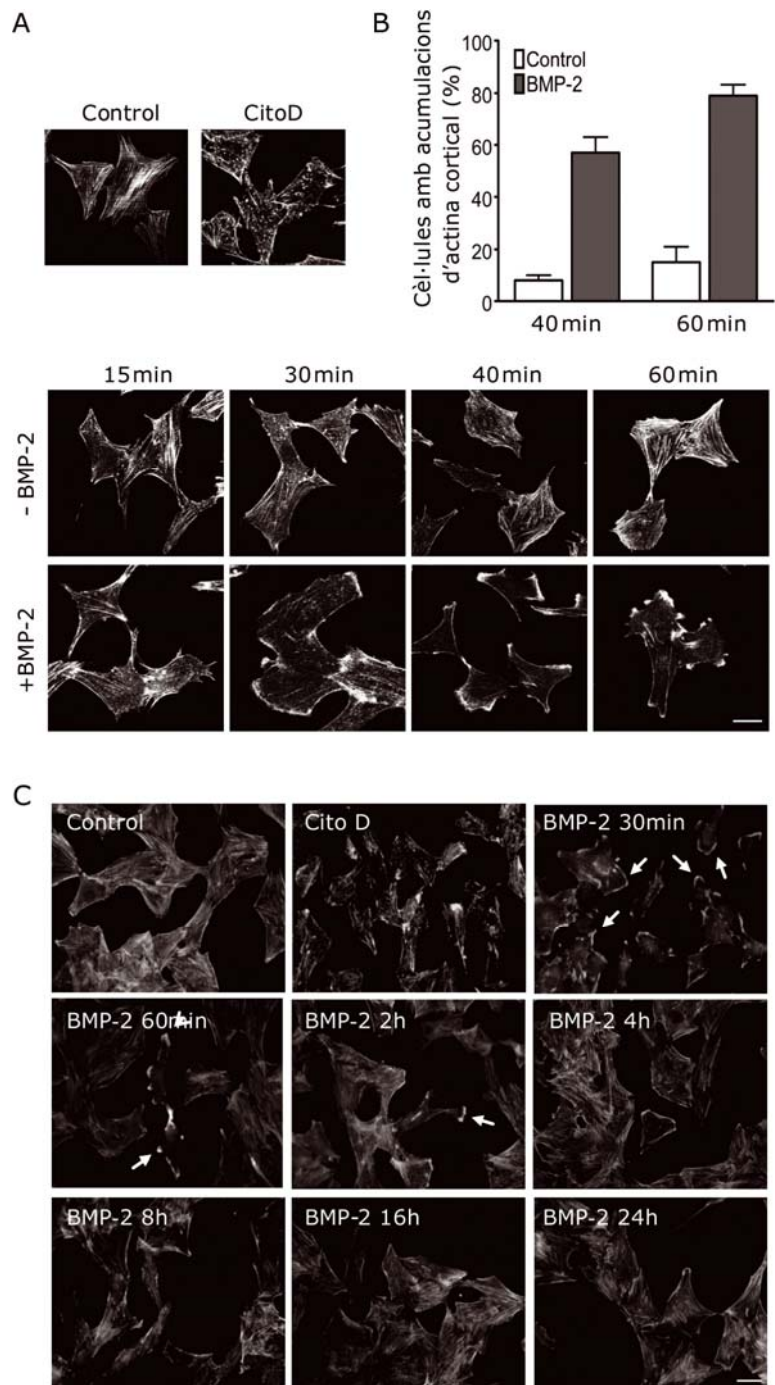


**Figura R5. El tractament amb CitoD induïx la despolimerització reversible del citoesquelet d'actina.** (A) Cèl·lules C2C12 es van tractar amb citoD 20 min, es van realitzar abundants rentats per eliminar la citoD del medi i es van deixar recuperar les cèl·lules en medi de deplecció 1 h en presència o absència de BMP-2. Es van preparar lisats cel·lulars i aquests es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-Smad1-P(Ser463/465) i posteriorment es va reincubar la membrana amb anti-tubulina. (B) Cèl·lules depleccionades de FBS 16 h (Control) tractades amb citoD 20 min (CitoD) es van deixar recuperar en absència de BMP-2 durant els temps indicats. Els filaments d'actina es van visualitzar mitjançant la tinció amb fal·loïdina conjugada a TRITC tal i com s'explica a l'apartat de Materials i Mètodes. La barra correspon a 20  $\mu$ m. (C) Anàlisi quantitatiu del percentatge de cèl·lules que presentaven fibres d'estrés en imatges preses als temps indicats. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de mínim 200 cèl·lules obtingudes en diferents camps en cinc experiments independents.

Posteriorment, es va desestructurar el citoesquelet d'actina de les cèl·lules de manera reversible amb citoD i es van deixar recuperar en presència de BMP-2. L'anàlisi de les imatges mostra que al cap de 1 h, més del 70% de les cèl·lules presentaven acumulacions d'actina cortical i no es

detectaven fibres d'estrès (Figura R6 AiB). L'estudi a temps més llargs mostrava que les protrusions d'actina resultaven evidents fins a les 2 h i després les cèl·lules recuperaven les abundants fibres d'estrès (Figura R6 C). En conjunt, aquest resultats indiquen que BMP-2 indueix un efecte ràpid i transitori en la dinàmica del citoesquelet d'actina.

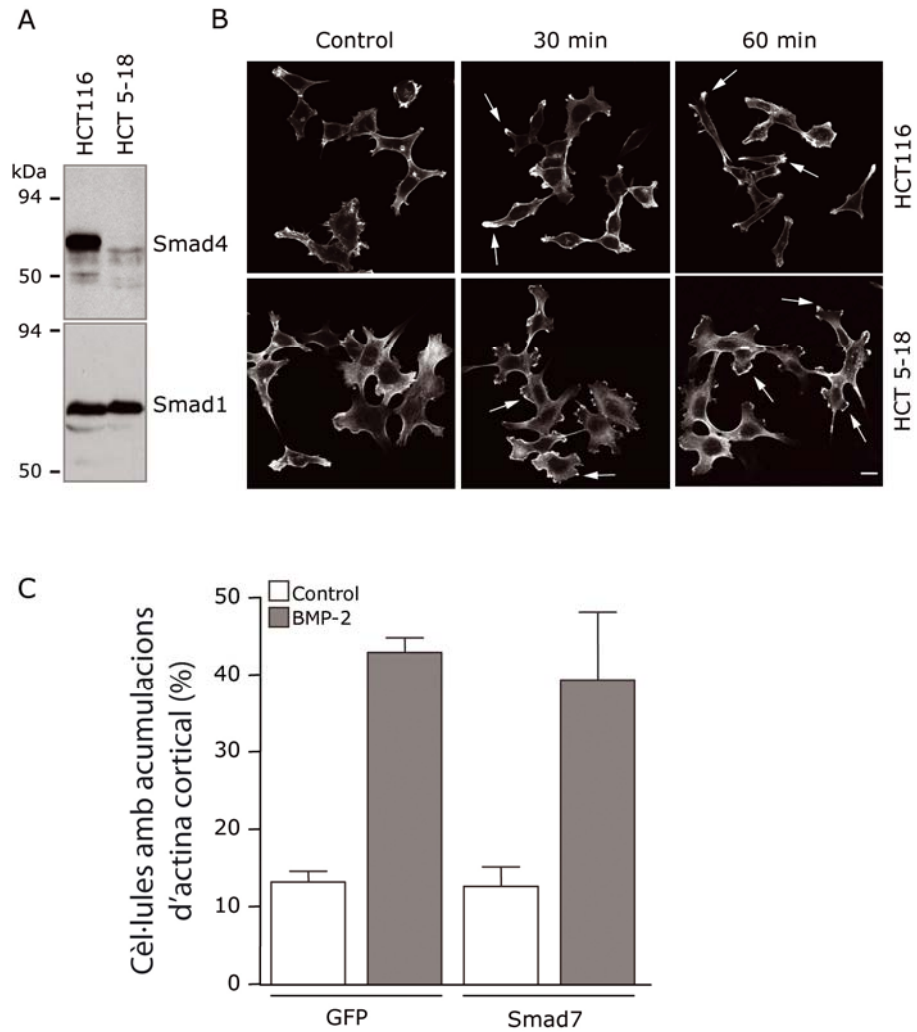
**Figura R6. BMP-2 indueix la formació de protrusions d'actina en cèl·lules C2C12.** (A) Imatges representatives de cèl·lules C2C12 tractades amb citoD i recuperades en presència o absència de BMP-2. Els filaments d'actina van ser visualitzat mitjançant la tinció de les cèl·lules amb fal·loïdina conjugada a TRITC. La barra correspon a 20  $\mu\text{m}$ . (B) Anàlisi quantitatiu de les cèl·lules que presentaven protrusions d'actina després de ser tractades amb citoD i recuperades en presència o absència de BMP-2. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de mínim 200 cèl·lules en diferents camps en cinc experiments independents. (C) Imatges representatives de cèl·lules C2C12 depleccionades de FBS (Control), tractades amb citoD (citoD) i deixades recuperar en presència de BMP-2 els temps indicats. Els filaments d'actina van ser visualitzats amb fal·loïdina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. Les fletxes senyalen protrusions d'actina. La barra correspon a 20  $\mu\text{m}$ .



Segons el paradigma de senyalització de les BMPs, la ruta s'inicia amb la unió del factor a un receptor heterodimèric compost per dos receptors amb activitat serina/treonina quinasa, denominats de tipus I i tipus II. Una vegada s'ha format el complex entre els receptors i el lligand, el receptor de tipus II fosforila al receptor de tipus I, i aquest propaga la senyal fosforilant les R-Smads, molècules de senyalització intracel·lular de la família Smad. Les R-Smads fosforilades es dissocien del receptor i s'associen amb un membre de la mateixa família anomenat Co-Smad o Smad4 per tal de translocar al nucli i regular els seus efectors transcripcionals específics. Tenint en compte això, en una primera aproximació per elucidar els possibles mecanismes moleculars mitjançant els quals BMP-2 regula la mobilització dels filaments d'actina i la migració cel·lular es va analitzar la possible participació de les proteïnes de la família Smad en els efectes descrits.

En primer lloc es va analitzar si el mediador comú Smad4 estava involucrat en la reorganització del citoesquelet d'actina induïda per BMP-2. La deleció dirigida de Smad4 en la línia cel·lular HCT116 dona lloc a la generació d'un clon anomenat HCT 5-18 que té abolida la resposta transcripcional dependent de TGF $\beta$  i BMPs (Lopez-Rovira et al., 2002; Zhou et al., 1998). La línia cel·lular parental i el clon deletat per Smad4 es van estimular amb BMP-2 i se'n van visualitzar els filaments d'actina. Com es mostra a la Figura R7 B, el tractament amb BMP-2 induïx la formació d'acumulacions d'actina a la perifèria cel·lular en ambdós tipus cel·lulars, fet que suggereix que la reorganització del citoesquelet d'actina estimulada pel tractament amb BMP-2 és independent de Smad4 i, per tant, de la resposta transcripcional dirigida per les proteïnes de la família Smad.

Resultats d'altres grups han implicat Smad7, un inhibidor de la ruta de senyalització de Smads, en la regulació per part de TGF $\beta$  de la dinàmica dels filaments d'actina en cèl·lules de carcinoma de pròstata (Edlund et al., 2004) i en cèl·lules Swiss3T3 (Vardouli et al., 2005). No obstant, els nostres resultats indiquen que en cèl·lules C2C12, la sobreexpressió de Smad7 no afectava l'organització basal del citoesquelet d'actina ni s'observaven diferències en la capacitat del BMP-2 d'induir la formació de protrusions d'actina (Figura R7 C). Els resultats mostrats fins al moment fan pensar que les proteïnes de la família de les Smads no estan implicades en els efectes de BMP-2 a temps curts descrits sobre la dinàmica del citoesquelet d'actina.



**Figura R7. Les proteïnes de la família Smad no estan implicades en els efectes de BMP-2 en la reorganització dels filaments d'actina.** (A) Lisats totals de cèl·lules HCT116 i del clon deficient en Smad4 (HCT 5-18) van ser analitzats per *western blot* amb anticossos anti-Smad4 i anti-Smad1. (B) Cèl·lules HCT116 i del clon deficient en Smad4 (HCT 5-18) es van estimular amb BMP-2 i els filaments d'actina es van visualitzar amb fal·loïdina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. Les fletxes senyalen protrusions d'actina. La barra correspon a 20 μm. (C) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb un plasmidi que codifica per Smad7 juntament amb un plasmidi que codifica per la proteïna GFP per a reconèixer les cèl·lules transfectades. 24 h post-transfecció, es van depleccionar les cèl·lules de FBS, es van tractar amb citoD i es van deixar recuperar en presència o absència de BMP-2 durant 1 h. Els filaments d'actina van ser visualitzats amb fal·loïdina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. Es mostra l'anàlisi quantitatiu del percentatge de cèl·lules que presentaven protrusions d'actina. Els valors corresponen a la mitja ± ES de mínim 200 cèl·lules obtingudes en diferents camps en dos experiments independents.

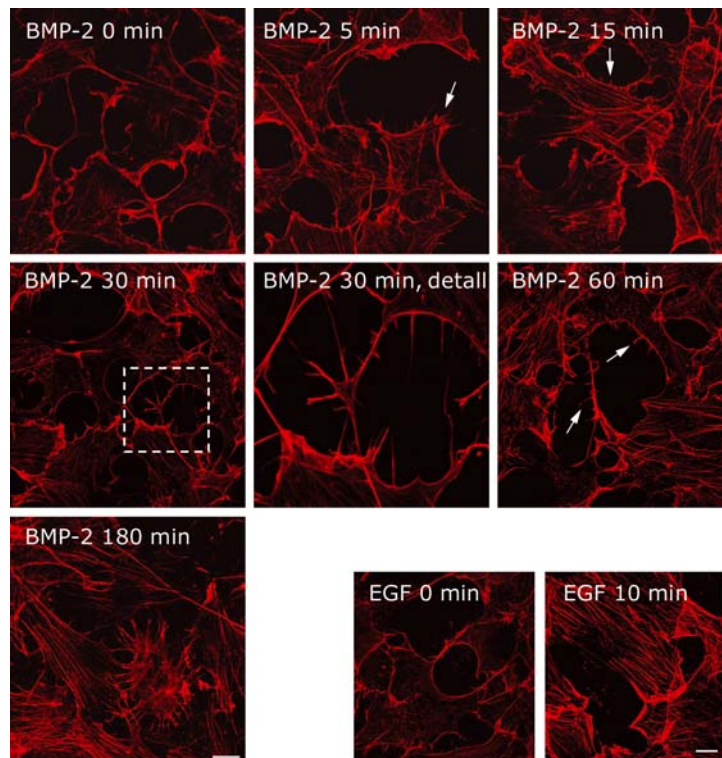
### **3. Cdc42 participa en la regulació per part de BMP-2 de la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular**

Els efectes de les BMPs a través de la senyalització per la via de les Smads ha estat subjecte d'anàlisis extensos. No obstant, la senyalització de les BMPs per vies independents de les de Smads ha estat menys estudiada, especialment aquelles que tenen lloc en períodes de temps curts i que, per tant, no involucren una resposta transcripcional. En cèl·lules C2C12, hem demostrat que BMP-2 afecta l'organització del citoesquelet d'actina induint l'acumulació d'actina cortical però, de la mateixa manera que ocórrer amb altres factors de creixement, les vies de senyalització implicades en aquest procés són poc conegudes.

Les proteïnes clàssiques implicades en la mobilització del citoesquelet d'actina són les petites GTPases de la família Rho, que inclouen Rho, Rac i Cdc42 (Raftopoulou and Hall, 2004). La participació de les Rho GTPases en l'organització del citoesquelet d'actina ha estat àmpliament estudiada en les cèl·lules fibroblàstiques Swiss3T3. En aquest model, s'ha descrit que Rho regula la formació de fibres d'estrès (Ridley and Hall, 1992), mentre que Rac i Cdc42 regulen la formació de lamelipodis i filopodis respectivament (Nobes and Hall, 1999). Tenint en compte això, es va analitzar si les Rho GTPases estaven involucrades en la regulació de l'organització dels filaments d'actina per part de BMP-2 utilitzant el model cel·lular de les Swiss3T3.

Les cèl·lules Swiss3T3 en estat quiescent presenten pocs filaments d'actina organitzats (Figura R8). L'estimulació amb BMP-2, a la mateixa concentració a la qual observàvem l'aparició de protrusions d'actina en C2C12, induïa en les Swiss3T3 la ràpida aparició de llargs *spikes* enriquits en filaments d'actina semblants a filopodis, un fenotip associat a l'activació de Cdc42 (Nobes and Hall, 1999). Aquestes estructures ja eren visibles a temps curts i resultaven molt evidents després de 30 minuts d'afegir el BMP-2. Al cap de 120 minuts, les cèl·lules recuperaven el seu aspecte basal però encara es podien detectar alguns filopodis. Paral·lelament, com a control, es van estimular cèl·lules amb EGF, factor que ha estat descrit que activa Rho i indueix la formació de fibres d'estrès (Mancini et al., 2003).

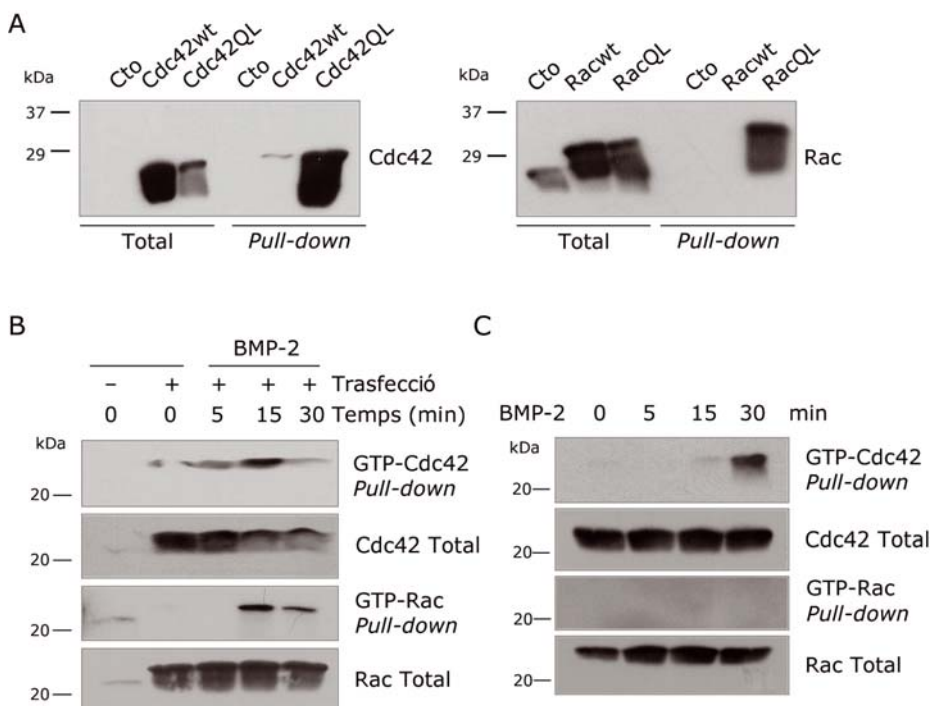




**Figura R8. BMP-2 induïx l'aparició de filopodis en les cèl·lules Swiss3T3.** Cèl·lules Swiss3T3 es van depleccionar de FBS set dies i es van estimular amb BMP-2 els temps indicats. Les fletxes senyalen *spike-like* filopodis (detall ampliat a 30 min d'estimulació amb BMP-2). Com a control, es van estimular cèl·lules amb 20 ng/ml EGF 10 min. Els filaments d'actina van ser visualitzats amb fal·loïdina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. La barra correspon a 20  $\mu$ m.

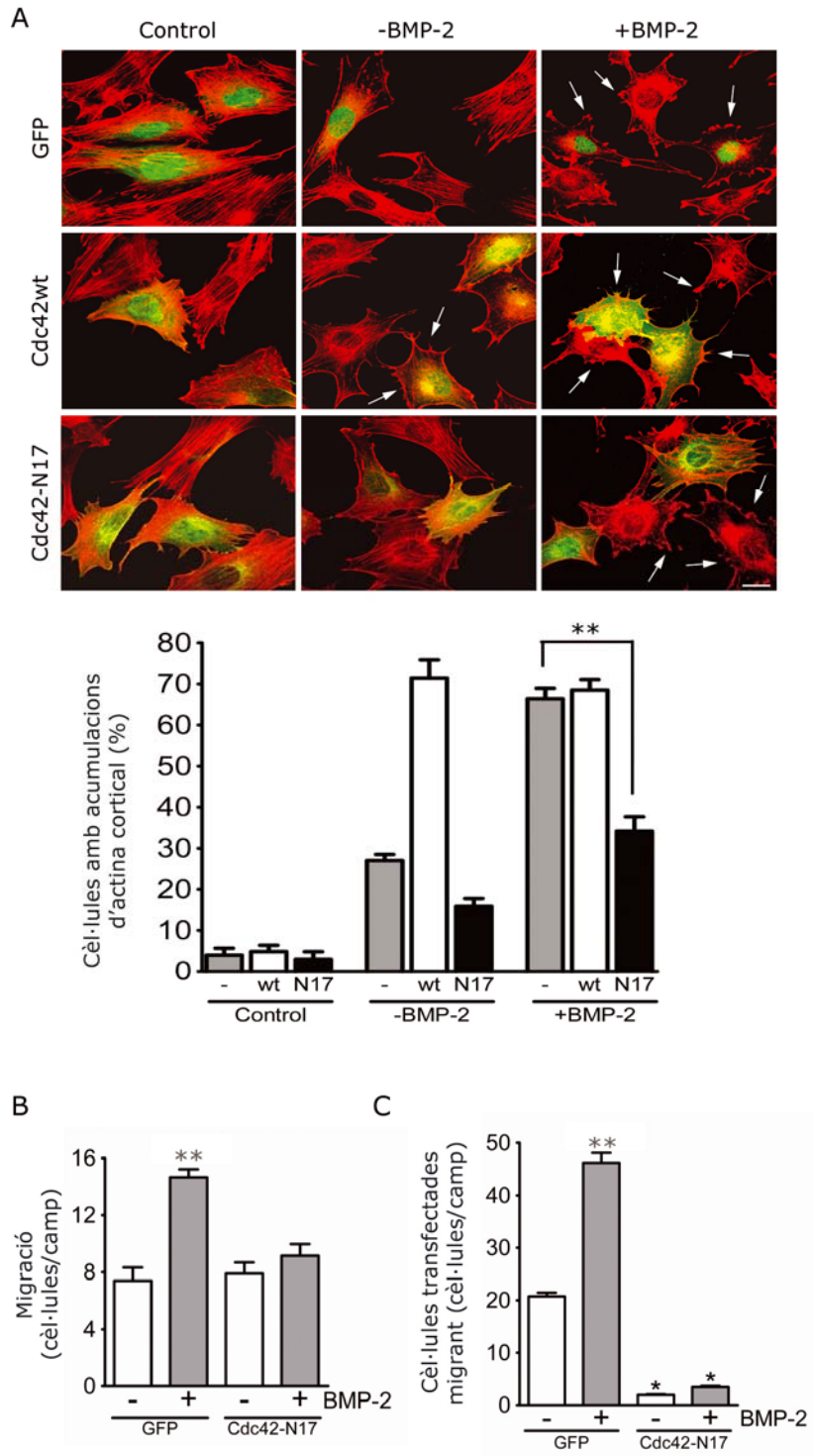
Tenint en compte que els resultats obtinguts en el model de les cèl·lules Swiss3T3 apuntaven cap a una possible participació de Cdc42 en els efectes de BMP-2 en la regulació de l'estructuració del citoesquelet d'actina, es va avaluar la capacitat de BMP-2 d'activar Cdc42. En una primera aproximació es va estudiar la capacitat de BMP-2 d'activar Cdc42 exogen en cèl·lules COS-1. Es van transfectar les cèl·lules amb plasmidis que codifiquen per les GTPases Cdc42 i Rac, es va estimular amb BMP-2 i es va analitzar el nivell d'activació de les Rho GTPases fent *pull-down* amb una proteïna de fusió unida a GST que conté el domini d'unió a GTPasa de la proteïna Pak1, un efector específic per Cdc42 i Rac (Pak-BD-GST) (Edlund et al., 2002). A la Figura R9 A es mostra l'especificitat del *pull-down* amb la proteïna Pak-BD-GST, fet que verifica que únicament les formes activades de Cdc42 (Cdc42-GTP) i Rac (Rac-GTP) s'unien al domini BD de la proteïna Pak1. L'anàlisi de l'activació de les Rho GTPases per part

de BMP-2 en cèl·lules COS-1 revela que BMP-2 mostrava la capacitat d'activar tant Cdc42 com Rac, essent aquest efecte màxim 15 min després d'estimular les cèl·lules amb BMP-2 (Figura R9 B). Per confirmar la capacitat de BMP-2 d'activar Cdc42 es va examinar l'activació de les Rho GTPases endògenes en cèl·lules C2C12. El tractament amb BMP-2 incrementava el nivell de Cdc42 endogen 15 min després de l'addició del lligand i presentava un màxim d'activació als 30 min. En contraposició, no es van observar alteracions en els nivells d'activació de Rac, al menys fins a 30 min després de l'estimulació amb BMP-2 (Figura R9 C).



**Figura R9. BMP-2 indueix l'activació de Cdc42.** (A) Cèl·lules COS-1 es van transfectar amb plasmidis que codifiquen per Cdc42 natiu (Cdc42wt), Cdc42 constitutivament actiu Q61L (Cdc42QL), Rac1 natiu (Racwt) o Rac1 constitutivament actiu Q61L (RacQL). 24 h post-transfecció els lisats cel·lulars es van sotmetre a *pull-down* amb proteïna purificada Pak-PBD-GST i es van analitzar les mostres purificades per *western blot* amb anticòs anti-Cdc42 i anti-Rac. Els Totals representen un 10% dels extractes solubles totals. (B) Cèl·lules COS-1 es van transfectar amb plasmidis que codifiquen per Cdc42 natiu o Rac1 natiu, 24 h post-transfecció les cèl·lules es van depleccionar de FBS 16 h i es van estimular amb BMP-2 els temps indicats. Els lisats cel·lulars es van sotmetre a *pull-down* amb proteïna purificada Pak-PBD-GST i es van analitzar les mostres purificades per *western blot* amb anticòs anti-Cdc42 i anti-Rac. Els totals representen un 10% dels extractes solubles totals. (C) Cèl·lules C2C12 depleccionades de FBS 16 h es van estimular amb BMP-2 i els nivells de Cdc42 i Rac1 endògens activats es van analitzar mitjançant *pull-down* amb proteïna purificada Pak-PBD-GST. Les mostres es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-Cdc42 i anti-Rac. Els totals representen un 10% dels extractes solubles totals.

En vista dels resultats obtinguts, es va analitzar la participació de Cdc42 en els canvis morfològics induïts per BMP-2. Es van transfectar cèl·lules C2C12 amb el mutant dominant negatiu Cdc42-N17 i després de desestructurar el citoesquelet d'actina amb citoD tal i com s'ha descrit anteriorment, les cèl·lules es van deixar recuperar en presència de BMP-2 (Figura R10 A). L'anàlisi de les imatges preses mostra que el tractament amb BMP-2 prevenia la formació de fibres d'estrès i afavoria l'acumulació d'actina en protrusions a la membrana en la condició control transfectada amb GFP; no obstant, aquest efecte no s'observava en les cèl·lules que expressaven Cdc42-N17. L'expressió de la forma nativa de Cdc42 era suficient per induir la formació d'acumulacions d'actina cortical i reduir les fibres d'estrès, fins i tot en absència de BMP-2; no obstant, no es va observar que incrementés la formació de protrusions d'actina per sobre dels nivells observats amb el tractament amb BMP-2. També es va estudiar si Cdc42 estava participant en els efectes descrits de BMP-2 sobre la migració cel·lular utilitzant l'assaig de migració quimiotàctica i l'assaig de ferida. Els resultats obtinguts en les dues aproximacions experimentals indiquen que en les cèl·lules que expressaven Cdc42-N17, BMP-2 no era capaç d'induir la migració cel·lular quan es comparava amb les cèl·lules control que havien estat transfectades amb GFP (Figura R10 BiC). Els resultats mostrats fins al moment suggereixen que l'activació de Cdc42 dependent de BMP-2 participa en la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.



**Figura R10. Cdc42 participa en la regulació per part de BMP-2 de la dinàmica del citoesquelet d'actina.** (A) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb plasmidis que codifiquen per GFP, GFP-Cdc42 natiu (Cdc42wt) i GFP-Cdc42 dominant negatiu N17 (Cdc42-N17), es van depleccionar de FBS (Control), es van tractar amb citoD i es van deixar recuperar 1 h en absència o presència de BMP-2. Els filaments d'actina van ser visualitzat amb fal·loidina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. Es mostren imatges combinades de la fal·loidina (vermell) i la senyal GFP (verd). Les fletxes senyalen protrusions d'actina. La barra correspon a 20 µm. L'anàlisi quantitatiu representa el percentatge de cèl·lules transfectades que presentaven protrusions d'actina en les diferents condicions. Els valors corresponen a la mitja ± ES de mínim 80 cèl·lules obtingudes de tres experiments independents (\*p<0.001, test t de Student). (B) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb un plasmidi que codifica per GFP o amb un que codifica per la forma de Cdc42 dominant negativa fusionada a GFP (Cdc42-N17) i 24 h després es van depleccionar les cèl·lules de FBS 16 h i es van sembrar al compartiment superior de *transwells*, la membrana dels quals havia estat prèviament gelatinitzat. Es van deixar adherir les cèl·lules 2 h, es va afegir el medi DMEM-1%BSA amb o sense BMP-2 al compartiment inferior i es van deixar migrar les cèl·lules 2 h. Es van retirar les cèl·lules que no havien migrat i es van fixar i tenyir amb iodur de propidi les cèl·lules que havien migrat a través de la membrana. Es mostra l'anàlisi quantitatiu de les cèl·lules transfectades que havien migrat en vuit camps triats a l'atzar en tres experiments independents. Els valors corresponen a la mitja ± ES (\*p<0.001 comparat amb les cèl·lules transfectades amb GFP i en absència de BMP-2, One-way ANOVA i Bonferroni's multiple comparison test). (C) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb el plasmidi que codifica per GFP o amb el que codifica per la forma de Cdc42 dominant negativa fusionada a GFP (Cdc42-N17) i 24 h després es van depleccionar amb DMEM-0.1% FBS. Es van fer les ferides a les monocapes de cèl·lules confluents i es van deixar recuperar en presència o absència de BMP-2 12 h. Es mostra l'anàlisi quantitatiu de les cèl·lules transfectades que havien migrat en vuit camps triats a l'atzar en tres experiments independents. Els valors corresponen a la mitja ± ES (\*\*p<0.001 i \*p<0.05 comparat amb les cèl·lules transfectades amb GFP i en absència de BMP-2, One-way ANOVA i Bonferroni's multiple comparison test).

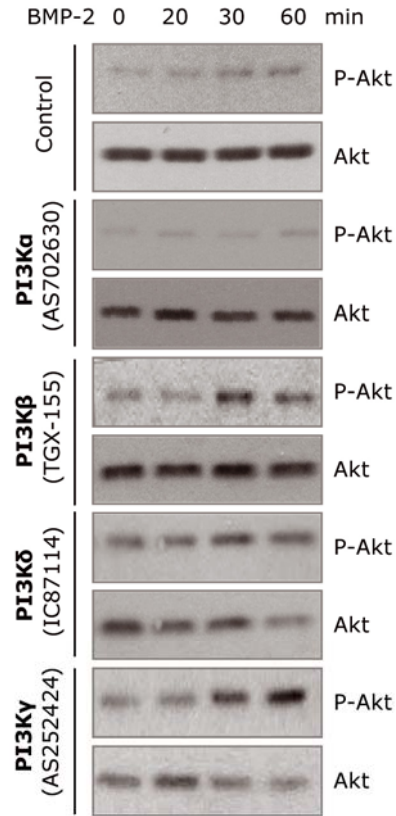
#### **4. L'activitat PI3K és necessària en la regulació per part de BMP-2 de la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular**

Diversos estudis previs han descrit que la PI3K i els seus productes lipídics, principalment fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfat (PIP<sub>3</sub>), juguen un paper clau en el control de la migració cel·lular i la polarització (Stephens et al., 2002). S'ha postulat que la migració quimiotàctica està controlada per l'establiment d'un gradient intracel·lular de PIP<sub>3</sub> generat al front d'avanç per les proteïnes PI3K de classe I (Ridley et al., 2003), de tal manera que els PIP<sub>3</sub> generats participen en la localització i activació de Cdc42 (Li et al., 2003), entre d'altres proteïnes de senyalització. Tenint en compte aquest context, es va analitzar si BMP-2 estava regulant l'activitat PI3K i si aquesta participava en els efectes de BMP-2 sobre la mobilització dels filaments d'actina i la migració cel·lular.

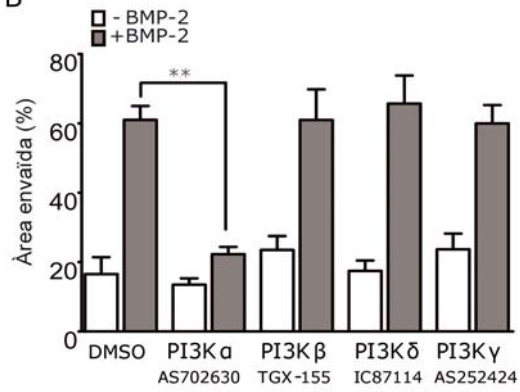
La capacitat de BMP-2 d'activar PI3K es va analitzar estudiant l'estat de fosforilació de Akt, ja que s'ha descrit que la fosforilació de Akt en el residu Ser473 correlaciona amb el nivell d'activitat de PI3K (Datta et al., 1999; Yano et al., 1998). Tal i com es mostra a la Figura R11 A, BMP-2 induïa la fosforilació de Akt, essent aquesta màxima al cap de 30 min d'estimular amb BMP-2, i la inducció resultava completament anul·lada quan es pretractaven les cèl·lules amb l'inhibidor de l'activitat de PI3K, LY294002. Posteriorment es va utilitzar LY294002 per caracteritzar l'efecte de PI3K en la reorganització del citoesquelet d'actina regulada per BMP-2. Com es mostra a la Figura R11 B, quan es pretractaven les cèl·lules amb LY294002, l'estimulació amb BMP-2 no s'acompanyava d'un increment en la formació de protrusions d'actina; fet que suggereix que la integritat de la via de senyalització de PI3K és indispensable perquè BMP-2 dugui a terme la mobilització dels filaments d'actina. En coherència amb el resultat anterior, vam realitzar l'assaig de ferida i així com BMP-2 induïa una acceleració en el tancament de la ferida, quan juntament amb el BMP-2 es tractaven les cèl·lules amb LY294002, no s'observa aquest increment en la migració cel·lular (Figura R11 C).

**Figura R11. L'activitat PI3K és crítica en control de la mobilització dels filaments d'actina i la migració cel·lular per part de BMP-2.** (A) Cèl·lules C2C12 es van incubar amb DMSO o amb 15  $\mu$ M LY294002 1 h i es van estimular amb BMP-2 els temps indicats. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-Akt-P(Ser473) i després es va reincubar les membranes amb anti-Akt. (B) Cèl·lules C2C12 es van tractar amb citoD simultàniament amb DMSO o amb 15  $\mu$ M LY294002 30 min i després d'eliminar la citoD es van estimular les cèl·lules amb BMP-2 juntament amb DMSO (-LY294002) o 15  $\mu$ M LY294002 (+LY294002) durant 1 h. Els filaments d'actina van ser visualitzats amb fal·loïdina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. Les fletxes senyalen cèl·lules amb protrusions d'actina. La barra correspon a 20  $\mu$ m. També es mostra l'anàlisi quantitatiu del percentatge de cèl·lules que presentaven protrusions d'actina. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de quatre experiments independents (\* $p$ <0.001, test t de Student). (C) Imatges representatives de contrast de fase de cèl·lules C2C12 pretractades amb DMSO o 15  $\mu$ M LY294002 durant 2 h on s'havia realitzat la ferida i s'havia deixat recuperar 12 h en presència o absència de BMP-2 juntament a DMSO (Control, BMP-2) o 15  $\mu$ M LY294002 (LY i BMP-2+LY). L'anàlisi quantitatiu mostra el percentatge d'àrea envaïda i es va obtenir de mínim tres camps fotogràfiats obtinguts en tres experiments independents. Els valors representen la mitja  $\pm$  ES (\* $p$ <0.001, test t de Student).

A



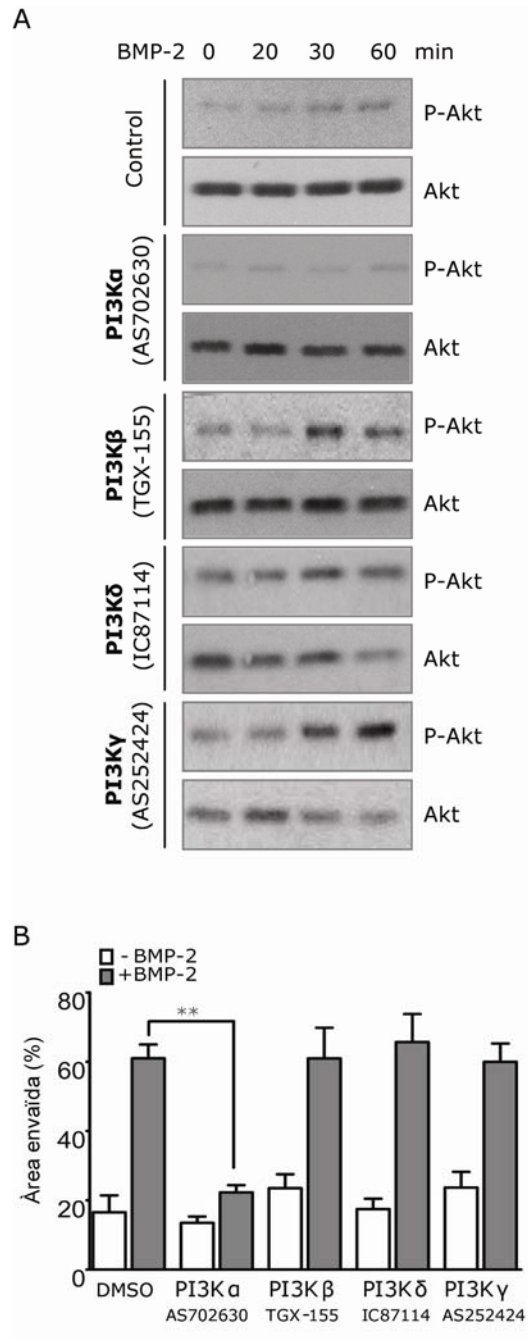
B



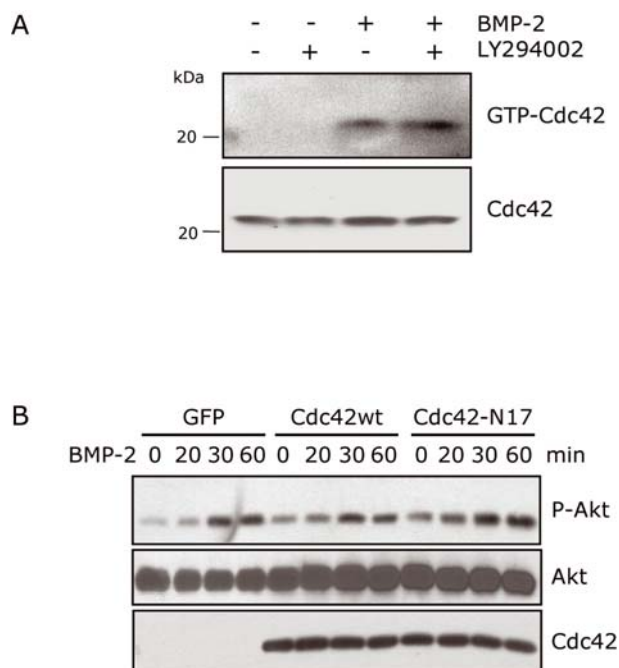
Per tal d'aprofundir en l'estudi de l'activació de PI3K per part de BMP-2, es va analitzar la contribució de les diferents isoformes de PI3K a l'efecte observat. Tenint en compte que l'inhibidor LY294002 no és selectiu entre els diferents membres de classe I de PI3K (Hawkins et al., 2006), es va utilitzar un conjunt d'inhibidors específics per les diferents isoformes de les proteïnes PI3K de classe I que s'havien desenvolupat recentment (Camps et al., 2005; Jackson et al., 2005; Pomel et al., 2006; Sadhu et al., 2003). Es van tractar les cèl·lules amb l'inhibidor selectiu de PI3K $\gamma$  AS252424 (Pomel et al., 2006), l'inhibidor selectiu de PI3K $\beta$  TGX-155 (Jackson et al., 2005), l'inhibidor selectiu de PI3K $\delta$  ICO87114 (Billottet et al., 2006; Sadhu et al., 2003) o l'inhibidor selectiu de PI3K $\alpha$  AS702630 (Ruckle et al., 2004), i es va analitzar l'estat de fosforilació de Akt després d'estimular les cèl·lules amb BMP-2. Es va observar que únicament quan es pretractaven les cèl·lules amb l'inhibidor AS702630 s'abolia la fosforilació de Akt dependent de BMP-2, fet que suggereix que, en les cèl·lules C2C12, BMP-2 activa específicament l'isoforma PI3K $\alpha$  (Figura R12 A). En coherència amb aquest resultat, es va realitzar l'assaig de ferida en presència dels inhibidors selectius de les diferents isoformes de PI3K i únicament quan s'afegia AS702630 al medi, l'estimulació amb BMP-2 no induïa un augment de la migració cel·lular (Figura R12 B). Aquestes observacions fan pensar que, en les cèl·lules C2C12, PI3K $\alpha$  juga un paper crític en els efectes de BMP-2 sobre la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.

**Figura R12. BMP-2 requereix l'activitat PI3K $\alpha$  per induir la migració cel·lular.** (A) Cèl·lules C2C12 es van incubar amb els inhibidors selectius dels membres de classe I de PI3K 1 h abans d'estimular amb BMP-2 els temps indicats en presència dels inhibidors. Els diferents inhibidors es van utilitzar a una concentració final de 1  $\mu$ M. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-Akt-P(Ser473) i després es va reincubar les membranes amb anti-Akt. (B) Anàlisi quantitatiu de les imatges de contrast de fase de l'assaig de ferida realitzat en cèl·lules C2C12 durant 12 h en presència de BMP-2 i els inhibidors selectius dels membres de classe I de PI3K a una concentració final de 1  $\mu$ M. Els valors representen la mitja  $\pm$  ES de tres experiments independents (\* $p$ <0.001, test t de Student).





Els resultats mostrats fins al moment indicaven que tant Cdc42 com PI3K participen en la regulació dels efectes de BMP-2 sobre la mobilització del filaments d'actina i la migració cel·lular, fet que ens va portar a analitzar la possible relació entre els dos processos. En primer lloc es va determinar si PI3K regulava l'activació de Cdc42 dependent de BMP-2. Així, es va analitzar l'activació de Cdc42 endogen per part de BMP-2 en presència de l'inhibidor de l'activitat PI3K LY294002 i, tal i com es mostra a la Figura R13 A, no es van observar diferències en els nivells d'activació de Cdc42. Per altra banda, la transfecció del mutant dominant negatiu de Cdc42 (Cdc42-N17) no modificava l'habilitat de BMP-2 d'induir l'activitat PI3K i fosforilar Akt (Figura R13 B). Aquestes observacions permeten concloure que BMP-2 activa Cdc42 i PI3K de manera independent i que ambdues vies de senyalització són imprescindibles perquè BMP-2 exerceixi els seus efectes sobre la regulació del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.



