

РЕГУЛЯЦИЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ И ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ МИОФИБРОБЛАСТОВ СИГНАЛЬНОЙ СИСТЕМОЙ ЦИТОСКЕЛЕТА

©2016 г. Н. САНДБО^{1*}, Л. В. СМОЛЬЯНИНОВА²,
С. Н. ОРЛОВ^{2,3*,#} и Н. О. ДУЛИН^{1,3,*#}

¹⁾ Департамент Медицины, Университет Висконсина, Мэдисон, США;

²⁾ Лаборатория биомембран биологического факультета
МГУ им. М.В.Ломоносова, Москва, Россия;

³⁾ Сибирский государственный медицинский университет, Томск, Россия;

⁴⁾ Департамент Медицины, Университет г. Чикаго, США

I. Введение. II. Формирование актиновых стресс волокон. III. Роль актиновых стресс волокон в перестройке внеклеточного матрикса. IV. Регуляции транскрипции динамикой актиновых филаментов. V. Контроль дифференцировки миофибробластов микротрубочками. VI. Контроль синтеза и секреции коллагена промежуточными филаментами. VII. Заключение

I. ВВЕДЕНИЕ

К миофибробластам относятся измененные фибробласты, вовлеченные в заживление ран в ответ на воспаление и в формирование патологических изменений внеклеточного матрикса (ЕСМ) при фиб-

Принятые сокращения: СагG box – СС(А/Т)6GG последовательность ДНК; ЕСМ – внеклеточный матрикс; ET1 – эндотелин-1; GPCR – рецепторы, сопряженные с G-белками; IDPN – иминодипропионитрил; IF – промежуточные филаменты; LPA – лизофосфатидная кислота; MRTF-A – миокардин-подобный транскрипционный фактор; Rho-GEFs – Rho факторы обмена гуаниновых нуклеотидов; RGD – аргинин, глицин, аспаргат; RPEL – аргинин/пролин/глутамат/лейцин; S1P – сфингозин-1 фосфат; SRF – фактор ответа сыворотки; TGF-β – трансформирующий ростовой фактор-бета; WF-A – витаферин-A; ГТФазы – гуанозин трифосфат гидролазы; МТ – микротрубочки.

#Адрес для корреспонденции: С.Н.Орлов – sergeinorlov@yandex.ru; Н.О.Дулин – ndulin@medicine.bsd.uchicago.edu.

Работа была поддержана Американскими обществами по изучению легких, фиброза легких и организацией по борьбе с фиброзом легких (Н.С.), стипендией Университета Висконсин и Национального института здоровья США HL126190 (Н.С.) и R56HL127395 (Н.О.Д.), грантами Национального центра помощи трансляционным наукам (UL1TR000430, Н.О.Д.), премией Ральфа и Марианна Фолька по поддержке медицинских исследований (Н.О.Д.), а также грантами РФФИ (15-04-00101, С.Н.О.) и Российского научного фонда (14-15-0006 и 16-15-10026, С.Н.О.).

* Авторы, внесшие равный вклад в написание обзора.

розе тканей. Исследования, проведенные с помощью электронной микроскопии, показали наличие в миофибробластах многочисленных хорошо сформированных микрофиламентов цитоскелета [1–3]. Эти микрофиламенты, были впоследствии идентифицированы как стресс волокна, состоящие как из универсальных цитозольных изоформ β и γ актина, так и α -актина, содержащегося в больших количествах в клетках гладкой мускулатуры, где обнаружены схожие стресс волокна. На основании этих наблюдений термин миофибробласты используется для описания фенотипа этих клеток.

Миофибробласты также характеризуются увеличенной экспрессией генов ЕСМ, которые участвуют в заживлении ран и образовании фиброзной ткани [4, 5]. К этим генам относятся периостин, фибронектин, включая сплайс-изоформу фибронектина, содержащую дополнительный домен EDA [6, 7], а также многочисленные изоформы коллагена [8]. Также отмечено увеличение экспрессии компонентов микрофиламентов, способствующих повышению сократительной активности миофибробластов [9]. Все это в совокупности с накоплением белков адгезии, таких как интегрины и протеогликаны, обеспечивает связь цитоскелета с внеклеточным матриксом и генерацию внутриклеточных сигналов в ответ на механические воздействия.

Таким образом, миофибробласты представляют собой сокращающиеся клетки, регулирующие функционирование органов в нормальных условиях. Они обнаружены в альвеолярном интерстиции, почечных синусах и регулируемых интерстициальных криптах [10]. При заживлении кожных ран миофибробласты необходимы для сокращения сформировавшихся гранулированных тканей, закрытия раны и для восстановления монослоя эпителия за счет развитого ЕСМ. Следует, однако, отметить, что чрезмерное накопление миофибробластов способствует развитию фиброза. Эти клетки являются основным поставщиком коллагена и других компонентов ЕСМ и обладают повышенной способностью к образованию зарождающегося при этом фибронектинового матрикса [11]. Они также обладают повышенной устойчивостью к апоптозу, что приводит к увеличению их относительной численности в ответ на воспаление и способствует формированию фиброза [12, 13]. В самом деле, миофибробласты найдены во всех фиброзных образованиях, исследовавшихся на этот предмет органов. Таким образом, управление процессом дифференцировки миофибробластов может явиться перспективной стратегией лечения болезней, обусловленных фиброзом тканей.

Ниже мы рассмотрим данные о решающей роли микрофиламентов цитоскелета в генерации механического напряжения фибробластов, образования комплексов фокальной адгезии, перестройке ЕСМ и регуляции транскрипции генов, имеющих критическое значение для дифференцировки миофибробластов. Мы также обсудим роль двух других компонентов системы цитоскелета – микротрубочек и промежуточных филаментов в дифференцировке миофибробластов и изменении свойств ЕСМ.

II. ФОРМИРОВАНИЕ АКТИНОВЫХ СТРЕСС ВОЛОКОН

Микрофиламенты цитоскелета образованы мономерами из 6 изоформ актина [14]. β и γ актин обнаружены в микрофиламентах большинства исследованных на этот предмет клеток. Как отмечалось выше, в миофибробластах увеличено содержание гладкомышечного α -актина, наряду с гладкомышечным γ -актином, а также α -актином сердечных и скелетных мышц. Микрофиламенты формирует трехмерную сеть, которая определяет форму клетки, способствует клеточной подвижности, и изменяет передачу силы к окружающему клетку матриксу.

Одна из морфологических особенностей миофибробластов – образование сети т.н. актиновых стресс волокон, принимающих важную роль в изменениях ЕСМ, окружающего плазматическую мембрану клетки. Стресс волокна представляют собой пучки полимеризованных актиновых микрофиламентов, которые, как правило, прикреплены одним или обоими концами к местам фокальной адгезии [15, 16]. В их образовании непосредственное участие принимает α -актинин, взаимодействующий с актином [17, 18]. Сходным образом, не мышечный миозин локализуется с актиновыми филаментами, являясь еще одним партнером актина [19]. С точки зрения проведения внеклеточных сигналов, актиновые филаменты образуются в ответ на активацию Rho семейства гуанозин трифосфат гидролаз (ГТФазы) [20], причем для этого процесса достаточна активация таких его представителей как Rho A, Rho B и Rho C [21, 22]. ГТФазы Rho семейства вовлечены в формирование стресс волокон через активацию двух серин-треониновых киназ ROCK1 и ROCK2, взаимодействующих с Rho белками. ROCK1 участвует в формировании актиновых филаментов путем инактивации кофилина (за счет его фосфорилирования LIM киназой), являющегося фактором деполимеризации актина [23] (рис. 1). Кроме того, киназы ROCK влияют на сокращение клеток через фосфорилирование и инактивацию фосфатазы легких цепей миозина, что приводит

Рис. 1. Сигнальные механизмы, контролирующие дифференцировку миофибробластов, и опосредованные актиновым цитоскелетом и микротрубочками.