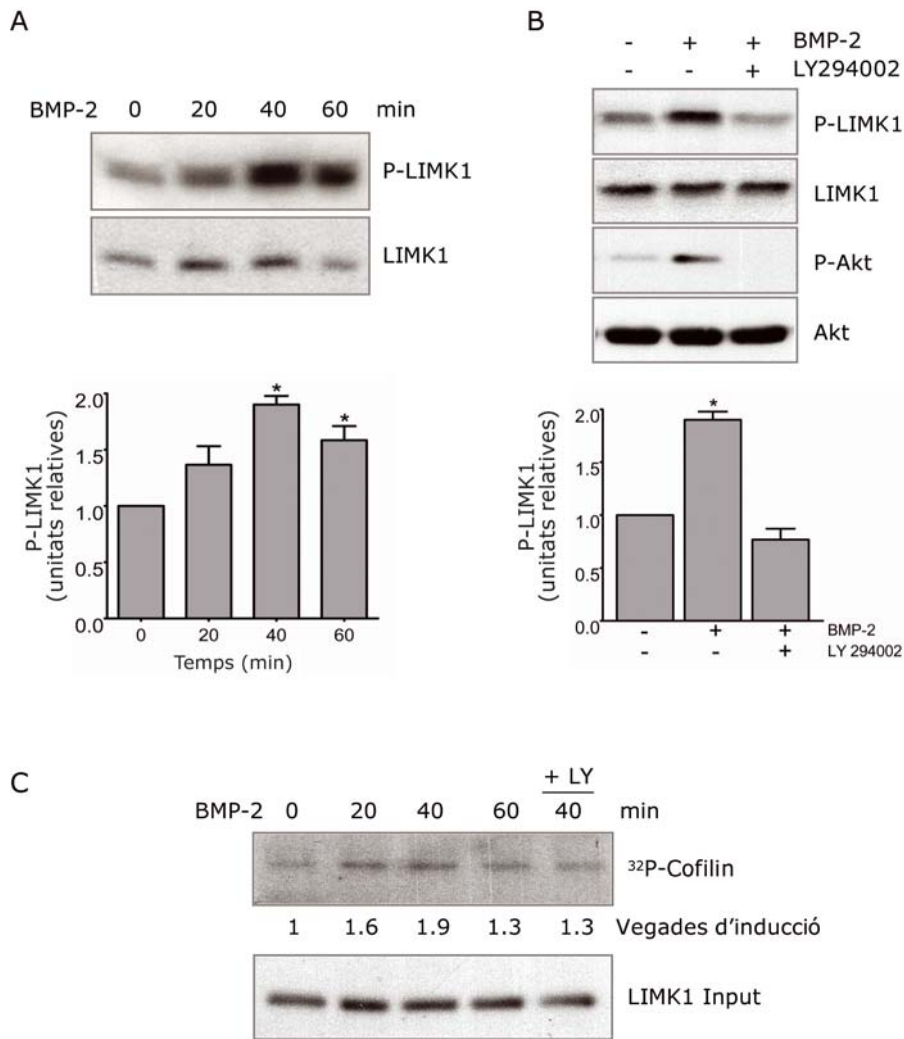
**Figura R13. BMP-2 activa Cdc42 i PI3K de manera independent.** (A) Cèl·lules C2C12 es van preincubar amb DMSO (-) o 15  $\mu$ M LY294002 (+) i posteriorment es van estimular amb BMP-2 en presència o absència de 15  $\mu$ M LY294002 durant 30 min. Els nivells de Cdc42 endogen activats es van analitzar mitjançant *pull-down* amb proteïna purificada Pak-PBD-GST. Les mostres es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-Cdc42. Els totals (Cdc42) representen un 10% dels extractes solubles totals. (B) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb plasmidis que codifiquen per GFP, GFP-Cdc42 natiu (Cdc42wt) i GFP-Cdc42 dominant negatiu N17 (Cdc42-

N17) i es van estimular amb BMP-2 els temps indicats. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-Akt-P(Ser473) i anti-Cdc42 i després es va reincubar les membranes amb anti-Akt.

## **5. BMP-2 indueix l'activació de LIMK1 a través d'un mecanisme dependent de PI3K**

Resultats previs indiquen que altres membres de la família de BMPs regulen l'activitat de la proteïna LIMK1 (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004; Wen et al., 2007). La funció més ben caracteritzada de la LIMK1 és la regulació de la cofilina, proteïna que juga un paper essencial en la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular a través del control de la polimerització dels filaments d'actina (Bamburg and Wiggan, 2002; Bernard, 2007). L'activitat de la cofilina és regulada de manera reversible per fosforilació al residu Ser3, essent la forma fosforilada la forma inactiva. La LIMK1 és la responsable de la fosforilació al residu Ser3 i per tant de la inactivació de la cofilina (Arber et al., 1998; Yang et al., 1998). Així doncs, tenint en compte els efectes observats de BMP-2 en la mobilització dels filaments d'actina varem analitzar la possible regulació de l'activitat LIMK1 per part de BMP-2.

Es va observar que l'estimulació de les cèl·lules C2C12 amb BMP-2 induïa la fosforilació de LIMK1 al residu Thr508, aminoàcid situat al domini quinasa, fosforilació que s'ha descrit que es correlaciona amb un increment de l'activitat de la proteïna (Scott and Olson, 2007) (Figura R14 A). Fins al moment, en el nostre model d'estudi havíem descrit que els efectes de BMP-2 sobre la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular eren sensibles a l'inhibidor de l'activitat PI3K, LY294002, i per tant era esperable que l'activació de LIMK1 en resposta a BMP-2 també fos regulada per PI3K. Tal i com es mostra a la Figura R14 B, en presència de LY294002 la fosforilació de LIMK1 dependent de BMP-2 resultava completament inhibida. Posteriorment es va estudiar si la fosforilació de LIMK1 dependent de BMP-2 correlacionava amb un augment d'activitat de la LIMK1. A la Figura R14 C es mostra que l'estimulació amb BMP-2 resultava en un augment de la l'activitat de la LIMK1 i que dita activació es perdia en presència de LY294002. D'acord amb els resultats aquí presentats, BMP-2 estimula tant l'activitat LIMK1 i dit efecte depèn de PI3K. Aquests resultats doncs suggereixen que BMP-2 podria regular directament la polimerització dels filaments d'actina a través del control de la proteïna cofilina, que alhora és regulada per LIMK1 de manera dependent de l'activitat PI3K.



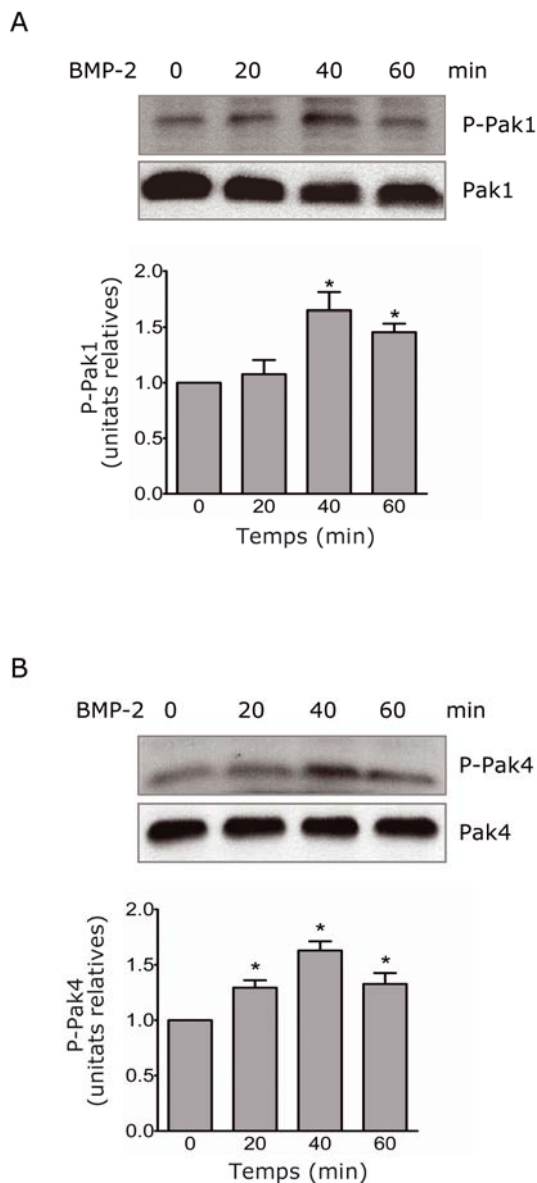
**Figura R14. BMP-2 estimula l'activitat LIMK1.** (A) Cèl·lules C2C12 es van estimular amb BMP-2 els temps indicats i els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-LIMK1-P(Thr508) i després es va reincubar les membranes amb anti-LIMK1. Es mostra la quantificació densitomètrica dels resultats obtinguts representats en histogrames com els nivells relatius de LIMK1-P/LIMK1 en relació a la situació control sense estimular amb BMP-2. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de tres experiments independents (\* $p < 0.05$ , test t de Student). (B) Cèl·lules C2C12 es van preincubar amb DMSO o 15  $\mu$ M LY294002 i posteriorment es van estimular amb BMP-2 en presència o absència de 15  $\mu$ M LY294002 durant 40 min. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb els anticòs indicats. Es mostra la quantificació densitomètrica dels resultats obtinguts representats en histogrames com els nivells relatius de LIMK1-P/LIMK1 en relació a la situació control sense estimular amb BMP-2. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de tres experiments independents (\* $p < 0.05$ , test t de Student). (C) Cèl·lules C2C12 es van preincubar amb DMSO (-) o 15  $\mu$ M LY294002 (+) 30 min i després es van estimular amb BMP-2 i LY294002 tal com s'indica. La LIMK1 endògena es va immunoprecipitar amb anticòs anti-LIMK1 i es va sotmetre a assaig quínsa *in vitro* utilitzant GST-cofilina com a substrat en presència de ATP marcat radioactivament.

Les reaccions es van resoldre per SDS-PAGE i es van analitzar per autoradiografia. Paral·lelament, un 10% dels lisats cel·lulars immunoprecipitats es van utilitzar per fer *western blot* anti-LIMK1 per controlar que la LIMK1 immunoprecipitada en les diferents condicions era comparable. Es mostra la quantificació densitomètrica dels resultats obtinguts representats com els nivells relatius de senyal obtinguda en la autoradiografia/LIMK1 obtinguda en el *western blot* en relació a la situació control sense estimular amb BMP-2.

## **6. BMP-2 estimula l'activitat Pak1 i Pak4 a través d'un mecanisme dependent de PI3K i de Cdc42**

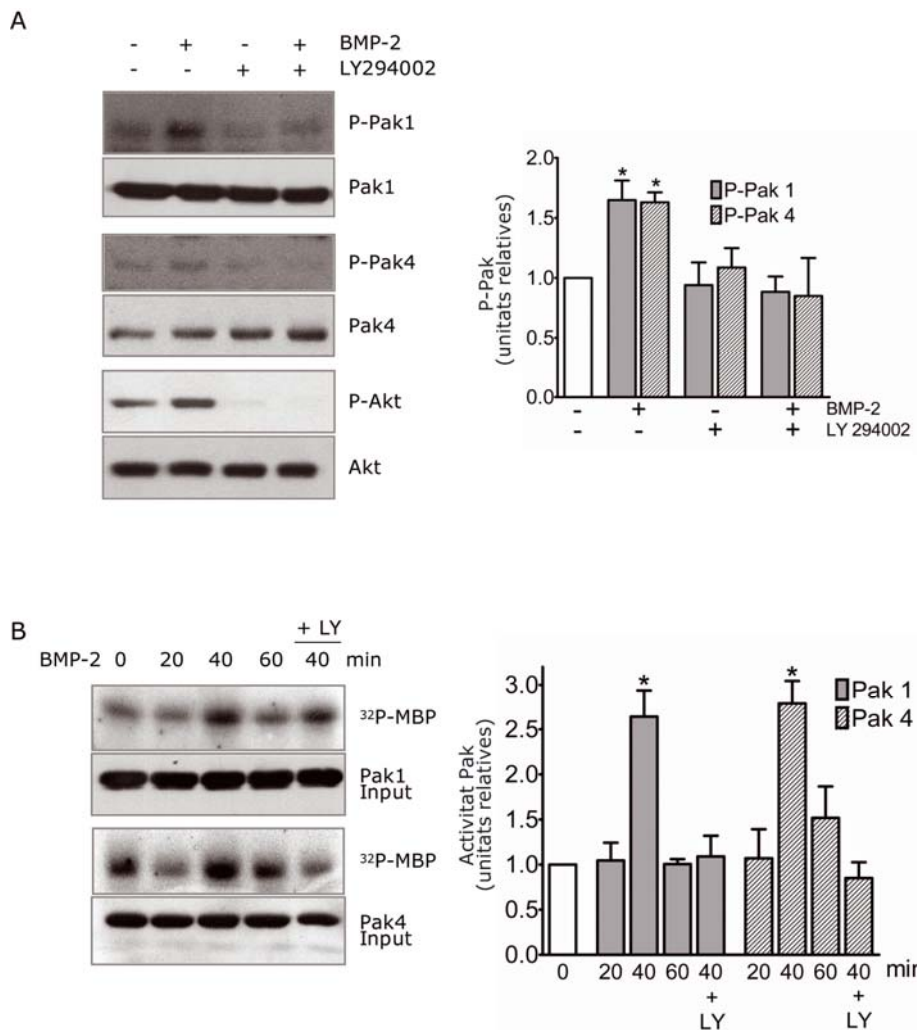
L'activitat LIMK1 està directament regulada per fosforilació per part de les proteïnes de la família PAK (Dan et al., 2001; Edwards et al., 1999). Els membres de la família PAK regulen una gran varietat de canvis del citoesquelet d'actina, generalment en resposta a les petites GTPases de la família Rho. Les PAKs activades es redistribueixen del citosol a estructures d'actina cortical com els lamelipodis, el front d'avanç de cèl·lules polaritzades i els *ruffles* de membrana. S'ha descrit que la unió de les petites GTPases en la seva forma activa a les proteïnes PAK dona lloc a un canvi conformacional en aquestes últimes que permet que el domini quinasa quedi catalíticament actiu per mitjà d'una autofosforilació al residu Thr308 en el cas de Pak1 (equivalent a Thr402 de Pak2) (Manser et al., 1994). Per altra banda, s'ha descrit que quinases de la via de senyalització de PI3K poden activar les PAKs per fosforilació a aquests mateixos i a altres residus (King et al., 2000). La nostra hipòtesis era que en resposta a BMP-2, l'activació de LIMK1 per part de les proteïnes de la família PAK acoblava la senyalització activada per PI3K i Cdc42 amb la dinàmica del citoesquelet d'actina.

Per a estudiar aquesta hipòtesis, en primer lloc es va analitzar la capacitat de BMP-2 de fosforilar Pak1 i Pak4. A la Figura R15 AiB es mostra com el tractament amb BMP-2 induïa un increment de l'estat de fosforilació d'ambdues PAKs analitzades, i dit efecte resultava màxim 40 min després d'incubar amb el factor.



**Figura R15. BMP-2 indueix la fosforilació de Pak1 i Pak4.** (A-B) Cèl·lules C2C12 es van estimular amb BMP-2 els temps indicats i els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-Pak1-P(Thr423) i després es van reincubar les membranes amb anti-Pak1 (A); i anti-Pak4-P(Ser474) i després es va reincubar les membranes amb anti-Pak4 (B). També es mostra la quantificació densitomètrica dels resultats obtinguts representats en histogrames com els nivells relatius de Pak-P/Pak en relació a la situació control sense estimular amb BMP-2. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de tres experiments independents (\* $p < 0.05$ , test t de Student).

Posteriorment es va avaluar si els efectes de BMP-2 sobre la fosforilació de les PAKs era dependent de l'activitat PI3K. Els resultats obtinguts demostren que el pretractament amb LY294002 bloquejava completament la fosforilació de Pak1 i Pak4 dependent de BMP-2 (Figura R16 A). Per confirmar la participació de PI3K en l'activació de Pak1 i Pak4 per part de BMP-2, es van analitzar la inducció de l'activitat de les PAKs per part de BMP-2 en presència de LY294002. Després d'estimular les cèl·lules amb BMP-2, en presència de LY294002, es va immunoprecipitar Pak1 i Pak4 i es va analitzar el seu estat d'activació envers un substrat no específic. La quantificació densitomètrica de l'autoradiografia mostra que, així com BMP-2 incrementava l'activitat de Pak1 i Pak4 més de dues vegades sobre el seu nivell basal, en presència de LY294002 s'inhibia completament aquesta activació (Figura R15 B). Aquests resultats permeten concloure que BMP-2 activa Pak1 i Pak4 per un mecanisme dependent de l'activitat PI3K.



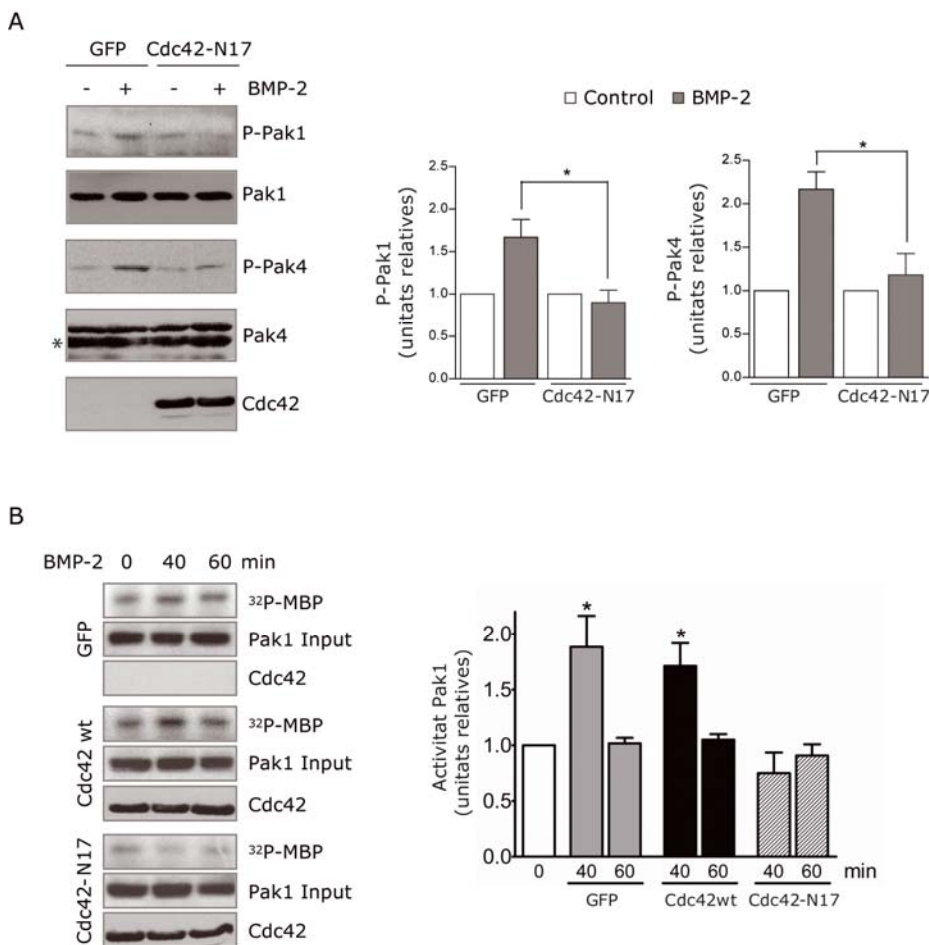
**Figura R16. BMP-2 estimula l'activitat de Pak1 i Pak4 de manera dependent a PI3K.** (A) Cèl·lules C2C12 es van preincubar amb DMSO (-) o 15 µM LY294002 (+) 30 min i posteriorment es van estimular amb BMP-2 en presència o absència de 15 µM LY294002 durant 40 min. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb els anticossos indicats. Es mostra la quantificació densitomètrica dels resultats obtinguts representats en histogrames com els nivells relatius de Pak-P/Pak en relació a la situació control sense estimular amb BMP-2. Els valors corresponen a la mitja ± ES de tres experiments independents (\*p<0.05, test t de Student). (B) Cèl·lules C2C12 es van preincubar amb 15 µM LY294002 30 min i després es van estimular amb BMP-2 i LY294002 tal com s'indica. La Pak1 i Pak4 endògenes es van immunoprecipitar amb anticòs anti-Pak1 o l'anti-Pak4 i es va sotmetre a assaig quinasa *in vitro* utilitzant MBP com a proteïna substrat en presència de ATP marcat radioactivament. Les reaccions es van resoldre per SDS-PAGE i es van analitzar per autoradiografia. Paral·lelament un 10% dels lisats cel·lulars immunoprecipitats es van utilitzar per fer *western blot* anti-Pak per controlar que la Pak immunoprecipitada en les diferents condicions era comparable. Es mostra la quantificació densitomètrica dels resultats obtinguts representats en histogrames com els nivells relatius de senyal obtinguda en la autoradiografia/Pak obtinguda en el *western blot* en relació a



---

la situació control sense estimular amb BMP-2. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de tres experiments independents (\* $p < 0.05$ , test t de Student).

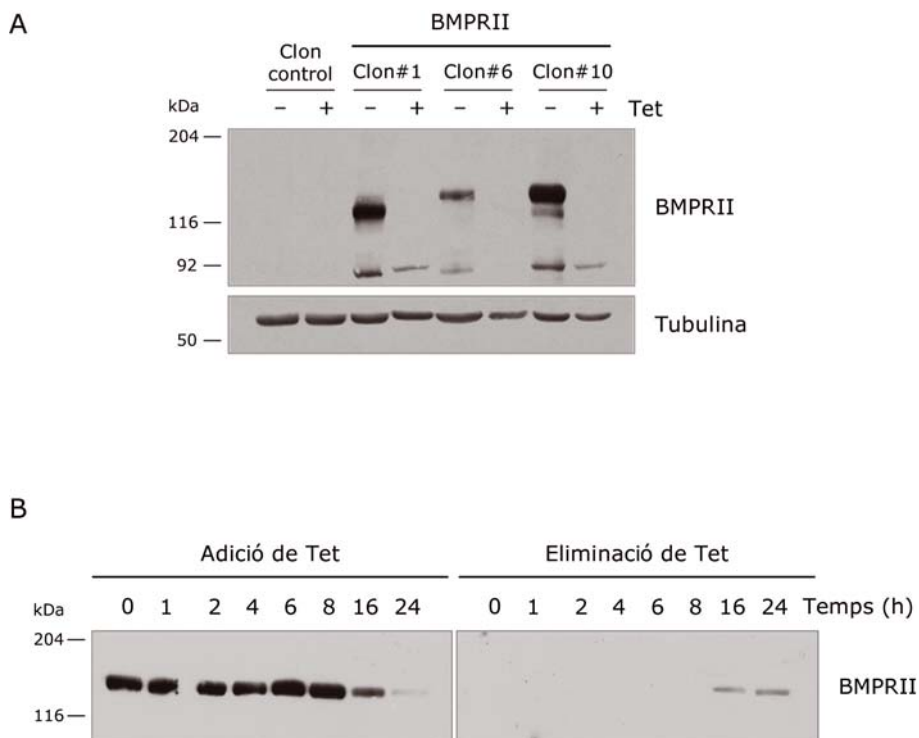
Per a analitzar la possible participació de Cdc42 en l'activació de les proteïnes de la família Pak en resposta a BMP-2 es van transfectar cèl·lules C2C12 amb un plasmidi que codifica pel mutant dominant negatiu Cdc42-N17 i després d'estimular amb BMP-2 es va analitzar l'estat de fosforilació de Pak1 i Pak4. Els resultats mostren que l'expressió de Cdc42-N17 era suficient per evitar la fosforilació per part de BMP-2 tant de Pak1 com de Pak4 (Figura R17 A). Tenint en compte aquest resultat era esperable que la regulació de la fosforilació de Pak1 i Pak4 per part de Cdc42 impliqués també un control de l'activitat d'ambdues Paks. Així doncs, per a confirmar aquesta hipòtesis, es van transfectar cèl·lules HeLa amb el dominant negatiu Cdc42-N17 i, després d'estimular amb BMP-2, es va analitzar l'activitat quinasa *in vitro* de la Pak1 endògena. En comparació amb la condició control transfectada amb la forma nativa de Cdc42, l'expressió de Cdc42-N17 prevenia totalment l'augment d'activitat de Pak1 dependent de BMP-2 (Figura R17 B). Basant-nos en la similitud de la cinètica d'activació dependent de BMP-2 de Pak1 i Pak4, i que ambdues proteïnes són regulades per PI3K, suggerim que l'activitat de Pak4 també deu estar regulada per Cdc42 de la mateixa manera que Pak1.



**Figura R17. Cdc42 és imprescindible perquè BMP-2 estimuli l'activitat de Pak.** (A) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb plasmidis que codifiquen per GFP i GFP-Cdc42 dominant negatiu N17 (Cdc42-N17) i es van estimular amb BMP-2 els temps indicats. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb els anticossos indicats. Es mostra la quantificació densitomètrica dels resultats obtinguts representats en histogrames com els nivells relatius de Pak-P/Pak en relació a la seva situació control (GFP) sense estimular amb BMP-2. Els valors corresponen la mitja ± ES de tres experiments independents (\* $p < 0.05$ , test t de Student). (B) Cèl·lules HeLa es van transfectar amb plasmidis que codifiquen per GFP, GFP-Cdc42 natiu (Cdc42wt) i GFP-Cdc42 dominant negatiu N17 (Cdc42-N17) i es van estimular amb BMP-2 els temps indicats. La Pak1 endògena es va immunoprecipitar amb anticòs anti-Pak1 i es va sotmetre a assaig quinasa *in vitro* utilitzant MBP com a substrat en presència d'ATP marcat radioactivament. Les reaccions es van resoldre per SDS-PAGE i es van analitzar per autoradiografia. Paral·lelament, un 10% dels lisats cel·lulars totals es van utilitzar per fer *western blot* anti-Cdc42 per comprovar l'eficiència de transfecció i un 10% dels lisats cel·lulars immunoprecipitats es van utilitzar per fer *western blot* anti-Pak1 per controlar que la Pak1 immunoprecipitada en les diferents condicions era comparable (Input). També es mostra la quantificació densitomètrica dels resultats obtinguts representats en histogrames com els nivells relatius de senyal obtinguda en la autoradiografia/Pak1 obtinguda en el *western blot* en relació a la situació control sense estimular amb BMP-2. Els valors corresponen a la mitja ± ES de tres experiments independents (\* $p < 0.05$ , test t de Student).

D'acord amb els resultats aquí presentats, en cèl·lules C2C12, l'estimulació amb BMP-2 activa Pak1 i Pak4 de manera dependent de l'activitat PI3K i Cdc42. A més a més, aquests resultats en conjunt amb les observacions descrites fins al moment, suggereixen que en la via de senyalització mitjançant la qual BMP-2 regula la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular, les proteïnes de la família Pak funcionen com un mòdul integrador on convergeixen les senyals de Cdc42 i PI3K.

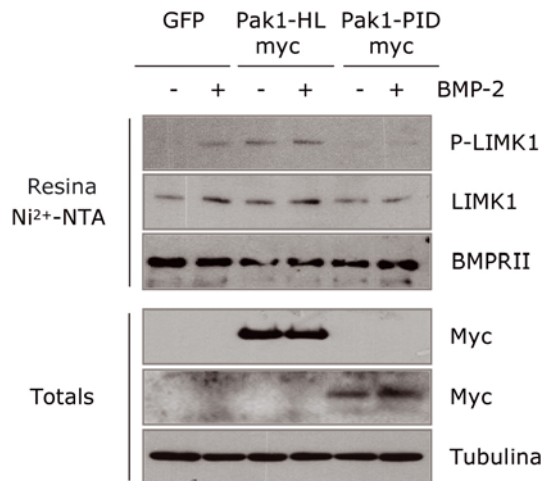
Evidències experimentals d'altres grups descriuen que l'activitat de la LIMK1 és regulada directament per fosforilació per part de proteïnes de la família PAK (Dan et al., 2001; Edwards et al., 1999); i Lee-Hoeflich et al. ja havien suggerit que existeix una proteïna regulada per Cdc42 implicada en l'activació de la LIMK1 unida a la cua de BMPRII (Lee-Hoeflich et al., 2004). Tenint en compte aquests precedents, vam analitzar si en la via de senyalització de BMP-2, l'activitat de la LIMK1 associada a la cua de BMPRII era regulada per part de les PAKs. Es van generar clons de cèl·lules C2C12 que expressaven de manera estable BMPRII-His sota el control d'un promotor que responia a tetraciclina i després de validar els diferents clons positius que es van obtenir, es va decidir treballar amb el clon #10 perquè era el que expressava una quantitat més elevada de proteïna BMPRII (Figura R18 A). Una vegada es va haver posat a punt les condicions òptimes per regular la senyal (Figura R18 B) es va utilitzar el clon #10 per a fer el següent experiment.



**Figura R18. Generació de clons que expressen BMPRII.** (A) Els clons de C2C12 que expressaven BMPRII natiu (BMPRII) es van generar tal i com s'explica a l'apartat de Materials i Mètodes. Per comprovar els clons, es van incubar les cèl·lules amb 100 ng/ml tetraciclina (+) o sense (-) durant 24 h i els lisats cel·lulars totals es van analitzar amb l'anticòs anti-BMPRII i anti-tubulina. El clon control (ClonCto) correspon a un clon de cèl·lules que no expressava BMPRII. Tots els clons que es mostren foren positius i regulables per tetraciclina. La resta d'experiments s'han realitzat amb el clon #10. (B) Cèl·lules C2C12 del clon BMPRII #10 es van tractar amb 100 ng/ml tetraciclina els períodes indicats i els lisats cel·lulars es van analitzar amb l'anticòs anti-BMPRII. Es va concloure que el tractament amb tetraciclina durant 24 h anul·lava l'expressió induïble de BMPRII (panell esquerra). Per altra banda, cèl·lules C2C12 del clon BMPRII #10 es van tractar amb 100 ng/ml tetraciclina 24 h i posteriorment es va eliminar la tetraciclina per permetre l'expressió de BMPRII. Els lisats cel·lulars es van analitzar amb l'anticòs anti-BMPRII. La deplecció de tetraciclina 16 h era suficient per obtenir uns nivells de BMPRII induïble detectables per *western blot* (panell dret).

Es va transfectar el clon que expressava de manera induïble BMPRII-His amb una forma constitutivament activa de Pak1 (Pak1-H83,86L) i una forma que actua com a dominant negatiu (Pak1-PID) i es va analitzar l'activació de la LIMK1 associada al BMPRII sobreexpressat. L'estimulació amb BMP-2 incrementava lleugerament la unió de LIMK1 a BMPRII i induïa un increment del nivell de fosforilació de la LIMK1 associada a BMPRII (Figura R19). L'expressió d'una forma activa de Pak1 incrementava, fins i tot en absència de BMP-2, el nivell de fosforilació de

LIMK1, i coherentment amb el que era presumible, l'expressió de Pak1-PID evitava la fosforilació de LIMK1 induïda per BMP-2. Aquests resultats suggereixen que l'activitat de les proteïnes PAK està implicada en l'activació de la LIMK1 unida a BMPRII.



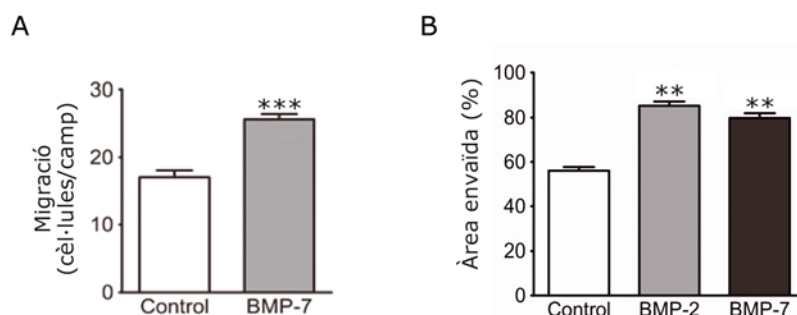
**Figura R19. L'activitat Pak1 és crítica perquè BMP-2 indueix la fosforilació de la LIMK1 associada a BMPRII.** Cèl·lules del clon de C2C12 que expressava BMPRII-His es van transfectar amb plasmidus que codifiquen per GFP, Pak1 constitutivament actiu H83,86L amb l'epítot myc (Pak1-HL myc) o el domini inhibidor de Pak1 PID(aa83-149) amb l'epítot myc (Pak1-PID myc) i es van estimular amb BMP-2 40 min. Els lisats cel·lulars es van sotmetre a *pull-down* amb resina de níquel i els extractes purificats es van analitzar per *western blot* amb els anticossos indicats. Un 10% dels lisats cel·lulars solubles totals es van utilitzar per fer *western blot* anti-myc per comprovar l'eficiència de transfecció i anti-tubulina; i un 10% dels lisats cel·lulars purificats es van utilitzar per fer *western blot* anti-BMPRII per controlar que el BMPRII-His purificat amb resina de níquel en les diferents condicions era comparable, i anti-LIMK1 i anti-LIMK1-P(Thr508) per analitzar l'estat de fosforilació de la LIMK1 associada a BMPRII-His.

## 7. Estudi de la rellevància funcional de la cua citoplasmàtica de BMPRII en els efectes de BMP-2 en la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular

Estudis previs han demostrat que LIMK1 interacciona directament amb la regió citoplasmàtica *downstream* del domini quinasa de BMPRII i és activada en resposta a l'estimulació amb BMPs per un mecanisme que involucra Cdc42 (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004). Els autors d'aquests treballs arriben a diferents conclusions en relació al mecanisme mitjançant el qual la unió de les BMPs als seus receptors incrementa l'activitat LIMK1, no obstant coincideixen en que el control per part de

membres de la subfamília de BMPs de processos com la dendritogènesi i l'estabilitat sinàptica requereixen l'activitat LIMK1 (Eaton and Davis, 2005; Lee-Hoeflich et al., 2004; Wen et al., 2007). En el nostre model d'estudi hem observat que la LIMK1 interacciona amb BMPRII, i que el tractament amb BMP-2 modifica el nivell de fosforilació de la LIMK1 associada a BMPRII (Figura R19). Tenint en compte aquests precedents ens proposarem estudiar la rellevància funcional de la cua citoplasmàtica de BMPRII en els efectes descrits de BMP-2 sobre la regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.

Per a dur a terme aquest objectiu, es van estudiar diverses situacions en les que BMPRII estava absent. En una primera aproximació es van analitzar els efectes de BMP-7 sobre la migració cel·lular ja que així com BMP-2 senyalitza preferentment a través de BMPRII, BMP-6 i BMP-7 ho fan a través de ActRIIA, receptor de la mateixa família però que no conté la llarga cua citoplasmàtica present a BMPRII (Ebisawa et al., 1999; Macias-Silva et al., 1998; Yu et al., 2005). Per tal d'analitzar els efectes de BMP-7 sobre la migració cel·lular es va realitzar l'assaig de migració quimiotàctic i l'assaig de ferida. Tal i com es representa a la Figura R20 AiB, els resultats obtinguts en les dues aproximacions experimentals realitzades mostren que l'addició de BMP-7 donava lloc a un augment de la migració cel·lular molt similar al prèviament descrit per BMP-2. Aquest resultat suggeria que la llarga cua citoplasmàtica de BMPRII no jugava un paper crític en la regulació de la migració cel·lular per part de BMP-2.



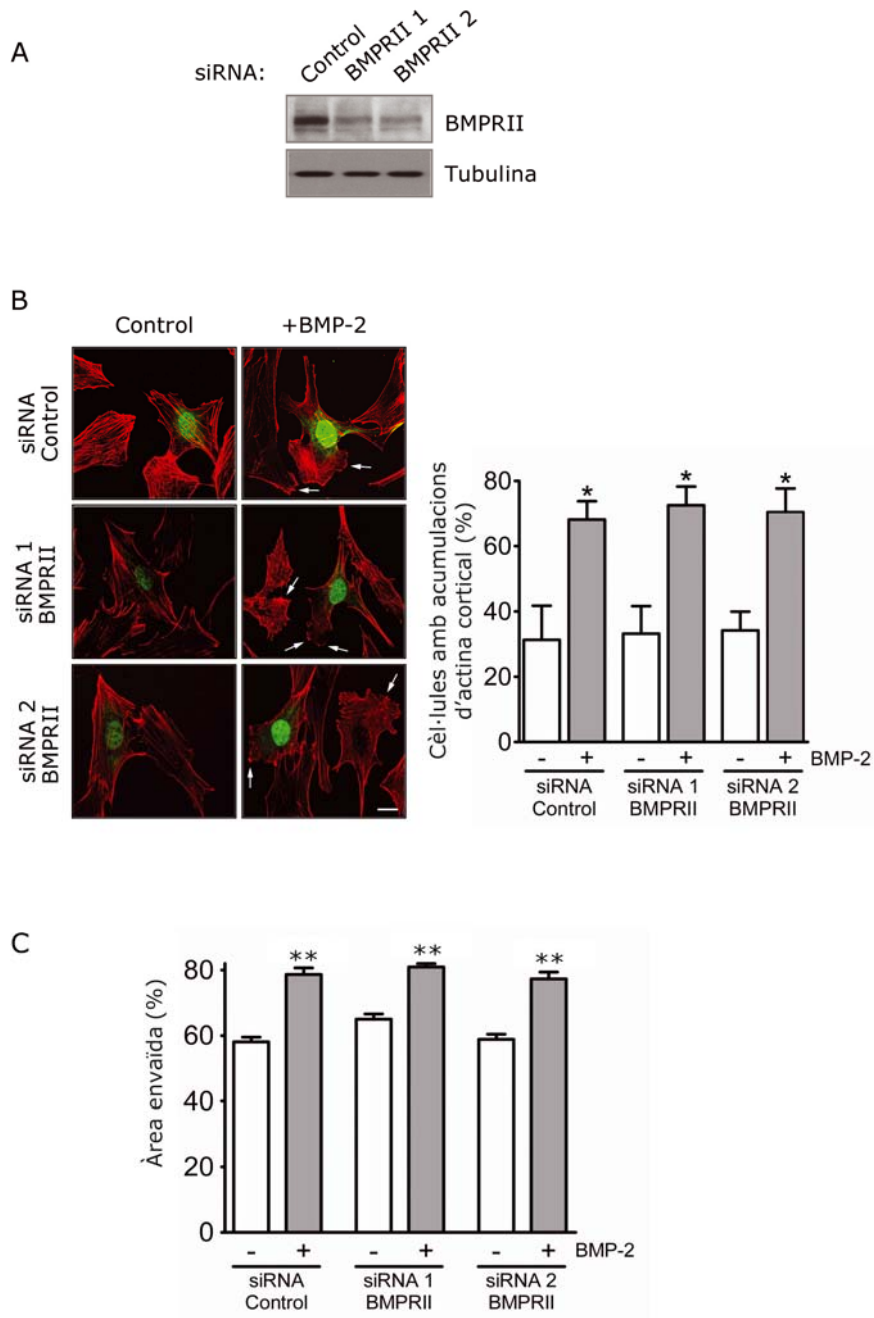
**Figura R20. BMP-7 indueix la migració de les cèl·lules C2C12.** (A) Assaig de migració quimiotàctica. Cèl·lules C2C12 depleccionades de FBS 16 h es van sembrar al compartiment superior dels *transwells*, la membrana dels quals havia estat prèviament gelatinitzada. Es van deixar adherir les cèl·lules 2 h, es va afegir el medi DMEM-1%BSA amb o sense 30 pM BMP-7 al compartiment inferior i es van deixar migrar les cèl·lules 2 h. Es van retirar les cèl·lules que no havien migrat i es van fixar i tenyir amb iodur de propidi les cèl·lules que havien migrat a través de la membrana. Es mostra l'anàlisi quantitatiu de la migració en vuit camps triats a l'atzar en tres experiments independents. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES

(\* $p < 0.0001$ , test t de Student). (B) Assaig de ferida. Cèl·lules C2C12 on s'havia realitzat la ferida es van deixar migrar en presència o absència de 3 nM BMP-7 o 3 nM BMP-2 durant 24 h. L'histograma mostra l'anàlisi quantitatiu de l'àrea envaïda. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de tres experiments independents (\* $p < 0.001$  comparat amb la situació control, test t de Student).

Per altra banda, la rellevància funcional de la cua citoplasmàtica de BMPRII en els efectes de BMP-2 sobre la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular es va analitzar eliminant l'expressió de BMPRII en cèl·lules C2C12 mitjançant siRNAs. En treballs previs s'havia descrit que en les cèl·lules deficientes per BMPRII, BMP-2 pot senyalitzar a través de la unió a ActRIIA juntament amb un conjunt de receptors de tipus I diferents d'aquells utilitzats per BMPRII (Yu et al., 2005). Es van dissenyar dos seqüències de siRNAs contra la regió codificant de BMPRII de ratolí. La seqüència de cada oligonucleòtid es detalla a la secció de Materials i Mètodes. Per a confirmar la funcionalitat i especificitat de les seqüències dissenyades, es va transfectar cèl·lules C2C12 amb els siRNAs i es va analitzar per *western blot* la capacitat de silenciament de cada un d'ells. Tal i com es mostra a la Figura R21 A, els nivells de proteïna BMPRII disminuïen en transfectar les dues seqüències nucleotídiques, donant lloc a un silenciament d'aproximadament el 70%. Cap de les dues seqüències emprades semblava induir toxicitat, tal i com evidenciaven els nivells estables del normalitzador endogen tubulina. Una vegada comprovada l'efectivitat dels siRNAs, es va analitzar l'efecte que tenia el silenciament de BMPRII en els efectes de BMP-2 sobre la mobilització del citoesquelet d'actina. Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb les dues seqüències de siRNAs i després de desestructurar el citoesquelet d'actina amb citoD, tal i com hem descrit anteriorment, les cèl·lules es van deixar recuperar en presència de BMP-2 (Figura R21 B). L'anàlisi quantitatiu de les imatges preses mostren que BMP-2 induïa la formació de protrusions d'actina en aquelles cèl·lules que havien internalitzat el siRNA de la mateixa manera que en la condició en que s'utilitzava una seqüència siRNA control. Aquest resultat es va corroborar posteriorment amb l'assaig de ferida, aproximació on tampoc s'observaven diferències en la capacitat de BMP-2 d'induir la migració de cèl·lules on els nivells de BMPRII s'havien reduït considerablement (Figura R21 C). Aquest conjunt de dades suggereixen que la llarga cua citoplasmàtica de BMPRII no és absolutament necessària perquè BMP-2 exerceixi els efectes descrits en relació a la dinàmica dels filaments d'actina i la migració cel·lular; no obstant, aquests resultats no exclouen la possibilitat que la regió citoplasmàtica de BMPRII estigui participant d'alguna manera en la via de senyalització implicada en la regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina en resposta a BMPs.

**Figura R21. BMPRII no és imprescindible en la regulació de la migració cel·lular per part de BMP-2.** (A) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb els siRNAs dissenyats contra BMPRII (siRNA control correspon a *scrambled* siRNA) i 48 h després es van preparar lisats cel·lulars i es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-BMPRII. La membrana es va incubar posteriorment amb anticòs anti-tubulina per normalitzar el contingut proteic dels extractes. (B) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb els siRNAs indicats juntament amb GFP i 48 h després es van depleccionar de FBS, es van tractar amb citoD i es van deixar recuperar 1 h en absència o presència de BMP-2. Els filaments d'actina van ser visualitzat amb fal·loïdina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. Es mostren imatges combinades de la fal·loïdina (vermell) i la senyal GFP (verd). Les fletxes senyalen protrusions d'actina. La barra correspon a 20  $\mu$ m. L'anàlisi quantitatiu representa el percentatge de cèl·lules transfectades que presentaven protrusions d'actina en les diferents condicions. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de mínim 80 cèl·lules obtingudes tres experiments independents (\* $p < 0.05$  comparat amb la condició en absència de BMP-2, test t de Student). (C) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb els siRNAs indicats juntament amb GFP i 48 h després es van depleccionar les cèl·lules de FBS. Es va fer les ferides a les monocapes de cèl·lules confluents i es van deixar recuperar en presència o absència de BMP-2 24 h. Es mostra l'anàlisi quantitatiu de l'àrea envaïda i els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de tres experiments independents (\* $p < 0.001$  comparat amb la corresponent condició en absència de BMP-2, One-way ANOVA i Bonferroni's multiple comparison test).



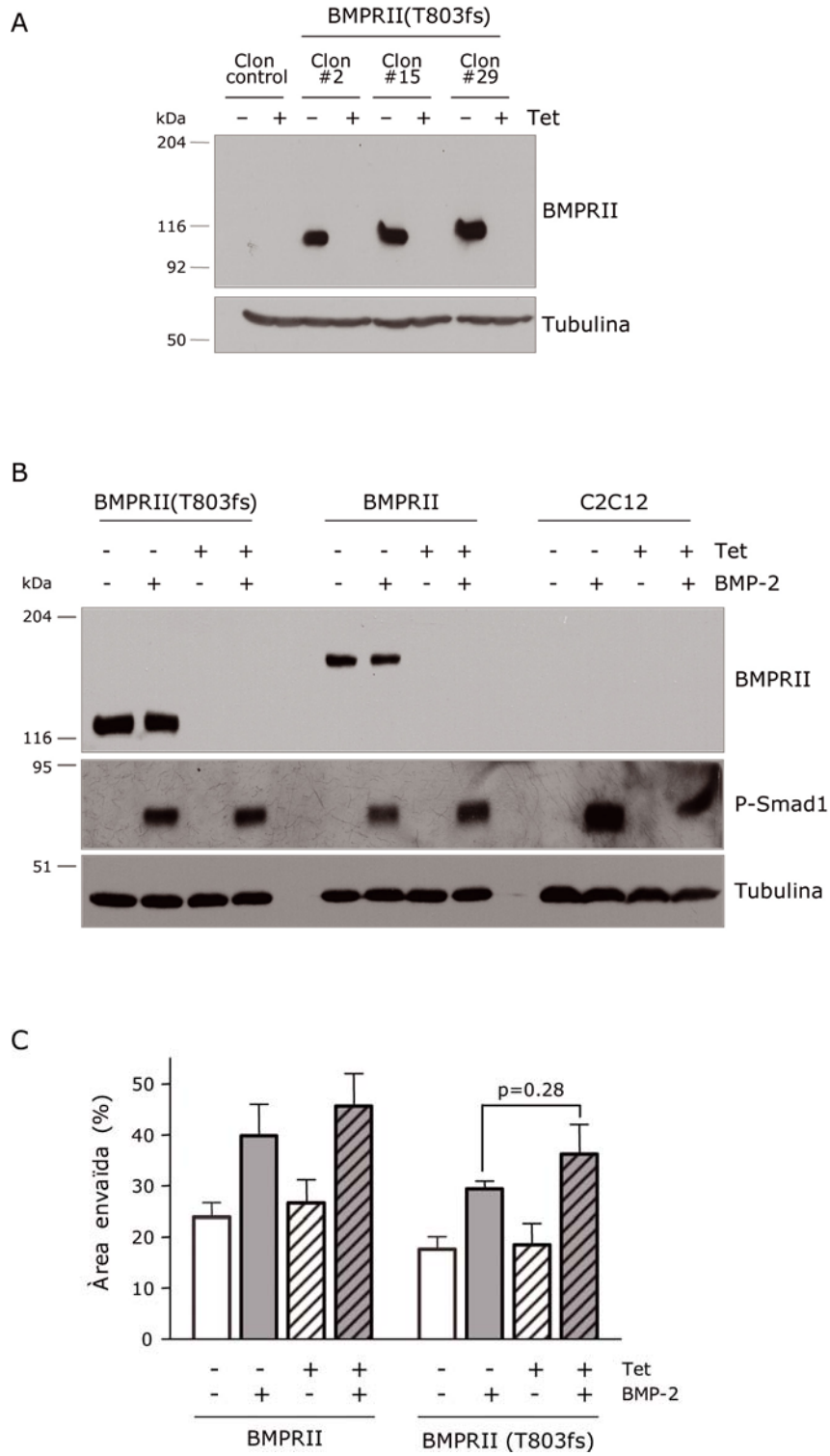


Fins al moment s'han presentat diverses evidències experimentals que mostren que en absència de BMPRII, BMP-2 és capaç de regular la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració, presumiblement unint-se a altres receptors tipus II de la família de TGF $\beta$  que no tenen la regió citoplasmàtica *downstream* del domini quinasa. En la mateixa línia, també hem descrit que BMP-7, que s'uneix amb més afinitat a ActRIIA que a BMPRII, és capaç d'induir la migració cel·lular de la mateixa manera que BMP-2. Aquests resultats apunten a que en absència de BMPRII, les BMPs poden activar rutes de senyalització implicades en la regulació de la migració cel·lular. Els resultats obtinguts fins al moment doncs no expliquen perquè mutacions puntuals a la seqüència de BMPRII a la zona que codifica per la cua citoplasmàtica que codifiquen per una forma truncada de la proteïna estan associades a la PPH (Machado et al., 2001). En aquesta línia, ens plantejarem mimetitzar dites mutacions i analitzar si la presència d'una forma truncada de BMPRII donava lloc a un canvi a nivell de la regulació per part de BMP-2 de la migració cel·lular. Així, es va estudiar l'efecte d'una mutació de BMPRII que mimetitzava una de les mutacions més freqüents en la cua C-terminal de BMPRII associada a la PPH. Altres grups han descrit que la regió mínima necessària de BMPRII per a la interacció amb LIMK1 és la que inclou de l'aminoàcid 751 al 813 (Lee-Hoeflich et al., 2004), de tal manera que es va utilitzar la construcció BMPRII(T803fs), que codifica per un canvi de pauta de lectura que dona lloc a una proteïna amb la zona d'interacció amb LIMK1 descrita truncada.

Per a caracteritzar l'efecte de la mutació T803fs en BMPRII es van generar clons que expressaven de manera estable BMPRII(T803fs)-His sota el control d'un promotor que respon a tetraciclina. Dels tres clons positius que es van obtenir es va utilitzar el clon #15 en els experiments posteriors (Figura R22 A). Es va comprovar que els clons conservaven la capacitat de senyalització en resposta a BMP-2, ja que en presència de BMP-2 i en absència de tetraciclina s'observava uns nivells de fosforilació d'Smad1 molt semblants als obtinguts en les cèl·lules C2C12 natives (Figura R22 B). L'absència de senyal corresponent al BMPRII endogen tant en les cèl·lules C2C12 natives com en els clons generats era esperable, doncs els nivells de BMPRII endogen són molt baixos en comparació amb els de BMPRII sobreexpressat. Per tal d'analitzar si la sobreexpressió de la forma truncada de BMPRII alterava la migració cel·lular induïda per BMP-2, es va realitzar l'assaig de ferida amb el clon cel·lular que sobreexpressava la forma salvatge de BMPRII en paral·lel amb el clon que sobreexpressava la forma mutada de BMPRII. El resultat mostra que la sobreexpressió de BMPRII(T803fs) no afectava significativament la capacitat de BMP-2 d'induir la migració cel·lular, tant si es comparava amb la condició en que

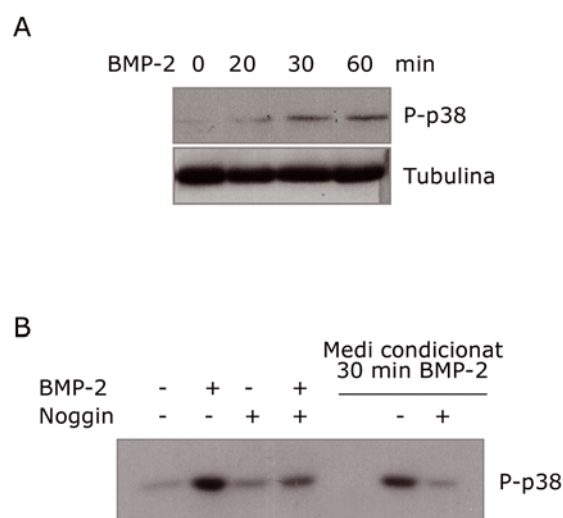
s'apagava amb tetraciclina la sobreexpressió de la forma mutada com quan es comparava amb els resultats obtinguts amb el clon que expressava la forma salvatge de BMPRII (Figura R22 C). Aquest resultat suggereix que la integritat de la cua citoplasmàtica de BMPRII no és imprescindible en la regulació per part de BMP-2 de la migració cel·lular ja que una forma truncada del receptor no actuava com a dominant negatiu bloquejant la migració.

**Figura R22. La integritat de la cua citoplasmàtica de BMPRII no és imprescindible en la migració induïda per BMP-2.** (A) El clon de C2C12 que expressava BMPRII amb la cua citoplasmàtica truncada (BMPRII(T803fs)) es va generar tal i com s'explica a l'apartat de Materials i Mètodes. Per comprovar els clons obtinguts, es van tractar les cèl·lules amb 100 ng/ml tetraciclina (+) durant 24 h i els lisats cel·lulars totals es van analitzar amb l'anticòs anti-BMPRII i anti-tubulina. El clon control (ClonCto) correspon a clon de cèl·lules que no expressava BMPRII(T803fs). Tots els clons que es mostren van resultar ser positius i regulats per tetraciclina. El clon #15 va ser escollit per a realitzar la resta d'experiments. (B) El clon de C2C12 que expressava BMPRII natiu (BMPRII), el clon BMPRII amb la cua citoplasmàtica truncada (BMPRII(T803fs)) i cèl·lules C2C12 salvatges es van tractar amb 100 ng/ml tetraciclina durant 24 h, es van depleccionar de FBS 16 h i es van estimular amb BMP-2 30 min. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb els anticossos indicats. (C) El clon de C2C12 que expressava BMPRII natiu (BMPRII) i el clon BMPRII amb la cua citoplasmàtica truncada (BMPRII(T803fs)) es van tractar amb 100 ng/ml tetraciclina durant 24 h i es van depleccionar de FBS 16 h. Es van fer les ferides a les monocapes de cèl·lules confluents i es van deixar recuperar en presència o absència de BMP-2 i de tetraciclina durant 24 h. L'anàlisi quantitatiu mostra el percentatge d'àrea envaïda i es va obtenir de mínim tres camps fotogràfiats obtinguts en tres experiments independents. Els valors representen la mitja  $\pm$  ES ( $p=0.28$ , One-way ANOVA i Bonferroni's multiple comparison test).



## **8. La via de senyalització de p38MAPK està implicada en els efectes de BMP-2 en la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular**

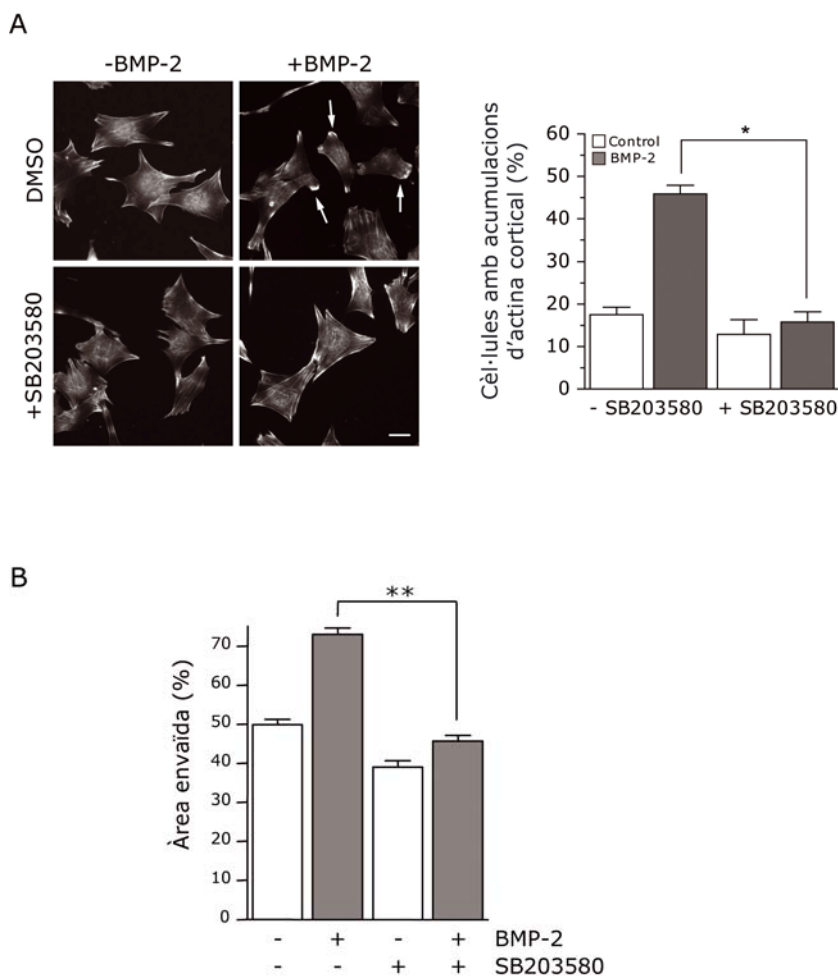
De les vies de senyalització activades en resposta als membres de la superfamília de TGF $\beta$  Smads-independents, la ruta més ben caracteritzada és la de p38MAPK (Derynck and Zhang, 2003), no obstant el mecanisme d'activació d'aquesta ruta de senyalització per part de les BMPs és encara força desconegut (Kimura et al., 2000; Nakamura et al., 1999; Nohe et al., 2002; Yamashita et al., 2008). Per tal d'aprofundir en l'estudi de la regulació de processos que impliquen la mobilització dels citoesquelet d'actina en resposta a BMP-2 es va analitzar la participació de la via de senyalització de p38. En primer lloc es va caracteritzar l'activació de p38 en resposta a BMP-2. L'estimulació de cèl·lules C2C12 amb BMP-2 induïa la fosforilació de p38 en Thr180/Tyr182 (Figura R23 A), tal i com ja havia estat descrit anteriorment per altres grups (Gallea et al., 2001; Vinals et al., 2002). La proteïna p38 és una quinasa que s'activa per estimulació amb factors de creixement i citoquines proinflamàtòries però també en resposta a una gran varietat de situacions que indueixen estrès cel·lular com el xoc osmòtic i la llum UV (Freshney et al., 1994; Han et al., 1994; Lee et al., 1994; Rouse et al., 1994). Tenint en compte això, i per confirmar que l'activació de p38 per part de BMP-2 observada era una resposta directe i específica de BMP-2, i no producte d'haver provocat una situació d'estrès cel·lular o una resposta indirecte d'algun factor secretat per l'estimulació amb BMP-2, es va realitzar un assaig amb medi condicionat. L'assaig va consistir en estimular cèl·lules amb BMP-2 i després de 30 min prendre el sobrenedant que contenia el BMP-2 que no havia estat internalitzat i tots aquells factors que les cèl·lules haguessin pogut secretar al medi en resposta a l'estimulació amb BMP-2. Es va retirar aquest sobrenedant, al qual se li va donar el nom de medi condicionat, i se li va addicionar Noggin, un antagonista de BMPs que evita que aquestes interaccionin amb els seus receptors de membrana. Finalment el medi condicionat en el que havíem antagonitzat el BMP-2 amb Noggin s'utilitzà per estimular una nova placa de cèl·lules. Tal i com es mostra a la Figura R23 B, en cèl·lules estimulades amb el medi condicionat amb BMP-2 al que havíem afegit Noggin no es detectava fosforilació de p38, fet que verificava que l'activació de p38 per part de BMP-2 era directa i específica.



**Figura R23. BMP-2 indueix la fosforilació de p38 de manera específica.** (A) Cèl·lules C2C12 es van estimular amb BMP-2 els temps indicats i els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-p38-P(Thr180/Tyr182) i posteriorment es van reincubar les membranes amb anti-tubulina. (B) Cèl·lules C2C12 depleccionades de FBS 16 h es van estimular amb BMP-2 30 min. Es va recollir el medi i se li va afegir 0.6  $\mu\text{g/ml}$  Noggin, es va incubar 5 min i es va utilitzar aquests medi (Medi condicionat) per a estimular cèl·lules prèviament depleccionades de FBS 16 h. Després de 45 min d'estimulació amb el medi condicionat es van preparar lisat cel·lulars i es van analitzar amb l'anticòs anti-p38-P(Thr180/Tyr182).

L'activació de p38 en resposta a membres de la superfamília de TGF $\beta$  ha estat implicada en diversos processos biològics que impliquen la mobilització del citoesquelet d'actina com, per exemple, la migració de cèl·lules de múscul llis en resposta a TGF $\beta$  (Hedges et al., 1999), la diferenciació neuronal de cèl·lules PC12 estimulades amb BMP-2 (Iwasaki et al., 1999), la transdiferenciació epitelio-mesenquimal induïda per TGF $\beta$  (Bakin et al., 2002; Bhowmick et al., 2001b), la diferenciació dels cardiomiòcits estimulats amb BMP (Monzen et al., 1999) i la morfogènesis de cèl·lules epitelials dependent de BMP-7 (Hu et al., 2004). Per avaluar la participació de p38 en els efectes de BMP-2 sobre la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular es va analitzar l'efecte de SB203580, un inhibidor específic de l'activitat de p38 que competeix amb l'ATP pel mateix lloc d'unió a p38. Com es mostra a la Figura R24 A, en presència de SB203580, l'estimulació amb BMP-2 no anava acompanyada d'un increment en la formació de protrusions d'actina; fet que suggereix que l'activitat de p38 és indispensable perquè BMP-2 dugui a terme la mobilització del filaments d'actina. Tenint en compte aquests resultat, es va analitzar si la migració cel·lular induïda per BMP-2 també era dependent

de p38. Es va realitzar l'assaig de ferida i es va observar que, així com BMP-2 induïa una acceleració en el tancament de la ferida, quan es preincubava les cèl·lules amb SB203580 s'abolia dit increment de la migració cel·lular (Figura R24 B).

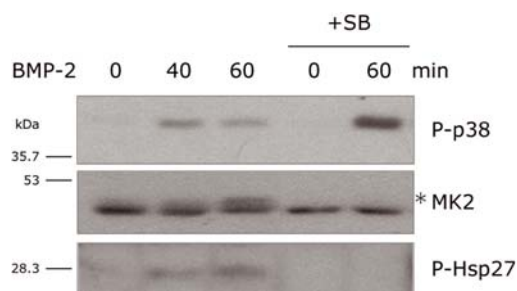


**Figura R24. L'activitat p38 està implicada en els efectes de BMP-2 sobre la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.** (A) Cèl·lules C2C12 es van tractar amb citoD juntament amb DMSO o amb 10  $\mu$ M SB203580 durant 30 min h i després d'eliminar la citoD es van estimular les cèl·lules amb BMP-2 i DMSO o 10  $\mu$ M SB203580 durant 1 h. Els filaments d'actina van ser visualitzats amb fal·loïdina conjugada a TRITC utilitzant el microscopi de fluorescència. Les fletxes senyalen cèl·lules amb protrusions d'actina. La barra correspon a 20  $\mu$ m. També es mostra l'anàlisi quantitatiu del percentatge de cèl·lules que presentaven protrusions d'actina. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES de tres experiments independents (\* $p$ <0.05, test t de Student). (B) Cèl·lules C2C12 depleccionades de FBS es van tractar amb DMSO (-) o 10  $\mu$ M SB203580 2 h (+), es van fer les ferides a les monocapes confluents i es van deixar recuperar en presència o absència 10  $\mu$ M SB203580 i de BMP-2 24 h. L'anàlisi quantitatiu mostra el percentatge d'àrea envaïda i es va obtenir de mínim tres camps fotogràfiats obtinguts en tres



experiments independents. Els valors representen la mitja  $\pm$  ES (\* $p < 0.001$ , One-way ANOVA i Bonferroni's multiple comparison test).

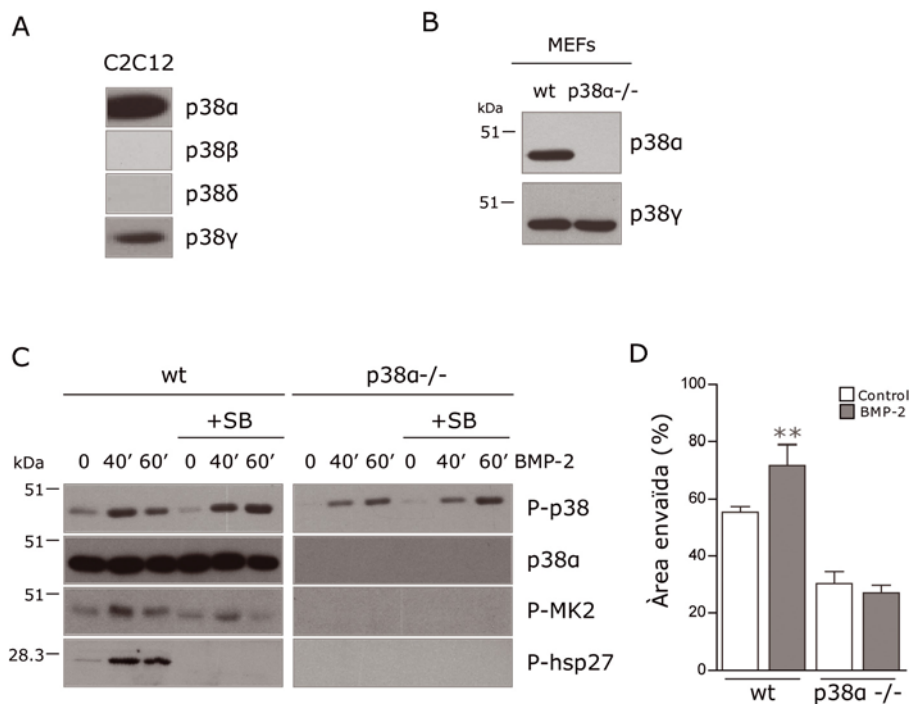
Posteriorment es va estudiar quins altres components de la via de senyalització de p38 estaven involucrats en la regulació de la migració cel·lular en resposta a BMP-2. MK2 i hsp27 han estat descrits com les dianes *downstream* de p38 involucrades en processos que impliquen la mobilització del citoesquelet d'actina (Guay et al., 1997; Landry and Huot, 1999; Rousseau et al., 1997). Hsp27 es comporta com una proteïna *cap-binding* dels filaments d'actina i, en la seva forma no fosforilada, inhibeix la polimerització d'actina. La fosforilació de hsp27, per part de MK2, permet l'alliberació d'aquesta de l'extrem (+) dels filaments d'actina, donant lloc a l'estimulació de la polimerització dels filaments d'actina (Landry and Huot, 1999). D'aquesta manera, s'ha descrit que la fosforilació de hsp27 en resposta a l'activació de p38/MK2 regula la dinàmica del citoesquelet d'actina en resposta a diversos factors de creixement (During et al., 2007; Hedges et al., 1999; Huot et al., 1998; Lavoie et al., 1993; Pichon et al., 2004; Rousseau et al., 2000). En cèl·lules C2C12 es va observar que l'estimulació amb BMP-2 induïa la fosforilació tant de MK2 com de hsp27, i que aquestes fosforilacions eren sensibles a SB203580 (Figura R25). En presència de SB203580 i de BMP-2 es van observar uns nivells de fosforilació de p38 més elevats que quan s'estimulaven les cèl·lules únicament amb BMP-2, fet que no és sorprenent doncs s'ha descrit que la inhibició de l'activitat p38 per part de SB203580 inhibeix també la fosfatasa encarregada de defosforilar p38 a nivell traduccional (Hu et al., 2007). Els resultats mostraven que l'activació de MK2 i hsp27 era sensible a l'inhibidor SB203580, de la mateixa manera que ho era la reorganització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular, fet que suggereix que p38 podria estar regulant dits efectes a través de l'activació de MK2 i hsp27.



**Figura R25. BMP-2 induïx la fosforilació de MK2 i hsp27.** Cèl·lules C2C12 es van incubar amb DMSO o amb 5  $\mu$ M SB203580 30 min i es van estimular amb BMP-2 els temps indicats en presència o absència de 5  $\mu$ M SB203580. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-p38-P(Thr180/Tyr182), anti-MK2 (l'asterisc senyala la banda amb una mobilitat relativa més retrassada que correspon a la forma fosforilada de MK2) i hsp27-P(Ser86).

Fins al moment s'han clonat 4 gens que codifiquen per p38MAPK: p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  i p38 $\delta$ . Encara que les diferents isoformes de p38 comparteixen especificitat per diferents substrats, alguns substrats semblen ser preferentment fosforilats per una o més isoformes (Nebreda and Porras, 2000). Tal i com es mostra a la Figura R26 A, en les cèl·lules C2C12 es va detectar per *western blot* que la isoforma més abundant era p38 $\alpha$  i en menys quantitat també es detectava l'expressió de p38 $\gamma$ . Amb els anticossos dissenyats contra p38 $\beta$  i p38 $\delta$  utilitzats no es va obtenir senyal. Aquestes observacions concorden amb els resultats obtinguts per altres investigadors en la mateixa línia cel·lular (Perdigueró et al., 2007). Aquest resultat, juntament amb el fet que MK2 s'ha descrit que és un substrat específic de p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  (Goedert et al., 1997) i que SB203580 inhibeix únicament l'activació de p38 $\alpha$  i p38 $\beta$  (Cuenda et al., 1995), permet deduir que els efectes que s'havien descrit en resposta a BMP-2 i sensibles a SB203580, eren regulats per p38 $\alpha$ .

La contribució específica de p38 $\alpha$  en la reorganització el citoesquelet d'actina i la migració cel·lular dependent de BMP-2 es va analitzar utilitzant la línia de fibroblasts embrionaris de ratolí (MEF) deficientes en p38 $\alpha$  (p38 $\alpha$  -/-). Una vegada es va haver verificat l'absència de la isoforma p38 $\alpha$  en les MEFs (Figura R26 B), es va analitzar l'estat de la via de senyalització de p38 en resposta a BMP-2 en aquestes cèl·lules. En les MEFs salvatges, l'estimulació amb BMP-2 induïa l'activació de MK2 i hsp27 a un temps molt similar a l'observat en les C2C12 (Figura R26 C), no obstant en les MEFs p38 $\alpha$  -/- no es va observar fosforilació de MK2 o hsp27, fet que no sorprenia doncs s'ha descrit que són substrats específics de fosforilació de la isoforma p38 $\alpha$ . L'anàlisi dels nivells de fosforilació de p38 en mostres de MEFs p38 $\alpha$  -/- mostrava una banda sensible a l'estimulació a BMP-2 que probablement correspon a la isoforma p38 $\gamma$  fosforilada ja que les cèl·lules MEFs expressen quantitats semblants de p38 $\alpha$  i p38 $\gamma$ . Si es compara la mobilitat de la banda corresponent a la forma fosforilada de p38 de les MEFs p38 $\alpha$  -/- i de les MEFs salvatges, es veu com en les MEFs p38 $\alpha$  -/- la banda està una mica retardada, fet que resulta coherent amb el fet que p38 $\gamma$  (46 kDa) té un pes molecular una mica més elevat en comparació amb p38 $\alpha$  (43 kDa).



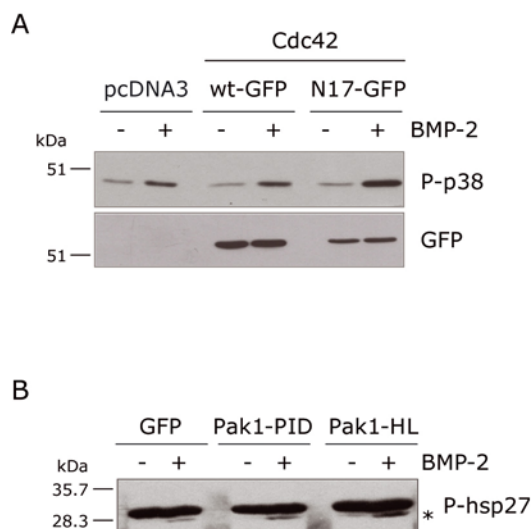
**Figura R26. p38α participa en el control de la migració induïda per BMP-2.**

(A) Es van obtenir lisats de cèl·lules C2C12 i es van analitzar per *western blot* amb anticossos contra les diferents isoformes de p38. (B) Quantitats equivalents de lisats cel·lulars de fibroblasts embrionaris de ratolí salvatges (MEFs wt) i deficients en p38α (MEFs p38α<sup>-/-</sup>) es van analitzar amb els anticossos indicats. (C) Cèl·lules MEFs salvatges (MEFs wt) i MEFs deficients en p38α (MEFs p38α<sup>-/-</sup>) es van depleccionar de FBS 16 h, es van incubar amb DMSO o amb 5 μM SB203580 30 min i es van estimular amb BMP-2 els temps indicats en presència o absència de 5 μM SB203580. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb els anticossos indicats. (D) Cèl·lules MEFs salvatges (MEFs wt) i MEFs deficients en p38α (MEFs p38α<sup>-/-</sup>) es van depleccionar de FBS 16 h i després de fer les ferides es van deixar migrar 24 h en presència o absència de BMP-2. Es mostra l'anàlisi quantitatiu del percentatge d'àrea envaïda obtingut en tres experiments independents. Els valors representen la mitja ± ES (\*p<0.001 comparat amb la corresponent condició en absència de BMP-2, One-way ANOVA i Bonferroni's multiple comparison test).

Segons els resultats obtinguts amb el tractament amb SB203580 de les cèl·lules C2C12, la inhibició de p38 anul·lava completament la migració induïda per BMP-2. En tant en que en les cèl·lules C2C12 només havíem pogut detectar l'expressió de les isoformes p38α i p38γ, i p38γ no s'ha descrit que tingui com a substrat específic MK2 ni que sigui sensible als efectes inhibitoris de SB203580, sembla probable que p38α sigui la isoforma de p38 que regula els efectes de BMP-2 sobre la migració cel·lular. Per verificar la participació de la isoforma p38α, es va analitzar la migració en resposta a BMP-2 de les cèl·lules MEFs p38α<sup>-/-</sup> mitjançant l'assaig de ferida. Tal i com es mostra a la Figura R26 D, les MEF que no

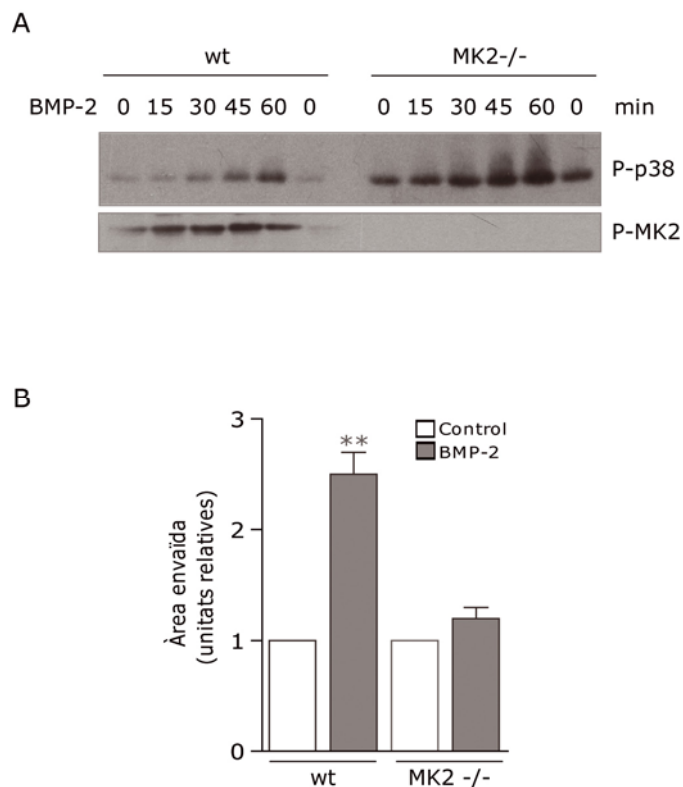
expressen p38 $\alpha$  presentaven una migració basal reduïda en comparació amb les MEFs salvatges, fet que ja havia estat descrit per altres autors (Rousseau et al., 2006). A més a més, la migració de les MEFs p38 $\alpha$ <sup>-/-</sup> en resposta a BMP-2 també es veia molt reduïda en comparació amb la línia cel·lular salvatge. El conjunt d'aquests darrers resultats apuntaven a que es tracte concretament p38 $\alpha$  qui jugava un paper clau en els mecanismes de senyalització de transducció de senyals regulats per BMP-2 en el control de la migració cel·lular.

Tenint en compte els resultats mostrats anteriorment en relació a la regulació de la migració cel·lular per part de BMP-2 a través de la via de senyalització PI3K/Cdc42-Pak-LIMK1, vam analitzar si algun dels components d'aquesta ruta estava regulant l'activació de la via de senyalització de p38. Els resultats obtinguts suggereixen que l'activació de p38 per part de BMP-2 és independent de la ruta PI3K/Cdc42-Pak-LIMK1: i) la sobreexpressió d'un mutant dominant negatiu de Cdc42 no alterava la capacitat de BMP-2 de fosforilar p38 (Figura R27 A); ii) la sobreexpressió d'una forma constitutivament activa de Pak1 o una forma que actua com a dominant negatiu no afectava l'activació de p38 en resposta a BMP-2 (Figura R27 B). No hem demostrat que PI3K no estigui involucrada en l'activació d'algun dels components de la via de p38 ja que aquesta opció és poc probable doncs no s'ha trobat en la literatura cap publicació que descrigui que algun factor de creixement o citoquina reguli la migració a partir de p38, i que l'activitat de p38 estigui modulada per PI3K.



**Figura R27. L'activació de la via de senyalització de p38 per part de BMP-2 és independent de l'activitat de Cdc42 i Pak1.** (A) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb plasmidis que codifiquen per un plasmidi control (pcDNA3), GFP-Cdc42 natiu (wt-GFP) i GFP-Cdc42 dominant negatiu N17 (N17-GFP) i es van estimular amb BMP-2 1h. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-p38-P(Thr180/Tyr182) i anti-GFP. (B) Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb plasmidis que codifiquen per GFP, Pak1 constitutivament actiu H83,86L amb el epítip myc (Pak1-HL myc) o el domini inhibidor de Pak1 PID(aa83-149) amb el epítip myc (Pak1-PID myc) i es van estimular amb BMP-2 40 min. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-hsp27-P(Ser86).

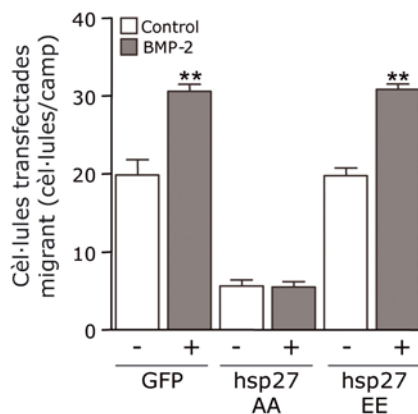
Els resultats descrits fins al moment mostren que p38 regula la migració cel·lular en resposta a BMP-2 i suggereixen que ho fa de manera independent a la via de senyalització PI3K/Cdc42-Pak-LIMK1. Tenint en compte que en resposta a BMP-2 s'havia observat l'activació de MK2 i hsp27, es va analitzar si p38 regulava la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular a través de l'activació de MK2 i hsp27. Per a dur a terme aquest objectiu es va avaluar la resposta de la línia MEF deficient en MK2 a l'estimulació amb BMP-2. L'anàlisi per *western blot* de les cèl·lules mostrava una absència total de MK2 en les MEFs MK2<sup>-/-</sup>, tal i com era esperable, i uns nivells de P-p38 elevats en comparació amb la línia de MEFs salvatge coherents amb els resultats publicats que indiquen que la fosfatasa encarregada de defosforilar p38 és regulada per la pròpia ruta de p38, per sota del nivell de MK2 (Hu et al., 2007) (Figura R28 A). Tal i com es mostra a la quantificació de l'assaig de ferida realitzat amb les MEFs MK2<sup>-/-</sup> (Figura R28 B), i en coherència amb els resultats obtinguts amb les MEFs p38<sup>α</sup><sup>-/-</sup>, en presència de BMP-2 no s'observava una acceleració en el tancament de la ferida en els experiments realitzats amb la línia deficient en MK2 en comparació amb la línia salvatge. Aquest resultat suggereix que l'activació de MK2 resulta crítica en la via de transducció de senyals implicada en la regulació per part de BMP-2 de la migració cel·lular.



**Figura R28. MK2 participa en la migració induïda per BMP-2.** (A) Cèl·lules MEFs salvatges (MEFs wt) i MEFs deficients en MK2 (MEFs MK2<sup>-/-</sup>) es van estimular amb BMP-2 els temps indicats. Els lisats cel·lulars es van analitzar per *western blot* amb anticòs anti-p38-P(Thr180/Tyr182) i anti-MK2-P(Thr334). (B) Cèl·lules MEFs salvatges (MEFs wt) i MEFs deficients en MK2 (MEFs MK2<sup>-/-</sup>) es van depleccionar de FBS 16 h i després de fer les ferides es van deixar migrar 24 h en presència o absència de BMP-2. Es mostra l'anàlisi quantitatiu del percentatge d'àrea envaïda obtinguts en tres experiments independents. Els valors representen la mitja  $\pm$  ES (\* $p < 0.001$  comparat amb la corresponent condició en absència de BMP-2, One-way ANOVA i Bonferroni's multiple comparison test).

Per a comprovar que BMP-2 estava regulant directament la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular a partir del control de la proteïna hsp27, es van transfectar cèl·lules C2C12 amb un plasmidi que codifica per una forma de hsp27 que actua com a dominant negatiu i les vam sotmetre a l'assaig de ferida. Tal i com es mostra a la figura R29, la velocitat de migració de les cèl·lules que expressen la forma dominant negativa de hsp27 es veu reduïda en comparació amb les cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Les cèl·lules que havien estat transfectades amb una forma constitutivament activa de hsp27 mostraven una eficiència de migració basal i en resposta a BMP-2 molt semblant a cèl·lules transfectades amb un plasmidi control. Aquest últim

resultat suggereix que la via de senyalització de p38 té un caràcter permissiu en la migració cel·lular en resposta a BMP-2. Aquests resultats són coherents amb els obtinguts per altres autors en cèl·lules de múscul llis en resposta a PDGF (Pichon et al., 2004) i en neutròfils incubats amb certes toxines (During et al., 2007), fet que fa pensar que la participació de hsp27 *downstream* de p38 en la regulació de la migració cel·lular a través del control de la dinàmica del citoesquelet d'actina és un mecanisme general.



**Figura R29. Hsp27 participa en la regulació per part de BMP-2 de la dinàmica del citoesquelet d'actina.** Cèl·lules C2C12 es van transfectar amb el plasmidi que codifica per GFP o amb el que codifica per la forma de hsp27 no fosforilable (hsp27-AA) o constitutivament activa (hsp27-EE) juntament amb GFP i 24 h després es van depleccionades les cèl·lules amb DMEM-0.1% FBS. Es van fer les ferides a les monocapes de cèl·lules confluents i es van deixar recuperar en presència o absència de BMP-2 12 h. Es mostra l'anàlisi quantitatiu de les cèl·lules transfectades que havien migrat en vuit camps triats a l'atzar en tres experiments independents. Els valors corresponen a la mitja  $\pm$  ES (\* $p < 0.001$  comparat amb la corresponent condició en absència de BMP-2, One-way ANOVA i Bonferroni's multiple comparison test).





# DISCUSSIÓ

En el present estudi es descriuen els efectes de BMP-2 en la dinàmica del citoesquelet d'actina i la seva participació en la polarització i la migració quimiotàctica en cèl·lules C2C12. Els resultats obtinguts demostren que BMP-2 regula aquests efectes a través de l'activació de vies de senyalització que involucren Cdc42, PI3K i p38MAPK, i que regulen proteïnes que tenen un impacte directe sobre la polimerització d'actina (Figura D4). En conjunt, les dades presentades suggereixen noves vies de senyalització activades en resposta BMP-2 que relacionen els receptors de membrana amb la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.

## **1. Impacte de BMP-2 en la dinàmica dels filaments d'actina i la migració cel·lular quimiotàctica**

Gradients de concentració de les BMPs són responsables de la migració de cèl·lules durant la morfogènesi embrionària i la progressió tumoral. Estudis previs demostren que les BMPs regulen la migració de cèl·lules malignes (Langenfeld et al., 2003; Rothhammer et al., 2005), així com la quimiotaxis de cèl·lules del llinatge osteoblàstic (Lind et al., 1996; Sotobori et al., 2006), progenitors mesenquimals (Fiedler et al., 2002) i cèl·lules endotelials (de Jesus Perez et al., 2009). Malgrat els nombrosos treballs encaminats a descriure com les BMPs regulen la migració cel·lular tant durant l'embriogènesi embrionària com en processos tumorals, fins al moment no es coneixien els mecanismes moleculars implicats en aquest procés. Els resultats presentats en aquest treball demostren que BMP-2 indueix la migració cel·lular quimiotàctica en cèl·lules C2C12. Les evidències experimentals que ens permeten arribar a aquesta conclusió

són: i) l'anàlisi de la migració cel·lular mitjançant l'assaig de ferida indica que en presència de BMP-2 la ferida és repoblada més eficientment i que aquest efecte és independent de la síntesis proteica *de novo* i de la proliferació cel·lular (Figura R1); ii) els resultats obtinguts en l'aproximació experimental basada en l'ús de la Càmera de Boyden mostren que la migració induïda per BMP-2 té caràcter quimiotàctic a favor de gradient de concentració (Figura R2).

Alguns autors han suggerit que les BMPs regulen la migració cel·lular a través del control de la unió de les cèl·lules a la matriu extracel·lular. No obstant, no queda clar com BMP-2 controla el procés d'adhesió cel·lular doncs existeix certa discrepància entre els treballs publicats al respecte. Alguns autors suggereixen que la senyalització induïda per les BMPs modula l'expressió d'integrines a nivell transcripcional, donant lloc a un augment d'aquestes proteïnes d'adhesió a la matriu extracel·lular (Jikko et al., 1999; Nissinen et al., 1997; Shah et al., 1999). No obstant, altres autors suggereixen que l'estimulació amb BMP-2 no implica un canvi a nivell del control transcripcional de les integrines sinó una modulació de la senyalització entre la proteïnes de la matriu extracel·lular i les integrines, i no obstant no es coneixen els mecanismes mitjançant els quals BMP-2 modula la senyalització de les integrines, s'ha proposat que les BMPs augmenten l'estabilitat de les adhesions cel·lulars principalment a través de la fosforilació de FAK, proteïna clau en la formació d'adhesions focals (Sotobori et al., 2006). Els nostres resultats mostren que, en la línia cel·lular mioblàstica C2C12, BMP-2 no induïx canvis en els processos d'adhesió ni *spreading* cel·lular (Figura R3), i coherentment amb aquests resultats, tampoc s'ha detectat que l'estimulació amb BMP-2 modifiqui els nivells de fosforilació de FAK (resultats no mostrats). Aquests resultats són consistents amb el resultat que mostren que BMP-2 induïx l'activitat de Cdc42 però no la de Rac (Figura R9), ja s'ha descrit que Rac és la principal Rho GTPasa involucrada en processos d'adhesió. En aquest context, s'ha descrit que cèl·lules MEFs en les que s'ha eliminat l'expressió de Rac1 presenten una reducció en la capacitat de *spreading* (Guo et al., 2006). És probable que les diferències entorn a la participació de BMP-2 en els processos d'adhesió i *spreading* siguin degudes a la línia cel·lular utilitzada i/o al tipus de matriu en el que s'han sembrat les cèl·lules per a realitzar l'assaig d'adhesió. En el nostre cas es va utilitzar gelatina, una matriu inerta, per realitzar els experiments d'adhesió i *spreading*; no obstant, en els treballs que suggereixen la regulació de les integrines per part de les BMPs, utilitzen substrats com la fibronectina o la laminina, components de la matriu extracel·lular que s'uneixen a les integrines de membrana i poden actuar com a transductors

de senyals intracel·lulars en la regulació de processos que involucren la mobilització dels filaments d'actina (Bitterman et al., 1983; Clark et al., 1988; Pacifici et al., 1992).