TGF- β способствует активации Rho через Smad (SBE)-зависимую экспрессию сфингозин киназы-1 (SphK1), продуцирующую сфингозин-1-фосфат (S1P) (лиганд GPCR); через экспрессию эндотелина-1, также действующего на GPCR; или экспрессию GEF-H1 (Rho фактор обмена гуаниновых нуклеотидов), который напрямую активирует Rho. Rho может быть также активирован другими лигандами GPCR (например, лизофосфатидная кислота, LPA), или жесткостью и натяжением ЕСМ. Активация Rho приводит к образованию филаментов F-актина с помощью двух механизмов: а) ROCK/LIMK-зависимого фосфорилирования и инактивации фактора деполимеризации актина кофилина; б) через иницируемую mDia полимеризацию актина с участием профилина. В совокупности, активация этих путей приводит к снижению содержания мономерного (глобулярного) G-актина за счет его связывания с MRTF, транслокации MRTF в ядро и активации SRF-зависимой транскрипции генов, содержащих [CC(A/T)6GG] последовательность (называемую CArG box), ответственных за дифференцировку фибробластов. Микротрубочки (MT) подавляют этот процесс через различные механизмы, включая связывание белков Smad, GEF-H1 и/или mDia2. Дифференцировка миофибробластов также контролируется транскрипционными факторами YAP/TAZ, действующими через TEAD элемент промоторов генов-мишеней. Rho/F-актин путь передачи сигнала активирует YAP/TAZ через ингибирование LATS-зависимого фосфорилирования YAP/TAZ, что приводит к его диссоциации от фосфо-серин связывающего белка 14-3-3, транслокации в ядро и транскрипции генов-мишеней. Для расшифровки сокращений см. текст.

к фосфорилированию легких цепей миозина, и как следствие к ассоциации миозина с актиновыми филаментами [20, 24, 25]. Активация не мышечного миозина – необходимое условие для связывания в пучки уже существующих филаментов актина [20, 26].

Семейство форминов, включая белки mDia1, mDia2 и INF2, является другим набором эффекторов Rho, вовлеченных в формирование актиновых филаментов (рис. 1). mDia формины аутоингибируются их С-концевым регуляторным доменом. В присутствии ГТФ Rho перемещает ауторегуляторный домен формины, что приводит к экспонированию FN2 домена, который участвует в полимеризации актина [27, 28]. При образовании стресс волокон mDia1 стимулирует образование актиновых филаментов, иницирующихся в участках фокальной адгезии [29]. Зарождающиеся филаменты связываются в пучки с помощью рассмотренного выше ROCK-зависимого механизма, в результате чего происходит завершающая стадия формирования стресс волокон [30].

Трансформирующий ростовой фактор-бета (TGF- β), сфингозин-1 фосфат (S1P), лизофосфатидная кислота (LPA) и эндотелин-1 (ET1)

являются основными внеклеточными стимулами, инициирующими процесс дифференцировки миофибробластов посредством образования актиновых стресс волокон (рис. 1). Натяжение, передающееся в клетку с помощью ЕСМ, также играет важную роль в этом процессе. Это положение подтверждается тем, что актиновые стресс волокна образуются в гранулированных, но не в нормальных тканях [1]. В этой связи интересно отметить, что в культуре фибробластов на закреплённом коллагене наблюдается образование актиновых стресс волокон, которые быстро разбираются при освобождении коллагена от подложки культуральной плашки [31, 32].

Передача натяжения осуществляется посредством молекул интегринов, таких как интегрин $\beta 1$, локализованных в участках фокальной адгезии [33]. Прикладываемое к интегринам натяжение приводит к активации внутриклеточной RhoA [34]. Этот процесс осуществляется при участии тирозиновых киназ Fyn, киназы фокальной адгезии (FAK) и последующей активации Rho факторов обменивающихся гуаниновые нуклеотиды LARG и GEF-H1, соответственно [35].

Обработка клеток TGF- β также приводит к образованию актиновых стресс волокон в фибробластах, культивируемых на жесткой подложке [36]. Этот эффект, по-видимому, связан с активацией Rho ГТФаз посредством Rho факторов обмена гуаниновых нуклеотидов (Rho GEFs), изменение экспрессия которых происходит при участии белков Smad [37, 38]. Стимуляция клеток TGF- β сопровождается накоплением гладкомышечного α -актина, который увеличивает натяжение актиновых стресс волокон [39].

III. РОЛЬ АКТИНОВЫХ СТРЕСС ВОЛОКОН В ПЕРЕСТРОЙКЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА

Образование филаментов актина и актиновых стресс волокон играет ключевую роль в изменении миофибробластами функций тканей. Это событие рассматривается как необходимое условие для фокальной адгезии клеток, что, в свою очередь, приводит к передаче сигнала на ЕСМ и набор киназ, активность которых регулируется адгезией. Как уже отмечалось выше, фокальная адгезия инициирует образование актиновых филаментов и стресс волокон. Образовавшиеся актиновые волокна сами по себе служат местом сборки белков адгезии. Актинмиозинное сокращение стресс волокон также способствует фокальной адгезии клеток [20, 40]. Включение в стресс волокна гладкомышечного α -актина приводит к увеличению силы их натяжения и дальнейшему усилению адгезии миофибро-

бластов [41]. Несмотря на то, что передача сигнала об увеличении силы натяжения от миозина к другим молекулам, связанным с местами фокальной адгезии, является значимой для комплекса адгезии, точный механизм, описывающий этот эффект, остается малоизученным. Одна из возможностей предполагает участие в этом процессе механически чувствительных элементов комплекса адгезии. Среди таких кандидатов рассматривается талин, который в ответ на увеличение действующей силы высвобождает участки связывания с местами другого белка адгезии винкулина [42]. Дополнительно к этому, p130Cas-ассоциированный субстрат (p130Cas), являющийся одним из ключевых белков адгезии, содержит домен, который увеличивает свои размеры в ответ на воздействие силы, делая его более доступным для фосфорилирования таким тирозиновым киназам как Src, что также способствует сборке белков адгезии [43]. Образование актиновых стресс волокон, и связанное с этим процессом формирование комплексов адгезии, приводит к передаче сигнала о воздействии силы на окружающий клетку ЕСМ. Гетеродимеры интегрин, собирающие комплекс адгезии, распознают аргинин/глицин/аспартат (RGD) участки в таких молекулах ЕСМ как фибронектин, что является ключевым моментом в функциональном ответе миофибробластов, приводящем к заживлению ран. Появление актиновых стресс волокон в миофибробластах гранулированных тканей коррелирует с генерацией силы их сокращения [39]. В самом деле, было отмечено, что сокращение фибробластами геля, сформированного коллагеном, нарушается при обработке клеток ингибиторами образования актиновых филаментов [44, 45].