L'anàlisi dels efectes de BMP-2 sobre la dinàmica del citoesquelet d'actina suggereix que BMP-2 regula la migració a través de la regulació de la polimerització dels filaments d'actina. Aquesta conclusió es base en l'observació que BMP-2 indueix l'aparició de protrusions d'actina i la polarització cel·lular, un fenotip morfològic associat a la migració cel·lular (Figura R4 i R6). Els canvis a nivell del citoesquelet d'actina que depenen de BMP-2 es caracteritzen per ser: i) un efecte que té lloc a temps curts (Figura R4 i R6), fet que suggereix que no requereix la síntesi proteica *de novo* i que, per tant, és independent de l'activitat transcripcional; ii) un efecte transitori, doncs s'ha analitzat els canvis en la dinàmica dels filaments d'actina fins a 24 h i s'ha observat que les protrusions d'actina són evidents fins a les 2 h i després les cèl·lules recuperen el seu aspecte inicial en forma d'abundants i robustes fibres d'estrès (Figura R6 C); iii) independents de l'organització basal dels filaments d'actina (Figura R4 i R6); iv) un efecte que no involucra la via de senyalització canònica de les Smads (Figura R7).

Diverses evidències experimentals indiquen que BMP-2 regula la dinàmica del citoesquelet d'actina de manera independent a les proteïnes Smad. En primer lloc, els estudis realitzats en la línia cel·lular HCT116 delecionada per Smad4 mostren que la formació de protrusions d'actina per part de BMP-2 no es veu compromesa en absència del cofactor comú de la ruta de les Smads (Figura R7 B). Aquest resultat coincideix amb els resultats publicats per altres grups que han descrit que altres membres de la superfamília de TGF $\beta$ , com TGF $\beta$  i Activina, regulen l'organització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular de manera independent de les Smads (Edlund et al., 2002). En segon lloc, ens basem en els resultats obtinguts en relació a Smad7. La proteïna Smad7 és un regulador negatiu de la senyalització per TGF $\beta$  que s'uneix als receptors de la família de TGF $\beta$  de tal manera que evita la fosforilació de les R-Smads i situa l'ubiquitina lligasa Smurf prop del complex receptor, induint així la ubiquitinització i degradació dels receptors (Moustakas et al., 2001; Ten Dijke et al., 2002). Hem demostrat que cèl·lules que sobreexpressen Smad7 presenten una organització dels filaments d'actina basal i en resposta a BMP-2 igual que la condició transfectada amb un plasmidi control (Figura R7 B), fet que suggereix que Smad7 no està involucrat en la reorganització del citoesquelet d'actina a temps curts induïda per BMP-2 en cèl·lules C2C12. La participació de Smad7 en processos que impliquen mobilització del

citoesquelet d'actina en resposta a TGF $\beta$  ha estat discutida en diverses publicacions i no s'ha arribat a un consens en relació a la seva funció. Alguns estudis suggereixen que la Smad7 inhibidora està implicada en l'activació retardada (12-24 h) de Cdc42 per part de TGF $\beta$  en cèl·lules de carcinoma de pròstata (Edlund et al., 2004), mentre que altres grups han demostrat que en cèl·lules Swiss3T3 estimulades amb TGF $\beta$  durant 3 h, l'expressió ectòpica de Smad7 té un paper inhibitori en la reorganització del citoesquelet d'actina i l'activació de Rho (Vardouli et al., 2005). Per altra banda, altres estudis descriuen que TGF $\beta$  regula el procés de transdiferenciació epitelio-mesenquimal de manera dependent de RhoA i que aquest no es veu afectat per la sobreexpressió de Smad7 (Bhowmick et al., 2001a). Una possible explicació de perquè Smad7 pot actuar algunes vegades com a regulador positiu i altres com a regulador negatiu suggerim que pot estar relacionat amb el temporalitat del procés, modificacions post-traduccionals de Smad7, reclutament de proteïnes reguladores del receptor de tipus I encara desconegudes o simplement dependre del tipus cel·lular i del procés que involucra la mobilització del citoesquelet d'actina motiu d'estudi.

En conjunt aquests resultats mostren que BMP-2 regula la dinàmica del citoesquelet d'actina a través d'un mecanisme independent de la ruta canònica de transcripció de Smads. Aquests resultats són consistents amb els obtinguts per altres grups que han descrit la participació d'altres membres de la família de les BMPs en el control de la dinàmica del citoesquelet d'actina i, no obstant existeix certa discrepància entre els mecanismes mitjançant els quals les BMPs regulen aquest procés, dels diferents treballs es desprèn la mateixa conclusió a la que arribem nosaltres, que es tracta d'un efecte Smad-independent (Edlund et al., 2002; Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004; Ng, 2008; Wen et al., 2007; Zhang et al., 2005).

## **2. BMP-2 i els mecanismes moleculars involucrats en el control de la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.**

### **Participació de la GTPasa Cdc42 i de PI3K.**

Les proteïnes implicades clàssicament en la mobilització del citoesquelet d'actina i la polarització cel·lular són les petites GTPases de la família Rho, que inclouen RhoA, Rac1 i Cdc42. En general, s'assumeix que Rho regula l'acoblament de filaments contràctils al llarg del cos cel·lular i al front posterior, mentre que Rac i Cdc42 regulen la polimerització d'actina al

front d'avang i concretament Cdc42 s'ha descrit que resulta crític en l'establiment de la polarització cel·lular (Raftopoulou and Hall, 2004).

Els resultats obtinguts en els estudis inicials d'aquest treball suggerien la participació concretament de les Rho GTPases Rac i Cdc42 en els efectes de BMP-2 en la dinàmica del citoesquelet d'actina ja que: i) en els experiments de migració cel·lular mitjançant l'assaig de ferida s'observa que en presència de BMP-2 la ferida és repoblada més eficientment, i un dels primers canvis morfològics que s'observen és la polarització de les cèl·lules del límit de la ferida (Figura R1). Aquesta observació suggereix que BMP-2 podria afectar la migració cel·lular fent que resulti més eficient el procés de polarització i formació del front d'avang, processos dependents de l'activitat de Rac i Cdc42 (Etienne-Manneville and Hall, 2002); ii) en els experiments de migració utilitzant la Càmera de Boyden es demostra que BMP-2 indueix la migració a favor de gradient de concentració (Figura R2) i el primer canvi que adopta la cèl·lula en un procés de migració quimiotàctica és la polarització cel·lular, procés que com ja hem comentat està orquestrat principalment per Rac i Cdc42; iii) les protrusions d'actina induïdes pel tractament de cèl·lules C2C12 amb BMP-2 tenen un aspecte molt similar als *ruffles* de membrana, estructures clàssicament associades a l'activació de Cdc42 (Figura R4) (Raftopoulou and Hall, 2004); iv) BMP-2 indueix la formació de filopodis en cèl·lules Swiss3T3, efecte que s'ha descrit que depèn exclusivament de l'activació de Cdc42 (Figura R8) (Nobes and Hall, 1999).

Els experiments dissenyats per analitzar els nivells d'activació de les proteïnes Rac i Cdc42 demostren que BMP-2 activa de manera específica Cdc42 i que dita activació ocorre en paral·lel a l'aparició de protrusions d'actina a la membrana cel·lular en resposta a BMP-2 (Figura R9 B). El fet que no es detectin canvis en els nivells d'activació endògens de Rac simultàniament a Cdc42 és consistent amb el model clàssic de participació de les GTPases en la migració cel·lular segons el qual l'activació de Cdc42 és imprescindible en la fase inicial per establir la polarització cel·lular i Rac està involucrada, juntament amb Cdc42, en el manteniment de la morfologia polaritzada (Raftopoulou and Hall, 2004). De fet, una observació comú en cèl·lules en que s'ha eliminat l'expressió de Cdc42 és una reducció de l'activitat de Rac (Czuchra et al., 2005; Wu et al., 2007). Els nostres resultats també demostren que l'activació de Cdc42 resulta imprescindible perquè BMP-2 indueixi la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració quimiotàctica (Figura R10). Malgrat que no es coneixen els mecanismes mitjançant els quals les BMPs activen Cdc42, altres autors també han descrit la seva participació en els canvis en la

organització del citoesquelet induïts per altres membres de la superfamília de TGF $\beta$  (Bhowmick et al., 2001a; Edlund et al., 2002; Edlund et al., 2004; Lee-Hoeflich et al., 2004; Ricos et al., 1999); per tant, és possible que els receptors per BMPs i TGF $\beta$  utilitzin una via de senyalització comú per activar Cdc42.

PI3K i els seus productes lipídics PIP<sub>3</sub> han estat implicats en el control de la migració cel·lular i la polarització (Stephens et al., 2002). En el nostre model cel·lular hem demostrat que BMP-2 activa PI3K ja que l'estimulació amb el factor indueix la fosforilació de Akt en Ser473 (Figura R11 A). L'activació de PI3K en resposta a BMP-2 ha estat descrita per altres grups, de tal manera que l'activació de PI3K per part de BMP-2 s'ha descrit que està implicada en la diferenciació d'osteoblasts (Ghosh-Choudhury et al., 2002), en el procés de contracció i prevenció de l'apoptosi en cardiomiòcits (Ghosh-Choudhury et al., 2003; Sugimori et al., 2005) i en la transformació de cèl·lules de càncer de pulmó (Langenfeld et al., 2005). El present treball és el primer que demostra que BMP-2 regula la mobilització del citoesquelet i la migració de cèl·lules C2C12 a través de l'activació de PI3K (Figura R11 BiC). No es coneixen amb profunditat els mecanismes moleculars d'activació de PI3K per part dels membres de la superfamília de TGF $\beta$ , no obstant, Yi et al. han demostrat que la subunitat reguladora de PI3K p85 es pot associar, indirectament a través d'un element desconegut fins al moment, amb els receptors de TGF- $\beta$  de tipus I i de tipus II de tal manera que el receptor de tipus I activa la PI3K de manera dependent de lligand (Yi et al., 2005). En la majoria de línies cel·lulars estudiades, s'ha descrit que la migració en resposta a múltiples estímuls està associada a la generació de PIP<sub>3</sub> i, per tant, a l'activació de PI3K de classe I. No obstant, la contribució específica de les diferents isoformes de PI3K a aquesta funció cel·lular únicament ha estat descrita per PI3K $\gamma$  i PI3K $\delta$ , en resposta a agents quimiotàctics, i per PI3K $\beta$  i PI3K $\delta$ , en resposta a factors de creixement (Camps et al., 2005; Puri et al., 2004; Sadhu et al., 2003; Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). Els nostres resultats demostren que la participació de PI3K de classe IA, específicament de p110 $\alpha$ , en els efectes de BMP-2 en la migració cel·lular i en l'activació de Akt en les cel·lular C2C12 (Figura R12).

Els resultats obtinguts suggereixen que tant l'activació de Cdc42 com la de PI3K resulten imprescindibles en la regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina per part de BMP-2, en primer lloc el perfil d'activació de Cdc42 i PI3K correlaciona temporalment amb la formació de protrusions d'actina en cèl·lules C2C12, COS-1 i Swiss3T3 estimulades amb BMP-2; i en segon lloc l'expressió d'un mutant dominant negatiu de Cdc42 o el

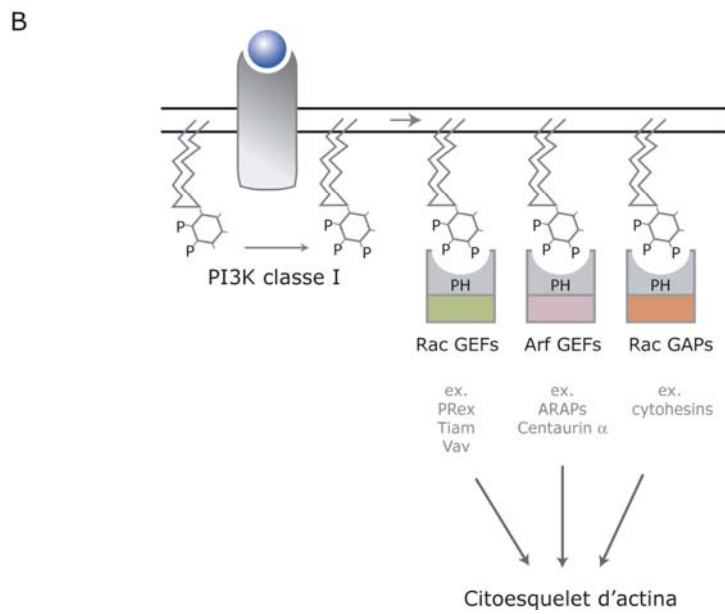
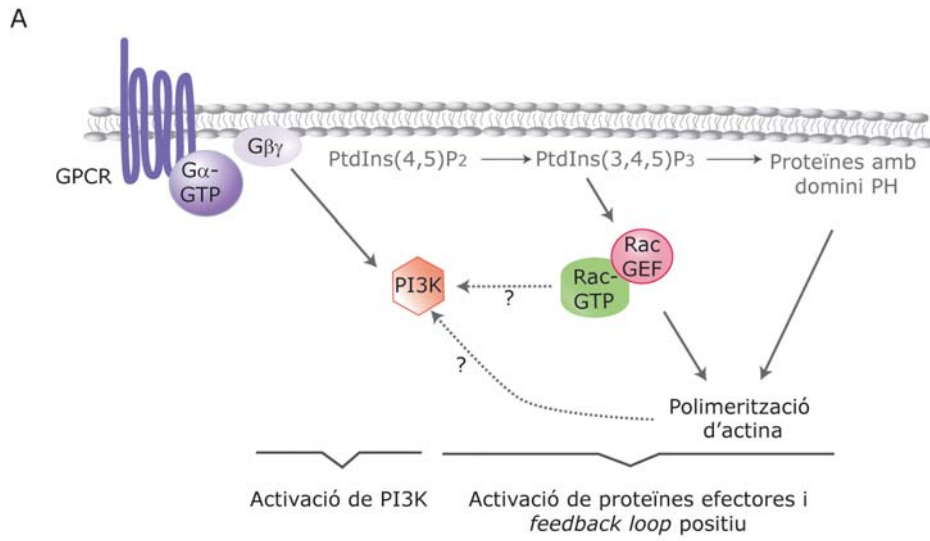
tractament amb l'inhibidor de PI3K, LY294002, així com amb l'inhibidor específic de PI3K $\alpha$ , AS702630, bloquegen completament la formació de protrusions d'actina en presència de BMP-2. Dependent del tipus cel·lular i de l'estímul, l'activació de Cdc42 s'ha descrit que té lloc *upstream*, *downstream* o en paral·lel a l'activitat PI3K (Bakin et al., 2000; Bosse et al., 2007; Edlund et al., 2004). De fet, alguns autors han proposat que existeix un *feedback loop* positiu entre els PIP<sub>3</sub> generats per les PI3K i les petites GTPases de la família Rho que és el responsable d'iniciar i mantenir la polarització cel·lular (Cain and Ridley, 2009; Hawkins et al., 2006; Inoue and Meyer, 2008) (Figura D1 A). El *feedback loop* consisteix, per una banda, en que l'estimulació amb agents quimiotàctics indueix l'activació de PI3K i l'acumulació de PIP<sub>3</sub> al front d'avanç. Aquest augment de la concentració localitzada de lípids a la membrana dóna lloc al reclutament de proteïnes efectores que contenen domini PH i a la seva activació (Figura D1 B). S'ha proposat que l'activació de les proteïnes efectores succeeix, segons el cas, perquè la translocació a la membrana dóna lloc a un augment de la concentració de proteïnes substrats i els seus interactors, o bé es produeix un canvi conformacional que incrementa l'activitat catalítica de les proteïnes efectores i/o canvia la seva afinitat pels seus interactors. En relació a la possible regulació de l'activitat de les petites GTPases de la família Rho, s'ha descrit que la producció de PIP<sub>3</sub> recluta a la membrana les proteïnes GEFs, proteïnes encarregades de reclutar i afavorir l'activació de les GTPases, ja que aquestes presenten un domini homòleg a Dbp1 que s'ha associat al domini PH, fet que les converteix en dianes potencials de la senyalització per PI3K (Schmidt and Hall, 2002) (Figura D1 B). Per altra banda, s'ha suggerit que les GTPases activades controlen la localització del *pool* de PIP<sub>3</sub> per un mecanisme que involucra el citoesquelet d'actina ja que la distribució espacial dels filaments d'actina controla la difusió fora del front d'avanç dels PIP<sub>3</sub> (Srinivasan et al., 2003; Wang et al., 2002). Així, l'acumulació asimètrica de PIP<sub>3</sub> i actina al front d'avanç depèn d'un *feedback loop* positiu en que l'acumulació de lípids dóna lloc a l'activació de les GTPases de la família Rho, i les GTPases de la família Rho activades i l'actina polimeritzada incrementen al seu torn l'acumulació dels lípids (Figura D1 A).

També s'ha proposat que l'activació localitzada de les proteïnes GEF al front d'avanç en resposta a l'activació de PI3K es podria donar perquè PI3K i les GEFs formen part d'un mateix complex de senyalització. L'existència de tal complex s'ha demostrat, per exemple, en el cas del GEF Sos-1, de tal manera que la PI3K de classe I es troba en un complex proteic que conté el RacGEF Sos-1, la proteïna amb el domini SH3 Eps8 i la proteïna *scaffold* Abi-1. La formació del complex s'ha descrit que és

imprescindible per l'estimulació de l'activitat GEF de Sos-1, i s'ha suggerit que aquest tipus de complex es podria formar, de manera localitzada, al front d'avanç en resposta a l'estimulació amb agents quimiotàctics (Innocenti et al., 2003). La participació de les diferents isoformes de PI3K en l'activació de les petites GTPases de la família Rho ha estat analitzada en els últims anys en varies línies cel·lulars i s'ha demostrat que: i) macròfags amb l'activitat PI3K $\delta$  reduïda presenten uns nivells d'activació de RhoA incrementats i uns nivells de Rac1 reduïts (Papakonstanti et al., 2007); ii) la reducció de l'activitat de PI3K $\alpha$  en cèl·lules endotelials dóna lloc a una disminució de l'activitat RhoA (Graupera et al., 2008); iii) la inhibició de PI3K $\gamma$  en monòcits induïx una disminució de l'activitat de Rac1 i Cdc42 (Ferreira et al., 2006). Aquests resultats suggereixen que les senyals que regulen les Rho GTPases són específiques en funció de la isoforma de PI3K que s'activi i del tipus cel·lular.

**Figura D1. Les GTPases de la família Rho i els gradients de fosfatidilinositols generats per PI3K.** (A) Model exemple de l'activació de PI3K de classe IB en el procés de migració cel·lular. La unió dels quimioatracients al receptor acoblat a proteïna G (GPCR) induïx la translocació i activació de les PI3K de classe IB a la membrana. La PI3K activada catalitza la fosforilació dels PIP<sub>2</sub>, de tal manera que els PIP<sub>3</sub> resultants recluten proteïnes amb domini PH que posteriorment s'activen de manera localitzada a la membrana. Algunes proteïnes GEF per a les Rho GTPases són efectors de PI3K, donant lloc a l'acumulació de Rho GTPases activades a regions concretes de la cèl·lula. Posteriorment la senyal s'amplifica per un *feedback loop* que involucra la polimerització d'actina. Adaptat de Merlot and Firtel (2003). (B) Efectors principals de la senyalització de PI3K de classe I en la regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina. L'activació dels membres de PI3K de classe I genera PIP<sub>3</sub> a la cara interna de la membrana plasmàtica. L'augment de la concentració d'aquests fosfolípids és detectada per múltiples proteïnes efectores que contenen el domini PH. La unió de les proteïnes amb dominis PH als fosfolípids productes de l'activació de PI3K desencadena en l'activació de dites proteïnes que posteriorment transmeten les senyals iniciades a la membrana fins a proteïnes reguladores de la dinàmica del citoesquelet d'actina. Adaptat de Hawkins et al. (2006).





Els nostres resultats indiquen que en cèl·lules C2C12 no té lloc un *feedback loop* positiu entre PI3K i Cdc42, sinó que BMP-2 activa de manera paral·lela i independent ambdues rutes ja que el bloqueig d'una d'elles no altera l'habilitat de BMP-2 d'activar l'altra (Figura R13), essent ambdues indispensables pels efectes descrits sobre la migració cel·lular. Altres autors han obtingut uns resultats semblants als nostres, per exemple, en la regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina en resposta a PDGF i HGF també s'ha suggerit que té lloc l'activació paral·lela i independent de les rutes de Cdc42 i PI3K (Bosse et al., 2007; Jimenez et al., 2000).

### **Les proteïnes PAK, un mòdul integrador on convergeixen les senyals de Cdc42 i PI3K.**

Les petites GTPases de la família Rho en el seu estat activat regulen proteïnes efectores que porten a terme diverses respostes cel·lulars, la majoria d'elles relacionades amb la regulació de l'organització del citoesquelet d'actina, la morfologia cel·lular i la migració (Bishop and Hall, 2000; Schmitz et al., 2000). Les proteïnes efectores de Cdc42 i Rac més ben caracteritzades són els membres de la família PAK (Manser et al., 1994). Un cop activades, les PAKs es redistribueixen del citosol a estructures d'actina cortical, com els lamelipodis, el front d'avang de cèl·lules polaritzades i els *ruffles* de membrana, i participen en el control de la dinàmica dels filaments d'actina. Les proteïnes de la família PAK es divideixen en dos grups basant-se en la seva estructura i homologia: el grup I, que inclou Pak1, Pak2 i Pak3; i el grup II, amb Pak4, Pak5 i Pak6 (Jaffer and Chernoff, 2002; Zhao and Manser, 2005). En aquest treball es mostra per primera vegada que una proteïna de la superfamília de TGF $\beta$  activa membres dels dos grups de PAKs (Figura R15 i R16). Els resultats presentats en aquest treball demostren que l'activació de les PAKs en resposta a BMP-2 depèn de l'activitat de Cdc42 (Figura R17) i de PI3K (Figura R16), fet que suggereix que les PAKs actuen com un mòdul integrador on convergeixen les senyals que provenen de les vies de senyalització que involucren Cdc42 i PI3K.

En aquest treball es mostra que l'activació de Pak1 i de Pak4 en cèl·lules C2C12 té lloc amb una cinètica similar a la inducció dels canvis en la dinàmica del citoesquelet d'actina per part de BMP-2. La contribució tant de Pak1 com de Pak4 ja havia estat descrita prèviament en processos que impliquen la reorganització del citoesquelet d'actina per altres factors de creixement, no obstant aquesta és la primera vegada en que es descriu l'activació per part de BMP-2 d'ambdues PAKs. En relació a la regulació de

les proteïnes PAK per part de membres de la superfamília de TGF $\beta$ , únicament existeixen publicats els treballs del grup del Dr. Edward B. Leof, que descriuen que TGF $\beta$  activa específicament Pak2 per una ruta Smad-independent i que aquesta activació té lloc de manera específica en cèl·lules mesenquimals (Suzuki et al., 2007; Wilkes and Leof, 2006; Wilkes et al., 2005; Wilkes et al., 2003). En el nostre model d'estudi l'estimulació amb BMP-2 no afecta l'estat de fosforilació de Pak2, fet que és consistent amb resultats previs que indiquen que l'activació de Pak2 ocorre principalment en resposta a estímuls d'estrès cel·lular com l'exposició a radiacions ionitzants, el xoc hiperosmòtic i la privació de sèrum (Roig et al., 2000). Pak4 és el membre més ben estudiat del grup II de PAKs i malgrat que nombrosos estudis han demostrat que s'activa principalment per Cdc42 (i en molta menys mesura per Rac), la contribució de Pak4 en el control de l'organització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular ha estat descrita únicament en estudis en cèl·lules epitelials i fibroblàstiques en resposta a HGF (Ahmed et al., 2008; Paliouras et al., 2009; Wells et al., 2002). La regulació de l'activitat de les proteïnes del grup I de PAKs per part de les petites GTPases de la família Rho s'ha descrit que es dona de tal manera que la unió de les RhoGTPases pertorba la unió dels dímers de PAKs donant lloc a un conjunt de canvis conformacionals que desestabilitza l'estructura plegada del domini autoinhibidor, induint la seva dissociació del domini catalític, fet que permet que tingui lloc l'autofosforilació corresponent al residu Thr423 del *loop* d'activació de Pak1 (Gatti et al., 1999) que resulta necessària perquè les PAKs tinguin una funció catalítica completa envers els seus substrats (Lei et al., 2000; Morreale et al., 2000; Zhao et al., 1998). A diferència del grup I de Paks, el mecanisme de regulació de les PAKs del grup II no és coneix tan profundament ja que no presenten el domini autoinhibidor i la unió de GTPases activades no afecta la seva activitat quinasa (Pandey et al., 2002). En el cas de Cdc42 s'ha suggerit que la seva unió resulta en la translocació de Pak4 a l'aparell de Golgi, fet que suggereix que l'associació amb les GTPases estaria regulant la seva activitat dirigint el grup II de PAKs a diferents localitzacions subcel·lulars (Abo et al., 1998).

La participació de l'activitat PI3K en la regulació de l'activació de les PAKs ja havia estat descrita anteriorment per altres factors de creixement. En el cas de les PAKs del grup I, el nivell d'activació màxim s'aconsegueix per autofosforilació en un residu treonina que correspon a Thr423 del *loop* d'activació de Pak1, no obstant s'ha descrit que altres molècules de senyalització de la via de PI3K poden afectar el seu estat d'activació. Aquests mecanismes inclouen: i) l'activació per fosforilació directa de les PAKs per part de quinases *downstream* de PI3K, com és el cas de PDK1 i

Akt (King et al., 2000; Zhou et al., 2003); ii) l'activació per interacció directa proteïna-proteïna com és el cas de PI3K (Papakonstanti and Stournaras, 2002; Tsakiridis et al., 1996); iii) l'activació indirecte per proteïnes que modulen l'estat d'activació de petites GTPases de la família Rho, com és el cas de Akt (Tang et al., 2000).

Tenint en compte les evidències presentades, suggerim que les diferents PAKs, amb diferents maneres d'activació, integren les senyals que involucren Cdc42 i PI3K iniciades pels receptors de BMPs a la membrana i la mobilització específica del citoesquelet d'actina.

### **Rellevància funcional de la interacció de LIMK1 i la cua citoplasmàtica del BMPRII.**

Les proteïnes PAKs regulen la dinàmica del citoesquelet d'actina principalment a través de l'activació de la LIMK1 i la LIMK2 (Dan et al., 2001; Edwards et al., 1999). Les PAKs fosforilen les LIMK en el seu *loop* d'activació, que equival a Thr508 per LIMK1, incrementant així la seva activitat envers la cofilina (Edwards et al., 1999; Scott and Olson, 2007), proteïna que regula directament la polimerització d'actina (Bamburg, 1999; Bamburg et al., 1999). Els nostres resultats indiquen que BMP-2 indueix la fosforilació de LIMK1, així com un increment de la seva activitat envers la cofilina (Figura R14), i demostrem que aquesta activació depèn de l'activitat PI3K i de les PAKs (Figura R14 i R19).

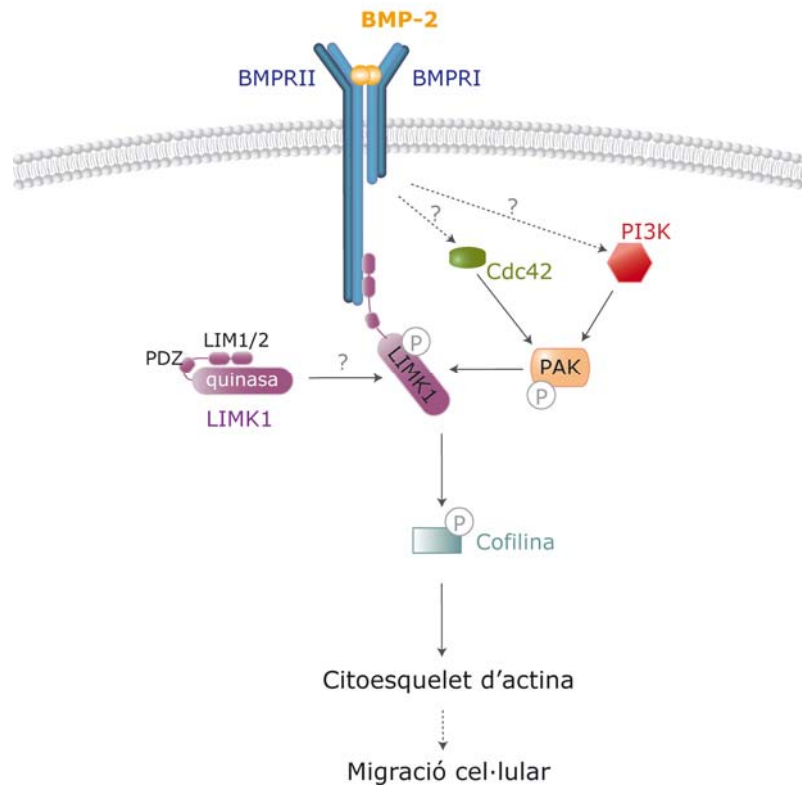
Estudis similars realitzats per altres grups ja havien demostrat l'activació de LIMK1 per part de membres de la família de BMPs en cèl·lules de mamífers (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004). Malgrat que ambdós treballs arriben a la conclusió que la interacció directe entre LIMK1 i la cua citoplasmàtica de BMPRII està involucrada en l'activació de LIMK1 per part de les BMPs, existeixen certes diferències mecanístiques entre els models proposats. La controvèrsia entre ambdues publicacions neix en relació a com la unió del BMP al seus receptors incrementa l'activitat LIMK1. Foletta et al. proposen que la unió de la LIMK1 a BMPRII manté la LIMK1 en un estat inhibít i que l'addició del BMP-4 promou la dissociació de la LIMK1 del receptor permetent així la seva activació (Foletta et al., 2003). No obstant, Lee-Hoeflich et al. descriuen que LIMK1 s'uneix a BMPRII tant en absència com en presència de lligand, i que aquesta unió confereix, per si sola, un augment d'activitat a la LIMK1 envers la cofilina. Posteriorment la LIMK1 unida a BMPRII és fosforilada al seu *loop*

d'activació per una via dependent de Cdc42 induït per BMP-7 (Lee-Hoeflich et al., 2004).

En aquest context, els nostres resultats mostren que en absència de BMP-2, una fracció de la LIMK1 interacciona amb BMPRII, i aquesta LIMK1 no està fosforilada en Thr508, fet suggereix que no està activada (Figura R19). De manera interessant, en presència de BMP-2 s'observen uns nivells més alts de LIMK1 unida a BMPRII. Aquests resultats coincideixen amb el model publicat per Lee-Hoeflich et al., malgrat que en el seu treball els autors afirmen que la unió de LIMK1 a BMPRII estimula l'activitat basal de LIMK1 i els nostres resultats mostren que la unió de LIMK1 a BMPRII no és suficient per estimular la fosforilació (Figura R19) ni l'activitat quinasa de LIMK1 (resultats preliminars) (Lee-Hoeflich et al., 2004). Proposem que aquesta divergència de resultats és conseqüència de que la observació en la qual es basen Lee-Hoeflich et al. per arribar a aquesta conclusió és un assaig quinasa en que comparen l'activitat quinasa *in vitro*, envers la cofilina, de BMPRII transfectat en comparació amb BMPRII cotransfectat amb LIMK1. Observen més cofilina fosforilada en la situació en que cotransfecten el BMPRII amb LIMK1 i d'aquesta observació dedueixen que la unió de LIMK1 a BMPRII confereix una activitat a la LIMK1 per sobre dels nivells basals. No obstant, discrepem amb aquest resultat ja que resultats propis (resultats preliminars) i d'altres grups (Foletta et al., 2003) han demostrat que la sobreexpressió de la forma nativa de LIMK1 *per se* indueix la fosforilació de la cofilina. A part d'això, el que és més probable, i que ja havia estat proposat anteriorment (Lee-Hoeflich et al., 2004), és que la unió dels dominis LIM1/2 de la LIMK1 al domini LBR (*LIMK1 binding region*) de BMPRII mantingui la LIMK1 en una conformació que permet que sigui activada posteriorment per fosforilació en Thr508 per part de les proteïnes PAK, ja que s'ha descrit que els dominis LIM de la LIMK1 regulen negativament la seva activitat quinasa via una interacció intramolecular entre els dominis LIM1/2 i el domini quinasa carboxi-terminal (Edwards and Gill, 1999; Nagata et al., 1999). Els nostres resultats mostren que BMP-2 indueix la fosforilació de la LIMK1 unida a BMPRII per un mecanisme que depèn de Pak1 ja que la sobreexpressió d'una forma constitutivament activa de Pak1 indueix, en absència de BMP-2, una fosforilació de LIMK1 similar a la observada per estimulació amb BMP-2 (Figura R19); i en presència d'una forma mutant de Pak1 que funciona com a dominant negatiu, l'estimulació amb BMP-2 no és capaç d'induir la fosforilació de la LIMK1 unida a BMPRII (Figura R19). D'acord amb estudis previs d'altres grups i amb els resultats aquí presentats, proposem que l'activitat màxima de LIMK1 s'assoleix en dos passos; en primer lloc la unió de LIMK1 a BMPRII manté la LIMK1 en una conformació

“activable” (que no activa), i en segon lloc l’activació de les proteïnes PAK per part de BMP-2 induïx la fosforilació en el residu Thr508 al *loop* d’activació de LIMK1, incrementant d’aquesta manera la seva activitat catalítica

En relació a la rellevància funcional de la interacció de LIMK1 amb la cua citoplasmàtica del BMPRII en els efectes de BMP-2 sobre la migració cel·lular, els nostres resultats suggereixen que dita interacció no és absolutament necessària ja que: i) la sobreexpressió d’una forma de BMPRII que no conté la regió mínima d’interacció amb la LIMK1 (domini LBR) (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004) no afecta significativament la capacitat de BMP-2 d’induir la migració cel·lular (Figura R22); ii) l’estimulació de cèl·lules amb BMP-7, que en cèl·lules C2C12 senyalitza preferencialment a través de ActRIIA (Ebisawa et al., 1999; Macias-Silva et al., 1998; Yu et al., 2005), receptor que no conté la llarga cua citoplasmàtica present a BMPRII, dóna lloc a un augment de la migració cel·lular quimiotàctica similar a la observada per BMP-2 (Figura R20); iii) en cèl·lules C2C12 en que s’ha eliminat l’expressió de BMPRII, BMP-2 induïx la mobilització dels filaments d’actina i la migració cel·lular de manera similar a la situació control (Figura R21). S’ha suggerit que, en absència de BMPRII, BMP-2 és capaç de senyalitzar a través de ActRIIA juntament amb un conjunt de receptors tipus I diferents dels utilitzats per BMPRII (de Jesus Perez et al., 2009; Yu et al., 2005). Aquestes evidències, i el fet que l’activació de LIMK1 per part de BMP-2 sigui dependent de l’activitat de PI3K i Cdc42, suggereix que a part de la interacció de la LIMK1 amb la cua citoplasmàtica de BMPRII, BMP-2 estimula vies de senyalització addicionals que donen lloc a l’activació completa de LIMK1. En línia amb aquests resultats, estudis d’altres grups indiquen que l’estimulació amb TGF $\beta$  induïx la migració cel·lular per un mecanisme molecular semblant al aquí presentat (Vardouli et al., 2005; Wilkes et al., 2005; Wilkes et al., 2003) i TGF $\beta$  únicament senyalitza a través del receptor de tipus II TGF $\beta$ RII, receptor que no conté la regió C-terminal (Lin et al., 1992). En conjunt, els resultats mostren que en absència de BMPRII, l’estimulació amb BMP-2 dóna lloc a la mobilització del citoesquelet d’actina i a la inducció de la migració cel·lular, probablement a través de la senyalització de ActRIIA, fet que suggereix que la regió C-terminal de BMPRII no resulta imprescindible en els efectes estudiats.



**Figura D2. Model proposat per la regulació de l'activitat de LIMK1 en la migració cel·lular induïda per BMP-2.** BMP-2 induïx l'activació de vies de senyalització que involucren Cdc42 i PI3K, que conflueixen en l'activació de les proteïnes PAK. Posteriorment, l'activació de les PAKs es tradueix en un augment de l'activitat de LIMK1 envers la cofilina. No es coneixen els mecanismes mitjançant els quals els receptors de BMP-2 induïxen l'activació de Cdc42 i PI3K ni com BMP-2 afavoreix la interacció entre LIMK1 i BMPRII.

Basant-nos en els nostres resultats i en els treballs d'altres grups es pot afirmar que la senyalització per part de BMPs involucrada en la migració cel·lular, la dendritogènesi i l'estabilitat sinàptica requereix la participació de LIMK1 (Eaton and Davis, 2005; Hocking et al., 2009; Lee-Hoeflich et al., 2004; Wen et al., 2007). D'acord amb els resultats presentats en aquest treball, la LIMK1 interacciona físicament amb BMPRII, no obstant dita interacció no és absolutament crítica per l'activació de la LIMK1 per part de BMP-2 en el control de la regulació del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular. BMP-2 estimula vies de senyalització alternatives que involucren PI3K, Cdc42 i proteïnes de la família PAK que modulen l'activació de LIMK1. Suggestim que l'ancoratge de la LIMK1 a la

cua C-terminal de BMPRII juga un paper "estructural" restringint la fosforilació de la cofilina a regions específiques de la cèl·lula, fet que dóna lloc a la formació localitzada de protrusions d'actina a la membrana. Així doncs, els gradients de BMP-2 indueixen la polarització cel·lular a través de l'estabilització/polimerització d'actina de manera asimètrica mitjançant la regulació espacial de la cofilina a través de la LIMK1 (Figura D2). Això explicaria perquè l'estimulació amb BMP-2 de cèl·lules que sobreexpressen una forma de BMPRII amb el domini mínim d'unió a LIMK1 truncat, malgrat no perden la capacitat de migrar en resposta a l'estimulació amb BMP-2, presenten una lleugera disminució de la migració en l'assaig de ferida, consistent amb el fet que porten a terme una polarització cel·lular i migració direccional menys eficient (Figura R22).

### **Participació de la via de senyalització de p38MAPK**

En la última dècada s'han publicat nombrosos articles que indiquen que tant les BMPs com TGF $\beta$  senyalitzen a través de vies MAPK de manera independent de les proteïnes Smads per induir apoptosi en processos fisiològics normals i en la supressió de tumors o per promoure la transició epiteli-mesenquimal en processos relacionats amb la metastasis (Derynck and Zhang, 2003; Moustakas and Heldin, 2005). Els efectes de BMPs i TGF $\beta$  en la regulació de les MAPKs JNK, p38 i ERK varia molt en magnitud i cinètica dependent del tipus cel·lular i les condicions estudiades. En alguns casos aquestes quinases són activades a temps llargs, suggerint que deuen ser efectes indirectes, però en altres casos l'activació és ràpida, suggerint que no depèn d'efectes transcripcionals. S'ha descrit que BMP-2 i TGF $\beta$  activen a temps curts p38 a través de MKK3/6 (Gallea et al., 2001; Hanafusa et al., 1999; Sano et al., 1999; Vinals et al., 2002) però la rellevància fisiològica d'aquests efectes és incerta en la majoria de casos. Els resultats presentats en aquest treball indiquen que BMP-2 indueix l'activació de la ruta de senyalització de p38 a temps curts i de manera específica (Figura R23 i R25) i que aquesta via de transducció de senyals està involucrada en el control de la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular (Figura R24). A més a més els nostres resultats demostren clarament que concretament p38 $\alpha$  és la isoforma responsable de regular la migració cel·lular en resposta a BMP-2 (Figura R26).

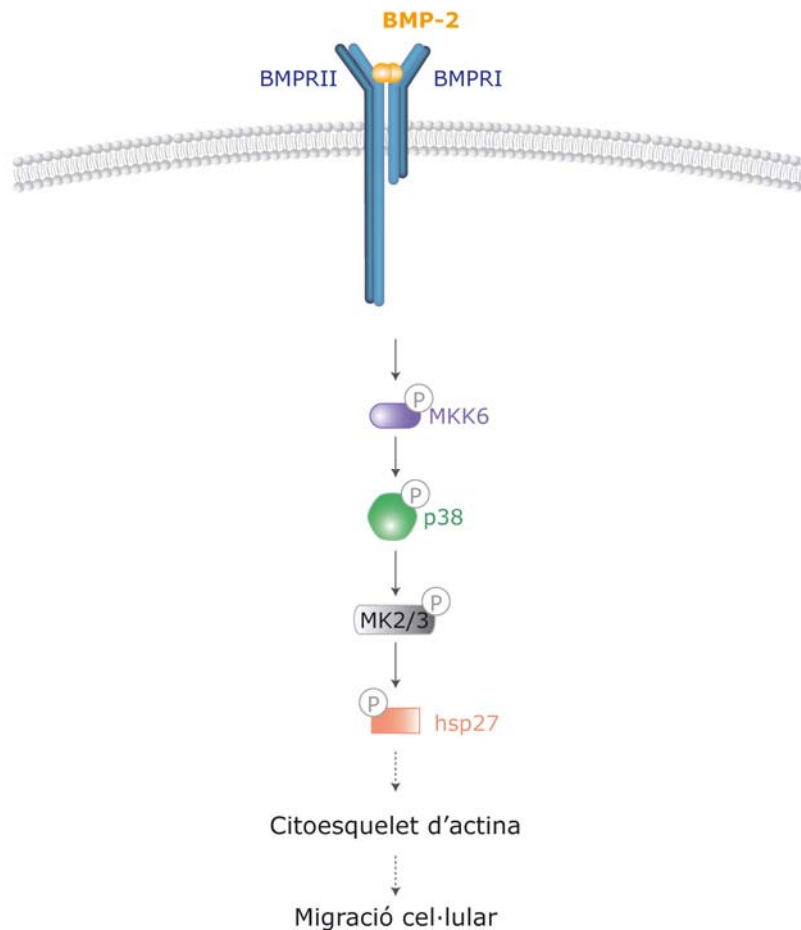
La participació de p38 en processos relacionats amb la migració cel·lular en resposta a BMPs no havia estat estudiada fins al moment, no obstant, estudis similars realitzats en resposta a altres membres de la



superfamília de TGF $\beta$  mostren que p38 juga un paper clau en la regulació de processos que involucren la migració (Bakin et al., 2002; Hedges et al., 1999), i estudis en *Drosophila* mostren que l'activitat p38 resulta crítica durant la morfogènesis de les ales per un mecanisme *downstream* de decapentaplegic (Dpp), un homòleg de TGF $\beta$  (Adachi-Yamada, 1999). En aquest treball presentem diversos resultats que descriuen per primera vegada que l'activació de la via de senyalització de p38 per part de BMP-2 juga un paper fonamental en la migració cel·lular a través del control de l'organització del citoesquelet d'actina. Les evidències experimentals que ens ho suggereixen són les següents: i) la formació d'acumulacions d'actina cortical i la migració cel·lular induïda per BMP-2 es veu compromesa en presència de l'inhibidor de l'activitat de p38, SB203580 (Figura R24); ii) la migració cel·lular induïda per BMP-2 es veu reduïda en cèl·lules MEF que no expressen p38 $\alpha$  en comparació amb la línia cel·lular salvatge (Figura R26); iii) BMP-2 no és capaç d'induir la migració en cèl·lules MEF en que s'ha eliminat l'expressió de MK2, proteïna diana de p38 (Figura R28); iv) la sobreexpressió d'un mutant dominant negatiu de hsp27, proteïna diana de MK2, bloqueja completament la migració cel·lular induïda per BMP-2. Els resultats obtinguts en relació a la contribució de p38 $\alpha$ , MK2 i hsp27 en el control de la migració cel·lular són consistent amb resultats obtinguts per altres grups que mostren, per exemple, que el ratolí *knock-out* de p38 $\alpha$  presenta defectes en l'angiogènesi (Adams et al., 2000), consistent amb el paper de p38 en la migració, o experiments realitzats en cèl·lules MEFs p38 $\alpha$ -/- on s'ha demostrat que tant la migració basal com la induïda per factors quimiotàctics es veu alterada (Rousseau et al., 2006). Diversos grups també han demostrat que cèl·lules deficientes en MK2 tenen afectada la direccionalitat de la migració en resposta a diferents factors de creixement (Hannigan et al., 2001; Kotlyarov et al., 2002; Rousseau et al., 2006).

Els nostres resultats suggereixen que p38 regula la migració cel·lular a través de l'estimulació de proteïnes que tenen un impacte directe sobre la dinàmica dels filaments d'actina. S'ha descrit que la fosforilació de la proteïna hsp27, per part de MK2, suprimeix la seva activitat *cap-binding*, de tal manera que els extrems *barbed* (+) queden lliures, afavorint així la polimerització d'actina necessària per l'extensió del front d'avanç durant la migració cel·lular. Resultats d'altres grups han demostrat que, *in vitro*, la proteïna hsp27 purificada defosforilada, a diferència de la fosforilada, inhibeix la polimerització d'actina (Benndorf et al., 1994; Miron et al., 1991). *In vivo* s'ha demostrat que hsp27 regula la dinàmica de l'actina ja que la sobreexpressió de hsp27 incrementa l'estabilitat dels filaments d'actina en fibroblasts en resposta a diversos factors de creixement (Guay

et al., 1997; Huot et al., 1997; Huot et al., 1996; Lavoie et al., 1993; Lavoie et al., 1995). Els nostres resultats demostrem que l'activació de p38 és essencial per l'activació de MK2 i la fosforilació de hsp27 en resposta a BMP-2, i que hsp27 resulta indispensable en la regulació de la migració cel·lular per part de BMP-2, ja que BMP-2 no és capaç d'induir un increment de la migració cel·lular, en relació a la situació basal, en cèl·lules que sobreexpressen una forma no fosforilable de hsp27 (Figura R29). Això suggereix que hsp27 és activada per BMP-2 de manera dependent de p38 i regula de manera directe la mobilització del citoesquelet d'actina afavorint la migració cel·lular. Aquest conjunt de dades indiquen que la via de senyalització de p38 està involucrada en la regulació de la migració induïda per BMP-2 i presentem evidències que suggereixen que aquest efecte és regulat directament a través del control de la polimerització dels filaments d'actina per part de proteïnes activades per p38.



**Figura D3. Model proposat de la participació de la via de senyalització de p38 en la migració cel·lular en resposta a BMP-2.** BMP-2 induïx l'activació de p38 i del seu substrat MK2, que al seu torn induïx la fosforilació de hsp27, proteïna que regula directament la polimerització dels filaments d'actina involucrada en la migració cel·lular.

### **Relació entre les vies de senyalització PI3K/Cdc42-PAK-LIMK1 i p38-MK2-hsp27**

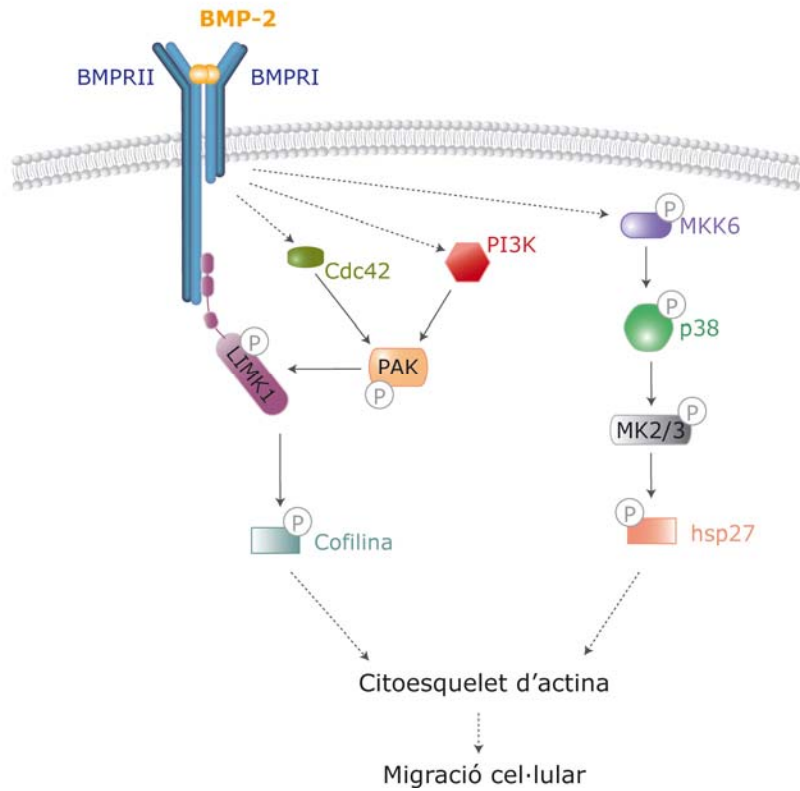
Els resultats presentats en aquest treball suggereixen que BMP-2 induïx la reorganització dels filaments d'actina per dues vies de senyalització: la via p38 $\alpha$ -MK2 que activa hsp27 i permet la polimerització dels filaments d'actina; i la via Cdc42/PI3K-PAKs-LIMK1 que inactiva la cofilina i evita la desestructuració dels filaments actina. Ambdues rutes desencadenen en l'activació de proteïnes que tenen un impacte directe sobre la polimerització dels filaments d'actina, regulant positivament la polimerització d'actina i permetent la formació d'estructures especialitzades de membrana necessàries per a la migració cel·lular quimiotàctica. També hem demostrat que l'activació completa d'ambdues vies resulta crítica perquè BMP-2 induïxi la migració cel·lular, de tal manera que suggerim que ambdues vies de senyalització resulten imprescindibles i no són redundants.

Un cop demostrada la contribució d'ambdues vies de senyalització en la regulació espaciotemporal del citoesquelet d'actina induïda per BMP-2, varem analitzar si ambdues rutes senyalitzaven de manera independent o existeix *crossstalk* entre elles. Estudis previs han demostrat que, en alguns casos, l'activitat p38 està involucrada en la regulació de la quimiotaxi de manera dependent de les proteïnes PAK o de les petites GTPases de la família Rho. Concretament, s'ha descrit que les proteïnes PAK poden fosforilar MKK3/6 i activar p38 en algunes condicions. Existeixen altres evidències experimentals publicades en aquest sentit, com per exemple: i) la sobreexpressió de formes constitutivament actives de Rac i Cdc42 donen lloc a l'activació de p38, mentre que l'expressió de mutants dominants negatius de les petites GTPases de la família Rho inhibeixen la fosforilació de p38; i experiments realitzats en cèl·lules COS-1 han demostrat que l'expressió d'un mutant dominant negatiu de Pak1 suprimeix tant l'activació de Rac/Cdc42 com de p38 dependent d'Interleuquina-1 (Zhang et al., 1995); ii) la proteïna  $\beta$ Pix, que interacciona amb Pak1 i actua com a GEF per Cdc42 i Rac, regula l'activitat de MKK3/6 en el control de la dinàmica dels filaments d'actina en cèl·lules fibroblàstiques estimulades amb PDGF (Lee et al., 2001); iii) Rac està

implicat en l'activació de p38 en el procés de transdiferenciació epitelio-mesenquimal regulat per TGF $\beta$  (Bakin et al., 2002). En el nostre model d'estudi basat en cèl·lules C2C12 estimulades amb BMP-2, l'anàlisi de la contribució de les PAKs i de les Rho GTPases en l'activació de la via de senyalització de p38 mostra que les proteïnes Pak1 i Cdc42 no estan involucrades en regulació de la ruta de p38 (Figura R27). Els nostres resultats també són coherents amb els obtinguts per altres grups que han descrit la participació paral·lela i independent d'aquestes dues rutes en altres models de migració quimiotàctica (Rousseau et al., 2006). També s'ha descrit que existeixen casos de *crossstalk* en sentit contrari; per exemple, resultats de Kaur R et al. han demostrat que MKK6 pot fosforilar la proteïna Pak6 (Kaur et al., 2005). En conjunt, els resultats obtinguts indiquen que són necessaris experiments futurs per tenir una idea més completa de la contribució i la interrelació de les vies de senyalització que orquestren la mobilització d'actina involucrada en la quimiotaxi en resposta a BMPs. El conjunt d'aquests darrers resultats suggereixen que la relació entre la via de senyalització que involucra les GTPases de la família Rho/PAK i les proteïnes de la cascada de senyalització de p38 varia en funció de l'estímul estudiat i/o del tipus cel·lular.

Pel que fa a la relació entre la ruta de p38 $\alpha$ -MK2 i la Cdc42/PI3K-PAK-LIMK1, Kobayashi et al. han demostrat que en cèl·lules endotelials estimulades amb VEGF, l'activitat LIMK1 és regulada directament per MK2 (Kobayashi et al., 2006). Els autors demostren que MK2 catalitza la fosforilació de LIMK1 al residu Ser323 i que aquesta fosforilació és essencial en la formació de fibres d'estrès, la migració cel·lular i la formació de microtúbuls en resposta a VEGF. Els resultats que mostren indiquen que la ruta MKK6-p38-MK2 regula directament l'activitat de LIMK1 i que els efectes observats en resposta a VEGF són independents de la fosforilació del residu Thr508 de LIMK1. Tenint en compte que el residu Ser323 es localitza a la regió de la LIMK1 que connecta el domini PDZ i el domini quinasa, els autors suggereixen que la fosforilació en Ser323 per part de MK2 incrementa l'activitat de LIMK1 induint un canvi conformacional que allibera l'efecte l'autoinhibitori de la regió N-terminal. L'expressió de formes dominant negatives de les petites GTPases i PAK suprimeixen l'activació de MK2 i LIMK1 dependent de VEGF, fet que els fa concloure que les GTPases i PAK regulen l'activitat de LIMK1 a través de l'activació de MK2, però no a través de la fosforilació directe en Thr508. Els autors del treball suggereixen que l'activació de LIMK1 per part de les GTPases i PAK deu estar protegida per separació d'aquestes proteïnes en les cèl·lules. Basant-nos en aquest treball, estem realitzant actualment alguns experiments per explorar la possibilitat que MK2 reguli l'activitat de LIMK1. Resultats

preliminars indiquen que la sobreexpressió d'una forma constitutivament activa de MKK6 no modula l'activitat quinasa de LIMK1 (resultats no mostrats), malgrat això s'han de realitzar més aproximacions experimentals per estudiar si en cèl·lules C2C12 estimulades amb BMP-2, l'activitat LIMK1 està regulada per la via de senyalització de p38.



**Figura D4. Esquema de les vies de senyalització involucrades en el control de la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular per part de BMP-2.** BMP-2 induïx la reorganització del citoesquelet d'actina involucrada en la migració de les cèl·lules C2C12 a través de l'activació de dues vies de senyalització que actuen de manera paral·lela. BMP-2 induïx l'activació de Cdc42 i PI3K, proteïnes que conflueixen en l'activació de varis membres de la família PAK i de LIMK1, que induïx la fosforilació de la cofilina i afavoreix l'estabilització dels filaments d'actina. Per altra banda, BMP-2 induïx l'activació de la via de senyalització de la p38MAPK i del seu substrat MK2, regulant d'aquesta manera hsp27 i promovent la polimerització dels filaments d'actina. Fins al moment no s'ha demostrat que existeixi *cross-talk* entre ambdues rutes en aquest model cel·lular.

Les conclusions que es desprenen d'aquest treball aporten nous coneixements al marc general de la regulació intracel·lular de la dinàmica del citoesquelet d'actina involucrada en el control de la migració cel·lular. Les evidències experimentals mostrades indiquen que la dinàmica del citoesquelet d'actina de cèl·lules mioblàstiques C2C12 és controlada per múltiples vies de senyalització en resposta a membres de la subfamília de BMPs (Figura D4). En un futur es requeriran estudis encaminats a determinar com els diferents models cel·lulars utilitzen les diferents rutes i si aquestes rutes senyalitzen de manera sinèrgica o independent en la regulació del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.

# CONCLUSIONS

- 1/ BMP-2 indueix la migració cel·lular quimiotàctica de les cèl·lules C2C12.
- 2/ BMP-2 indueix la migració cel·lular a través de la reorganització del citoesquelet d'actina, afavorint la formació de protrusions d'actina.
- 3/ La regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina per part de BMP-2 es caracteritza per esser ràpida, reversible i independent de les proteïnes de la família Smad.
- 4/ BMP-2 regula la mobilització dels filaments d'actina i la migració cel·lular a través de l'activació paral·lela i independent de Cdc42 i PI3K.
- 5/ L'activitat PI3K i Cdc42 estimulada per BMP-2 està implicada en la regulació de l'activitat de varis membres de la família de proteïnes PAK, que alhora regulen la LIMK1, proteïna implicada en el control de la polimerització dels filaments d'actina a través de la fosforilació de la cofilina.
- 6/ La regió C-terminal de BMPRII no resulta imprescindible per part de BMP-2 en la regulació de la mobilització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular.
- 7/ L'activitat de la MAPK p38 $\alpha$  resulta imprescindible en la regulació de la dinàmica del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular dependent de BMP-2.
- 8/ La MAPK p38 regula la polimerització del citoesquelet d'actina i la migració cel·lular a través d'una via de senyalització que involucra MK2 i hsp27.





---

# REFERÈNCIES

- Abo, A., Qu, J., Cammarano, M. S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B., and Minden, A. (1998). PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *Embo J* *17*, 6527-6540.
- Adams, R. H., Porras, A., Alonso, G., Jones, M., Vintersten, K., Panelli, S., Valladares, A., Perez, L., Klein, R., and Nebreda, A. R. (2000). Essential role of p38alpha MAP kinase in placental but not embryonic cardiovascular development. *Mol Cell* *6*, 109-116.
- Ahmed, T., Shea, K., Masters, J. R., Jones, G. E., and Wells, C. M. (2008). A PAK4-LIMK1 pathway drives prostate cancer cell migration downstream of HGF. *Cell Signal* *20*, 1320-1328.
- Alblas, J., Ulfman, L., Hordijk, P., and Koenderman, L. (2001). Activation of RhoA and ROCK are essential for detachment of migrating leukocytes. *Mol Biol Cell* *12*, 2137-2145.
- Allen, W. E., Zicha, D., Ridley, A. J., and Jones, G. E. (1998). A role for Cdc42 in macrophage chemotaxis. *J Cell Biol* *141*, 1147-1157.
- Amano, M., Ito, M., Kimura, K., Fukata, Y., Chihara, K., Nakano, T., Matsuura, Y., and Kaibuchi, K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). *J Biol Chem* *271*, 20246-20249.
- Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase. *Nature* *393*, 805-809.
- Attisano, L., Wrana, J. L., Montalvo, E., and Massague, J. (1996). Activation of signalling by the activin receptor complex. *Mol Cell Biol* *16*, 1066-1073.
- Backer, J. M. (2008). The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* *410*, 1-17.
- Bakin, A. V., Rinehart, C., Tomlinson, A. K., and Arteaga, C. L. (2002). p38 mitogen-activated protein kinase is required for TGFbeta-mediated fibroblastic transdifferentiation and cell migration. *J Cell Sci* *115*, 3193-3206.
- Bakin, A. V., Tomlinson, A. K., Bhowmick, N. A., Moses, H. L., and Arteaga, C. L. (2000). Phosphatidylinositol 3-kinase function is required for transforming growth factor beta-mediated epithelial to mesenchymal transition and cell migration. *J Biol Chem* *275*, 36803-36810.
- Bamburg, J. R. (1999). Proteins of the ADF/cofilin family: essential regulators of actin dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* *15*, 185-230.

- Bamburg, J. R., McGough, A., and Ono, S. (1999). Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. *Trends Cell Biol* 9, 364-370.
- Bamburg, J. R., and Wiggan, O. P. (2002). ADF/cofilin and actin dynamics in disease. *Trends Cell Biol* 12, 598-605.
- Benndorf, R., Hayess, K., Ryazantsev, S., Wieske, M., Behlke, J., and Lutsch, G. (1994). Phosphorylation and supramolecular organization of murine small heat shock protein HSP25 abolish its actin polymerization-inhibiting activity. *J Biol Chem* 269, 20780-20784.
- Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T., and Miyazono, K. (2000). BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. *Dev Biol* 221, 249-258.
- Bernard, O. (2007). Lim kinases, regulators of actin dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 1071-1076.
- Bhowmick, N. A., Ghiassi, M., Bakin, A., Aakre, M., Lundquist, C. A., Engel, M. E., Arteaga, C. L., and Moses, H. L. (2001a). Transforming growth factor-beta1 mediates epithelial to mesenchymal transdifferentiation through a RhoA-dependent mechanism. *Mol Biol Cell* 12, 27-36.
- Bhowmick, N. A., Zent, R., Ghiassi, M., McDonnell, M., and Moses, H. L. (2001b). Integrin beta 1 signaling is necessary for transforming growth factor-beta activation of p38MAPK and epithelial plasticity. *J Biol Chem* 276, 46707-46713.
- Bienz, M. (2002). The subcellular destinations of APC proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 328-338.
- Bilancio, A., Okkenhaug, K., Camps, M., Emery, J. L., Ruckle, T., Rommel, C., and Vanhaesebroeck, B. (2006). Key role of the p110delta isoform of PI3K in B-cell antigen and IL-4 receptor signaling: comparative analysis of genetic and pharmacologic interference with p110delta function in B cells. *Blood* 107, 642-650.
- Billottet, C., Grandage, V. L., Gale, R. E., Quattropiani, A., Rommel, C., Vanhaesebroeck, B., and Khwaja, A. (2006). A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene* 25, 6648-6659.
- Bishop, A. L., and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-255.
- Bitterman, P. B., Rennard, S. I., Adelberg, S., and Crystal, R. G. (1983). Role of fibronectin as a growth factor for fibroblasts. *J Cell Biol* 97, 1925-1932.
- Bokoch, G. M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* 72, 743-781.
- Bosse, T., Ehinger, J., Czuchra, A., Benesch, S., Steffen, A., Wu, X., Schloen, K., Niemann, H. H., Scita, G., Stradal, T. E., et al. (2007). Cdc42 and phosphoinositide 3-kinase drive Rac-mediated actin polymerization downstream of c-Met in distinct and common pathways. *Mol Cell Biol* 27, 6615-6628.
- Boyd, P. J., Doyle, J., Gee, E., Pallan, S., and Haas, T. L. (2005). MAPK signaling regulates endothelial cell assembly into networks and expression of MT1-MMP and MMP-2. *Am J Physiol Cell Physiol* 288, C659-668.
- Cain, R. J., and Ridley, A. J. (2009). Phosphoinositide 3-kinases in cell migration. *Biol Cell* 101, 13-29.
- Camps, M., Ruckle, T., Ji, H., Ardissonne, V., Rintelen, F., Shaw, J., Ferrandi, C., Chabert, C., Gillieron, C., Francon, B., et al. (2005). Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat Med* 11, 936-943.
- Carlier, M. F., Ressad, F., and Pantaloni, D. (1999). Control of actin dynamics in cell motility. Role of ADF/cofilin. *J Biol Chem* 274, 33827-33830.
- Castrillon, D. H., and Wasserman, S. A. (1994). Diaphanous is required for cytokinesis in *Drosophila* and shares domains of similarity with the products of the limb deformity gene. *Development* 120, 3367-3377.
- Chacko, B. M., Qin, B. Y., Tiwari, A., Shi, G., Lam, S., Hayward, L. J., De Caestecker, M., and Lin, K. (2004). Structural basis of heteromeric smad protein assembly in TGF-beta signaling. *Mol Cell* 15, 813-823.
- Chambard, J. C., and Pognonec, P. (1998). A reliable way of obtaining stable inducible clones. *Nucleic Acids Res* 26, 3443-3444.
- Chamberlain, M. D., Berry, T. R., Pastor, M. C., and Anderson, D. H. (2004). The p85alpha subunit of phosphatidylinositol 3'-kinase binds to and stimulates the GTPase activity of Rab proteins. *J Biol Chem* 279, 48607-48614.
- Chan, M. C., Nguyen, P. H., Davis, B. N., Ohoka, N., Hayashi, H., Du, K., Lagna, G., and Hata, A. (2007). A novel regulatory mechanism of the bone morphogenetic protein (BMP)

- signaling pathway involving the carboxyl-terminal tail domain of BMP type II receptor. *Mol Cell Biol* 27, 5776-5789.
- Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.
- Charest, P. G., and Firtel, R. A. (2007). Big roles for small GTPases in the control of directed cell movement. *Biochem J* 401, 377-390.
- Chen, F., and Weinberg, R. A. (1995). Biochemical evidence for the autophosphorylation and transphosphorylation of transforming growth factor beta receptor kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 1565-1569.
- Chen, Y. G., Hata, A., Lo, R. S., Wotton, D., Shi, Y., Pavletich, N., and Massague, J. (1998). Determinants of specificity in TGF-beta signal transduction. *Genes Dev* 12, 2144-2152.
- Cheung, P. C., Campbell, D. G., Nebreda, A. R., and Cohen, P. (2003). Feedback control of the protein kinase TAK1 by SAPK2a/p38alpha. *Embo J* 22, 5793-5805.
- Chiariello, M., Marinissen, M. J., and Gutkind, J. S. (2001). Regulation of c-myc expression by PDGF through Rho GTPases. *Nat Cell Biol* 3, 580-586.
- Clark, R. A., Wikner, N. E., Doherty, D. E., and Norris, D. A. (1988). Cryptic chemotactic activity of fibronectin for human monocytes resides in the 120-kDa fibroblastic cell-binding fragment. *J Biol Chem* 263, 12115-12123.
- Cohen, S. N., Chang, A. C., and Hsu, L. (1972). Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 2110-2114.
- Constantin, G., Majeed, M., Giagulli, C., Piccio, L., Kim, J. Y., Butcher, E. C., and Laudanna, C. (2000). Chemokines trigger immediate beta2 integrin affinity and mobility changes: differential regulation and roles in lymphocyte arrest under flow. *Immunity* 13, 759-769.
- Coso, O. A., Chiariello, M., Yu, J. C., Teramoto, H., Crespo, P., Xu, N., Miki, T., and Gutkind, J. S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.
- Cote, J. F., and Vuori, K. (2007). GEF what? Dock180 and related proteins help Rac to polarize cells in new ways. *Trends Cell Biol* 17, 383-393.
- Cuenda, A., Cohen, P., Buee-Scherrer, V., and Goedert, M. (1997). Activation of stress-activated protein kinase-3 (SAPK3) by cytokines and cellular stresses is mediated via SAPKK3 (MKK6); comparison of the specificities of SAPK3 and SAPK2 (RK/p38). *Embo J* 16, 295-305.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y. N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T. F., Young, P. R., and Lee, J. C. (1995). SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett* 364, 229-233.
- Czuchra, A., Wu, X., Meyer, H., van Hengel, J., Schroeder, T., Geffers, R., Rottner, K., and Brakebusch, C. (2005). Cdc42 is not essential for filopodium formation, directed migration, cell polarization, and mitosis in fibroblastoid cells. *Mol Biol Cell* 16, 4473-4484.
- Dan, C., Kelly, A., Bernard, O., and Minden, A. (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J Biol Chem* 276, 32115-32121.
- Datta, S. R., Brunet, A., and Greenberg, M. E. (1999). Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev* 13, 2905-2927.
- Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A., and Hall, A. (2001). Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* 276, 1677-1680.
- De Caestecker, M., and Meyrick, B. (2001). Bone morphogenetic proteins, genetics and the pathophysiology of primary pulmonary hypertension. *Respir Res* 2, 193-197.
- de Jesus Perez, V. A., Alastalo, T. P., Wu, J. C., Axelrod, J. D., Cooke, J. P., Amieva, M., and Rabinovitch, M. (2009). Bone morphogenetic protein 2 induces pulmonary angiogenesis via Wnt-beta-catenin and Wnt-RhoA-Rac1 pathways. *J Cell Biol* 184, 83-99.
- De Robertis, E. M., and Kuroda, H. (2004). Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 285-308.
- Derynck, R., and Zhang, Y. E. (2003). Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature* 425, 577-584.
- Desai, A., and Mitchison, T. J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 83-117.
- Di Guglielmo, G. M., Le Roy, C., Goodfellow, A. F., and Wrana, J. L. (2003). Distinct endocytic pathways regulate TGF-beta receptor signalling and turnover. *Nat Cell Biol* 5, 410-421.

- Domin, J., Harper, L., Aubyn, D., Wheeler, M., Florey, O., Haskard, D., Yuan, M., and Zicha, D. (2005). The class II phosphoinositide 3-kinase PI3K-C2beta regulates cell migration by a PtdIns3P dependent mechanism. *J Cell Physiol* *205*, 452-462.
- Domin, J., Pages, F., Volinia, S., Rittenhouse, S. E., Zvelebil, M. J., Stein, R. C., and Waterfield, M. D. (1997). Cloning of a human phosphoinositide 3-kinase with a C2 domain that displays reduced sensitivity to the inhibitor wortmannin. *Biochem J* *326* ( Pt 1), 139-147.
- Du, K., Herzig, S., Kulkarni, R. N., and Montminy, M. (2003). TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science* *300*, 1574-1577.
- Dudas, M., Sridurongrit, S., Nagy, A., Okazaki, K., and Kaartinen, V. (2004). Craniofacial defects in mice lacking BMP type I receptor Alk2 in neural crest cells. *Mech Dev* *121*, 173-182.
- During, R. L., Gibson, B. G., Li, W., Bishai, E. A., Sidhu, G. S., Landry, J., and Southwick, F. S. (2007). Anthrax lethal toxin paralyzes actin-based motility by blocking Hsp27 phosphorylation. *Embo J* *26*, 2240-2250.
- Eaton, B. A., and Davis, G. W. (2005). LIM Kinase1 controls synaptic stability downstream of the type II BMP receptor. *Neuron* *47*, 695-708.
- Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T. K., Kawabata, M., Miyazono, K., and Imamura, T. (1999). Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J Cell Sci* *112* ( Pt 20), 3519-3527.
- Eden, S., Rohatgi, R., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., and Kirschner, M. W. (2002). Mechanism of regulation of WAVE1-induced actin nucleation by Rac1 and Nck. *Nature* *418*, 790-793.
- Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C. H., and Aspenstrom, P. (2002). Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol Biol Cell* *13*, 902-914.
- Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C. H., and Aspenstrom, P. (2004). Smad7 is required for TGF-beta-induced activation of the small GTPase Cdc42. *J Cell Sci* *117*, 1835-1847.
- Edwards, D. C., and Gill, G. N. (1999). Structural features of LIM kinase that control effects on the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* *274*, 11352-11361.
- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., and Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat Cell Biol* *1*, 253-259.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* *420*, 629-635.
- Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2003). Cdc42 regulates GSK-3beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* *421*, 753-756.
- Etienne-Manneville, S., Manneville, J. B., Nicholls, S., Ferenczi, M. A., and Hall, A. (2005). Cdc42 and Par6-PKCzeta regulate the spatially localized association ofDlg1 and APC to control cell polarization. *J Cell Biol* *170*, 895-901.
- Evangelista, M., Pruyne, D., Amberg, D. C., Boone, C., and Bretscher, A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol* *4*, 260-269.
- Eyers, C. E., McNeill, H., Knebel, A., Morrice, N., Arthur, S. J., Cuenda, A., and Cohen, P. (2005). The phosphorylation of CapZ-interacting protein (CapZIP) by stress-activated protein kinases triggers its dissociation from CapZ. *Biochem J* *389*, 127-135.
- Eyers, P. A., Craxton, M., Morrice, N., Cohen, P., and Goedert, M. (1998). Conversion of SB 203580-insensitive MAP kinase family members to drug-sensitive forms by a single amino-acid substitution. *Chem Biol* *5*, 321-328.
- Feijoo, C., Campbell, D. G., Jakes, R., Goedert, M., and Cuenda, A. (2005). Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly. *J Cell Sci* *118*, 397-408.
- Feil, R., Hofmann, F., and Kleppisch, T. (2005). Function of cGMP-dependent protein kinases in the nervous system. *Rev Neurosci* *16*, 23-41.
- Feng, X. H., and Derynck, R. (1997). A kinase subdomain of transforming growth factor-beta (TGF-beta) type I receptor determines the TGF-beta intracellular signaling specificity. *Embo J* *16*, 3912-3923.
- Feng, X. H., and Derynck, R. (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 659-693.
- Fenteany, G., and Glogauer, M. (2004). Cytoskeletal remodeling in leukocyte function. *Curr Opin Hematol* *11*, 15-24.
- Ferreira, A. M., Isaacs, H., Hayflick, J. S., Rogers, K. A., and Sandig, M. (2006). The p110delta isoform of PI3K differentially regulates beta1 and beta2 integrin-mediated monocyte adhesion and spreading and modulates diapedesis. *Microcirculation* *13*, 439-456.

- Fiedler, J., Roderer, G., Gunther, K. P., and Brenner, R. E. (2002). BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J Cell Biochem* 87, 305-312.
- Foletta, V. C., Lim, M. A., Soosairajah, J., Kelly, A. P., Stanley, E. G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massague, J., and Bernard, O. (2003). Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J Cell Biol* 162, 1089-1098.
- Foster, F. M., Traer, C. J., Abraham, S. M., and Fry, M. J. (2003). The phosphoinositide (PI) 3-kinase family. *J Cell Sci* 116, 3037-3040.
- Frame, M. C. (2002). Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim Biophys Acta* 1602, 114-130.
- Freshney, N. W., Rawlinson, L., Guesdon, F., Jones, E., Cowley, S., Hsuan, J., and Saklatvala, J. (1994). Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell* 78, 1039-1049.
- Friedl, P., Hegerfeldt, Y., and Tusch, M. (2004). Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int J Dev Biol* 48, 441-449.
- Fry, M. J. (2001). Phosphoinositide 3-kinase signalling in breast cancer: how big a role might it play? *Breast Cancer Res* 3, 304-312.
- Fukata, M., Nakagawa, M., and Kaibuchi, K. (2003). Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* 15, 590-597.
- Fukata, M., Watanabe, T., Noritake, J., Nakagawa, M., Yamaga, M., Kuroda, S., Matsuura, Y., Iwamatsu, A., Perez, F., and Kaibuchi, K. (2002). Rac1 and Cdc42 capture microtubules through IQGAP1 and CLIP-170. *Cell* 109, 873-885.
- Gallea, S., Lallemand, F., Atfi, A., Rawadi, G., Ramez, V., Spinella-Jaegle, S., Kawai, S., Faucheu, C., Huet, L., Baron, R., and Roman-Roman, S. (2001). Activation of mitogen-activated protein kinase cascades is involved in regulation of bone morphogenetic protein-2-induced osteoblast differentiation in pluripotent C2C12 cells. *Bone* 28, 491-498.
- Gallo, G., and Letourneau, P. (2002). Axon guidance: proteins turnover in turning growth cones. *Curr Biol* 12, R560-562.
- Gallo, K. A., and Johnson, G. L. (2002). Mixed-lineage kinase control of JNK and p38 MAPK pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 663-672.
- Gammill, L. S., and Bronner-Fraser, M. (2003). Neural crest specification: migrating into genomics. *Nat Rev Neurosci* 4, 795-805.
- Gardiner, E. M., Pestonjamas, K. N., Bohl, B. P., Chamberlain, C., Hahn, K. M., and Bokoch, G. M. (2002). Spatial and temporal analysis of Rac activation during live neutrophil chemotaxis. *Curr Biol* 12, 2029-2034.
- Gatti, A., Huang, Z., Tuazon, P. T., and Traugh, J. A. (1999). Multisite autophosphorylation of p21-activated protein kinase gamma-PAK as a function of activation. *J Biol Chem* 274, 8022-8028.
- Gavard, J., Lambert, M., Grosheva, I., Marthiens, V., Irinopoulou, T., Riou, J. F., Bershadsky, A., and Mege, R. M. (2004). Lamellipodium extension and cadherin adhesion: two cell responses to cadherin activation relying on distinct signalling pathways. *J Cell Sci* 117, 257-270.
- Gerszten, R. E., Friedrich, E. B., Matsui, T., Hung, R. R., Li, L., Force, T., and Rosenzweig, A. (2001). Role of phosphoinositide 3-kinase in monocyte recruitment under flow conditions. *J Biol Chem* 276, 26846-26851.
- Ghosh-Choudhury, N., Abboud, S. L., Chandrasekar, B., and Ghosh Choudhury, G. (2003). BMP-2 regulates cardiomyocyte contractility in a phosphatidylinositol 3 kinase-dependent manner. *FEBS Lett* 544, 181-184.
- Ghosh-Choudhury, N., Abboud, S. L., Nishimura, R., Celeste, A., Mahimainathan, L., and Choudhury, G. G. (2002). Requirement of BMP-2-induced phosphatidylinositol 3-kinase and Akt serine/threonine kinase in osteoblast differentiation and Smad-dependent BMP-2 gene transcription. *J Biol Chem* 277, 33361-33368.
- Gilboa, L., Nohe, A., Geissendorfer, T., Sebald, W., Henis, Y. I., and Knaus, P. (2000). Bone morphogenetic protein receptor complexes on the surface of live cells: a new oligomerization mode for serine/threonine kinase receptors. *Mol Biol Cell* 11, 1023-1035.
- Ginsberg, M. H., Partridge, A., and Shattil, S. J. (2005). Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol* 17, 509-516.
- Goedert, M., Cuenda, A., Craxton, M., Jakes, R., and Cohen, P. (1997). Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J* 16, 3563-3571.

- Goldstein, A. M., Brewer, K. C., Doyle, A. M., Nagy, N., and Roberts, D. J. (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech Dev* *122*, 821-833.
- Goldstein, B., and Macara, I. G. (2007). The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization. *Dev Cell* *13*, 609-622.
- Govek, E. E., Newey, S. E., and Van Aelst, L. (2005). The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* *19*, 1-49.
- Graupera, M., Guillermet-Guibert, J., Foukas, L. C., Phng, L. K., Cain, R. J., Salpekar, A., Pearce, W., Meek, S., Millan, J., Cutillas, P. R., *et al.* (2008). Angiogenesis selectively requires the p110alpha isoform of PI3K to control endothelial cell migration. *Nature* *453*, 662-666.
- Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J. N., Huot, J., and Landry, J. (1997). Regulation of actin filament dynamics by p38 map kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *J Cell Sci* *110* ( Pt 3), 357-368.
- Guicheux, J., Lemonnier, J., Ghayor, C., Suzuki, A., Palmer, G., and Caverzasio, J. (2003). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun-NH2-terminal kinase by BMP-2 and their implication in the stimulation of osteoblastic cell differentiation. *J Bone Miner Res* *18*, 2060-2068.
- Gum, R. J., McLaughlin, M. M., Kumar, S., Wang, Z., Bower, M. J., Lee, J. C., Adams, J. L., Livi, G. P., Goldsmith, E. J., and Young, P. R. (1998). Acquisition of sensitivity of stress-activated protein kinases to the p38 inhibitor, SB 203580, by alteration of one or more amino acids within the ATP binding pocket. *J Biol Chem* *273*, 15605-15610.
- Gundersen, G. G. (2002). Microtubule capture: IQGAP and CLIP-170 expand the repertoire. *Curr Biol* *12*, R645-647.
- Guo, F., Deidda, M., Yang, L., Williams, D. A., and Zheng, Y. (2006). Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *J Biol Chem* *281*, 18652-18659.
- Gurdon, J. B., and Bourillot, P. Y. (2001). Morphogen gradient interpretation. *Nature* *413*, 797-803.
- Han, J., Lee, J. D., Bibbs, L., and Ulevitch, R. J. (1994). A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science* *265*, 808-811.
- Han, J., Luby-Phelps, K., Das, B., Shu, X., Xia, Y., Mosteller, R. D., Krishna, U. M., Falck, J. R., White, M. A., and Broek, D. (1998). Role of substrates and products of PI 3-kinase in regulating activation of Rac-related guanosine triphosphatases by Vav. *Science* *279*, 558-560.
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1999). Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* *274*, 27161-27167.
- Hannigan, M. O., Zhan, L., Ai, Y., Kotlyarov, A., Gaestel, M., and Huang, C. K. (2001). Abnormal migration phenotype of mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2/- neutrophils in Zigmund chambers containing formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine gradients. *J Immunol* *167*, 3953-3961.
- Hartung, A., Bitton-Worms, K., Rechtman, M. M., Wenzel, V., Boergermann, J. H., Hassel, S., Henis, Y. I., and Knaus, P. (2006). Different routes of bone morphogenic protein (BMP) receptor endocytosis influence BMP signaling. *Mol Cell Biol* *26*, 7791-7805.
- Hasegawa, M., Cuenda, A., Spillantini, M. G., Thomas, G. M., Buee-Scherrer, V., Cohen, P., and Goedert, M. (1999). Stress-activated protein kinase-3 interacts with the PDZ domain of alpha1-syntrophin. A mechanism for specific substrate recognition. *J Biol Chem* *274*, 12626-12631.
- Hassel, S., Schmitt, S., Hartung, A., Roth, M., Nohe, A., Petersen, N., Ehrlich, M., Henis, Y. I., Sebald, W., and Knaus, P. (2003). Initiation of Smad-dependent and Smad-independent signaling via distinct BMP-receptor complexes. *J Bone Joint Surg Am* *85-A Suppl 3*, 44-51.
- Hata, A., Lagna, G., Massague, J., and Hemmati-Brivanlou, A. (1998). Smad6 inhibits BMP/Smad1 signaling by specifically competing with the Smad4 tumor suppressor. *Genes Dev* *12*, 186-197.
- Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K., and Stephens, L. R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* *34*, 647-662.
- Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y. Y., Grinnell, B. W., Richardson, M. A., Topper, J. N., Gimbrone, M. A., Jr., Wrana, J. L., and Falb, D. (1997). The MAD-related protein Smad7 associates with the TGFbeta receptor and functions as an antagonist of TGFbeta signaling. *Cell* *89*, 1165-1173.

- Hedges, J. C., Dechert, M. A., Yamboliev, I. A., Martin, J. L., Hickey, E., Weber, L. A., and Gerthoffer, W. T. (1999). A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration. *J Biol Chem* *274*, 24211-24219.
- Heit, B., Tavener, S., Raharjo, E., and Kubes, P. (2002). An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. *J Cell Biol* *159*, 91-102.
- Heldin, C. H., Miyazono, K., and ten Dijke, P. (1997). TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* *390*, 465-471.
- Heuertz, R. M., Tricomi, S. M., Ezekiel, U. R., and Webster, R. O. (1999). C-reactive protein inhibits chemotactic peptide-induced p38 mitogen-activated protein kinase activity and human neutrophil movement. *J Biol Chem* *274*, 17968-17974.
- Hill, C. S., Wynne, J., and Treisman, R. (1995). The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell* *81*, 1159-1170.
- Hocking, J. C., Hehr, C. L., Bertolesi, G., Funakoshi, H., Nakamura, T., and McFarlane, S. (2009). LIMK1 acts downstream of BMP signaling in developing retinal ganglion cell axons but not dendrites. *Dev Biol* *330*, 273-285.
- Hogan, B. L. (1996a). Bone morphogenetic proteins in development. *Curr Opin Genet Dev* *6*, 432-438.
- Hogan, B. L. (1996b). Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development. *Genes Dev* *10*, 1580-1594.
- Hu, J. H., Chen, T., Zhuang, Z. H., Kong, L., Yu, M. C., Liu, Y., Zang, J. W., and Ge, B. X. (2007). Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cell Signal* *19*, 393-400.
- Hu, M. C., Wasserman, D., Hartwig, S., and Rosenblum, N. D. (2004). p38MAPK acts in the BMP7-dependent stimulatory pathway during epithelial cell morphogenesis and is regulated by Smad1. *J Biol Chem* *279*, 12051-12059.
- Huang, C., Borchers, C. H., Schaller, M. D., and Jacobson, K. (2004). Phosphorylation of paxillin by p38MAPK is involved in the neurite extension of PC-12 cells. *J Cell Biol* *164*, 593-602.
- Huang, T. Y., DerMardirossian, C., and Bokoch, G. M. (2006). Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr Opin Cell Biol* *18*, 26-31.
- Huot, J., Houle, F., Marceau, F., and Landry, J. (1997). Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circ Res* *80*, 383-392.
- Huot, J., Houle, F., Rousseau, S., Deschesnes, R. G., Shah, G. M., and Landry, J. (1998). SAPK2/p38-dependent F-actin reorganization regulates early membrane blebbing during stress-induced apoptosis. *J Cell Biol* *143*, 1361-1373.
- Huot, J., Houle, F., Spitz, D. R., and Landry, J. (1996). HSP27 phosphorylation-mediated resistance against actin fragmentation and cell death induced by oxidative stress. *Cancer Res* *56*, 273-279.
- Iden, S., and Collard, J. G. (2008). Crosstalk between small GTPases and polarity proteins in cell polarization. *Nat Rev Mol Cell Biol* *9*, 846-859.
- Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J., Kawabata, M., and Miyazono, K. (1997). Smad6 inhibits signalling by the TGF-beta superfamily. *Nature* *389*, 622-626.
- Innocenti, M., Frittoli, E., Ponzanelli, I., Falck, J. R., Brachmann, S. M., Di Fiore, P. P., and Scita, G. (2003). Phosphoinositide 3-kinase activates Rac by entering in a complex with Eps8, Abi1, and Sos-1. *J Cell Biol* *160*, 17-23.
- Inoue, T., and Meyer, T. (2008). Synthetic activation of endogenous PI3K and Rac identifies an AND-gate switch for cell polarization and migration. *PLoS One* *3*, e3068.
- Ishizaki, T., Morishima, Y., Okamoto, M., Furuyashiki, T., Kato, T., and Narumiya, S. (2001). Coordination of microtubules and the actin cytoskeleton by the Rho effector mDia1. *Nat Cell Biol* *3*, 8-14.
- Ishizuka, T., Okajima, F., Ishiwara, M., Iizuka, K., Ichimonji, I., Kawata, T., Tsukagoshi, H., Dobashi, K., Nakazawa, T., and Mori, M. (2001). Sensitized mast cells migrate toward the antigen: a response regulated by p38 mitogen-activated protein kinase and Rho-associated coiled-coil-forming protein kinase. *J Immunol* *167*, 2298-2304.
- Itoh, S., Landstrom, M., Hermansson, A., Itoh, F., Heldin, C. H., Heldin, N. E., and ten Dijke, P. (1998). Transforming growth factor beta1 induces nuclear export of inhibitory Smad7. *J Biol Chem* *273*, 29195-29201.
- Iwasaki, S., Iguchi, M., Watanabe, K., Hoshino, R., Tsujimoto, M., and Kohno, M. (1999). Specific activation of the p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathway and induction of neurite outgrowth in PC12 cells by bone morphogenetic protein-2. *J Biol Chem* *274*, 26503-26510.