Следует отметить, что передача силового воздействия на индивидуальные компоненты ЕСМ может изменить модулирующую функцию фибробластов. Так, например, фибронектиновый матрикс вызывает кластеризацию фибробластов и миофибробластов. Фибриллы фибронектина собираются при связывании димеров фибронектина с поверхностью клеток посредством их N-конца, а также при связывании $\alpha 5 \beta 1$ димеров интегрин с RGD участками фибронектина [46, 47]. В результате этого процесса димеры фибронектина разворачиваются и экспонируются те его домены, которые до этого были в глубине его третичной структуры. В дальнейшем происходит $\alpha 5 \beta 1$ -опосредованная адгезия клеток, получившая название фибриллярной адгезии, связывающая внеклеточный фибронектин с актиновым цитоскелетом посредством интегрин- и актин-связывающего белка TNS1 [48]. Сокращение, опосредованное актомиозином, приводит к увеличению натяжения молекул фибронектина и появлению дополнительных до

этого скрытых участков связывания фибронектина [49, 50]. Этот процесс может регулироваться изменениями Rho-зависимого сокращения актомиозина, например, в ответ на добавление лизофосфатидной кислоты [51]. Как и в случае формирования фокальной адгезии, для формирования внеклеточных фибрилл из фибриноектина необходим интактный внутриклеточный цитоскелет [52] и этот процесс регулируется ROCK1/2 и миозином II [53]. Формирование миофибробластов также связано с увеличением скорости образования фибрилл фибронектина, что отчасти связано с увеличением содержания гладкомышечного α -актина [11]. Этот эффект, вероятно, происходит за счет увеличения силы натяжения молекул фибронектина, что приводит к усилению их разворачивания.

IV. РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ДИНАМИКОЙ АКТИНОВЫХ ФИЛАМЕНТОВ

Как было показано выше, структурные изменения актиновых филаментов участвуют в передаче силовых сигналов на внеклеточный матрикс, способствуя его перестройке в процессе дифференцировки миофибробластов. В дополнение к этой важной роли, структурная организация цитоскелета принимает участие в регуляции транскрипции генов в ответ на профибротические ростовые факторы и увеличения жесткости матрикса.

Регуляция транскрипции актиновым цитоскелетом осуществляется посредством изменения локализации коактиваторов транскрипции, взаимодействующих с актином. Первая подобная система регуляции была обнаружена при изучении механизма проведения сигналов, приводящих к активации SRF – транскрипционного фактора, регулируемого динамикой актиновых филаментов посредством Rho ГТФаз (рис. 1) [54, 55]. Было установлено, что одним из ключевых коактиваторов SRF является взаимодействующий с актином миокардин-подобный транскрипционный фактор (MRTF-A), также известный как MAL и MKL1 [56]. MRTF-A локализован в цитозоле за счет связывания через N-концевой аргинин/пролин/глутамат/лейцин (RPEL) мотив с мономерным (глобулярным) G-актином. Индукция Rho-зависимой полимеризации актина сопровождается диссоциацией MRTF-A от мономерного актина и его дислокацией в ядро, где он взаимодействует с SRF, связанным с ДНК в участках с последовательностью CC(A/T)₆GG, получившей название CArG-box. Это взаимодействие приводит к активации SRF, и посредством этого

механизма MRTF/SRF регулирует транскрипцию большого числа генов, кодирующих цитоскелетные и сократительные белки [57–59].

Rho-зависимая транскрипция, опосредованная MRTF/SRF, может быть активирована любыми внеклеточными стимулами, инициирующими полимеризацию актина. Лиганды рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR), такие как лизофосфатидная кислота и эндотелин-1, были первыми внеклеточными стимулами, для которых была обнаружена регуляция этого сигнального механизма [54, 60, 61]. Мы показали, что в ходе дифференцировки миофибробластов, вызванной профибротическим цитокином TGF- β , действие которого не опосредовано GPCR, также происходит полимеризация актина и активирование RhoA- и MRTF/SRF-опосредованных сигнальных каскадов [62, 63]. Сигналы, генерируемые TGF- β , опосредованы его взаимодействием с рецепторными серин/треониновыми киназами, что приводит к фосфорилированию белков семейства Smad (Smad 2/3), их гетеротримезацией с белком Smad4, транслокации комплекса в ядро, где он взаимодействует со Smad-связывающим элементом промоторов генов-мишеней (рис. 1). TGF- β , используя Smad-зависимый механизм, запускает экспрессию ряда молекул, активирующих Rho/актин/MRTF-A/SRF сигнальную систему, таких как агонисты GPCR, Rho белки, и Rho GEFs [37, 38, 64]. Более того, в ответ на добавление TGF- β увеличивается экспрессия интермедиатов этого сигнального каскада, включая MRTF-A и SRF [62, 63]. Таким образом, в ходе дифференцировки миофибробластов активация MRTF-A/SRF в ответ на TGF- β способствует Smad-зависимой регуляции экспрессии SRF-чувствительных генов. Дальнейшая интенсификация этого сигнального пути может обеспечиваться агонистами GPCR. Нокаут гена MRTF-A устраняет экспрессию маркера дифференцировки миофибробластов гладкомышечного α -актина и препятствует развитию фиброза миокарда и легких [65, 66], тем самым демонстрируя важную роль этого интермедиата в патогенезе фиброзных болезней.

Rho-зависимая активация MRTF-A происходит также в ответ на биомеханические сигналы, такие как прямое силовое воздействие на интегрины [67] или культивирование фибробластов на патологически модифицированном жестком ECM, вызывающем дифференцировку миофибробластов [68, 69]. При развитии фиброза легких MRTF-A/SRF-зависимый механизм также индуцирует экспрессию антиапоптотического белка BCL2 [70, 71]. В самом деле, фармакологическая блокада сигнальной системы MRTF-A/SRF способствует апоптозу миофибробластов и замедляет развитие фиброза легких [72].

Таким образом, эти механизмы предполагают, что Rho/Актин/MRTF/SRF, сигнальная цепь, объединяет многочисленные профиброзные сигналы, которые вызывают дифференцировку миофибробластов и фиброз тканей.

Наряду с MRTF/SRF, динамика актиновых филаментов регулирует экспрессию генов через Hippo/Yes-ассоциированный белок (YAP), являющийся коактиватором транскрипции через PDZ-связывающий мотив TAZ (рис. 1). У млекопитающих Hippo-опосредованная сигнальная система основана на регулируемой транслокации из цитоплазмы в ядро двух родственных факторов регуляции транскрипции: YAP и TAZ [73]. Серин-содержащие мотивы YAP/TAZ фосфорилируются LATS1/2 киназой, что приводит к высокоаффинному взаимодействию с цитоплазматическим фосфосерин-связывающим белком 14-3-3. В свою очередь LATS1/2 фосфорилируется Ste20-подобной киназой Mst1/2, которая является ортологом Hippo дрозофилы. Ингибирование фосфорилирования LATS1/2 киназой приводит к диссоциации YAP/TAZ от белка 14-3-3 и транслокации YAP/TAZ в ядро. В ядре YAP/TAZ связывается с доменами TEAD, найденными в структуре ряда факторов регуляции транскрипции, контролирующих пролиферацию клеток [74]. YAP/TAZ накапливается в ядре в ответ на увеличение жесткости ECM, контролируемой актиновым цитоскелетом [75]. Было обнаружено, что локализация YAP/TAZ находится под контролем полимеризации актина через ингибирование LATS1/2 [76, 77]. Механизм этого явления остается не исследованным. Следует отметить, что Rho может также регулировать локализацию YAP/TAZ независимо от активности LATS1/2 [75]. Показано, что транслокация YAP/TAZ необходима для экспрессии целого ряда маркеров дифференцировки миофибробластов, обнаруживаемых в фибробластах, культивируемых на жестком матриксе, в то время как повышенная экспрессия YAP и TAZ обеспечивает поддержание профиброзного фенотипа клеток [78]. Кроме того, YAP/TAZ и MRTF-A как факторы регуляции транскрипции могут взаимодействовать в ядре друг с другом для осуществления регуляции транскрипции [79–81].

V. КОНТРОЛЬ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ МИОФИБРОБЛАСТОВ МИКРОТРУБОЧКАМИ

Микротрубочки – компонент цитоскелета, обнаруженный во всех типах клеток и вовлеченный в процессы разделения хромосом при митозе, распределения в цитоплазме органелл, миграции, образования микроресничек, устойчивости клеток к факторам деформации. Микротрубочки состоят из α/β гетеродимеров тубулина, собранные в цилиндры, являющиеся структурной основой микротрубочек [82]. Микротрубочки ассиметричны и располагают быстрорастущим «плюс» концом, где осуществляется процесс удлинения микротрубочек, за счет гидролиза ГТФ, связанного с β -тубулином [83]. Микротрубочки характеризуются динамической нестабильностью, когда периоды элонгации филаментов заменяются их быстрой деполимеризацией. В контексте взаимодействия цитоскелета с клеточным матриксом степень полимеризации микротрубочек может регулироваться натяжением клеток на жестком субстрате [84], изменением плотности [85] и жесткости ЕСМ [86], указывая на микротрубочки как на механически чувствительные структуры.

В дополнение к восприятию внеклеточных биомеханических событий, степень полимеризации микротрубочек способна генерировать сигналы, приводящие к перестройке ЕСМ фибробластов. В самом деле, разрушение полимерной структуры микротрубочек вызывает образование актиновых филаментов, а, следовательно, увеличение силы сокращения [87]. Сопряжение микротрубочек с актиновым цитоскелетом осуществляется либо механически [88], либо биохимически через ассоциированный с микротрубочками белок p190RhoGEF, который активирует Rho-опосредованную полимеризацию актина [89] или образование актиновых филаментов с помощью mDIA1 и mDIA2 [90–93] (рис. 1). Сборка актиновых филаментов, опосредованная микротрубочками, приводит к быстрому формированию волокон фибронектина в ЕСМ [51], одновременно с индукцией профиброзных генов – ингибитор-1 активатора плазминогена (PAI-1) и фактор роста соединительной ткани (CTGF) [94, 95].

Ограниченное число работ рассматривает механизм вовлечение микротрубочек в регуляцию фосфорилирования и локализации Smad2/3 через их связывание с β -тубулином в эпителиальных клетках легкого, кардиомиоцитах и миобластов линии C2C12 [96, 97]. В этих работах показано, что нарушение структуры микротрубочек с помощью нокодазола или колхицина приводит к увеличению как базального, так и индуцированного TGF- β фосфорилирования Smad и Smad-зависимой транскрипции генов. В этих исследованиях

предложена механистическая модель, согласно которой Smad2/3/4 связывается с микротрубочками, в то время как TGF- β вызывает диссоциацию белков Smad, что в свою очередь приводит к их фосфорилированию, транслокации в ядро и транскрипции Smad-чувствительных генов. Эта модель предполагает, что микротрубочки могут рассматриваться как цитоплазматическая сеть, способная ограничивать функционирование белков Smad, контролируя фосфорилирование Smad2 активированным рецептором TGF- β [97]. Тем не менее, до сих пор не показано разрушение микротрубочек TGF- β , не рассматривается возможный механизм этого явления, а также не получен ответ на вопрос, каким образом разрушение микротрубочек нокодазолом приводит к фосфорилированию Smad2 и Smad-зависимой транскрипции генов в отсутствие TGF- β [97].

Описанная выше модель рассматривает динамику микротрубочек как фактор, регулирующий дифференцировку миофибробластов. В самом деле, мы показали, что стабилизация таксомом микротрубочек в фибробластах легких человека устраняет накопление миофибробластов в ответ на добавление TGF- β [93]. Следует, однако, отметить, что наши данные предполагают наличие механизма, отличного от предложенного при исследовании эпителиальных клеток легких, кардиомиоцитов и культуры C2C12 [96, 97]. В самом деле, в наших экспериментах на фибробластах, изолированных из легкого человека, TGF- β не оказывал влияние на полимеризацию микротрубочек. Мы также показали, что нарушение микротрубочек с помощью колхицина приводит к появлению маркера миофибробластов гладкомышечного α -актина на фоне неизменного фосфорилирования Smad2/3 и его транслокации в ядро. Более того, стабилизация микротрубочек таксомом, блокировала действие TGF- β на эти процессы, не изменяя при этом фосфорилирование Smad и Smad-зависимую транскрипцию генов в ответ на добавление TGF- β [93].

Результаты, полученные нами на фибробластах легкого человека, предполагают, что микротрубочки контролируют индуцированную TGF- β дифференцировку миобластов на уровне формирования актиновых стресс волокон [93]. Такой механизм может быть обусловлен связыванием микротрубочками фактора обмена гуаниновых нуклеотидов GEF-H1, известного также как активатор Rho киназ [89]. В самом деле, установлено, что TGF- β вызывает экспрессию GEF-H1 в клетках эпителия сетчатки, и что этот механизм может быть вовлечен в TGF- β -индуцированную экспрессию гладкомышечного α -актина [95]. В наших экспериментах, TGF- β также вызывал увеличение содержания GEF-H1 в фибробластах легкого, в то время

как инактивация GEF-H1 с помощью малых интерферирующих РНК (siRNA) не влияла на дифференцировку миофибробластов (данные подготавливаются к печати). В качестве альтернативного механизма можно предположить, что микротрубочки могут контролировать образование актиновых стресс волокон, активацию SRF, и дифференцировку миофибробластов через секвестрацию белка mDia2 [93], выполняющего центральную роль в формировании актиновых стресс волокон [29].

VI. КОНТРОЛЬ СИНТЕЗА И СЕКРЕЦИИ КОЛЛАГЕНА ПРОМЕЖУТОЧНЫМИ ФИЛАМЕНТАМИ

Промежуточные филаменты представляют собой волокна диаметром ~10 нм, сформированные из набора белков, кодируемых как минимум 65 генами [98, 99]. Поддержание механического напряжения и сопротивление механическому воздействию потока внеклеточной жидкости рассматриваются в качестве основных функций промежуточных филаментов. Клетки млекопитающих содержат два принципиально различных типа промежуточных филаментов: ядерные и цитоплазматические. Ядерные промежуточные филаменты состоят из ламин, образующих вместе с набором других белков ядерную пластинку, которая поддерживает структуру ядра и формирование комплексов ядерных белков [100]. С использованием агентов, разрушающих цитоплазматические промежуточные филаменты, было показано, что эти структуры отвечают за поддержание формы клеток [101]. Основываясь на гомологии аминокислотных последовательностей, белки промежуточных филаментов разделяются на 6 групп: 1) кислые кератины; 2) щелочные кератины; 3) виментин, десмин, глиальный фибриллярный кислый белок (GFAP), периферин; 4) триплетный белок нейрофиламентов, α -интернексин, нестин; 5) ламины и 6) специфические белки хрусталика и бусообразные структурные белки филаментов Vfsp1 и Vfsp2 [102].

Виментин – наиболее распространенный белок промежуточных филаментов и основной строительный блок для создания цитоплазматических промежуточных филаментов мезенхимальных клеток, включая фибробласты. В этой связи интересно отметить, что нокаут гена виментина у мышей не оказывает видимого влияния на их развитие, репродуктивную способность и структурно-функциональную организацию органов [103]. Тем не менее, некоторые особенности этих мышей были обнаружены в условиях стресса, вызванного нарушениями процесса заживления ран [104] и развитием эксперимен-

тального колита [105]. Последние исследования также показали, что нокаут виментина приводит к нарушению воспалительного процесса и развития фиброза в ответ на инъекции липополисахаридов и блеомицина [106]. Было установлено, что виментин необходим для активации «инфламмосомы» – комплекса белков, ответственных за передачу воспалительного сигнала клетками иммунной системы. Химерные мыши с клетками костного мозга, не имеющими виментина, обнаруживали уменьшенное развитие фиброза легких в ответ на инъекции блеомицина [106].