- Jackson, S. P., Schoenwaelder, S. M., Goncalves, I., Nesbitt, W. S., Yap, C. L., Wright, C. E., Kenche, V., Anderson, K. E., Doppeide, S. M., Yuan, Y., *et al.* (2005). PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat Med* *11*, 507-514.
- Jaffe, A. B., and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* *21*, 247-269.
- Jaffer, Z. M., and Chernoff, J. (2002). p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* *34*, 713-717.
- Jikko, A., Harris, S. E., Chen, D., Mendrick, D. L., and Damsky, C. H. (1999). Collagen integrin receptors regulate early osteoblast differentiation induced by BMP-2. *J Bone Miner Res* *14*, 1075-1083.
- Jimbo, T., Kawasaki, Y., Koyama, R., Sato, R., Takada, S., Haraguchi, K., and Akiyama, T. (2002). Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nat Cell Biol* *4*, 323-327.
- Jimenez, C., Portela, R. A., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Collard, J., Serrano, A., Martinez, A. C., Avila, J., and Carrera, A. C. (2000). Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J Cell Biol* *151*, 249-262.
- Jones, M. C., Caswell, P. T., and Norman, J. C. (2006). Endocytic recycling pathways: emerging regulators of cell migration. *Curr Opin Cell Biol* *18*, 549-557.
- Kaur, R., Liu, X., Gjoerup, O., Zhang, A., Yuan, X., Balk, S. P., Schneider, M. C., and Lu, M. L. (2005). Activation of p21-activated kinase 6 by MAP kinase kinase 6 and p38 MAP kinase. *J Biol Chem* *280*, 3323-3330.
- Kawano, Y., Fukata, Y., Oshiro, N., Amano, M., Nakamura, T., Ito, M., Matsumura, F., Inagaki, M., and Kaibuchi, K. (1999). Phosphorylation of myosin-binding subunit (MBS) of myosin phosphatase by Rho-kinase in vivo. *J Cell Biol* *147*, 1023-1038.
- Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O., and Akiyama, T. (2000). Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* *289*, 1194-1197.
- Kendall, S. E., Battelli, C., Irwin, S., Mitchell, J. G., Glackin, C. A., and Verdi, J. M. (2005). NRAGE mediates p38 activation and neural progenitor apoptosis via the bone morphogenetic protein signaling cascade. *Mol Cell Biol* *25*, 7711-7724.
- Kimura, N., Matsuo, R., Shibuya, H., Nakashima, K., and Taga, T. (2000). BMP2-induced apoptosis is mediated by activation of the TAK1-p38 kinase pathway that is negatively regulated by Smad6. *J Biol Chem* *275*, 17647-17652.
- King, C. C., Gardiner, E. M., Zenke, F. T., Bohl, B. P., Newton, A. C., Hemmings, B. A., and Bokoch, G. M. (2000). p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J Biol Chem* *275*, 41201-41209.
- Kiosses, W. B., Daniels, R. H., Otey, C., Bokoch, G. M., and Schwartz, M. A. (1999). A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol* *147*, 831-844.
- Kiosses, W. B., Shattil, S. J., Pampori, N., and Schwartz, M. A. (2001). Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration. *Nat Cell Biol* *3*, 316-320.
- Kishigami, S., and Mishina, Y. (2005). BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev* *16*, 265-278.
- Klekotka, P. A., Santoro, S. A., Wang, H., and Zutter, M. M. (2001). Specific residues within the alpha 2 integrin subunit cytoplasmic domain regulate migration and cell cycle progression via distinct MAPK pathways. *J Biol Chem* *276*, 32353-32361.
- Knight, Z. A., Gonzalez, B., Feldman, M. E., Zunder, E. R., Goldenberg, D. D., Williams, O., Loewith, R., Stokoe, D., Balla, A., Toth, B., *et al.* (2006). A pharmacological map of the PI3-K family defines a role for p110alpha in insulin signaling. *Cell* *125*, 733-747.
- Kobayashi, M., Nishita, M., Mishima, T., Ohashi, K., and Mizuno, K. (2006). MAPKAPK-2-mediated LIM-kinase activation is critical for VEGF-induced actin remodeling and cell migration. *Embo J* *25*, 713-726.
- Kosako, H., Goto, H., Yanagida, M., Matsuzawa, K., Fujita, M., Tomono, Y., Okigaki, T., Odai, H., Kaibuchi, K., and Inagaki, M. (1999). Specific accumulation of Rho-associated kinase at the cleavage furrow during cytokinesis: cleavage furrow-specific phosphorylation of intermediate filaments. *Oncogene* *18*, 2783-2788.
- Kotlyarov, A., Yannoni, Y., Fritz, S., Laass, K., Telliez, J. B., Pitman, D., Lin, L. L., and Gaestel, M. (2002). Distinct cellular functions of MK2. *Mol Cell Biol* *22*, 4827-4835.
- Kovacs, E. M., Ali, R. G., McCormack, A. J., and Yap, A. S. (2002). E-cadherin homophilic ligation directly signals through Rac and phosphatidylinositol 3-kinase to regulate adhesive contacts. *J Biol Chem* *277*, 6708-6718.



- Kraemer, A., Goodwin, M., Verma, S., Yap, A. S., and Ali, R. G. (2007). Rac is a dominant regulator of cadherin-directed actin assembly that is activated by adhesive ligation independently of Tiam1. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C1061-1069.
- Kuma, Y., Campbell, D. G., and Cuenda, A. (2004). Identification of glycogen synthase as a new substrate for stress-activated protein kinase 2b/p38beta. *Biochem J* 379, 133-139.
- Kuntziger, T., Gavet, O., Manceau, V., Sobel, A., and Bornens, M. (2001). Stathmin/Op18 phosphorylation is regulated by microtubule assembly. *Mol Biol Cell* 12, 437-448.
- Kupfer, A., Louvard, D., and Singer, S. J. (1982). Polarization of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in cultured fibroblasts at the edge of an experimental wound. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79, 2603-2607.
- Kyriakis, J. M., and Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* 81, 807-869.
- Lai, C. F., and Cheng, S. L. (2002). Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells. *J Biol Chem* 277, 15514-15522.
- Lander, A. D. (2007). Morpheus unbound: reimagining the morphogen gradient. *Cell* 128, 245-256.
- Landry, J., and Huot, J. (1999). Regulation of actin dynamics by stress-activated protein kinase 2 (SAPK2)-dependent phosphorylation of heat-shock protein of 27 kDa (Hsp27). *Biochem Soc Symp* 64, 79-89.
- Lane, K. B., Machado, R. D., Pauciulo, M. W., Thomson, J. R., Phillips, J. A., 3rd, Loyd, J. E., Nichols, W. C., and Trembath, R. C. (2000). Heterozygous germline mutations in *BMPR2*, encoding a TGF-beta receptor, cause familial primary pulmonary hypertension. The International PPH Consortium. *Nat Genet* 26, 81-84.
- Langenfeld, E. M., Calvano, S. E., Abou-Nukta, F., Lowry, S. F., Amenta, P., and Langenfeld, J. (2003). The mature bone morphogenetic protein-2 is aberrantly expressed in non-small cell lung carcinomas and stimulates tumor growth of A549 cells. *Carcinogenesis* 24, 1445-1454.
- Langenfeld, E. M., Kong, Y., and Langenfeld, J. (2005). Bone morphogenetic protein-2-induced transformation involves the activation of mammalian target of rapamycin. *Mol Cancer Res* 3, 679-684.
- Lavoie, J. N., Hickey, E., Weber, L. A., and Landry, J. (1993). Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268, 24210-24214.
- Lavoie, J. N., Lambert, H., Hickey, E., Weber, L. A., and Landry, J. (1995). Modulation of cellular thermoresistance and actin filament stability accompanies phosphorylation-induced changes in the oligomeric structure of heat shock protein 27. *Mol Cell Biol* 15, 505-516.
- Lawson, K. A., Dunn, N. R., Roelen, B. A., Zeinstra, L. M., Davis, A. M., Wright, C. V., Korving, J. P., and Hogan, B. L. (1999). *Bmp4* is required for the generation of primordial germ cells in the mouse embryo. *Genes Dev* 13, 424-436.
- Lee, J. C., Laydon, J. T., McDonnell, P. C., Gallagher, T. F., Kumar, S., Green, D., McNulty, D., Blumenthal, M. J., Heys, J. R., Landvatter, S. W., and et al. (1994). A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature* 372, 739-746.
- Lee, S. H., Eom, M., Lee, S. J., Kim, S., Park, H. J., and Park, D. (2001). BetaPix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling. *J Biol Chem* 276, 25066-25072.
- Lee, Y. S., and Chuong, C. M. (1997). Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. *J Cell Physiol* 170, 153-165.
- Lee-Hoeflich, S. T., Causing, C. G., Podkova, M., Zhao, X., Wrana, J. L., and Attisano, L. (2004). Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, *BMPRII*, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *Embo J* 23, 4792-4801.
- Lei, M., Lu, W., Meng, W., Parrini, M. C., Eck, M. J., Mayer, B. J., and Harrison, S. C. (2000). Structure of PAK1 in an autoinhibited conformation reveals a multistage activation switch. *Cell* 102, 387-397.
- Li, F., and Higgs, H. N. (2003). The mouse Formin *mDia1* is a potent actin nucleation factor regulated by autoinhibition. *Curr Biol* 13, 1335-1340.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A. V., Wu, G., Li, L., Liu, M., et al. (2003). Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* 114, 215-227.

- Lian, L., Wang, Y., Draznin, J., Eslin, D., Bennett, J. S., Poncz, M., Wu, D., and Abrams, C. S. (2005). The relative role of PLCbeta and PI3Kgamma in platelet activation. *Blood* *106*, 110-117.
- Lin, H. Y., Wang, X. F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R. A., and Lodish, H. F. (1992). Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* *68*, 775-785.
- Lind, M., Eriksen, E. F., and Bunger, C. (1996). Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. *Bone* *18*, 53-57.
- Lopez-Rovira, T., Chaloux, E., Massague, J., Rosa, J. L., and Ventura, F. (2002). Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J Biol Chem* *277*, 3176-3185.
- Lu, C. C., Brennan, J., and Robertson, E. J. (2001). From fertilization to gastrulation: axis formation in the mouse embryo. *Curr Opin Genet Dev* *11*, 384-392.
- Ma, S., and Chisholm, R. L. (2002). Cytoplasmic dynein-associated structures move bidirectionally in vivo. *J Cell Sci* *115*, 1453-1460.
- Machado, R. D., Pauciulo, M. W., Thomson, J. R., Lane, K. B., Morgan, N. V., Wheeler, L., Phillips, J. A., 3rd, Newman, J., Williams, D., Galie, N., *et al.* (2001). BMPR2 haploinsufficiency as the inherited molecular mechanism for primary pulmonary hypertension. *Am J Hum Genet* *68*, 92-102.
- Machado, R. D., Rudarakanchana, N., Atkinson, C., Flanagan, J. A., Harrison, R., Morrell, N. W., and Trembath, R. C. (2003). Functional interaction between BMPR-II and Tctex-1, a light chain of Dynein, is isoform-specific and disrupted by mutations underlying primary pulmonary hypertension. *Hum Mol Genet* *12*, 3277-3286.
- Macias-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M., and Wrana, J. L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J Biol Chem* *273*, 25628-25636.
- Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K., and Narumiya, S. (1999). Signaling from Rho to the actin cytoskeleton through protein kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* *285*, 895-898.
- Maffucci, T., Cooke, F. T., Foster, F. M., Traer, C. J., Fry, M. J., and Falasca, M. (2005). Class II phosphoinositide 3-kinase defines a novel signaling pathway in cell migration. *J Cell Biol* *169*, 789-799.
- Manabe, R., Whitmore, L., Weiss, J. M., and Horwitz, A. R. (2002). Identification of a novel microtubule-associated protein that regulates microtubule organization and cytokinesis by using a GFP-screening strategy. *Curr Biol* *12*, 1946-1951.
- Mancini, R., Piccolo, E., Mariggio, S., Filippi, B. M., Iurisci, C., Pertile, P., Berrie, C. P., and Corda, D. (2003). Reorganization of actin cytoskeleton by the phosphoinositide metabolite glycerophosphoinositol 4-phosphate. *Mol Biol Cell* *14*, 503-515.
- Manser, E., Leung, T., Salihuddin, H., Zhao, Z. S., and Lim, L. (1994). A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* *367*, 40-46.
- Massague, J. (1990). The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol* *6*, 597-641.
- Massague, J. (1998). TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem* *67*, 753-791.
- Massague, J., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1994). The TGF-beta family and its composite receptors. *Trends Cell Biol* *4*, 172-178.
- Massague, J., Blain, S. W., and Lo, R. S. (2000). TGFbeta signaling in growth control, cancer, and heritable disorders. *Cell* *103*, 295-309.
- McLachlan, R. W., Kraemer, A., Helwani, F. M., Kovacs, E. M., and Yap, A. S. (2007). E-cadherin adhesion activates c-Src signaling at cell-cell contacts. *Mol Biol Cell* *18*, 3214-3223.
- Merlot, S., and Firtel, R. A. (2003). Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J Cell Sci* *116*, 3471-3478.
- Miron, T., Vancompennolle, K., Vandekerckhove, J., Wilchek, M., and Geiger, B. (1991). A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J Cell Biol* *114*, 255-261.
- Mirzapooiazova, T., Kolosova, I. A., Romer, L., Garcia, J. G., and Verin, A. D. (2005). The role of caldesmon in the regulation of endothelial cytoskeleton and migration. *J Cell Physiol* *203*, 520-528.
- Mishina, Y., Suzuki, A., Ueno, N., and Behringer, R. R. (1995). *Bmpr* encodes a type I bone morphogenetic protein receptor that is essential for gastrulation during mouse embryogenesis. *Genes Dev* *9*, 3027-3037.

- Mitchison, T. J., and Cramer, L. P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* *84*, 371-379.
- Miyazono, K. (2002). A new partner for inhibitory Smads. *Cytokine Growth Factor Rev* *13*, 7-9.
- Montaner, S., Perona, R., Saniger, L., and Lacal, J. C. (1998). Multiple signalling pathways lead to the activation of the nuclear factor kappaB by the Rho family of GTPases. *J Biol Chem* *273*, 12779-12785.
- Monzen, K., Shiojima, I., Hiroi, Y., Kudoh, S., Oka, T., Takimoto, E., Hayashi, D., Hosoda, T., Habara-Ohkubo, A., Nakaoka, T., *et al.* (1999). Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol* *19*, 7096-7105.
- Moon, S. Y., and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* *13*, 13-22.
- Moren, A., Imamura, T., Miyazono, K., Heldin, C. H., and Moustakas, A. (2005). Degradation of the tumor suppressor Smad4 by WW and HECT domain ubiquitin ligases. *J Biol Chem* *280*, 22115-22123.
- Morreale, A., Venkatesan, M., Mott, H. R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P. N., and Laue, E. D. (2000). Structure of Cdc42 bound to the GTPase binding domain of PAK. *Nat Struct Biol* *7*, 384-388.
- Morrell, N. W., Yang, X., Upton, P. D., Jourdan, K. B., Morgan, N., Sheares, K. K., and Trembath, R. C. (2001). Altered growth responses of pulmonary artery smooth muscle cells from patients with primary pulmonary hypertension to transforming growth factor-beta(1) and bone morphogenetic proteins. *Circulation* *104*, 790-795.
- Moustakas, A., and Heldin, C. H. (2005). Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci* *118*, 3573-3584.
- Moustakas, A., Souchelnytskyi, S., and Heldin, C. H. (2001). Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* *114*, 4359-4369.
- Mudgett, J. S., Ding, J., Guh-Siesel, L., Chartrain, N. A., Yang, L., Gopal, S., and Shen, M. M. (2000). Essential role for p38alpha mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *97*, 10454-10459.
- Nagata, K., Ohashi, K., Yang, N., and Mizuno, K. (1999). The N-terminal LIM domain negatively regulates the kinase activity of LIM-kinase 1. *Biochem J* *343 Pt 1*, 99-105.
- Nagy, A., and Rossant, J. (2001). Chimaeras and mosaics for dissecting complex mutant phenotypes. *Int J Dev Biol* *45*, 577-582.
- Nakamura, K., Shirai, T., Morishita, S., Uchida, S., Saeki-Miura, K., and Makishima, F. (1999). p38 mitogen-activated protein kinase functionally contributes to chondrogenesis induced by growth/differentiation factor-5 in ATDC5 cells. *Exp Cell Res* *250*, 351-363.
- Nakamura, M., Zhou, X. Z., and Lu, K. P. (2001). Critical role for the EB1 and APC interaction in the regulation of microtubule polymerization. *Curr Biol* *11*, 1062-1067.
- Nakao, A., Afrakhte, M., Moren, A., Nakayama, T., Christian, J. L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N. E., Heldin, C. H., and ten Dijke, P. (1997). Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature* *389*, 631-635.
- Narumiya, S., Tanji, M., and Ishizaki, T. (2009). Rho signaling, ROCK and mDia1, in transformation, metastasis and invasion. *Cancer Metastasis Rev* *28*, 65-76.
- Nathke, I. S., Adams, C. L., Polakis, P., Sellin, J. H., and Nelson, W. J. (1996). The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol* *134*, 165-179.
- Nebreda, A. R., and Porras, A. (2000). p38 MAP kinases: beyond the stress response. *Trends Biochem Sci* *25*, 257-260.
- Ng, J. (2008). TGF-beta signals regulate axonal development through distinct Smad-independent mechanisms. *Development* *135*, 4025-4035.
- Nguyen, J., Gogusev, J., Knapnougel, P., and Bauvois, B. (2006). Protein tyrosine kinase and p38 MAP kinase pathways are involved in stimulation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human monocytes. *Immunol Lett* *106*, 34-41.
- Nimnual, A. S., Taylor, L. J., and Bar-Sagi, D. (2003). Redox-dependent downregulation of Rho by Rac. *Nat Cell Biol* *5*, 236-241.
- Nishihara, A., Watabe, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2002). Functional heterogeneity of bone morphogenetic protein receptor-II mutants found in patients with primary pulmonary hypertension. *Mol Biol Cell* *13*, 3055-3063.
- Nissinen, L., Pirila, L., and Heino, J. (1997). Bone morphogenetic protein-2 is a regulator of cell adhesion. *Exp Cell Res* *230*, 377-385.

- Niwa, R., Nagata-Ohashi, K., Takeichi, M., Mizuno, K., and Uemura, T. (2002). Control of actin reorganization by Slingshot, a family of phosphatases that dephosphorylate ADF/cofilin. *Cell* *108*, 233-246.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* *81*, 53-62.
- Nobes, C. D., and Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol* *144*, 1235-1244.
- Nohe, A., Hassel, S., Ehrlich, M., Neubauer, F., Sebald, W., Henis, Y. I., and Knaus, P. (2002). The mode of bone morphogenetic protein (BMP) receptor oligomerization determines different BMP-2 signaling pathways. *J Biol Chem* *277*, 5330-5338.
- Nohe, A., Keating, E., Underhill, T. M., Knaus, P., and Petersen, N. O. (2003). Effect of the distribution and clustering of the type I A BMP receptor (ALK3) with the type II BMP receptor on the activation of signalling pathways. *J Cell Sci* *116*, 3277-3284.
- Nohno, T., Ishikawa, T., Saito, T., Hosokawa, K., Noji, S., Wolsing, D. H., and Rosenbaum, J. S. (1995). Identification of a human type II receptor for bone morphogenetic protein-4 that forms differential heteromeric complexes with bone morphogenetic protein type I receptors. *J Biol Chem* *270*, 22522-22526.
- Noth, U., Tuli, R., Seghatoleslami, R., Howard, M., Shah, A., Hall, D. J., Hickok, N. J., and Tuan, R. S. (2003). Activation of p38 and Smads mediates BMP-2 effects on human trabecular bone-derived osteoblasts. *Exp Cell Res* *291*, 201-211.
- Obermeier, A., Ahmed, S., Manser, E., Yen, S. C., Hall, C., and Lim, L. (1998). PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *Embo J* *17*, 4328-4339.
- Ohno, S. (2001). Intercellular junctions and cellular polarity: the PAR-aPKC complex, a conserved core cassette playing fundamental roles in cell polarity. *Curr Opin Cell Biol* *13*, 641-648.
- Ohoka, N., Yoshii, S., Hattori, T., Onozaki, K., and Hayashi, H. (2005). TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *Embo J* *24*, 1243-1255.
- Olson, M. F., Ashworth, A., and Hall, A. (1995). An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science* *269*, 1270-1272.
- Pacifici, R., Basilio, C., Roman, J., Zutter, M. M., Santoro, S. A., and McCracken, R. (1992). Collagen-induced release of interleukin 1 from human blood mononuclear cells. Potentiation by fibronectin binding to the alpha 5 beta 1 integrin. *J Clin Invest* *89*, 61-67.
- Pages, G., Berra, E., Milanini, J., Levy, A. P., and Pouyssegur, J. (2000). Stress-activated protein kinases (JNK and p38/HOG) are essential for vascular endothelial growth factor mRNA stability. *J Biol Chem* *275*, 26484-26491.
- Palazzo, A. F., Cook, T. A., Alberts, A. S., and Gundersen, G. G. (2001). mDia mediates Rho-regulated formation and orientation of stable microtubules. *Nat Cell Biol* *3*, 723-729.
- Paliouras, G. N., Naujokas, M. A., and Park, M. (2009). Pak4, a novel Gab1 binding partner, modulates cell migration and invasion by the Met receptor. *Mol Cell Biol* *29*, 3018-3032.
- Pandey, A., Dan, I., Kristiansen, T. Z., Watanabe, N. M., Voldby, J., Kajikawa, E., Khosravi-Far, R., Blagoev, B., and Mann, M. (2002). Cloning and characterization of PAK5, a novel member of mammalian p21-activated kinase-II subfamily that is predominantly expressed in brain. *Oncogene* *21*, 3939-3948.
- Papakonstanti, E. A., Ridley, A. J., and Vanhaesebroeck, B. (2007). The p110delta isoform of PI 3-kinase negatively controls RhoA and PTEN. *Embo J* *26*, 3050-3061.
- Papakonstanti, E. A., and Stournaras, C. (2002). Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization. *Mol Biol Cell* *13*, 2946-2962.
- Pavlov, D., Muhlrud, A., Cooper, J., Wear, M., and Reisler, E. (2007). Actin filament severing by cofilin. *J Mol Biol* *365*, 1350-1358.
- Pece, S., Chiariello, M., Murga, C., and Gutkind, J. S. (1999). Activation of the protein kinase Akt/PKB by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell junctions. Evidence for the association of phosphatidylinositol 3-kinase with the E-cadherin adhesion complex. *J Biol Chem* *274*, 19347-19351.
- Pegtel, D. M., Ellenbroek, S. I., Mertens, A. E., van der Kammen, R. A., de Rooij, J., and Collard, J. G. (2007). The Par-Tiam1 complex controls persistent migration by stabilizing microtubule-dependent front-rear polarity. *Curr Biol* *17*, 1623-1634.
- Perdiguero, E., Ruiz-Bonilla, V., Gresh, L., Hui, L., Ballestar, E., Sousa-Victor, P., Baeza-Raja, B., Jardi, M., Bosch-Comas, A., Esteller, M., *et al.* (2007). Genetic analysis of p38 MAP

- kinases in myogenesis: fundamental role of p38alpha in abrogating myoblast proliferation. *Embo J* 26, 1245-1256.
- Perona, R., Montaner, S., Saniger, L., Sanchez-Perez, I., Bravo, R., and Lacal, J. C. (1997). Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev* 11, 463-475.
- Persson, U., Izumi, H., Souchelnytskyi, S., Itoh, S., Grimsby, S., Engstrom, U., Heldin, C. H., Funai, K., and ten Dijke, P. (1998). The L45 loop in type I receptors for TGF-beta family members is a critical determinant in specifying Smad isoform activation. *FEBS Lett* 434, 83-87.
- Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., and De Robertis, E. M. (1996). Dorsoventral patterning in *Xenopus*: inhibition of ventral signals by direct binding of chordin to BMP-4. *Cell* 86, 589-598.
- Pichon, S., Bryckaert, M., and Berrou, E. (2004). Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells. *J Cell Sci* 117, 2569-2577.
- Pierre, P., Scheel, J., Rickard, J. E., and Kreis, T. E. (1992). CLIP-170 links endocytic vesicles to microtubules. *Cell* 70, 887-900.
- Piotrowicz, R. S., Hickey, E., and Levin, E. G. (1998). Heat shock protein 27 kDa expression and phosphorylation regulates endothelial cell migration. *Faseb J* 12, 1481-1490.
- Pomel, V., Klicic, J., Covini, D., Church, D. D., Shaw, J. P., Roulin, K., Burgat-Charvillon, F., Valognes, D., Camps, M., Chabert, C., et al. (2006). Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J Med Chem* 49, 3857-3871.
- Puri, A., McGoan, M. D., and Kushwaha, S. S. (2007). Pulmonary arterial hypertension: current therapeutic strategies. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4, 319-329.
- Puri, K. D., Doggett, T. A., Douangpanya, J., Hou, Y., Tino, W. T., Wilson, T., Graf, T., Clayton, E., Turner, M., Hayflick, J. S., and Diacovo, T. G. (2004). Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood* 103, 3448-3456.
- Qi, L., Heredia, J. E., Altarejos, J. Y., Sreaton, R., Goebel, N., Niessen, S., Macleod, I. X., Liew, C. W., Kulkarni, R. N., Bain, J., et al. (2006). TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science* 312, 1763-1766.
- Qi, X., Li, T. G., Hao, J., Hu, J., Wang, J., Simmons, H., Miura, S., Mishina, Y., and Zhao, G. Q. (2004). BMP4 supports self-renewal of embryonic stem cells by inhibiting mitogen-activated protein kinase pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6027-6032.
- Raftopoulou, M., and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev Biol* 265, 23-32.
- Rich, S., Dantzker, D. R., Ayres, S. M., Bergofsky, E. H., Brundage, B. H., Detre, K. M., Fishman, A. P., Goldring, R. M., Groves, B. M., Koerner, S. K., and et al. (1987). Primary pulmonary hypertension. A national prospective study. *Ann Intern Med* 107, 216-223.
- Ricos, M. G., Harden, N., Sem, K. P., Lim, L., and Chia, W. (1999). Dcdc42 acts in TGF-beta signaling during *Drosophila* morphogenesis: distinct roles for the Drac1/JNK and Dcdc42/TGF-beta cascades in cytoskeletal regulation. *J Cell Sci* 112 ( Pt 8), 1225-1235.
- Ridley, A. J. (2001). Rho family proteins: coordinating cell responses. *Trends Cell Biol* 11, 471-477.
- Ridley, A. J. (2006). Rho GTPases and actin dynamics in membrane protrusions and vesicle trafficking. *Trends Cell Biol* 16, 522-529.
- Ridley, A. J., and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70, 389-399.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T., and Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Rohatgi, R., Ma, L., Miki, H., Lopez, M., Kirchhausen, T., Takenawa, T., and Kirschner, M. W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42-dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231.
- Rohatgi, R., Nollau, P., Ho, H. Y., Kirschner, M. W., and Mayer, B. J. (2001). Nck and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate synergistically activate actin polymerization through the N-WASP-Arp2/3 pathway. *J Biol Chem* 276, 26448-26452.
- Roig, J., Tuazon, P. T., Zipfel, P. A., Pendergast, A. M., and Traugh, J. A. (2000). Functional interaction between c-Abl and the p21-activated protein kinase gamma-PAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 14346-14351.

- Roovers, K., and Assoian, R. K. (2003). Effects of rho kinase and actin stress fibers on sustained extracellular signal-regulated kinase activity and activation of G(1) phase cyclin-dependent kinases. *Mol Cell Biol* 23, 4283-4294.
- Rosenzweig, B. L., Imamura, T., Okadome, T., Cox, G. N., Yamashita, H., ten Dijke, P., Heldin, C. H., and Miyazono, K. (1995). Cloning and characterization of a human type II receptor for bone morphogenetic proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7632-7636.
- Rothhammer, T., Poser, I., Soncin, F., Bataille, F., Moser, M., and Bosserhoff, A. K. (2005). Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration. *Cancer Res* 65, 448-456.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamanillo, D., Hunt, T., and Nebreda, A. R. (1994). A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027-1037.
- Rousseau, S., Dolado, I., Beardmore, V., Shpiro, N., Marquez, R., Nebreda, A. R., Arthur, J. S., Case, L. M., Tessier-Lavigne, M., Gaestel, M., et al. (2006). CXCL12 and C5a trigger cell migration via a PAK1/2-p38alpha MAPK-MAPKAP-K2-HSP27 pathway. *Cell Signal* 18, 1897-1905.
- Rousseau, S., Houle, F., and Huot, J. (2000). Integrating the VEGF signals leading to actin-based motility in vascular endothelial cells. *Trends Cardiovasc Med* 10, 321-327.
- Rousseau, S., Houle, F., Landry, J., and Huot, J. (1997). p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. *Oncogene* 15, 2169-2177.
- Ruckle, T., Biamonte, M., Grippi-Vallotton, T., Arkininstall, S., Cambet, Y., Camps, M., Chabert, C., Church, D. J., Halazy, S., Jiang, X., et al. (2004). Design, synthesis, and biological activity of novel, potent, and selective (benzoylaminoethyl)thiophene sulfonamide inhibitors of c-Jun-N-terminal kinase. *J Med Chem* 47, 6921-6934.
- Rugina, M., Caras, I., Jurcut, R., Jurcut, C., Serbanescu, F., Salageanu, A., and Apetrei, E. (2007). Systemic inflammatory markers in patients with aortic sclerosis. *Roum Arch Microbiol Immunol* 66, 10-16.
- Sabio, G., Arthur, J. S., Kuma, Y., Peggie, M., Carr, J., Murray-Tait, V., Centeno, F., Goedert, M., Morrice, N. A., and Cuenda, A. (2005). p38gamma regulates the localisation of SAP97 in the cytoskeleton by modulating its interaction with GKAP. *Embo J* 24, 1134-1145.
- Sabio, G., Reuver, S., Feijoo, C., Hasegawa, M., Thomas, G. M., Centeno, F., Kuhlendahl, S., Leal-Ortiz, S., Goedert, M., Garner, C., and Cuenda, A. (2004). Stress- and mitogen-induced phosphorylation of the synapse-associated protein SAP90/PSD-95 by activation of SAPK3/p38gamma and ERK1/ERK2. *Biochem J* 380, 19-30.
- Sadhu, C., Dick, K., Tino, W. T., and Staunton, D. E. (2003). Selective role of PI3K delta in neutrophil inflammatory responses. *Biochem Biophys Res Commun* 308, 764-769.
- Sagot, I., Rodal, A. A., Moseley, J., Goode, B. L., and Pellman, D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol* 4, 626-631.
- Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A., and Collard, J. G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147, 1009-1022.
- Sanders, L. C., Matsumura, F., Bokoch, G. M., and de Lanerolle, P. (1999). Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* 283, 2083-2085.
- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T., and Ishii, S. (1999). ATF-2 is a common nuclear target of Smad and TAK1 pathways in transforming growth factor-beta signaling. *J Biol Chem* 274, 8949-8957.
- Schlossmann, J., Feil, R., and Hofmann, F. (2005). Insights into cGMP signalling derived from cGMP kinase knockout mice. *Front Biosci* 10, 1279-1289.
- Schmidt, A., and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-1609.
- Schmitz, A. A., Govek, E. E., Bottner, B., and Van Aelst, L. (2000). Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res* 261, 1-12.
- Schwappacher, R., Weiske, J., Heining, E., Ezerski, V., Marom, B., Henis, Y. I., Huber, O., and Knaus, P. (2009). Novel crosstalk to BMP signalling: cGMP-dependent kinase I modulates BMP receptor and Smad activity. *Embo J* 28, 1537-1550.
- Scott, R. W., and Olson, M. F. (2007). LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J Mol Med*.

- Sela-Donenfeld, D., and Kalcheim, C. (1999). Regulation of the onset of neural crest migration by coordinated activity of BMP4 and Noggin in the dorsal neural tube. *Development* *126*, 4749-4762.
- Sells, M. A. (1999). Pictures in cell biology. Pak1 kinase activity affects the character of cell morphology and movement. *Trends Cell Biol* *9*, 355.
- Sepp, K. J., and Auld, V. J. (2003). Reciprocal interactions between neurons and glia are required for *Drosophila* peripheral nervous system development. *J Neurosci* *23*, 8221-8230.
- Shah, A. K., Lazatin, J., Sinha, R. K., Lennox, T., Hickok, N. J., and Tuan, R. S. (1999). Mechanism of BMP-2 stimulated adhesion of osteoblastic cells to titanium alloy. *Biol Cell* *91*, 131-142.
- Shi, W., Sun, C., He, B., Xiong, W., Shi, X., Yao, D., and Cao, X. (2004). GADD34-PP1c recruited by Smad7 dephosphorylates TGFbeta type I receptor. *J Cell Biol* *164*, 291-300.
- Shi, Y., and Massague, J. (2003). Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* *113*, 685-700.
- Shirakabe, K., Yamaguchi, K., Shibuya, H., Irie, K., Matsuda, S., Moriguchi, T., Gotoh, Y., Matsumoto, K., and Nishida, E. (1997). TAK1 mediates the ceramide signaling to stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* *272*, 8141-8144.
- Siegrist, S. E., and Doe, C. Q. (2007). Microtubule-induced cortical cell polarity. *Genes Dev* *21*, 483-496.
- Simon, C., Goepfert, H., and Boyd, D. (1998). Inhibition of the p38 mitogen-activated protein kinase by SB 203580 blocks PMA-induced Mr 92,000 type IV collagenase secretion and in vitro invasion. *Cancer Res* *58*, 1135-1139.
- Somanath, P. R., Kandel, E. S., Hay, N., and Byzova, T. V. (2007). Akt1 signaling regulates integrin activation, matrix recognition, and fibronectin assembly. *J Biol Chem* *282*, 22964-22976.
- Sossey-Alaoui, K., Ranalli, T. A., Li, X., Bakin, A. V., and Cowell, J. K. (2005). WAVE3 promotes cell motility and invasion through the regulation of MMP-1, MMP-3, and MMP-9 expression. *Exp Cell Res* *308*, 135-145.
- Sotobori, T., Ueda, T., Myoui, A., Yoshioka, K., Nakasaki, M., Yoshikawa, H., and Itoh, K. (2006). Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp Cell Res* *312*, 3927-3938.
- Srinivasan, S., Wang, F., Glavas, S., Ott, A., Hofmann, F., Aktories, K., Kalman, D., and Bourne, H. R. (2003). Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis. *J Cell Biol* *160*, 375-385.
- Stanyon, C. A., and Bernard, O. (1999). LIM-kinase1. *Int J Biochem Cell Biol* *31*, 389-394.
- Stephens, L., Ellison, C., and Hawkins, P. (2002). Roles of PI3Ks in leukocyte chemotaxis and phagocytosis. *Curr Opin Cell Biol* *14*, 203-213.
- Stokoe, D., Engel, K., Campbell, D. G., Cohen, P., and Gaestel, M. (1992). Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett* *313*, 307-313.
- Sugimori, K., Matsui, K., Motomura, H., Tokoro, T., Wang, J., Higa, S., Kimura, T., and Kitajima, I. (2005). BMP-2 prevents apoptosis of the N1511 chondrocytic cell line through PI3K/Akt-mediated NF-kappaB activation. *J Bone Miner Metab* *23*, 411-419.
- Suire, S., Coadwell, J., Ferguson, G. J., Davidson, K., Hawkins, P., and Stephens, L. (2005). p84, a new Gbetagamma-activated regulatory subunit of the type IB phosphoinositide 3-kinase p110gamma. *Curr Biol* *15*, 566-570.
- Sumi, T., Matsumoto, K., Shibuya, A., and Nakamura, T. (2001). Activation of LIM kinases by myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase alpha. *J Biol Chem* *276*, 23092-23096.
- Sun, H. W., Li, C. J., Chen, H. Q., Lin, H. L., Lv, H. X., Zhang, Y., and Zhang, M. (2007). Involvement of integrins, MAPK, and NF-kappaB in regulation of the shear stress-induced MMP-9 expression in endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* *353*, 152-158.
- Suzuki, K., Wilkes, M. C., Garamszegi, N., Edens, M., and Leof, E. B. (2007). Transforming growth factor beta signaling via Ras in mesenchymal cells requires p21-activated kinase 2 for extracellular signal-regulated kinase-dependent transcriptional responses. *Cancer Res* *67*, 3673-3682.
- Sweeney, H. L., and Holzbaur, E. L. (1996). Mutational analysis of motor proteins. *Annu Rev Physiol* *58*, 751-792.

- Tadokoro, S., Shattil, S. J., Eto, K., Tai, V., Liddington, R. C., de Pereda, J. M., Ginsberg, M. H., and Calderwood, D. A. (2003). Talin binding to integrin beta tails: a final common step in integrin activation. *Science* *302*, 103-106.
- Takaishi, K., Sasaki, T., Kameyama, T., Tsukita, S., and Takai, Y. (1995). Translocation of activated Rho from the cytoplasm to membrane ruffling area, cell-cell adhesion sites and cleavage furrows. *Oncogene* *11*, 39-48.
- Takenawa, T., and Miki, H. (2001). WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci* *114*, 1801-1809.
- Tang, Y., Zhou, H., Chen, A., Pittman, R. N., and Field, J. (2000). The Akt proto-oncogene links Ras to Pak and cell survival signals. *J Biol Chem* *275*, 9106-9109.
- ten Dijke, P. (2006). Bone morphogenetic protein signal transduction in bone. *Curr Med Res Opin* *22 Suppl 1*, S7-11.
- ten Dijke, P., Fu, J., Schaap, P., and Roelen, B. A. (2003). Signal transduction of bone morphogenetic proteins in osteoblast differentiation. *J Bone Joint Surg Am* *85-A Suppl 3*, 34-38.
- Ten Dijke, P., Goumans, M. J., Itoh, F., and Itoh, S. (2002). Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* *191*, 1-16.
- ten Dijke, P., Yamashita, H., Ichijo, H., Franzen, P., Laiho, M., Miyazono, K., and Heldin, C. H. (1994). Characterization of type I receptors for transforming growth factor-beta and activin. *Science* *264*, 101-104.
- Teramoto, H., Malek, R. L., Behbahani, B., Castellone, M. D., Lee, N. H., and Gutkind, J. S. (2003). Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes. *Oncogene* *22*, 2689-2697.
- Thomas, P. Q., Brown, A., and Beddington, R. S. (1998). Hex: a homeobox gene revealing peri-implantation asymmetry in the mouse embryo and an early transient marker of endothelial cell precursors. *Development* *125*, 85-94.
- Thomson, J. R., Machado, R. D., Pauculo, M. W., Morgan, N. V., Humbert, M., Elliott, G. C., Ward, K., Yacoub, M., Mikhail, G., Rogers, P., *et al.* (2000). Sporadic primary pulmonary hypertension is associated with germline mutations of the gene encoding BMPR-II, a receptor member of the TGF-beta family. *J Med Genet* *37*, 741-745.
- Tsakiridis, T., Taha, C., Grinstein, S., and Klip, A. (1996). Insulin activates a p21-activated kinase in muscle cells via phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* *271*, 19664-19667.
- Tsukazaki, T., Chiang, T. A., Davison, A. F., Attisano, L., and Wrana, J. L. (1998). SARA, a FYVE domain protein that recruits Smad2 to the TGFbeta receptor. *Cell* *95*, 779-791.
- Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Ahmadi, K., Timms, J., Katso, R., Driscoll, P. C., Woscholski, R., Parker, P. J., and Waterfield, M. D. (2001). Synthesis and function of 3-phosphorylated inositol lipids. *Annu Rev Biochem* *70*, 535-602.
- Vanhaesebroeck, B., and Waterfield, M. D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res* *253*, 239-254.
- Vardouli, L., Moustakas, A., and Stournaras, C. (2005). LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* *280*, 11448-11457.
- Vinals, F., Lopez-Rovira, T., Rosa, J. L., and Ventura, F. (2002). Inhibition of PI3K/p70 S6K and p38 MAPK cascades increases osteoblastic differentiation induced by BMP-2. *FEBS Lett* *510*, 99-104.
- Virbasius, J. V., Guilherme, A., and Czech, M. P. (1996). Mouse p170 is a novel phosphatidylinositol 3-kinase containing a C2 domain. *J Biol Chem* *271*, 13304-13307.
- Vitt, U. A., Mazerbourg, S., Klein, C., and Hsueh, A. J. (2002). Bone morphogenetic protein receptor type II is a receptor for growth differentiation factor-9. *Biol Reprod* *67*, 473-480.
- Waite, K. A., and Eng, C. (2003). From developmental disorder to heritable cancer: it's all in the BMP/TGF-beta family. *Nat Rev Genet* *4*, 763-773.
- Wan, M., and Cao, X. (2005). BMP signaling in skeletal development. *Biochem Biophys Res Commun* *328*, 651-657.
- Wang, F., Herzmark, P., Weiner, O. D., Srinivasan, S., Servant, G., and Bourne, H. R. (2002). Lipid products of PI(3)Ks maintain persistent cell polarity and directed motility in neutrophils. *Nat Cell Biol* *4*, 513-518.
- Wang, W., Eddy, R., and Condeelis, J. (2007). The cofilin pathway in breast cancer invasion and metastasis. *Nat Rev Cancer* *7*, 429-440.
- Watanabe, N., and Higashida, C. (2004). Formins: processive cappers of growing actin filaments. *Exp Cell Res* *301*, 16-22.



- Watanabe, N., Madaule, P., Reid, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Nakao, K., Jockusch, B. M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *Embo J* *16*, 3044-3056.
- Weaver, A. M., Young, M. E., Lee, W. L., and Cooper, J. A. (2003). Integration of signals to the Arp2/3 complex. *Curr Opin Cell Biol* *15*, 23-30.
- Wegener, K. L., Partridge, A. W., Han, J., Pickford, A. R., Liddington, R. C., Ginsberg, M. H., and Campbell, I. D. (2007). Structural basis of integrin activation by talin. *Cell* *128*, 171-182.
- Welch, H. C., Coadwell, W. J., Stephens, L. R., and Hawkins, P. T. (2003). Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett* *546*, 93-97.
- Wells, C. M., Abo, A., and Ridley, A. J. (2002). PAK4 is activated via PI3K in HGF-stimulated epithelial cells. *J Cell Sci* *115*, 3947-3956.
- Wen, Z., Han, L., Bamburg, J. R., Shim, S., Ming, G. L., and Zheng, J. Q. (2007). BMP gradients steer nerve growth cones by a balancing act of LIM kinase and Slingshot phosphatase on ADF/cofilin. *J Cell Biol* *178*, 107-119.
- Werle, M., Schmal, U., Hanna, K., and Kreuzer, J. (2002). MCP-1 induces activation of MAP-kinases ERK, JNK and p38 MAPK in human endothelial cells. *Cardiovasc Res* *56*, 284-292.
- Wilkes, M. C., and Leaf, E. B. (2006). Transforming growth factor beta activation of c-Abl is independent of receptor internalization and regulated by phosphatidylinositol 3-kinase and PAK2 in mesenchymal cultures. *J Biol Chem* *281*, 27846-27854.
- Wilkes, M. C., Mitchell, H., Penheiter, S. G., Dore, J. J., Suzuki, K., Edens, M., Sharma, D. K., Pagano, R. E., and Leaf, E. B. (2005). Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res* *65*, 10431-10440.
- Wilkes, M. C., Murphy, S. J., Garamszegi, N., and Leaf, E. B. (2003). Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol Cell Biol* *23*, 8878-8889.
- Wilson, Y. M., Richards, K. L., Ford-Perriss, M. L., Panthier, J. J., and Murphy, M. (2004). Neural crest cell lineage segregation in the mouse neural tube. *Development* *131*, 6153-6162.
- Winnier, G., Blessing, M., Labosky, P. A., and Hogan, B. L. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. *Genes Dev* *9*, 2105-2116.
- Wittmann, T., and Waterman-Storer, C. M. (2001). Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* *114*, 3795-3803.
- Wong, W. K., Knowles, J. A., and Morse, J. H. (2005). Bone morphogenetic protein receptor type II C-terminus interacts with c-Src: implication for a role in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol* *33*, 438-446.
- Woo, C. H., Lim, J. H., and Kim, J. H. (2004). Lipopolysaccharide induces matrix metalloproteinase-9 expression via a mitochondrial reactive oxygen species-p38 kinase-activator protein-1 pathway in Raw 264.7 cells. *J Immunol* *173*, 6973-6980.
- Worth, D. C., and Parsons, M. (2008). Adhesion dynamics: mechanisms and measurements. *Int J Biochem Cell Biol* *40*, 2397-2409.
- Wozney, J. M., Rosen, V., Celeste, A. J., Mitscock, L. M., Whitters, M. J., Kriz, R. W., Hewick, R. M., and Wang, E. A. (1988). Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science* *242*, 1528-1534.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F., and Massague, J. (1994). Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* *370*, 341-347.
- Wu, X., Li, S., Chrostek-Grashoff, A., Czuchra, A., Meyer, H., Yurchenco, P. D., and Brakebusch, C. (2007). Cdc42 is crucial for the establishment of epithelial polarity during early mammalian development. *Dev Dyn* *236*, 2767-2778.
- Yamaguchi, K., Nagai, S., Ninomiya-Tsuji, J., Nishita, M., Tamai, K., Irie, K., Ueno, N., Nishida, E., Shibuya, H., and Matsumoto, K. (1999). XIAP, a cellular member of the inhibitor of apoptosis protein family, links the receptors to TAB1-TAK1 in the BMP signaling pathway. *Embo J* *18*, 179-187.
- Yamashita, M., Fatyol, K., Jin, C., Wang, X., Liu, Z., and Zhang, Y. E. (2008). TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF-beta. *Mol Cell* *31*, 918-924.
- Yang, C., Huang, M., DeBiasio, J., Pring, M., Joyce, M., Miki, H., Takenawa, T., and Zigmund, S. H. (2000). Profilin enhances Cdc42-induced nucleation of actin polymerization. *J Cell Biol* *150*, 1001-1012.

- Yang, N., Higuchi, O., Ohashi, K., Nagata, K., Wada, A., Kangawa, K., Nishida, E., and Mizuno, K. (1998). Cofilin phosphorylation by LIM-kinase 1 and its role in Rac-mediated actin reorganization. *Nature* *393*, 809-812.
- Yano, S., Tokumitsu, H., and Soderling, T. R. (1998). Calcium promotes cell survival through CaM-K kinase activation of the protein-kinase-B pathway. *Nature* *396*, 584-587.
- Yeatman, T. J. (2004). A renaissance for SRC. *Nat Rev Cancer* *4*, 470-480.
- Yi, J. Y., Shin, I., and Arteaga, C. L. (2005). Type I transforming growth factor beta receptor binds to and activates phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* *280*, 10870-10876.
- Ying, Y., Liu, X. M., Marble, A., Lawson, K. A., and Zhao, G. Q. (2000). Requirement of Bmp8b for the generation of primordial germ cells in the mouse. *Mol Endocrinol* *14*, 1053-1063.
- Ying, Y., and Zhao, G. Q. (2001). Cooperation of endoderm-derived BMP2 and extraembryonic ectoderm-derived BMP4 in primordial germ cell generation in the mouse. *Dev Biol* *232*, 484-492.
- Yip, S. C., El-Sibai, M., Coniglio, S. J., Mouneimne, G., Eddy, R. J., Drees, B. E., Neilsen, P. O., Goswami, S., Symons, M., Condeelis, J. S., and Backer, J. M. (2007). The distinct roles of Ras and Rac in PI 3-kinase-dependent protrusion during EGF-stimulated cell migration. *J Cell Sci* *120*, 3138-3146.
- Yoshizaki, H., Ohba, Y., Kurokawa, K., Itoh, R. E., Nakamura, T., Mochizuki, N., Nagashima, K., and Matsuda, M. (2003). Activity of Rho-family GTPases during cell division as visualized with FRET-based probes. *J Cell Biol* *162*, 223-232.
- Yu, P. B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E., and Bloch, K. D. (2005). Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J Biol Chem* *280*, 24443-24450.
- Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* *2*, 107-117.
- Zhang, H., and Bradley, A. (1996). Mice deficient for BMP2 are nonviable and have defects in amnion/chorion and cardiac development. *Development* *122*, 2977-2986.
- Zhang, L., Deng, M., Parthasarathy, R., Wang, L., Mongan, M., Molkentin, J. D., Zheng, Y., and Xia, Y. (2005). MEKK1 transduces activin signals in keratinocytes to induce actin stress fiber formation and migration. *Mol Cell Biol* *25*, 60-65.
- Zhang, S., Fei, T., Zhang, L., Zhang, R., Chen, F., Ning, Y., Han, Y., Feng, X. H., Meng, A., and Chen, Y. G. (2007). Smad7 antagonizes transforming growth factor beta signaling in the nucleus by interfering with functional Smad-DNA complex formation. *Mol Cell Biol* *27*, 4488-4499.
- Zhang, S., Han, J., Sells, M. A., Chernoff, J., Knaus, U. G., Ulevitch, R. J., and Bokoch, G. M. (1995). Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J Biol Chem* *270*, 23934-23936.
- Zhao, Z. S., and Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* *386*, 201-214.
- Zhao, Z. S., Manser, E., Chen, X. Q., Chong, C., Leung, T., and Lim, L. (1998). A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol Cell Biol* *18*, 2153-2163.
- Zhou, G. L., Zhuo, Y., King, C. C., Fryer, B. H., Bokoch, G. M., and Field, J. (2003). Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. *Mol Cell Biol* *23*, 8058-8069.
- Zhou, S., Zawal, L., Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Characterization of human FAST-1, a TGF beta and activin signal transducer. *Mol Cell* *2*, 121-127.
- Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., and Harland, R. M. (1996). The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4. *Cell* *86*, 599-606.
- Zumbrunn, J., Kinoshita, K., Hyman, A. A., and Nathke, I. S. (2001). Binding of the adenomatous polyposis coli protein to microtubules increases microtubule stability and is regulated by GSK3 beta phosphorylation. *Curr Biol* *11*, 44-49.

# BMP2 induction of actin cytoskeleton reorganization and cell migration requires PI3-kinase and Cdc42 activity

Cristina Gamell<sup>1,\*</sup>, Nelson Osses<sup>1,2,\*</sup>, Ramon Bartrons<sup>1</sup>, Thomas Rückle<sup>3</sup>, Montserrat Camps<sup>3</sup>, José Luis Rosa<sup>1</sup> and Francesc Ventura<sup>1,‡</sup>

<sup>1</sup>Departament de Ciències Fisiològiques II, Universitat de Barcelona, IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>2</sup>Instituto de Química, Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Chile

<sup>3</sup>Departments of Chemistry and Signal Transduction, Merck Serono SA, Research Center Geneva, 9, chemin des Mines, 1211 Geneva, Switzerland

\*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (e-mail: fventura@ub.edu)

Accepted 5 September 2008

Journal of Cell Science 121, 3960-3970 Published by The Company of Biologists 2008

doi:10.1242/jcs.031286

## Summary

Bone morphogenetic proteins (BMPs) are potent regulators of several cellular events. We report that exposure of C2C12 cells to BMP2 leads to an increase in cell migration and a rapid rearrangement of the actin filaments into cortical protrusions. These effects required independent and parallel activation of the Cdc42 small GTPase and the  $\alpha$ -isoform of the phosphoinositide 3-kinase (PI3K $\alpha$ ), because ectopic expression of a dominant-negative form of Cdc42 or distinct pharmacological PI3K inhibitors abrogated these responses. Furthermore, we demonstrate that BMP2 activates different

group I and group II PAK isoforms as well as LIMK1 with similar kinetics to Cdc42 or PI3K activation. BMP2 activation of PAK and LIMK1, measured by either kinase activity or with antibodies raised against phosphorylated residues at their activation loops, were abolished by blocking PI3K-signaling pathways. Together, these findings suggest that Cdc42 and PI3K signals emanating from BMP receptors are involved in specific regulation of actin assembly and cell migration.

Key words: BMP, Cell migration, Actin cytoskeleton, PI3K, Cdc42

## Introduction

Cellular motility processes are essential in physiological and pathological situations such as embryonic morphogenesis, cell recruitment during tissue repair and regeneration, angiogenesis and tumor metastasis. An early feature of migrating cells is their polarization and the extension of protrusions, such as lamellipodia or spike-like filopodia, driven by actin polymerization, providing the basis for exploration of the local environment and directional migration (Ridley et al., 2003). Different proteins participate in signal transduction events that modulate actin cytoskeleton reorganization in response to a migration promoter agent. Members of the Rho family of small GTPases Cdc42 and Rac are essential mediators in regulating cytoskeleton dynamics during protrusion formation (Etienne-Manneville and Hall, 2002; Ridley et al., 2003). Small G proteins are activated by the exchange of bound GDP for GTP by a specific activated guanine exchange factor (GEF). Binding of GTP to Cdc42 or Rac allow the activation of p21-activated protein kinase (PAK) family members through binding of the GTPase to a CRIB (Cdc42/Rac interaction-binding) domain, which causes a conformational change on the kinase, inducing autophosphorylation and an increase in its kinase activity (Zhao and Manser, 2005). Activation of PAK has been shown to result in peripheral actin reorganization by phosphorylating substrates such as LIM kinase 1 (LIMK1), which in turn phosphorylates and inactivates cofilin, a protein that promotes depolymerization of F-actin, leading to actin filament stabilization (Edwards et al., 1999). Both PAK activation and cofilin phosphorylation by LIMK1 have a key role in maintaining and

extending protrusions at the leading edge of migrating cells (Cau and Hall, 2005; Dawe et al., 2003).

Directional migration is also controlled by the establishment of an intracellular gradient of phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphate [PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> or PIP<sub>3</sub>] and PI(3,4)P<sub>2</sub> generated at the leading edge by Class I phosphoinositide 3-kinases (PI3Ks) (Ridley et al., 2003). Class I PI3Ks are divided into Class IA (PI3K $\alpha$ , PI3K $\beta$  and PI3K $\delta$ ) and Class IB (PI3K $\gamma$ ). Class IA isoforms (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  and p110 $\delta$ ) form heterodimers with a regulatory subunit known as p85 and are activated specifically in response to growth factor or cytokine receptors, through a tyrosine-kinase-dependent mechanism (Cantley, 2002). In contrast to class IA, PI3K $\gamma$  activation is driven by activation of pertussis-toxin-sensitive G $\alpha_i$ -coupled receptors, such as chemokine or chemoattractant receptors (Suire et al., 2006). Expression of PI3K $\alpha$  and PI3K $\beta$  is ubiquitous, whereas expression of the PI3K $\delta$  and PI3K $\gamma$  isoforms is restricted to the hematopoietic tissue (Wetzker and Rommel, 2004). The increased concentration of PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub> and PtdIns(3,4)P<sub>2</sub> leads to the rapid subcellular relocalization and consequent activation of several effector proteins containing pleckstrin homology (PH) domains, such as Akt, modulating their availability at the leading edge (Chung et al., 2001; Merlot and Firtel, 2003). PIP<sub>3</sub> generation also appears to be required for the relocalization and activation of the small GTPase protein Cdc42 activity (Li et al., 2003) and of different GTP-exchange factor (GEF) proteins by virtue of their PH domains (Merlot and Firtel, 2003), implying a network of positive-feedback loops between small GTPases, PI3K products and

effectors, such as PAK, working together to initiate and maintain the polarity of migrating cells.

Bone morphogenetic proteins (BMPs) belong to the transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) superfamily and have been shown to participate in patterning and specification of several tissues and organs during vertebrate development, and to regulate cell growth, apoptosis and differentiation in different cell types (Capdevila and Izpisua Belmonte, 2001; Massague, 2000). BMPs were originally identified by their ability to induce ectopic bone formation and BMP2, BMP4 and BMP7 have been characterized as key molecules for normal bone development in vertebrates (Wan and Cao, 2005), and can induce osteoblastic differentiation of C2C12 mesenchymal pluripotent cells (Katagiri et al., 1994). Early events in BMP signaling are initiated through the phosphorylation of specific receptor-regulated Smad proteins, namely Smad1, Smad5 or Smad8. After phosphorylation, R-Smads form heteromeric complexes with the common mediator Smad4. These Smad complexes migrate to the nucleus and activate the transcription of specific target genes (Massague, 2000). BMP activity has been also shown to be involved in cell migration. BMP2 signaling is required for migration of neural crest pluripotent population that generates craniofacial structures and enteric nervous system (Dudas et al., 2004; Goldstein et al., 2005; Kishigami and Mishina, 2005). Furthermore, BMP2 induces migration of bone marrow mesenchymal progenitors, osteoblasts and endothelial cells (Fiedler et al., 2002; Lind et al., 1996; Sotobori et al., 2006). Despite the known signaling events leading to the transcriptional activity induced by BMPs, little is known about the signaling pathways involved in BMP2-mediated cell migration. In this study, we report that in pluripotent C2C12 cells, BMP2 induces cell migration and a rapid rearrangement of the actin cytoskeleton, with extension of protrusions resembling filopodia. This effect requires parallel activation of the small GTPase Cdc42 and the class IA PI3K $\alpha$  isoform. Moreover, we also demonstrate that BMP2 activates PAKs and LIMK1 following the same kinetics observed for BMP2 induction of cytoskeletal rearrangement, suggesting their participation in the observed effects. The results presented here provide new information on the signaling mechanisms involved in BMP-induced actin reorganization and cell migration.

## Results

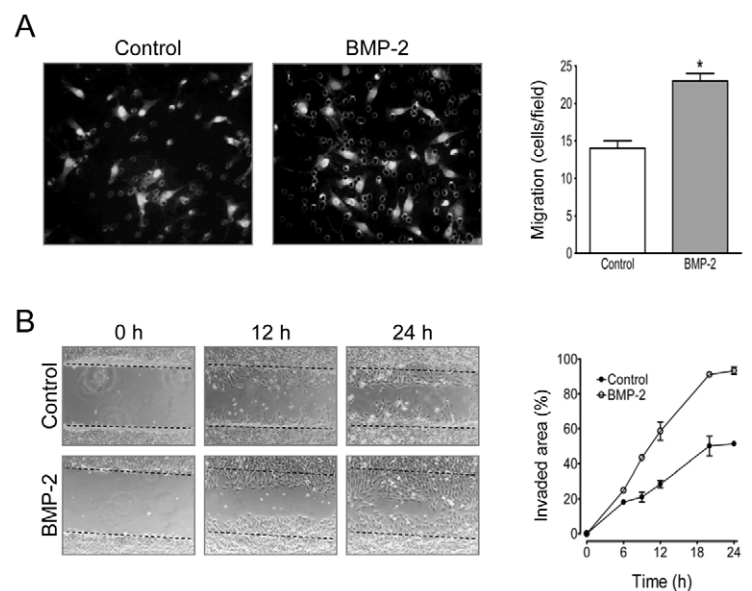
### BMP2 induces cell migration

Several reports indicate that BMPs regulate cell migration during embryonic morphogenesis (Dudas et al., 2004; Goldstein et al., 2005; Kishigami and Mishina, 2005). To test the involvement of BMP2 on C2C12 cell migration, we performed an in vitro migration assay with a chemotaxis chamber. Cells were allowed to migrate for 2 hours in the presence or absence of BMP2 in the lower chamber. Quantification of cell migration revealed that in the presence of BMP2, 70% more cells migrated compared with the control (Fig. 1A), demonstrating that BMP2 induced chemotactic cell migration.

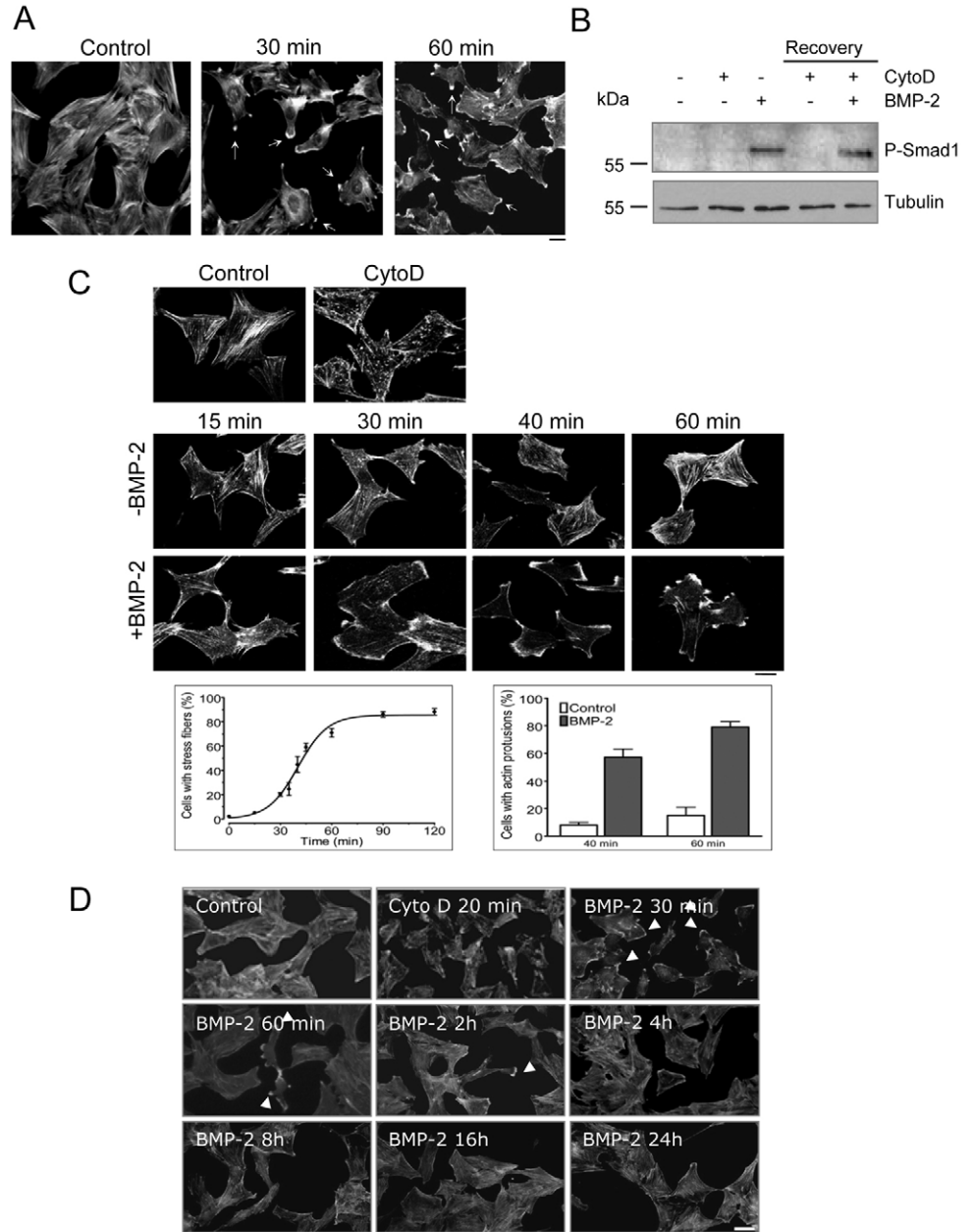
Wound-healing migration assays were performed to confirm the migratory behavior of C2C12 cells in response to BMP2. Cell monolayers were scrape-wounded and allowed to heal in the presence of BMP2. As shown in Fig. 1B, the wound was more efficiently invaded in the presence of BMP2. To quantify this effect, we determined the percentage of invaded area relative to the initial wound area, confirming that BMP2 stimulated cell migration. Furthermore, inhibition of protein synthesis by addition of 1  $\mu$ g/ml cycloheximide 30 minutes before stimulation of the cells with BMP2, had no effect on wound closure (data not shown), suggesting that changes in gene transcription and protein synthesis were not required for BMP2-dependent effects. Similarly, when cells were pretreated with the inhibitor of DNA synthesis mitomycin C (10  $\mu$ g/ml), BMP2 was still able to accelerate the wound closure, indicating that the increase in cell migration is not due to an increase in cell proliferation.

### BMP2 induces actin cytoskeleton reorganization

The control of actin filament assembly is likely to underpin directed cell migration in all cell types (Ridley et al., 2003). To analyze whether BMP2 was playing a role in the organization of the actin cytoskeleton, C2C12 cells were stimulated with BMP2, fixed at different time-points and filamentous actin was visualized (Fig. 2A). BMP2 induced the accumulation of cortical actin to the cell periphery. To emphasize and quantify the effect induced by BMP2, C2C12 cells were pretreated with cytochalasin D, a depolymerizing F-actin agent, to transiently disrupt the actin cytoskeleton. To analyze whether the disruption of the actin filaments affected the BMP2-signaling pathway, phosphorylation of Smad1 was visualized in cells treated with



**Fig. 1.** BMP2 induces chemotactic C2C12 cell migration. (A) Representative images of propidium-iodide-stained C2C12 migrated cells are shown on the left. Quantitative analysis of eight random fields from three independent experiments is shown on the right (mean  $\pm$  s.e.m.; \* $P$ <0.001, paired  $t$ -test). (B) Wounded C2C12 cell monolayers were allowed to migrate in the presence or absence of 3 nM BMP2 for different times. A quantitative analysis of the invaded area was obtained from three photographed fields obtained in at least four independent experiments and represented as mean  $\pm$  s.e.m.



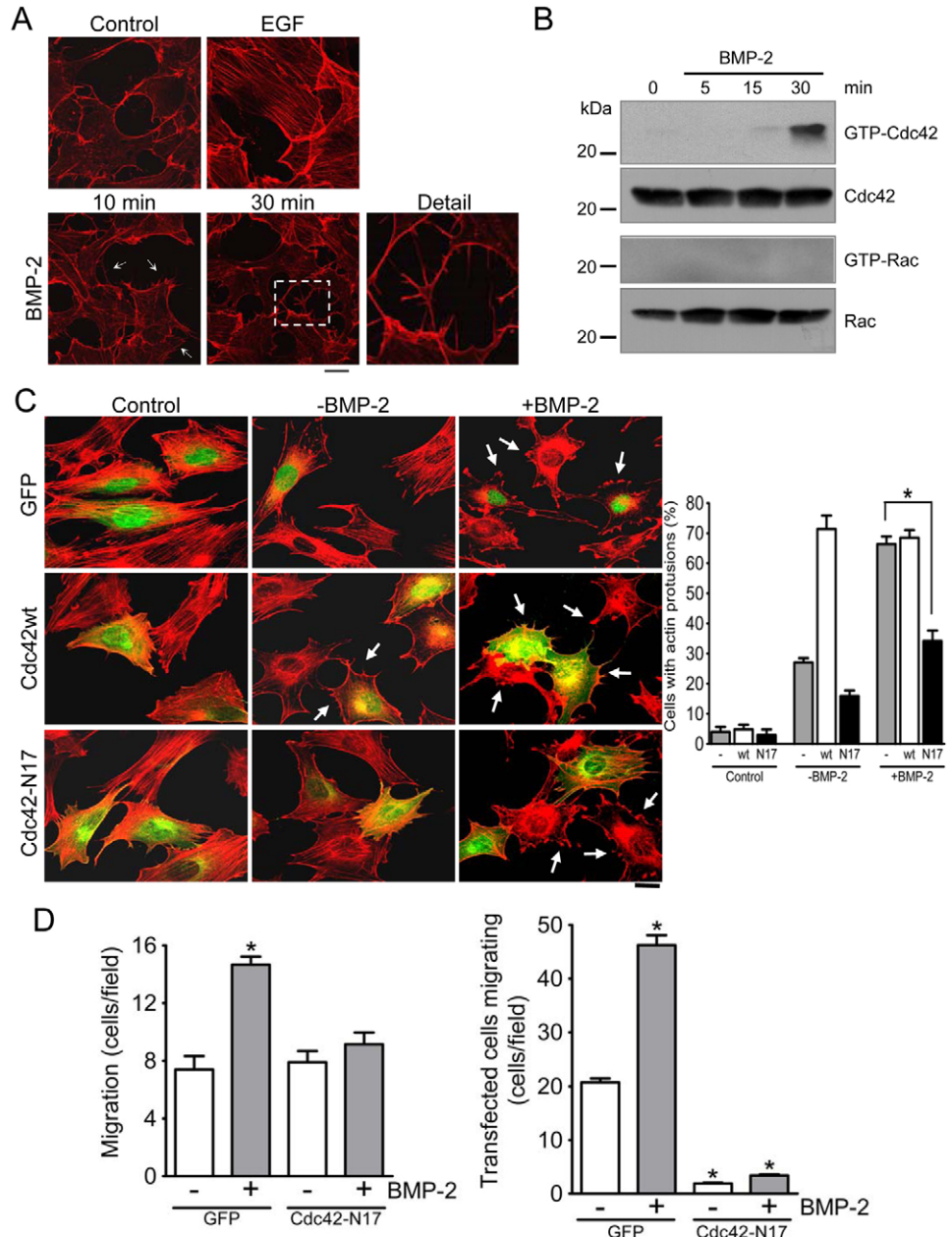
**Fig. 2.** BMP2 induces actin cytoskeleton reorganization. (A) C2C12 cells were stimulated with 3 nM BMP2 for the indicated times. Actin was visualized with TRITC-conjugated phalloidin using a confocal microscope. Arrows indicate actin cortical protrusions. Scale bar: 20  $\mu$ m. (B) Serum-starved C2C12 cells were pretreated with 2  $\mu$ M cytochalasin D (Cyto D) for 20 minutes and allowed to recover in the absence or presence of 3 nM BMP2 for 1 hour. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-phospho-Smad1 and reprobbed with anti- $\alpha$ -tubulin antibodies. (C) Cells treated as above were allowed to recover in the absence or presence of 3 nM BMP2. Upper row shows cells before and after 2  $\mu$ M Cyto D treatment. Middle and lower rows show recovery in the absence or presence of BMP2, respectively. Scale bar: 20  $\mu$ m. A quantitative analysis of the formation of stress fibers in the absence of BMP2 or cells showing cortical actin protrusions as a percent of total in the presence of BMP2 are shown. Data are mean  $\pm$  s.e.m. of at least 200 cells obtained in different fields from five independent experiments. (D) Serum-starved C2C12 cells (Control) were pre-treated with 2  $\mu$ M cytochalasin D (Cyto D) for 20 minutes and after washing, were allowed to recover in the presence of 3 nM BMP2 for different times. Actin was visualized with TRITC-conjugated phalloidin using a confocal microscope. Arrows indicate actin cortical protrusions that were evident within the first 60 minutes and cells then recovered their initial aspect showing abundant stress fibers. Scale bar: 20  $\mu$ m.

cytochalasin D. No significant changes were observed (Fig. 2B). As shown in Fig. 2C, whereas in control conditions cells recovered their initial aspect and had abundant stress fibers, in the presence of BMP2, the number of cells that presented cortical protrusions enriched in F-actin and without stress fibers was significantly increased (up to 70% more than in untreated cells). Cells pretreated with cytochalasin D were allowed to recover in the presence of BMP2 for longer periods. Cortical actin protrusions were evident until 2 hours and then cells recovered abundant stress fibers (Fig. 2D). Taken together, our findings indicate that BMP2 induced a rapid, significant and transient effect on the dynamics of the actin cytoskeleton.

#### BMP2-induced actin reorganization and cell migration is mediated by Cdc42

Actin filament organization is controlled by the Rho family of small GTPases, including Rho, Rac and Cdc42 (Raftopoulos and Hall,

2004). The participation of the Rho family of small GTPases in the organization of the actin cytoskeleton has been widely studied in Swiss3T3 fibroblasts, where Rho regulates the formation of contractile actin-myosin filaments to form stress fibers (Ridley and Hall, 1992), and Rac and Cdc42 regulate lamellipodia and filopodia formation, respectively (Nobes and Hall, 1999). We therefore tested the hypothesis that BMP2-induced membrane actin protrusion formation might be mediated through small GTPases in Swiss3T3 cells. As shown in Fig. 3A, BMP2 rapidly induced the appearance of long F-actin-rich spike-like filopodia, a phenotype associated with active Cdc42. As a control, cells were stimulated with EGF, which has been shown to activate Rho and to induce the formation of stress fibers (Mancini et al., 2003). To confirm the potential involvement of Cdc42 on BMP2-induced filopodia, we examined whether BMP2 activated Cdc42 in C2C12 cells. Treatment of C2C12 cells with BMP2 increased the endogenous levels of active



**Fig. 3.** BMP2-induced actin reorganization and cell migration is mediated by Cdc42. (A) Swiss 3T3 cells were serum-starved for 7 days and stimulated with 3 nM BMP2. Arrows indicate spike-like filopodia (see detail at 30 minutes). As a control, cells were stimulated with EGF 20 ng/ml for 10 minutes (upper row). Scale bar, 20 μm. (B) Serum-starved C2C12 cells were stimulated with 3 nM BMP2. Levels of active GTP-bound Cdc42 and Rac were determined using the PBD domain of PAK1 followed by immunoblotting with anti-Cdc42 and anti-Rac antibodies. (C) C2C12 cells were transfected with the indicated GFP-tagged expression vectors. Cells were serum-starved for 16 hours (control), pre-treated with cytochalasin D and allowed to recover for 1 hour in the absence or presence of 3 nM BMP2. Merged images of phalloidin (red) and GFP signal (green) are shown. Cells showing cortical actin protrusions (arrows) are indicated. Scale bar: 20 μm. Transfected cells were counted and those showing cortical actin protrusions represented as % of total (graph on right). Mean ± s.e.m. of at least 80 transfected cells obtained from three independent experiments ( $*P < 0.001$ , paired *t*-test). (D) C2C12 cells were transfected with the GFP-tagged expression vectors indicated and analyzed by chemotaxis assay after 2 hours (left panel) and by wound-healing migration assay performed for 12 hours (right panel) in the presence or absence of BMP2. Mean ± s.e.m. of three independent experiments ( $*P < 0.001$  compared with the GFP-transfected control cells and in the absence of BMP2, One-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

Cdc42 after 15 minutes of ligand addition and peaked at 30 minutes. By contrast, active GTP-bound endogenous Rac levels were not altered up to 30 minutes after BMP2 stimulation (Fig. 3B). To verify the requirement of the Cdc42 pathway in the observed morphological changes induced by BMP2, cells were transfected with the dominant-negative mutant Cdc42-N17-GFP and allowed to recover as described above (Fig. 2C). Microscopy examination showed that BMP2 prevented the formation of stress fibers and induced the accumulations of actin in cortical protrusions in control cells, whereas these effects were impaired in cells expressing Cdc42-N17. Expression of wild-type Cdc42 was sufficient for the induction of actin protrusions and reduction of stress fibers in the absence of BMP2, but did not further increase BMP2-induced actin protrusion formation (Fig. 3C).

We further addressed whether Cdc42 was also regulating the BMP2 effects on cell migration using chemotaxis and wound-

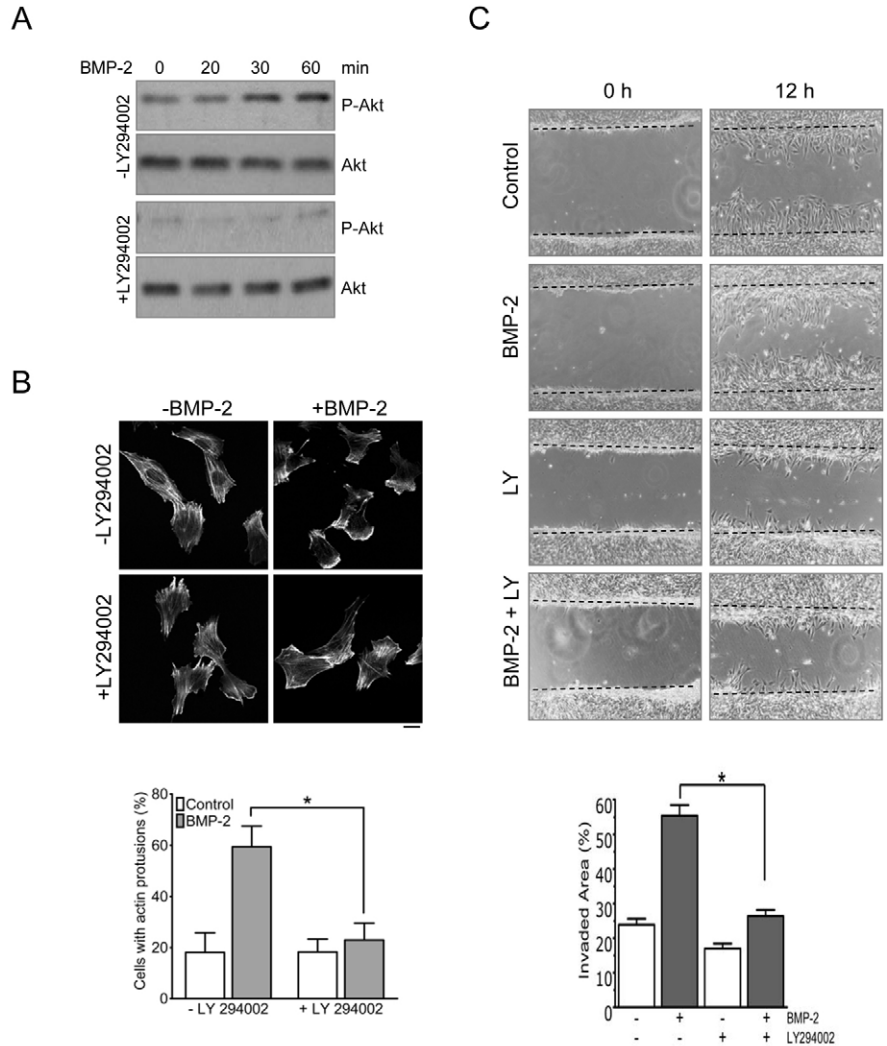
induced migration assays. The results obtained in both types of assay indicated that in cells expressing Cdc42-N17, BMP2 was not able to induce migration when compared with the GFP-transfected control cells (Fig. 3D). Altogether, these data suggest that Cdc42 activation is involved in BMP2-induced rearrangement of the actin cytoskeleton and cell migration.

PI3K activity is required for BMP2-induced actin reorganization. PI3K activity has previously been shown to mediate the activation of small GTPases of the Rho family upon stimulation with several growth factors (Hawkins et al., 2006; Merlot and Firtel, 2003; Raftopoulos and Hall, 2004; Suire et al., 2006). We first confirmed the ability of BMP2 to activate PI3K by examining the phosphorylation status of Akt, because phosphorylation of Akt on residue Ser473 correlates with Akt activation by PI3K. We demonstrated that BMP2 activated PI3K activity in a time-

dependent manner. An increase in Akt phosphorylation was observed by 30 minutes and reached a plateau at 60 minutes. BMP2-induced PI3K activation was completely abolished by treatment with the inhibitor of PI3K activity LY294002 (Fig. 4A). We next characterized the effect of LY294002 on the observed BMP2 reorganization of the actin cytoskeleton. Pretreatment with LY294002 completely abolished BMP2-dependent induction of cortical actin protrusion formation, suggesting that an intact PI3K-signaling pathway was required for the BMP2-induced mobilization of the actin filament system (Fig. 4B). In a wound-induced migration assay, addition of BMP2 to serum-free medium accelerated the wound closure, whereas the presence of PI3K inhibitor strongly diminished the BMP2 migratory effects (Fig. 4C). These data suggest that PI3K is involved in BMP2-induced cell migration.

To further characterize BMP2-mediated activation of PI3K, we analyzed the contribution of the individual PI3K isoforms to BMP2-induced PI3K activation. Since LY294002 is not selective among the members of the class I PI3Ks (Hawkins et al., 2006), we used a set of recently developed isoform-selective class I PI3K inhibitors (Camps et al., 2005; Jackson et al., 2005; Pomel et al., 2006; Sadhu et al., 2003). Cells were treated with either the PI3K $\gamma$ -selective inhibitor AS252424 (Pomel et al., 2006), the PI3K $\beta$ -selective inhibitor TGX-155 (Jackson et al., 2005), the PI3K $\delta$ -selective inhibitor IC87114 (Billottet et al., 2006; Sadhu et al., 2003) or the PI3K $\alpha$ -selective inhibitor AS702630 (Ruckle et al., 2004), and analyzed phosphorylation of Akt after stimulated with BMP2 for different times. BMP2-mediated Akt phosphorylation was abolished only in cells pretreated with AS702630, but not with any other of the selective inhibitors used, suggesting that, in C2C12 cells, BMP2 induced Akt phosphorylation through the specific activation of the PI3K $\alpha$  isoform (Fig. 5A). Furthermore, the wound-healing assay was performed in the presence of the class I PI3K isoform-selective inhibitors mentioned above and only in the presence of AS702630, was BMP2 unable to induce cell migration (Fig. 5B). Together, these data suggest that PI3K $\alpha$  is required for BMP2-induced actin cytoskeleton rearrangement and cell migration in C2C12 cells.

We next investigated the relationship between Cdc42 and PI3K in this process. We first checked whether PI3K was implicated in the activation of Cdc42 by measuring the activation of the endogenous Cdc42 by BMP2 in the presence of the PI3K inhibitor LY294002. Under these conditions, we did not observe differences in the activation of Cdc42 (Fig. 6A). Similarly, the expression of a dominant-negative form of Cdc42 did not modify the ability of BMP2 to induce PI3K activity and to phosphorylate Akt (Fig. 6B).

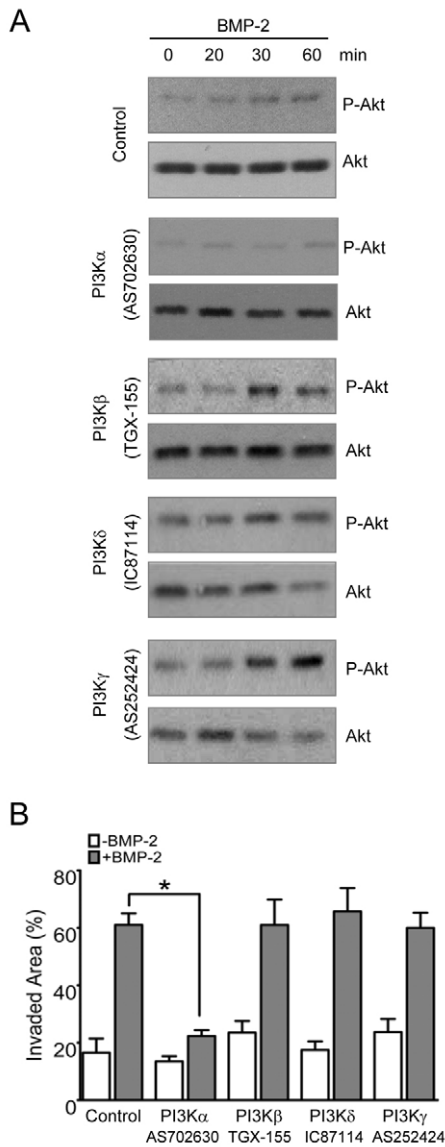


**Fig. 4.** PI3K activity is required for BMP2-induced actin reorganization and cell migration in C2C12 cells. (A) Cells were serum-starved for 16 hours prior to preincubation with 15  $\mu$ M LY294002 for 60 minutes and then stimulated with 3 nM BMP2 for the indicated times. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-Akt-P(Ser473) and reprobbed with anti-Akt total antibody. (B) Cells treated as above were fixed and stained with TRITC-conjugated phalloidin. Scale bar: 20  $\mu$ m. Cells with actin protrusions were quantified as shown in graph below. Mean  $\pm$  s.e.m. from four independent experiments ( $*P < 0.001$ , paired *t*-test). (C) Cell monolayers were wounded and allowed to migrate for 12 hours in the presence or absence of 3 nM BMP2 and/or LY294002. The graph in lower panel indicates the invaded area. Mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $*P < 0.001$ , paired *t*-test).

These observations indicate that BMP2 activates Cdc42 and PI3K pathways independently and that both signaling pathways are required for the BMP2-induced mobilization of the actin filaments system.

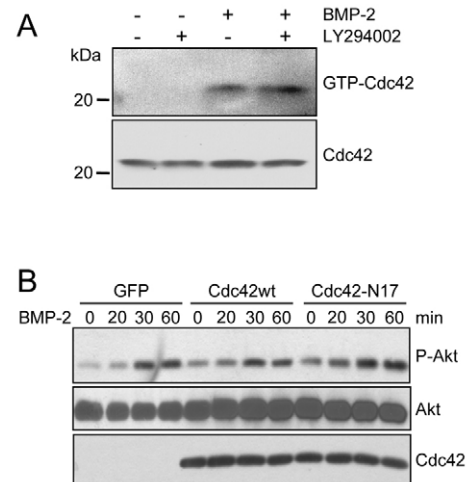
#### BMP2 induces LIMK1 activation through a PI3K-dependent mechanism

Since previous results indicate that other members of the BMP family are able to induce LIMK1 activity (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004), we tested whether LIMK1 was regulated by BMP2. As shown in Fig. 7A, BMP2 enhanced the phosphorylation of LIMK1 at their activation loop in Thr508 (Scott and Olson, 2007) with maximal effect 40 minutes after ligand addition. We next examined the requirement of PI3K on BMP2-induced LIMK1



**Fig. 5.** PI3K $\alpha$  is required for BMP2-induced cell migration. (A) Cells were serum-starved for 16 hours. The isoform-selective inhibitors of class I PI3K were added to the medium 1 hour before stimulation of cells with BMP2 and used at a final concentration of 1  $\mu$ M. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-Akt-P(Ser473) and membranes reprobbed with anti-Akt total antibody. (B) Quantitative analysis of phase-contrast images of a wound-healing assay performed for 12 hours in the presence of 3 nM BMP2 and the PI3K-isoform-selective inhibitors. Mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments (\* $P$ <0.001, paired  $t$ -test).

phosphorylation. As seen in Fig. 7B, complete inhibition of BMP2-induced LIMK1 phosphorylation was achieved by pretreatment with LY294002 inhibitor. Because LIMK1 has been described to directly activate cofilin, we also examined whether the BMP2-dependent phosphorylation of LIMK1 observed correlated with an increase of LIMK1 activity and/or with enhanced cofilin phosphorylation. BMP2 stimulation resulted in an  $\sim$ 1.9-fold increase in LIMK1-mediated cofilin in vitro phosphorylation. As expected, the effect of BMP2 on LIMK1 activity was abrogated in the presence of LY294002 inhibitor (Fig. 7C). These data suggest that BMP2 stimulates both LIMK1 activity and cofilin phosphorylation and that these effects require PI3K activity.



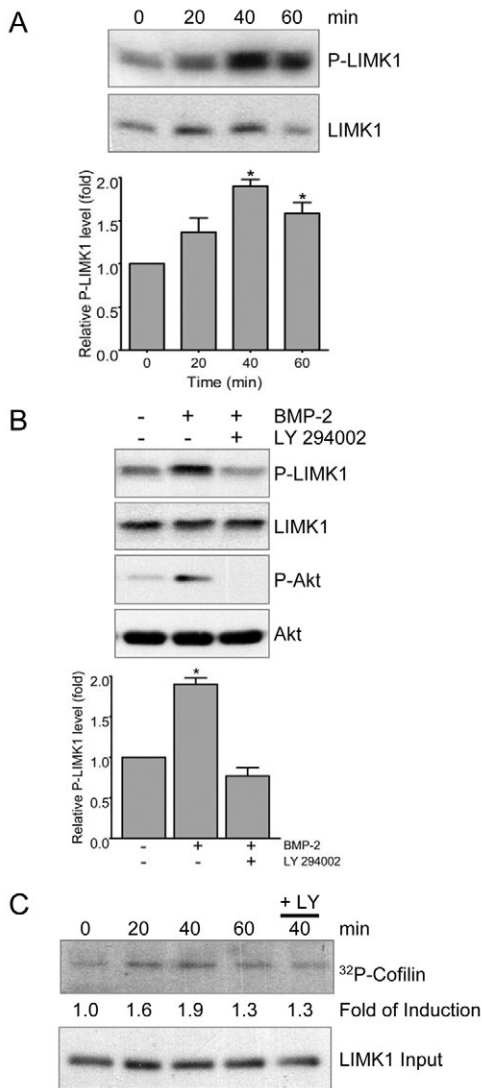
**Fig. 6.** BMP2 activates Cdc42 and PI3K pathways independently. (A) C2C12 cells treated with 3 nM BMP2 and/or LY294002. Levels of GTP-bound Cdc42 were determined using GST pull-down assay. (B) C2C12 cells were transfected with GFP-tagged plasmids for wild-type Cdc42 (GFP-Cdc42wt) or a dominant-negative form (GFP-Cdc42N17). Cells were stimulated with 3 nM BMP2 and cell lysates were analyzed by immunoblotting with anti-Akt-P(Ser473), and reprobbed with anti-Akt antibody and anti-Cdc42 antibody.

#### BMP2 stimulates PAK1 and PAK4 kinase activity through PI3K- and Cdc42-dependent mechanisms

The PAK family of protein kinases have been implicated in activation of LIMK1 (Dan et al., 2001; Edwards et al., 1999). Thus, we analyzed whether PAK proteins were also regulated by BMP2. Cells were stimulated with BMP2 and phosphorylation of either PAK1 or PAK4 was analyzed. Increased phosphorylation was detected 30 minutes after stimulation, which peaked at 40 minutes in both cases and decreased thereafter (Fig. 8A). Incubation with LY294002 blocked BMP2-induced PAK1 and PAK4 phosphorylation (Fig. 8B). As further support for PI3K involvement in PAK1 and PAK4 activation by BMP2, in vitro kinase assays were carried out. Whereas BMP2 stimulated both PAK1 and PAK4 kinase activity to more than twofold basal levels after 40 minutes, LY294002 completely inhibited this activation (Fig. 8C). These results thus indicate that BMP2 activates PAK1 and PAK4 in a time-dependent manner and that this activation depends on PI3K activity.