При культивировании клеток эмбрионов мышей, лишенных виментина, было обнаружено, что фибробласты характеризуются снижением жесткости, механической стабильности, подвижности и перемещением в направлении фибронектина, тромбоцитарного фактора роста и среды, в которой росли клетки контрольных животных [107]. Это явление сопровождалось нарушением пространственной организации белков фокальной адгезии и актиновых микрофиламентов [107]. Рассматривая эти данные в совокупности с известной ролью актиновых филаментов в регуляции описанных выше сигналов, связанных с SRF и Hippo, представляется интересным изучение активности этих сигнальных систем, особенности дифференцировки миофибробластов и развития фиброза у мышей, лишенных виментина.

Несмотря на то, что дифференцировка миофибробластов у мышей, лишенных виментина, не была исследована, было обнаружено, что дефицит этого белка сопровождается нарушением синтеза коллагена-1 с привлечением уникального механизма проведения сигнала (рис. 2) [108]. Известно, что стабилизация мРНК коллагена играет главную роль в регуляции его синтеза [109–111]. 5'-нетранслируемый участок (UTR) мРНК Col1A1 и Col1A2 содержит т.н. шпильку (5'SL). Этот участок контролирует стабильность и трансляцию мРНК посредством белка LARP6, связывающегося с высоким сродством с 5'SL [112]. Полученные данные указывают на то, что мРНК Col1A1 and Col1A2 взаимодействуют с филаментами виментина (но не с белком, находящимся в растворе) по механизму, опосредованному 5'SL/LARP6, что и является причиной увеличения ее стабильности. Нокаут виментина или разрушение промежуточных филаментов с помощью иминодипропионитрила (IDPN) вызывает резкое уменьшение времени жизни мРНК коллагена, а, следовательно, и содержания белков Col1A1 и Col1A2 [108].

В последующих работах [113] был использован витаферин-А (WF-A), выделенный из растения Ашвагандха, или индийский женьшень (*Withania somnifera*) – соединение, связывающееся с вимен-

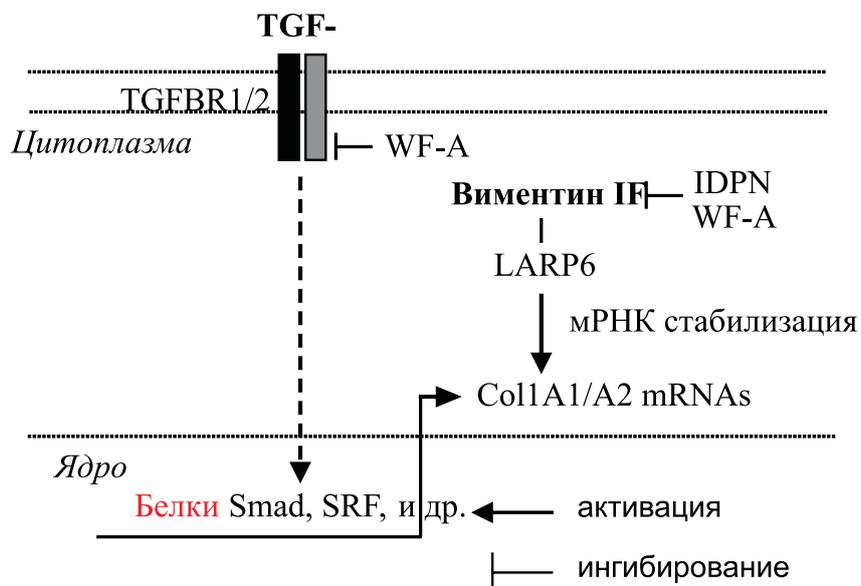


Рис. 2. Контроль синтеза коллагена промежуточными филаментами виментина.

мРНК Col1A1 и Col1A2 взаимодействуют и стабилизируются белком LARP6, который также взаимодействует с промежуточными филаментами виментина (IF), и это взаимодействие необходимо для РНК-стабилизирующей функции LARP6. Разрушение промежуточных филаментов соединениями IDPN или WF-A вызывает деградацию мРНК Col1A1 и Col1A2. WF-A также ингибирует TGF- β -индуцированную транскрипцию генов Col1A1 и Col1A2 через подавление фосфорилирования рецепторов TGFBR1; тем не менее, роль виментиновых филаментов в этом механизме остается не изученной. Для расшифровки сокращений см. текст.

тином и разрушающее сеть промежуточных филаментов за счет ковалентной модификации цистеинового остатка виментина [114]. Разрушение промежуточных филаментов WF-A в фибробластах человека сопровождалось уменьшением стабильности Col1A1 и Col1A2 мРНК и снижением содержания как самих мРНК, так и белков Col1A1 и Col1A2, соответственно (рис. 2). Такое же действие WF-A было показано на гепатоцитах и фибробластах сердца крысы. Во всех случаях WF-A подавлял экспрессию коллагена-1, индуцированную TGF- β . В этих же работах был обнаружен другой механизм действия WF-A, опосредованный снижением в присутствии

TGF- β фосфорилирования его рецептора и белка Smad3, а также подавление транскрипции Col1A2 на уровне промотора этого гена. В экспериментах *in vivo* было показано, что WF-A подавляет фиброз сердца, вызванный введением изопротеренола [113]. Для выяснения роли нарушения филаментов виментина в ингибировании WF-A сигнальной системы, индуцированной TGF- β , требуется проведение дополнительных экспериментов.

Совсем недавно был описан другой механизм контроля секреции коллагена-1, опосредованный LARP6. Он связан с фосфорилированием LARP6 АКТ киназой по остатку серина-451, данное фосфорилирование контролирует скорость секреции коллагена-1, но не оказывает никакого влияния на содержание его мРНК [115]. Роль филаментов виментина в фосфорилировании LARP6 и секреции коллагена не исследовалась.

VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Цитоскелет, состоящий из актиновых филаментов, микротрубочек и промежуточных филаментов, традиционно рассматривался как ключевой элемент структурной организации клетки. Так, например, профибротически модифицированные (мио)фибробласты были исходно морфологически идентифицированы как клетки, содержащие актиновые стресс волокна. Более поздние исследования показали динамическую природу организации элементов цитоскелета и, неожиданно, установили их роль во взаимодействии с клеточным матриксом и генерацией сигналов, которые определяют дальнейшую судьбу клетки. В настоящее время считается, что компоненты цитоскелета олицетворяют все структурно-функциональные взаимодействия клетки, в том числе, ответ (мио)фибробластов на действие внеклеточных ростовых факторов, биомеханические воздействия, а также перестройки в составе образующегося матрикса и грануляцию тканей при заживлении ран и развитии фиброза. Дополнительные исследования должны быть проведены для того, чтобы использовать эти знания для разработки новых подходов лечения воспалительных процессов и болезней, обусловленных фиброзом тканей.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gabbiani, G., Ryan, G.B., Majne, G. (1971) Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction, *Experientia*, **27**, 549–550.
2. Majno, G., Gabbiani, G., Hirschel, B.J., Ryan, G.B., Statkov, P.R. (1971) Contraction of granulation tissue in vitro: similarity to smooth muscle, *Science*, **173**, 548–550.
3. Ryan, G.B., Cliff, W.J., Gabbiani, G., Irle, C., Montandon, D., Statkov, P.R., Majno, G. (1974) Myofibroblasts in human granulation tissue, *Hum. Pathol.*, **5**, 55–67.
4. Horiuchi, K., Amizuka, N., Takeshita, S., Takamatsu, H., Katsuura, M., Ozawa, H., Toyama, Y., Bonewald, L.F., Kudo, A. (1999) Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta, *J. Bone Miner. Res.*, **14**, 1239–1249.
5. Elliott, C.G., Wang, J., Guo, X., Xu, S.W., Eastwood, M., Guan, J., Leask, A., Conway, S.J., Hamilton, D.W. (2012) Periostin modulates myofibroblast differentiation during full-thickness cutaneous wound repair, *Journal Cell Science*, **125**, 121–132.
6. Roberts, C.J., Birkenmeier, T.M., McQuillan, J.J., Akiyama, S.K., Yamada, S.S., Chen, W.T., Yamada, K.M., McDonald, J.A. (1988) Transforming growth factor beta stimulates the expression of fibronectin and of both subunits of the human fibronectin receptor by cultured human lung fibroblasts, *Journal Biological Chemistry*, **263**, 4586–4592.
7. Serini, G., Bochaton-Piallat, M.-L., Ropraz, P., Geinoz, A., Borsi, L., Zardi, L., Gabbiani, G. (1998) The Fibronectin Domain ED-A Is Crucial for Myofibroblastic Phenotype Induction by Transforming Growth Factor- β 1, *Journal Cell Biology*, **142**, 873–881.
8. Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., et al. (1986) Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 4167–4171.
9. Malmstrom, J., Lindberg, H., Lindberg, C., Bratt, C., Wieslander, E., Delander, E.L., Sarnstrand, B., Burns, J.S., Mose-Larsen, P., Fey, S., Marko-Varga, G. (2004) Transforming growth factor-beta 1 specifically induce proteins involved in the myofibroblast contractile apparatus, *Mol. Cell Proteomics*, **3**, 466–477.
10. Powell, D.W., Mifflin, R.C., Valentich, J.D., Crowe, S.E., Saada, J.I., West, A.B. (1999) Myofibroblasts. I. Paracrine cells important in health and disease, *Am. J. Physiol.*, **277**, C1–C19.
11. Torr, E.E., Ngam, C.R., Bernau, K., Tomasini-Johansson, B., Acton, B., Sandbo, N. (2015) Myofibroblasts exhibit enhanced fibronectin assembly that is intrinsic to their contractile phenotype, *Journal Biological Chemistry*, **290**, 6951–6961.
12. Zhang, H.Y., Phan, S.H. (1999) Inhibition of myofibroblast apoptosis by transforming growth factor beta(1), *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, **21**, 658–665.
13. Desmouliere, A., Chaponnier, C., Gabbiani, G. (2005) Tissue repair, contraction, and the myofibroblast, *Wound Repair Regen.*, **13**, 7–12.
14. Perrin, B.J., Ervasti, J.M. (2010) The actin gene family: function follows isoform, *Cytoskeleton*, **67**, 630–634.

15. Goldman, R.D., Lazarides, E., Pollock, R., Weber, K. (1975) The distribution of actin in non-muscle cells. The use of actin antibody in the localization of actin within the microfilament bundles of mouse 3T3 cells, *Exp. Cell Res.*, **90**, 333–344.
16. Kreis, T.E., Winterhalter, K.H., Birchmeier, W. (1979) In vivo distribution and turnover of fluorescently labeled actin microinjected into human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 3814–3818.
17. Lazarides, E. (1975) Immunofluorescence studies on the structure of actin filaments in tissue culture cells, *J. Histochem. Cytochem.*, **23**, 507–528.
18. Lazarides, E., Burridge, K. (1975) Alpha-actinin: immunofluorescent localization of a muscle structural protein in nonmuscle cells, *Cell*, **6**, 289–298.
19. Weber, K., Groeschel-Stewart, U. (1974) Antibody to myosin: the specific visualization of myosin-containing filaments in nonmuscle cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 4561–4564.
20. Chrzanowska-Wodnicka, M., Burridge, K. (1996) Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions, *Journal Cell Biology*, **133**, 1403–1415.
21. Paterson, H.F., Self, A.J., Garrett, M.D., Just, I., Aktories, K., Hall, A. (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology, *Journal Cell Biology*, **111**, 1001–1007.
22. Giry, M., Popoff, M.R., von Eichel-Streiber, C., Boquet, P. (1995) Transient expression of RhoA, -B, and -C GTPases in HeLa cells potentiates resistance to *Clostridium difficile* toxins A and B but not to *Clostridium sordellii* lethal toxin, *Infect. Immun.*, **63**, 4063–4071.
23. Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., Mizuno, K. (2000) Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop, *Journal Biological Chemistry*, **275**, 3577–3582.
24. Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., Kaibuchi, K. (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase), *Science*, **273**, 245–248.
25. Yoneda, A., Multhaupt H.A., Couchman, J.R. (2005) The Rho kinases I and II regulate different aspects of myosin II activity, *Journal Cell Biology*, **170**, 443–453.
26. Lamb, N.J., Fernandez, A., Conti, M.A., Adelstein, R., Glass, D.B., Welch, W.J., Feramisco, J.R. (1988) Regulation of actin microfilament integrity in living nonmuscle cells by the cAMP-dependent protein kinase and the myosin light chain kinase, *Journal Cell Biology*, **106**, 1955–1971.
27. Alberts, A.S. (2001) Identification of a carboxyl-terminal diaphanous-related formin homology protein autoregulatory domain, *Journal Biological Chemistry*, **276**, 2824–2830.
28. Zigmond, S.H. (2004) Formin-induced nucleation of actin filaments, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **16**, 99–105.
29. Hotulainen, P., Lappalainen, P. (2006) Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells, *The Journal Cell Biology*, **173**, 383–394.
30. Watanabe, N., Kato, T., Fujitani A., Ishizaki T., Narumiya, S. (1999) Cooperation between mDial and ROCK in Rho-induced actin reorganization, *Nat. Cell Biol.*, **1**, 136–143.