We next determined whether the BMP2 activation of PAK depended on Cdc42 activity. C2C12 cells were transfected with the dominant-negative mutant Cdc42-N17 and, after BMP2 stimulation, the phosphorylation of either PAK1 or PAK4 was analyzed. In contrast to control cells transfected with GFP, expression of the dominant-negative form of Cdc42 prevented BMP2-induced phosphorylation of PAK1 and PAK4 (Fig. 9A). These results thereby indicated that BMP2 activation of PAK1 and PAK4 depended on Cdc42. We also analyzed the involvement of PAK on the activation of LIMK1 associated with the tail of BMPRII. We generated C2C12 cells stably expressing His-tagged BMPRII under a tetracycline-responsive promoter (Fig. 9B, left panel). These cells were transfected with a constitutive active form of PAK1 (PAK-H83,86L) and a dominant-negative form (PAK-PID) and analyzed for activation of LIMK1 associated with BMPRII after purification of His-tagged BMPRII with Ni<sup>2+</sup>-NTA-beads. Addition of BMP2 slightly increased association of LIMK1 to the tail of BMPRII and more importantly, increased the level of phosphorylated LIMK1





**Fig. 7.** BMP2 stimulates LIMK1 activity. (A) Serum-starved C2C12 cells were stimulated with 3 nM BMP2 and cell lysates analyzed by immunoblotting with anti-LIMK1-*P* and anti-LIMK1 antibody. The bottom panel indicates the relative LIMK1-*P* levels. Mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $*P < 0.05$ , paired *t*-test). (B) C2C12 cells were treated as above for 40 minutes but in the absence or presence of LY294002. Cell lysates were analyzed by immunoblotting with the indicated antibodies. The bottom panel indicates the relative LIMK1-*P* levels. Mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $*P < 0.05$ , paired *t*-test). (C) C2C12 cells were treated with BMP2 and LY294002 as indicated. Endogenous LIMK1 was subjected to an in vitro kinase assay with GST-cofilin as a substrate. Values of cofilin phosphorylation with respect to the LIMK1 present in cell extracts are shown.

(LIMK1-*P*) at Thr508 (Fig. 9, right panel). Furthermore, expression of the active form of PAK1 increased the levels of LIMK1-*P* even in the absence of BMP2, whereas expression of PAK-PID partially prevented the phosphorylation of LIMK1 induced by BMP2. These data suggest that PAK activity is involved in the activation of LIMK1 interacting with the BMPRII tail.

It has been shown that although BMP2 binds preferentially to BMPRII, BMP6 and BMP7 signal preferentially through ActRII, which lack the cytoplasmic tail present in BMPRII (Ebisawa et al., 1999; Macias-Silva et al., 1998). Furthermore, in BMPRII-deficient

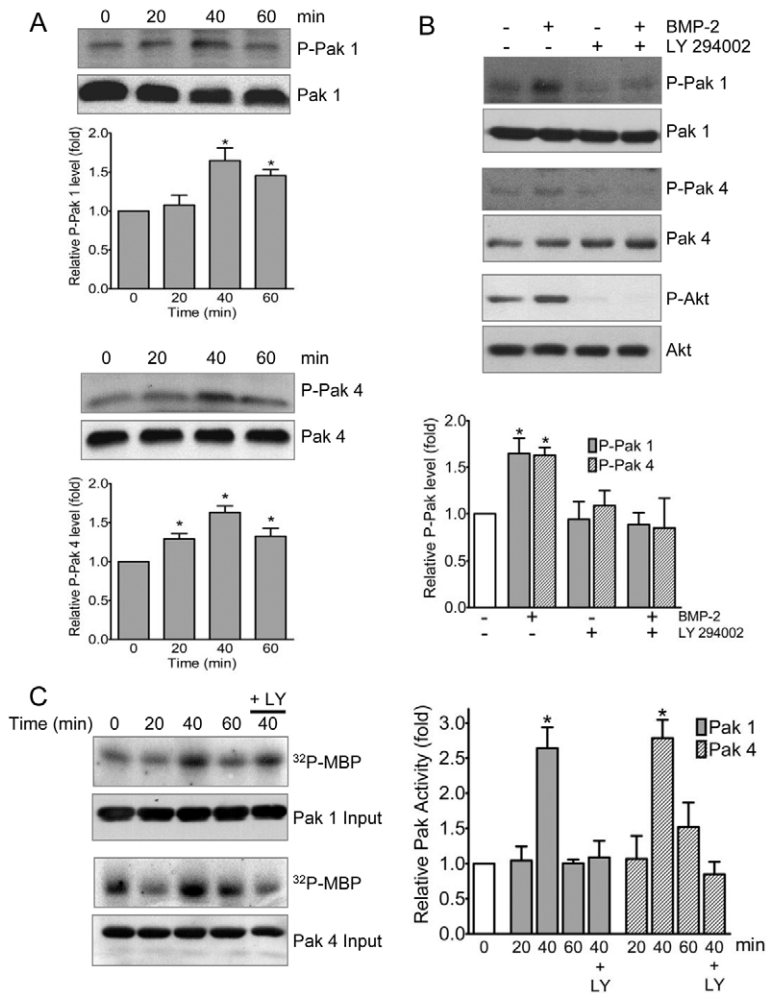
cells BMP2 can signal through ActRII in conjunction with a set of type I receptors distinct from those used by BMPRII (Yu et al., 2005). Taking this into account, we also analyzed the migration and invasive effects of addition of BMP7 as well as the effects of BMP2 in C2C12 cells in which BMPRII expression was knocked down (Fig. 10C). Addition of BMP7 led to similar effects as observed with BMP2 in chemotaxis and wound-healing assays (Fig. 10A,B), and reduction of BMPRII levels did not significantly modify cytoskeletal and migratory responses to BMP2 (Fig. 10D,E). These data suggest that, although LIMK physically interacts with the C-terminal tail of BMPRII, the C-terminal tail is not absolutely required for the cytoskeletal and migratory effects of BMPs.

## Discussion

Cell responses to morphogens include actin cytoskeletal reorganization and cell migration, which are crucial not only during embryogenesis or bone turnover but also during tumor progression and invasion (Dormann and Weijer, 2003; Kishigami and Mishina, 2005). Here, we describe that BMP2 stimulation induces the accumulation of actin in cortical protrusions and migration of mesenchymal cells. The data presented indicate that, in C2C12 cells, BMP2-induced cytoskeletal rearrangements depend on the activities of both Cdc42 and the  $\alpha$ -isoform of PI3K, which are activated independently by BMP2. These data also demonstrate that BMP2 activates group I and group II PAKs as well as LIMK1 in a PI3K-dependent manner, suggesting that they have a role integrating the signals from both pathways and in the control of BMP-induced actin reorganization and cell migration.

BMPs have been shown to promote chemotactic migration of mesenchymal cells in vitro, as well as during skeletal development (Fiedler et al., 2002; Sotobori et al., 2006). Our results indicate that the rapid appearance of cortical actin protrusions did not require protein synthesis, suggesting it is independent of transcriptional activity. Previous data also suggest a role for the inhibitory Smad7 in the delayed activation of Cdc42 (12–24 hours) by TGF $\beta$  in prostate carcinoma cells (Edlund et al., 2004). However, overexpression of Smad7 in mesenchymal C2C12 cells did not increase either basal or BMP-induced appearance of actin-enriched membrane protrusions (data not shown). These results are in agreement with data obtained in Swiss3T3 fibroblasts (Vardouli et al., 2005) suggesting that Smad7 is not involved in the rapid cytoskeletal rearrangements induced by BMP2 in mesenchymal versus epithelial cells.

We also show that BMP2 activates Cdc42 and PI3K, confirmed by the appearance of GTP-bound Cdc42 and Akt phosphorylated on Ser473, respectively. We propose that both signaling pathways, acting in parallel but independently, are required for the BMP-induced cytoskeletal effects. We base this conclusion on the following observations: the temporal profiles of activation of both Cdc42 and PI3K correlated with the formation of BMP2 induced cortical actin protrusions in C2C12 cells and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. Moreover, expression of a dominant-negative form of Cdc42 or pretreatment with the PI3K inhibitors LY294002 or AS702630, both completely suppressed the BMP-induced appearance of actin protrusions. Although the pathway that leads to BMP2 activation of Cdc42 is still unknown, several reports indicate its requirement for cytoskeletal changes induced by BMPs or TGF $\beta$  (Edlund et al., 2002; Edlund et al., 2004; Lee-Hoeflich et al., 2004; Ricos et al., 1999). Depending on the cell type or stimuli, activation of Cdc42 has been described to be upstream or downstream of PI3K activity (Hawkins et al., 2006; Jimenez et al.,



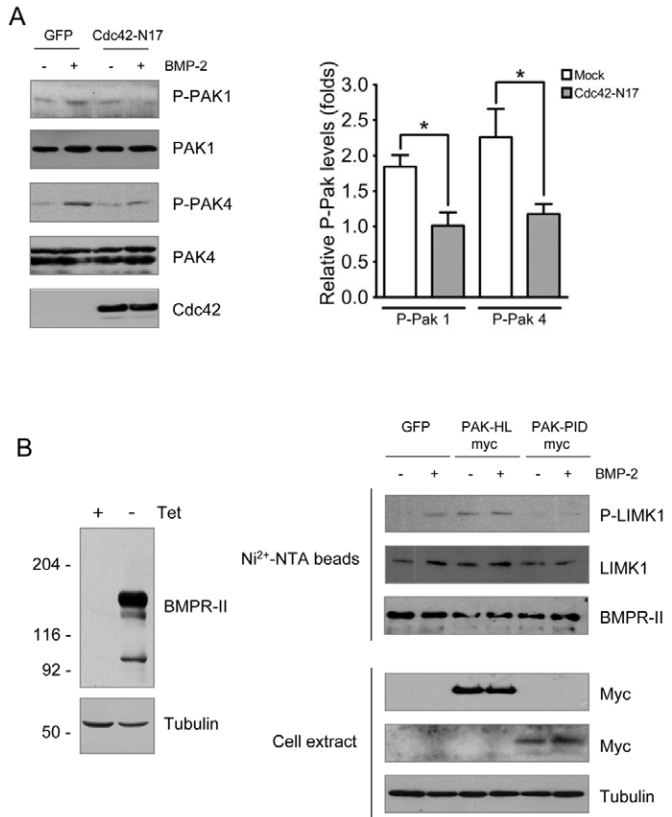
**Fig. 8.** BMP2 stimulates PAK1 and PAK4 activity. (A) C2C12 cells were stimulated with 3 nM BMP2 for different times and cell lysates were analyzed with the indicated phospho-specific antibodies, and membranes probed with anti-PAK1 and anti-PAK4 antibodies. Graphs indicate the relative PAK1-*P* and PAK4-*P* levels. Mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $*P < 0.05$ , paired *t*-test). (B) C2C12 cells were serum-starved, incubated with LY294002 and stimulated with 3 nM BMP2 for 40 minutes. Cell lysates were analyzed as above. Graph indicates the relative PAK1-*P* and PAK4-*P* levels. Mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $*P < 0.05$ , paired *t*-test). (C) C2C12 cells stimulated with 3 nM BMP2 and LY294002 were analyzed for PAK1 or PAK4 *in vitro* kinase activity using MBP as a substrate. The graph indicates the relative PAK1 and PAK4 activity. Mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $*P < 0.05$ , paired *t*-test).

2000; Merlot and Firtel, 2003; Raftopoulou and Hall, 2004; Ridley et al., 2003). Importantly our results indicate that, although Cdc42 and PI3K pathways are both required for the migratory effects, BMP2 is able to activate both routes independently, because the block of one pathway does not alter the ability of BMP2 to stimulate the other. Although cell migration in response to several stimuli, and in a vast majority of cell types, has been unequivocally associated to PIP3 formation (and therefore to class I PI3K activation), the contribution of specific PI3K isoforms to this cellular function has only been reported for PI3K $\gamma$  and PI3K $\delta$ , in response to chemoattractants or to PI3K $\delta$  and PI3K $\beta$ , in response to growth factors (Camps et al., 2005; Puri et al., 2004; Sadhu et al., 2003; Vanhaesebroeck and Waterfield, 1999). However, no role of class IA PI3K $\alpha$  in cell migration has been reported so far. Our data strongly involve class I $A$ , and specifically p110 $\alpha$ , in BMP2-induced

cytoskeletal effects and cell migration, as well as in the activation of Akt-signaling pathway in C2C12 cells.

Members of the PAK family have been shown to regulate a wide variety of cytoskeletal changes, usually in response to small GTPases. Upon activation, PAKs redistribute from the cytosol into cortical actin structures including lamellae, the leading edge of polarized cells and membrane ruffles. PAKs can be categorized into two subgroups: the group I (PAK1, PAK2 and PAK3) share high sequence homology throughout the protein, whereas group II (PAK4, PAK5 and PAK6) have highly related kinase domains but are more divergent in other domains of the protein (Bokoch, 2003; Zhao and Manser, 2005). Our results are the first to show that BMP2 is able to activate members of both classes of PAKs. Activation takes place following similar kinetics (30-60 minutes) observed for BMP2 induction of cytoskeletal rearrangement. Furthermore, we also demonstrate that activation of PAKs by BMP2 is abolished by either inhibition of the PI3K pathway or expression of dominant-negative Cdc42. Thus, it could be hypothesized that PAKs act as integrative signaling modules where the signals from both pathways converge. It has been shown that class I PAKs are not only stimulated by GTP-bound forms of Rac and Cdc42 through binding to an autoinhibitory N-terminal region (Parrini et al., 2002), but also by a variety of GTPase-independent mechanisms. For example, although full catalytic activity is achieved by autophosphorylation of Thr423 in the catalytic domain of PAK1 (equivalent to Thr402 of PAK2), other kinases activated in response to PI3K stimulation, such as the PH-containing, 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1), can also activate PAK1 through phosphorylation at the same site (King et al., 2000). In addition, Akt, through phosphorylation of Ser21, and PI3K, through physical association, have been shown to activate PAK1 independently of small GTPase binding (Chung and Firtel, 1999; Papakonstanti and Stournaras, 2002; Zhou et al., 2003). In contrast to group I PAKs, group II PAKs lack this autoinhibitory domain and are not activated by Cdc42/Rac binding, and the exact mechanisms that regulate their kinase activity are still unclear. However, it has been shown that PI3K regulates not only kinase activity but also its subcellular localization (Wells et al., 2002) and that full kinase activity requires phosphorylation of the corresponding residues in the catalytic domain (Abo et al., 1998). We therefore suggest that different PAKs, with slightly different modes of activation, might integrate the different signals emanating from the BMP receptors into specific cytoskeletal rearrangements.

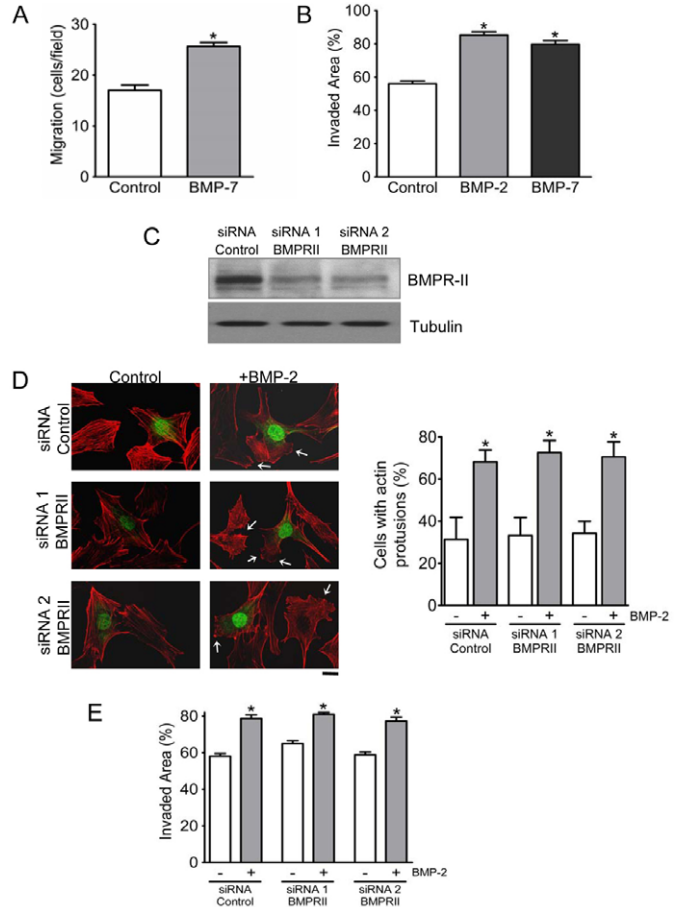
To date, major substrates for PAKs identified are LIMK1 and LIMK2 (Dan et al., 2001; Edwards et al., 1999). LIM kinases are implicated in the regulation of actin cytoskeletal dynamics through their ability to phosphorylate cofilin at Ser3. This has been identified as the missing link that couples PAK activation to cytoskeletal rearrangements. Active PAKs phosphorylate LIM kinases in the activation loop (Thr508 for LIMK1) increasing their activity towards cofilin (Edwards et al., 1999; Scott and Olson, 2007). Our results indicate that, in C2C12 cells, BMP2 activates both LIMK1 phosphorylation on Thr508 and its activity against exogenous substrates. Moreover, we demonstrate that LIMK1 activation by



**Fig. 9.** Cdc42 is required for BMP2-dependent PAK1 and PAK4 phosphorylation. (A) C2C12 cells transfected with the indicated expression vectors were serum-starved for 16 hours and stimulated with 3 nM BMP2 for 40 minutes. Cell lysates were analyzed with the indicated phospho-specific antibodies, and membranes re-probed with anti-PAK1, anti-PAK4 and anti-Cdc42 antibodies. Graph indicates PAK1-*P* and PAK4-*P* levels of BMP2-treated cells relative to their respective untreated controls. Mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments ( $*P < 0.05$ , unpaired *t*-test). (B) PAK activity is required for BMP2 to phosphorylate the LIMK1 associated to the BMPRII tail. Immunoblot analysis of C2C12 cells overexpressing His-tagged BMPRII under a tetracyclin (Tet-off)-regulated promoter (left panel). Cells overexpressing His-tagged BMPRII were transfected with the expression constructs indicated, serum-starved for 16 hours and stimulated with 3 nM BMP2 for 40 minutes. Cell extracts were subjected to immunoblotting to detect the total and phosphorylated LIMK1 after Ni<sup>2+</sup>-NTA-agarose purification (right panel).

BMP2 is dependent on PI3K and PAK activities. Previous reports indicate a direct interaction and activation of LIMK1 by the long cytoplasmic tail of the BMP receptor type II and a further synergism with BMP-activated Cdc42 (Foletta et al., 2003; Lee-Hoeflich et al., 2004). Although these studies reached different conclusions about the mechanism by which BMP binding to its receptors increases LIMK1 activity, it seems clear that BMP signaling in dendritogenesis and synaptic stability requires LIMK1 activity downstream of BMP receptors (Eaton and Davis, 2005; Lee-Hoeflich et al., 2004).

Our results also indicate that addition of BMP7 led to similar effects as with BMP2 in chemotaxis and wound-healing assays, and reduction of BMPRII levels did not significantly modify formation of protrusions or migration in wound-healing assays in response to BMP2. This evidence, and the fact that LIMK1 activation by BMP2 is dependent on PI3K and PAK activities, suggests that in addition



**Fig. 10.** Role of BMPRII in BMP2-dependent actin cytoskeleton reorganization and cell migration. (A) Chemotaxis assay. Serum-starved C2C12 cells were allowed to migrate for 2 hours in the presence or absence of 30 pM BMP7 as described in Materials and Methods. Quantitative analysis of eight random fields from three independent experiments (Mean  $\pm$  s.e.m.;  $*P < 0.0001$ , paired *t*-test). (B) Wound-healing migration assay. Serum-starved wounded C2C12 cell monolayers were allowed to migrate in the presence or absence of 3 nM BMP2 or 3 nM BMP7 for 24 hours. The graph indicates the invaded area. Mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments ( $*P < 0.001$ , paired *t*-test). (C) Immunoblot analysis of BMPRII expression in C2C12 cells transfected with the indicated siRNA for 48 hours. (D) C2C12 cells were transfected with the indicated siRNA for 48 hours and serum-starved for 16 hours. Then, cells were pretreated with 2  $\mu$ M cytochalasin D for 20 minutes and allowed to recover in the absence or presence of 3 nM BMP2 for 1 hour. Merged images of phalloidin and GFP signals are shown. Cells showing cortical actin protrusions (arrows) are indicated. Scale bar: 20  $\mu$ m. Transfected cells were counted and those showing cortical actin protrusions represented as % of total (graph on right). Mean  $\pm$  s.e.m. of at least 80 transfected cells obtained from three independent experiments ( $*P < 0.05$ , paired *t*-test compared with the condition in the absence of BMP2). (E) C2C12 cells were transfected with the indicated siRNA for 48 hours and serum-starved for 16 hours. Cell monolayers were wounded and allowed to migrate for 24 hours in the presence or absence of 3 nM BMP2. The graph indicates the invaded area. Mean  $\pm$  s.e.m. from three independent experiments ( $*P < 0.001$  compared with the condition in the absence of BMP2, one-way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison test).

to the interaction of LIMK1 with the BMPRII cytoplasmic tail, BMP2 is able to stimulate additional pathways that lead to full activation of LIM kinases. In line with these findings, several reports indicate that TGF $\beta$ , whose receptor lacks the LIMK1-interacting cytoplasmic tail, regulates the actin cytoskeleton in mesenchymal but not in epithelial

cell types through activation of distinct PAK and LIMK family members (Vardouli et al., 2005; Wilkes et al., 2005; Wilkes et al., 2003). Further studies will be required to understand how different cell types use these pathways separately or synergistically in the spatial regulation of the actin cytoskeleton by BMPs.

## Materials and Methods

### Plasmids, reagents and antibodies

Vectors encoding Cdc42wt-GFP and Cdc42-T17N-GFP were kindly provided by Xosé Bustelo (CSIC, Salamanca, Spain). The expression vectors encoding myc-tagged full-length activated PAK (PAK1-H83,86L) and the deletion mutant PAK-PID (aa83-149) were provided by Gary Bokoch (The Scripps Research Institute, La Jolla, CA). BMP2 was a generous gift from Wyeth (Cambridge, MA) and BMP-7 was obtained from R&D Systems (Minneapolis, MN). The inhibitor LY294002 (Sigma, St Louis, MO) was added to medium 1 hour before stimulation of cells with BMP2 and used at a final concentration of 15  $\mu$ M. The isoform-selective inhibitors of class I PI3Ks were obtained from Merck-Serono (Geneva, Switzerland) and used at a final concentration of 1  $\mu$ M. Purified MBP was obtained from Sigma and purified cofilin 1 from Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY). Antibodies used were Smad1-P(Ser463/465), Rac1 (Upstate); Tubulin (Sigma); Cdc42 (BD Biosciences, San Jose, CA); Akt, BMPR2, myc (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); Akt-P(Ser473), PAK1-P(Thr423)/PAK2-P(Thr402), PAK4-P(Ser474)/PAK5-P(Ser602)/PAK6-P(Ser560), PAK1, PAK4, LIMK1-P(Thr508)/LIMK2-P(Thr505) and LIMK1 (Cell Signaling, Beverly, MA).

### Cell culture and transfection

C2C12 and Swiss 3T3 cell lines were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS, antibiotics and glutamine. Cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA) or FuGENE6 (Roche, Indianapolis, IN). We generated C2C12 cells with inducible expression of His-tagged BMPRII following the Tet-Off protocol as described (Chambard and Pognonec, 1998). First, we used two distinct vectors that encode a tetracycline-regulated transactivator (tTA) and puromycin resistance under the control of a tTA-responsive promoter (tetO-CMV) to generate C2C12 cells that stably expressed tTA. After selection of puromycin-resistant clones, we transfected BMPRII-His under the control of the tTA-responsive promoter. The concentration of tetracycline was 100 ng/ml in all experiments.

### RNA interference assays

To knockdown BMPRII expression, two siRNA duplexes against murine BMPRII mRNA were purchased from Dharmacon (Lafayette, CO). Sense sequences of the siRNA used were (5' to 3'): BMPRII siRNA 1, GCACAUAGGUCCCAAGAAAtt; BMPRII siRNA 2, GGGAGCACGUGUUAUGGUCtt (Yu et al., 2005). A scrambled control siRNA was transfected under the same conditions. 40 pmol siRNA duplexes (and GFP plasmid to control the transfection efficiency) were added to subconfluent C2C12 cells in 24-well plates in a mixture of Lipofectamine 2000 and OptiMEM in the absence of serum and antibiotics. After 6 hours, fetal calf serum was added to cultures at a final concentration of 10%. Assays to measure BMPRII levels were performed 48 hours after transfection. Assays to measure BMP2-mediated cell migration and actin cytoskeleton reorganization were performed after an additional 16 hours of serum starvation.

### Immunoblotting, immunoprecipitation and protein kinase assays

Protein extracts were subjected to SDS-PAGE and immunoblotted as previously described (Lopez-Rovira et al., 2002; Vinals et al., 2004) or used for in vitro kinase assay. For kinase assays, cells were grown to confluence, starved in serum-free medium for 16 hours and stimulated with 2 nM BMP2. Cells were washed twice in cold PBS and lysed on ice with 500  $\mu$ l per 10 cm dish of ice-cold lysis buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.2% NP-40, 10% glycerol, 50 mM NaF, 40 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 200  $\mu$ M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M phenylmethylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ M pepstatin A, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 4  $\mu$ g/ml aprotinin). Lysates were pre-cleared by centrifugation at 15,000 g for 10 minutes at 4°C and equivalent protein amount (500–700  $\mu$ g) was incubated overnight at 4°C with the specific antibody. Immune complexes were collected with protein-A-Sepharose and protein-G-Sepharose (Sigma) and washed four times in lysis buffer and twice in kinase buffer (50 mM HEPES pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 5% glycerol, 1 mM dithiothreitol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) prior to incubation in 50  $\mu$ l kinase buffer containing 5  $\mu$ M ATP, 5  $\mu$ Ci [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP per reaction and 5  $\mu$ g of either myelin basic protein (Sigma) for endogenous PAK1 and PAK4 activity assays or GST-cofilin for endogenous LIMK1 activity assay. After 20 minutes at 30°C, reactions were stopped by addition of SDS sample buffer and boiled for 10 minutes. The reaction mixture was separated by SDS-PAGE and analysed by autoradiography. Quantification was performed using the Bio-Rad Molecular Imager software.

### F-actin staining

Cells were grown on glass coverslips in 12-well plates, starved in serum-free medium for 16 hours and then stimulated with 3 nM BMP2. Cells were fixed in 3%

paraformaldehyde in PBS for 30 minutes at room temperature, washed twice in PBS and permeabilized for 4 minutes in PBS containing 0.2% Triton X-100, and then blocked in TBS containing 2% BSA for 45 minutes. To visualize F-actin, cells were incubated with 1  $\mu$ M TRITC-conjugated phalloidin (Sigma) and washed three times with PBS before mounting on slides. Images were acquired using Leica TCS-SL Spectral confocal microscope. For some experiments, cells were incubated with 2  $\mu$ M cytochalasin D (Sigma) for 20 minutes, washed five times with medium and allowed to recover in the presence or absence of 3 nM BMP2.

### Chemotaxis assay

Chemotaxis assays were performed in 24-well Transwell plates using 8  $\mu$ m pore-size polycarbonate filters of 6.5 mm diameter. Filters were coated with 1% gelatin (from porcine skin, Type A, Sigma) for 2 hours at 37°C, washed in PBS and blocked in PBS containing 5% BSA for 16 hours at 4°C. C2C12 cells were trypsinized, and 5 × 10<sup>4</sup> cells were loaded onto the upper well and left for 2 hours at 37°C to allow the adhesion of the cells to the filter before the lower well was filled with DMEM-1% BSA or 30 pM BMP2. After 2 hours at 37°C, non-migrated cells in the top chamber were removed with a cotton swab and migrated cells were fixed and stained with 5  $\mu$ g/ml propidium iodide for 5 minutes. Images were acquired using Leica DM IRB2 microscope linked to a Olympus DP50 camera and cell migration was quantified by counting the total number of cells in eight systematically sampled microscopic fields at ×100 magnification.

### Wound-healing migration assay

C2C12 cells grown to confluence in 24-well plates and serum-starved for a minimum of 16 hours to establish quiescence. Cells were incubated with 10  $\mu$ g/ml mitomycin C for 2 hours to eliminate the effect of proliferation, and cell monolayers were wounded with a plastic tip and washed with medium to remove detached cells. The wound was allowed to close in the presence or absence of 3 nM BMP2. The wound was photographed in a phase-contrast microscope (Leica DM IRB2 microscope linked to a OLYMPUS DP50 camera) and the rate of cell migration was measured as the percentage of invaded area with respect to the initial wound area.

### GST pull-down assay

C2C12 cells were grown to confluence and serum-starved for 16 hours before stimulation with BMP2. Cells were lysed in MLB buffer (25 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>). Lysates were clarified by centrifugation and incubated with 20  $\mu$ g of the bacterially produced PAK-PBD-GST fusion protein. Bound proteins were purified with Glutathione-Sepharose beads (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) and immunoblotted with antibodies against Rac1 and Cdc42. An aliquot of the total lysate used for precipitation was run alongside to quantify total Rac1 and Cdc42.

We thank Wyeth for providing BMP2. We also thank Gary Bokoch, Xosé Bustelo and Joan Massagué for reagents and F. Viñals for helpful discussions. We also thank E. Adanero, E. Castaño and B. Torrejón for technical assistance. N.O. and C.G. are recipients of a fellowship from the MEC. This research was supported by grants from the MEC (BFU2005-01474), ISCIII (RETIC RD06/0020), Generalitat de Catalunya (Distinció de la Generalitat a joves investigadors) and FONDECYT 11060513.

## References

- Abó, A., Qu, J., Cammarano, M. S., Dan, C., Fritsch, A., Baud, V., Belisle, B. and Minden, A. (1998). PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J.* **17**, 6527–6540.
- Billottet, C., Grandage, V. L., Gale, R. E., Quattropiani, A., Rommel, C., Vanhaesebroeck, B. and Khwaja, A. (2006). A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene* **25**, 6648–6659.
- Bokoch, G. M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu. Rev. Biochem.* **72**, 743–781.
- Camps, M., Ruckle, T., Ji, H., Ardisson, V., Rintelen, F., Shaw, J., Ferrandi, C., Chabert, C., Gillieron, C., Francon, B. et al. (2005). Blockade of PI3Kgamma suppresses joint inflammation and damage in mouse models of rheumatoid arthritis. *Nat. Med.* **11**, 936–943.
- Cantley, L. C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* **296**, 1655–1657.
- Capdevila, J. and Izpisua Belmonte, J. C. (2001). Patterning mechanisms controlling vertebrate limb development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 87–132.
- Cau, J. and Hall, A. (2005). Cdc42 controls the polarity of the actin and microtubule cytoskeletons through two distinct signal transduction pathways. *J. Cell Sci.* **118**, 2579–2587.
- Chambard, J. C. and Pognonec, P. (1998). A reliable way of obtaining stable inducible clones. *Nucleic Acids Res.* **26**, 3443–3444.
- Chung, C. Y. and Firtel, R. A. (1999). PAKa, a putative PAK family member, is required for cytokinesis and the regulation of the cytoskeleton in Dictyostelium discoideum cells during chemotaxis. *J. Cell Biol.* **147**, 559–576.

- Chung, C. Y., Potikyan, G. and Firtel, R. A. (2001). Control of cell polarity and chemotaxis by Akt/PKB and PI3 kinase through the regulation of PAKs. *Mol. Cell* **7**, 937-947.
- Dan, C., Kelly, A., Bernard, O. and Minden, A. (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J. Biol. Chem.* **276**, 32115-32121.
- Dawe, H. R., Minamide, L. S., Bamburg, J. R. and Cramer, L. P. (2003). ADF/cofilin controls cell polarity during fibroblast migration. *Curr. Biol.* **13**, 252-257.
- Dormann, D. and Weijer, C. J. (2003). Chemotactic cell movement during development. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**, 358-364.
- Dudas, M., Sridurongrit, S., Nagy, A., Okazaki, K. and Kaartinen, V. (2004). Craniofacial defects in mice lacking BMP type I receptor Alk2 in neural crest cells. *Mech. Dev.* **121**, 173-182.
- Eaton, B. A. and Davis, G. W. (2005). LIM Kinase1 controls synaptic stability downstream of the type II BMP receptor. *Neuron* **47**, 695-708.
- Ebisawa, T., Tada, K., Kitajima, I., Tojo, K., Sampath, T. K., Kawabata, M., Miyazono, K. and Imamura, T. (1999). Characterization of bone morphogenetic protein-6 signaling pathways in osteoblast differentiation. *J. Cell Sci.* **112**, 3519-3527.
- Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C. H. and Aspenstrom, P. (2002). Transforming growth factor-beta-induced mobilization of actin cytoskeleton requires signaling by small GTPases Cdc42 and RhoA. *Mol. Biol. Cell* **13**, 902-914.
- Edlund, S., Landstrom, M., Heldin, C. H. and Aspenstrom, P. (2004). Smad7 is required for TGF-beta-induced activation of the small GTPase Cdc42. *J. Cell Sci.* **117**, 1835-1847.
- Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M. and Gill, G. N. (1999). Activation of LIM-kinase by Pak1 couples Rac/Cdc42 GTPase signalling to actin cytoskeletal dynamics. *Nat. Cell Biol.* **1**, 253-259.
- Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629-635.
- Fiedler, J., Roderer, G., Gunther, K. P. and Brenner, R. E. (2002). BMP-2, BMP-4, and PDGF-bb stimulate chemotactic migration of primary human mesenchymal progenitor cells. *J. Cell Biochem.* **87**, 305-312.
- Foletta, V. C., Lim, M. A., Soosairajah, J., Kelly, A. P., Stanley, E. G., Shannon, M., He, W., Das, S., Massague, J. and Bernard, O. (2003). Direct signaling by the BMP type II receptor via the cytoskeletal regulator LIMK1. *J. Cell Biol.* **162**, 1089-1098.
- Goldstein, A. M., Brewer, K. C., Doyle, A. M., Nagy, N. and Roberts, D. J. (2005). BMP signaling is necessary for neural crest cell migration and ganglion formation in the enteric nervous system. *Mech. Dev.* **122**, 821-833.
- Hawkins, P. T., Anderson, K. E., Davidson, K. and Stephens, L. R. (2006). Signalling through Class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* **34**, 647-662.
- Jackson, S. P., Schoenwaelder, S. M., Goncalves, L., Nesbitt, W. S., Yap, C. L., Wright, C. E., Kenche, V., Anderson, K. E., Dopheide, S. M., Yuan, Y. et al. (2005). PI 3-kinase p110beta: a new target for antithrombotic therapy. *Nat. Med.* **11**, 507-514.
- Jimenez, C., Portela, R. A., Mellado, M., Rodriguez-Frade, J. M., Collard, J., Serrano, A., Martinez, A. C., Avila, J. and Carrera, A. C. (2000). Role of the PI3K regulatory subunit in the control of actin organization and cell migration. *J. Cell Biol.* **151**, 249-262.
- Katagiri, T., Yamaguchi, A., Komaki, M., Abe, E., Takahashi, N., Ikeda, T., Rosen, V., Wozney, J. M., Fujisawa-Sehara, A. and Suda, T. (1994). Bone morphogenetic protein-2 converts the differentiation pathway of C2C12 myoblasts into the osteoblast lineage. *J. Cell Biol.* **127**, 1755-1766.
- King, C. C., Gardiner, E. M., Zenke, F. T., Bohl, B. P., Newton, A. C., Hemmings, B. A. and Bokoch, G. M. (2000). p21-activated kinase (PAK1) is phosphorylated and activated by 3-phosphoinositide-dependent kinase-1 (PDK1). *J. Biol. Chem.* **275**, 41201-41209.
- Kishigami, S. and Mishina, Y. (2005). BMP signaling and early embryonic patterning. *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**, 265-278.
- Lee-Hoeflich, S. T., Causing, C. G., Podkowa, M., Zhao, X., Wrana, J. L. and Attisano, L. (2004). Activation of LIMK1 by binding to the BMP receptor, BMPRII, regulates BMP-dependent dendritogenesis. *EMBO J.* **23**, 4792-4801.
- Li, Z., Hannigan, M., Mo, Z., Liu, B., Lu, W., Wu, Y., Smrcka, A. V., Wu, G., Li, L., Liu, M. et al. (2003). Directional sensing requires G beta gamma-mediated PAK1 and PIX alpha-dependent activation of Cdc42. *Cell* **114**, 215-227.
- Lind, M., Eriksen, E. F. and Burger, C. (1996). Bone morphogenetic protein-2 but not bone morphogenetic protein-4 and -6 stimulates chemotactic migration of human osteoblasts, human marrow osteoblasts, and U2-OS cells. *Bone* **18**, 53-57.
- Lopez-Rovira, T., Chalaux, E., Massague, J., Rosa, J. L. and Ventura, F. (2002). Direct binding of Smad1 and Smad4 to two distinct motifs mediates bone morphogenetic protein-specific transcriptional activation of Id1 gene. *J. Biol. Chem.* **277**, 3176-3185.
- Macias-Silva, M., Hoodless, P. A., Tang, S. J., Buchwald, M. and Wrana, J. L. (1998). Specific activation of Smad1 signaling pathways by the BMP7 type I receptor, ALK2. *J. Biol. Chem.* **273**, 25628-25636.
- Mancini, R., Piccolo, E., Mariggio, S., Filippi, B. M., Iurisci, C., Pertile, P., Berrie, C. P. and Corda, D. (2003). Reorganization of actin cytoskeleton by the phosphoinositide metabolite glycerophosphoinositol 4-phosphate. *Mol. Biol. Cell* **14**, 503-515.
- Massague, J. (2000). How cells read TGF-beta signals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 169-178.
- Merlot, S. and Firtel, R. A. (2003). Leading the way: directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways. *J. Cell Sci.* **116**, 3471-3478.
- Nobes, C. D. and Hall, A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* **144**, 1235-1244.
- Papakonstanti, E. A. and Stournaras, C. (2002). Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization. *Mol. Biol. Cell* **13**, 2946-2962.
- Parrini, M. C., Lei, M., Harrison, S. C. and Mayer, B. J. (2002). Pak1 kinase homodimers are autoinhibited in trans and dissociated upon activation by Cdc42 and Rac1. *Mol. Cell* **9**, 73-83.
- Pomel, V., Klicic, J., Covini, D., Church, D. D., Shaw, J. P., Roulin, K., Burgat-Charvillon, F., Valognes, D., Camps, M., Chabert, C. et al. (2006). Furan-2-ylmethylene thiazolidinediones as novel, potent, and selective inhibitors of phosphoinositide 3-kinase gamma. *J. Med. Chem.* **49**, 3857-3871.
- Puri, K. D., Doggett, T. A., Douangpanya, J., Hou, Y., Tino, W. T., Wilson, T., Graf, T., Clayton, E., Turner, M., Hayflick, J. S. et al. (2004). Mechanisms and implications of phosphoinositide 3-kinase delta in promoting neutrophil trafficking into inflamed tissue. *Blood* **103**, 3448-3456.
- Raftopoulou, M. and Hall, A. (2004). Cell migration: Rho GTPases lead the way. *Dev. Biol.* **265**, 23-32.
- Ricos, M. G., Harden, N., Sem, K. P., Lim, L. and Chia, W. (1999). Dcdc42 acts in TGF-beta signaling during Drosophila morphogenesis: distinct roles for the Drac1/JNK and Dcdc42/TGF-beta cascades in cytoskeletal regulation. *J. Cell Sci.* **112**, 1225-1235.
- Ridley, A. J. and Hall, A. (1992). The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**, 389-399.
- Ridley, A. J., Schwartz, M. A., Burridge, K., Firtel, R. A., Ginsberg, M. H., Borisy, G., Parsons, J. T. and Horwitz, A. R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* **302**, 1704-1709.
- Ruckle, T., Biamonte, M., Grippi-Valotton, T., Arkininstall, S., Cambet, Y., Camps, M., Chabert, C., Church, D. J., Halazy, S., Jiang, X. et al. (2004). Design, synthesis, and biological activity of novel, potent, and selective (benzoylamino)methylthiophene sulfonamide inhibitors of c-Jun-N-terminal kinase. *J. Med. Chem.* **47**, 6921-6934.
- Sadhu, C., Dick, K., Tino, W. T. and Staunton, D. E. (2003). Selective role of PI3K delta in neutrophil inflammatory responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **308**, 764-769.
- Scott, R. W. and Olson, M. F. (2007). LIM kinases: function, regulation and association with human disease. *J. Mol. Med.* **85**, 555-568.
- Sotobori, T., Ueda, T., Myoui, A., Yoshioka, K., Nakasaki, M., Yoshikawa, H. and Itoh, K. (2006). Bone morphogenetic protein-2 promotes the haptotactic migration of murine osteoblastic and osteosarcoma cells by enhancing incorporation of integrin beta1 into lipid rafts. *Exp. Cell Res.* **312**, 3927-3938.
- Suire, S., Condliffe, A. M., Ferguson, G. J., Ellison, C. D., Guillou, H., Davidson, K., Welch, H., Coadwell, J., Turner, M., Chilvers, E. R. et al. (2006). Gbetagamma and the Ras binding domain of p110gamma are both important regulators of PI(3)Kgamma signalling in neutrophils. *Nat. Cell Biol.* **8**, 1303-1309.
- Vanhaesebroeck, B. and Waterfield, M. D. (1999). Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* **253**, 239-254.
- Vardouli, L., Moustakas, A. and Stournaras, C. (2005). LIM-kinase 2 and cofilin phosphorylation mediate actin cytoskeleton reorganization induced by transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **280**, 11448-11457.
- Vinals, F., Reiriz, J., Ambrosio, S., Bartrons, R., Rosa, J. L. and Ventura, F. (2004). BMP-2 decreases Mash1 stability by increasing Id1 expression. *EMBO J.* **23**, 3527-3537.
- Wan, M. and Cao, X. (2005). BMP signaling in skeletal development. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **328**, 651-657.
- Wells, C. M., Abo, A. and Ridley, A. J. (2002). PAK4 is activated via PI3K in HGF-stimulated epithelial cells. *J. Cell Sci.* **115**, 3947-3956.
- Wetzker, R. and Rommel, C. (2004). Phosphoinositide 3-kinases as targets for therapeutic intervention. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 1915-1922.
- Wilkes, M. C., Murphy, S. J., Garamszegi, N. and Leof, E. B. (2003). Cell-type-specific activation of PAK2 by transforming growth factor beta independent of Smad2 and Smad3. *Mol. Cell Biol.* **23**, 8878-8889.
- Wilkes, M. C., Mitchell, H., Penheiter, S. G., Dore, J. J., Suzuki, K., Edens, M., Sharma, D. K., Pagano, R. E. and Leof, E. B. (2005). Transforming growth factor-beta activation of phosphatidylinositol 3-kinase is independent of Smad2 and Smad3 and regulates fibroblast responses via p21-activated kinase-2. *Cancer Res.* **65**, 10431-10440.
- Yu, P. B., Beppu, H., Kawai, N., Li, E. and Bloch, K. D. (2005). Bone morphogenetic protein (BMP) type II receptor deletion reveals BMP ligand-specific gain of signaling in pulmonary artery smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* **280**, 24443-24450.
- Zhao, Z. S. and Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases-effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem. J.* **386**, 201-214.
- Zhou, G. L., Zhuo, Y., King, C. C., Fryer, B. H., Bokoch, G. M. and Field, J. (2003). Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. *Mol. Cell Biol.* **23**, 8058-8069.