31. Farsi, J.M., Aubin, J.E. (1984) Microfilament rearrangements during fibroblast-induced contraction of three-dimensional hydrated collagen gels, *Cell Motil.*, **4**, 29–40.
32. Mochitate, K., Pawelek, P., Grinnell, F. (1991) Stress relaxation of contracted collagen gels: disruption of actin filament bundles, release of cell surface fibronectin, and down-regulation of DNA and protein synthesis, *Exp. Cell Res.*, **193**, 198–207.
33. Arora, P.D., Narani, N., McCulloch, C.A. (1999) The compliance of collagen gels regulates transforming growth factor-beta induction of alpha-smooth muscle actin in fibroblasts, *Am. J. Pathol.*, **154**, 871–882.
34. Huvneers, S., Danen, E.H.J. (2009) Adhesion signaling – crosstalk between integrins, Src and Rho, *Journal Cell Science*, **122**, 1059–1069.
35. Guilluy, C., Swaminathan, V., Garcia-Mata, R., O'Brien, E.T., Superfine, R., Burridge, K. (2011) The Rho GEFs LARG and GEF-H1 regulate the mechanical response to force on integrins, *Nat. Cell Biol.*, **13**, 722–727.
36. Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F., Gabbiani, G. (1993) Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts, *Journal Cell Biology*, **122**, 103–111.
37. Shen, X., Li, J., Hu, P.P., Waddell, D., Zhang, J., Wang, X.F. (2001) The activity of guanine exchange factor NET1 is essential for transforming growth factor-beta-mediated stress fiber formation, *Journal Biological Chemistry*, **276**, 15362–15368.
38. Tsapara, A., Luthert, P., Greenwood, J., Hill, C.S., Matter, K., Balda, M.S. (2010) The RhoA activator GEF-H1/Lfc is a transforming growth factor-beta target gene and effector that regulates alpha-smooth muscle actin expression and cell migration, *Molecular Biology Cell*, **21**, 860–870.
39. Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C., Gabbiani, G. (2001) Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation, *Am. J. Pathol.*, **159**, 1009–1020.
40. Delanoe-Ayari, H., Al Kurdi, R., Vallade, M., Gulino-Debrac, D., Riveline, D. (2004) Membrane and acto-myosin tension promote clustering of adhesion proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 2229–2234.
41. Hinz, B., Dugina, V., Ballestrem, C., Wehrle-Haller, B., Chaponnier, C. (2003) Alpha-smooth muscle actin is crucial for focal adhesion maturation in myofibroblasts, *Molecular Biology Cell*, **14**, 2508–2519.
42. del Rio, A., Perez-Jimenez, R., Liu, R., Roca-Cusachs, P., Fernandez, J.M., Sheetz, M.P. (2009) Stretching single talin rod molecules activates vinculin binding, *Science*, **323**, 638–641.
43. Sawada, Y., Tamada, M., Dubin-Thaler, B.J., Cherniavskaya, O., Sakai, R., Tanaka, S., Sheetz, M.P. (2006) Force sensing by mechanical extension of the Src family kinase substrate p130Cas, *Cell*, **127**, 1015–1026.
44. Bell, E., Ivarsson, B., Merrill, C. (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 1274–1278.
45. Kolodney, M.S., Wysolmerski, R.B. (1992) Isometric contraction by fibroblasts and endothelial cells in tissue culture: a quantitative study, *Journal Cell Biology*, **117**, 73–82.
46. Schwarzbauer, J.E., DeSimone, D.W. (2011) Fibronectins, their fibrillogenesis, and in vivo functions, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **3**.

47. Tomasini-Johansson, B.R., Annis, D.S., Mosher, D.F., (2006) The N-terminal 70-kDa fragment of fibronectin binds to cell surface fibronectin assembly sites in the absence of intact fibronectin, *Matrix. Biol.*, **25**, 282–293.
48. Zamir, E., Katz, B.Z., Aota, S., Yamada, K.M., Geiger, B., Kam, Z. (1999) Molecular diversity of cell-matrix adhesions, *Journal Cell Science*, **112** (Pt 11), 1655–1669.
49. Baneyx, G., Baugh, L., Vogel, V. (2002) Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 5139–5143.
50. Zhong, C., Chrzanowska-Wodnicka, M., Brown, J., Shaub, A., Belkin, A.M., Burridge, K. (1998) Rho-mediated contractility exposes a cryptic site in fibronectin and induces fibronectin matrix assembly, *Journal Cell Biology*, **141**, 539–551.
51. Zhang, Q., Magnusson, M.K., Mosher, D.F. (1997) Lysophosphatidic acid and microtubule-destabilizing agents stimulate fibronectin matrix assembly through Rho-dependent actin stress fiber formation and cell contraction, *Molecular Biology Cell*, **8**, 1415–1425.
52. Wu, C., Keivens, V.M., O'Toole, T.E., McDonald, J.A., Ginsberg, M.H. (1995) Integrin activation and cytoskeletal interaction are essential for the assembly of a fibronectin matrix, *Cell*, **83**, 715–724.
53. Yoneda, A., Ushakov, D., Multhaupt, H.A., Couchman, J.R. (2007) Fibronectin matrix assembly requires distinct contributions from Rho kinases I and -II, *Molecular Biology Cell*, **18**, 66–75.
54. Hill, C.S., Wynne, J., Treisman, R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF, *Cell*, **81**, 1159–1170.
55. Sotiropoulos, A., Gineitis, D., Copeland, J., Treisman, R. (1999) Signal-regulated activation of serum response factor is mediated by changes in actin dynamics, *Cell*, **98**, 159–169.
56. Miralles, F., Posern, G., Zaromytidou, A.I., Treisman, R. (2003) Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL, *Cell*, **113**, 329–342.
57. Miano, J.M. (2003) Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression, *Journal Molecular Cellular Cardiology*, **35**, 577–593.
58. Sun, Q., Chen, G., Streb, J.W., Long, X., Yang, Y., Stoeckert, C.J., Jr., Miano, J.M. (2006) Defining the mammalian CARome, *Genome Research*, **16**, 197–207.
59. Esnault, C., Stewart, A., Gualdrini, F., East, P., Horswell, S., Matthews, N., Treisman, R. (2014) Rho-actin signaling to the MRTF coactivators dominates the immediate transcriptional response to serum in fibroblasts, *Genes Development*, **28**, 943–958.
60. Mao, J., Yuan, H., Xie, W., Simon, M.I., Wu, D. (1998) Specific involvement of G proteins in regulation of serum response factor-mediated gene transcription by different receptors, *Journal Biological Chemistry*, **273**, 27118–27123.
61. Gohla, A., Offermanns, S., Wilkie, T.M., Schultz, G. (1999) Differential involvement of G α 12 and G α 13 in receptor-mediated stress fiber formation, *Journal Biological Chemistry*, **274**, 17901–17907.
62. Sandbo, N., Kregel, S., Taurin, S., Bhorade, S., Dulin, N.O. (2009) Critical role of serum response factor in pulmonary myofibroblast differentiation induced by TGF- β , *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, **41**, 332–338.

63. Sandbo, N., Lau, A., Kach, J., Ngam, C., Yau, D., Dulin, N.O. (2011) Delayed stress fiber formation mediates pulmonary myofibroblast differentiation in response to TGF- β , *American Journal Physiology*, **301**, L656–L666.
64. Cencetti, F., Bernacchioni, C., Nincheri, P., Donati, C., Bruni, P. (2010) Transforming growth factor- β 1 induces transdifferentiation of myoblasts into myofibroblasts via up-regulation of sphingosine kinase-1/S1P3 axis, *Molecular Biology Cell*, **21**, 1111–1124.
65. Small, E.M., Thatcher, J.E., Sutherland, L.B., Kinoshita, H., Gerard, R.D., Richardson, J.A., Dimairo, J.M., Sadek, H., Kuwahara, K., Olson, E.N. (2010) Myocardin-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction, *Circulation Research*, **107**, 294–304.
66. Bernau, K., Ngam, C., Torr, E.E., Acton, B., Kach, J., Dulin, N.O., Sandbo, N. (2015) Megakaryoblastic leukemia-1 is required for the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, *Respiratory Research*, **16**, 45.
67. Zhao, X.H., Laschinger, C., Arora, P., Szaszi, K., Kapus, A., McCulloch, C.A. (2007) Force activates smooth muscle α -actin promoter activity through the Rho signaling pathway, *Journal Cell Science*, **120**, 1801–1809.
68. Liu, F., Mih, J.D., Shea, B.S., Kho, A.T., Sharif, A.S., Tager, A.M., Tschumperlin, D.J. (2010) Feedback amplification of fibrosis through matrix stiffening and COX-2 suppression, *Journal Cell Biology*, **190**, 693–706.
69. Huang, X., Yang, N., Fiore, V.F., Barker, T.H., Sun, Y., Morris, S.W., Ding, Q., Thannickal, V.J., Zhou, Y. (2012) Matrix stiffness-induced myofibroblast differentiation is mediated by intrinsic mechanotransduction, *American Journal Respiratory Cell Molecular Biology*, **47**, 340–348.
70. Schratt, G., Philippar, U., Hockemeyer, D., Schwarz, H., Alberti, S., Nordheim, A. (2004) SRF regulates Bcl-2 expression and promotes cell survival during murine embryonic development, *EMBO Journal*, **23**, 1834–1844.
71. Zhou, Y., Huang, X., Hecker, L., Kurundkar, D., Kurundkar, A., Liu, H., Jin, T.H., Desai, L., Bernard, K., Thannickal, V.J., Inhibition of mechanosensitive signaling in myofibroblasts ameliorates experimental pulmonary fibrosis, *Journal Clinical Investigation*, **123**, (2013) 1096–1108.
72. Sisson, T.H., Ajayi, I.O., Subbotina, N., Dodi, A.E., Rodansky, E.S., Chibucos, L.N., Kim, K.K., Keshamouni, V.G., White, E.S., Zhou, Y., Higgins, P.D., Larsen, S.D., Neubig, R.R., Horowitz, J.C. (2015) Inhibition of myocardin-related transcription factor/serum response factor signaling decreases lung fibrosis and promotes mesenchymal cell apoptosis, *Am. J. Pathol.*, **185**, 969–986.
73. Low, B.C., Pan, C.Q., Shivashankar, G.V., Bershadsky, A., Sudol, M., Sheetz, M. (2014) YAP/TAZ as mechanosensors and mechanotransducers in regulating organ size and tumor growth, *FEBS Letters*, **588**, 2663–2670.
74. Vassilev, A., Kaneko, K.J., Shu, H., Zhao, Y., DePamphilis, M.L. (2001) TEAD/TEF transcription factors utilize the activation domain of YAP65, a Src/Yes-associated protein localized in the cytoplasm, *Genes Development*, **15**, 1229–1241.
75. Dupont, S., Morsut, L., Aragona, M., Enzo, E., Giulitti, S., Cordenonsi, M., Zanconato, F., Le Digabel, J., Forcato, M., Bicciato, S., Elvassore, N., Piccolo, S. (2011) Role of YAP/TAZ in mechanotransduction, *Nature*, **474**, 179–183.

76. Sansores-Garcia, L., Bossuyt, W., Wada, K., Yonemura, S., Tao, C., Sasaki, H., Halder, G. (2011) Modulating F-actin organization induces organ growth by affecting the Hippo pathway, *EMBO Journal*, **30**, 2325–2335.
77. Wada, K., Itoga, K., Okano, T., Yonemura, S., Sasaki, H. (2011) Hippo pathway regulation by cell morphology and stress fibers, *Development (Cambridge, England)*, **138**, 3907–3914.
78. Liu, F., Lagares, D., Choi, K.M., Stopfer, L., Marinkovic, A., Vrbanac, V., Probst, C.K., Hiemer, S.E., Sisson, T.H., Horowitz, J.C., Rosas, I.O., Fredenburgh, L.E., Feghali-Bostwick, C., Varelas, X., Tager, A.M., Tschumperlin, D.J. (2015) Mechanosignaling through YAP and TAZ drives fibroblast activation and fibrosis, *American Journal Physiology*, **308**, L344–L357.
79. Yu, O.M., Miyamoto, S., Brown, J.H. (2015) Myocardin-Related Transcription Factor A and Yes-Associated Protein Exert Dual Control in G Protein-Coupled Receptor- and RhoA-Mediated Transcriptional Regulation and Cell Proliferation, *Molecular Cellular Biology*, **36**, 39–49.
80. Liu, C.Y., Chan, S.W., Guo, F., Toloczko, A., Cui, L., Hong, W. (2016) MRTF/SRF dependent transcriptional regulation of TAZ in breast cancer cells, *Oncotarget*, **7**, 13706–13716.
81. Speight, P., Kofler, M., Szaszi, K., Kapus, A. (2016) Context-dependent switch in chemo/mechanotransduction via multilevel crosstalk among cytoskeleton-regulated MRTF and TAZ and TGFbeta-regulated Smad3, *Nature Communications*, **7**, 11642.
- [82. Desai A., Mitchison T.J., Microtubule polymerization dynamics, Annual review of cell and developmental biology 13 (1997) 83–117.
83. Weisenberg, R.C., Deery, W.J., Dickinson, P.J. (1976) Tubulin-nucleotide interactions during the polymerization and depolymerization of microtubules, *Biochemistry*, **15**, 4248–4254.
84. Putnam, A.J., Schultz, K., Mooney, D.J. (2001) Control of microtubule assembly by extracellular matrix and externally applied strain, *American Journal Physiology*, **280**, C556–564.
85. Mooney, D.J., Hansen, L.K., Langer, R., Vacanti, J.P., Ingber, D.E., Extracellular matrix controls tubulin monomer levels in hepatocytes by regulating protein turnover, *Molecular Biology Cell*, **5**, (1994) 1281–1288.
86. Heck, J.N., Ponik, S.M., Garcia-Mendoza, M.G., Pehlke, C.A., Inman, D.R., Eliceiri, K.W., Keelym P.J. (2012) Microtubules regulate GEF-H1 in response to extracellular matrix stiffness, *Molecular Biology Cell*, **23**, 2583–2592.
87. Danowski, B.A. (1989) Fibroblast contractility and actin organization are stimulated by microtubule inhibitors, *Journal Cell Science*, **93 (Pt 2)**, 255–266.
88. Ingber, D.E., Tensegrity, I. (2003) Cell structure and hierarchical systems biology, *Journal Cell Science*, **116**, 1157–1173.
89. Krendel, M., Zenke, F.T., Bokoch, G.M. (2002) Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton, *Nat. Cell Biol.*, **4**, 294–301.
90. Bartolini, F., Moseley, J.B., Schmorranzer, J., Cassimeris, L., Goode, B.L., Gundersen, G.G. (2008) The formin mDia2 stabilizes microtubules independently of its actin nucleation activity, *Journal Cell Biology*, **181**, 523–536.
91. Gaillard, J., Ramabhadran, V., Neumanne, E., Gurel, P., Blanchoin, L., Vantard, M., Higgs, H.N. (2011)

- Differential interactions of the formins INF2, mDia1, and mDia2 with microtubules, *Molecular Biology Cell*, **22**, 4575–4587.
92. Goode, B.L., Eck, M.J. (2007) Mechanism and function of formins in the control of actin assembly, *Annual Review Biochemistry*, **76**, 593–627.
93. Sandbo, N., Ngam, C., Torr, E., Kregel, S., Kach, J., Dulin, N. (2013) Control of myofibroblast differentiation by microtubule dynamics through a regulated localization of mDia2, *Journal of Biological Chemistry*, **288**, 15466–15473.
94. Ott, C., Iwanciw, D., Graness, A., Giehl, K., Goppelt-Struebe, M. (2003) Modulation of the expression of connective tissue growth factor by alterations of the cytoskeleton, *Journal Biological Chemistry*, **278**, 44305–44311.
95. Samarakoon, R., Goppelt-Struebe, M., Higgins, P.J. (2010) Linking cell structure to gene regulation: signaling events and expression controls on the model genes PAI-1 and CTGF, *Cellular Signalling*, **22**, 1413–1419.
96. Dai, P., Nakagami, T., Tanaka, H., Hitomi, T., Takamatsu, T. (2007) Cx43 mediates TGF-beta signaling through competitive Smads binding to microtubules, *Molecular Biology Cell*, **18**, 2264–2273.
97. Dong, C., Li, Z., Alvarez, R., Jr., Feng, X.H. (2000) Goldschmidt-Clermont P.J., Microtubule binding to Smads may regulate TGF beta activity, *Molecular Cell*, **5**, 27–34.
98. Fuchs, E., Weber, K. (1994) Intermediate filaments: structure, dynamics, function, and disease, *Annual Review Biochemistry*, **63**, 345–382.
99. Herrmann, H., Bar, H., Kreplak, L., Strelkov, S.V., Aebi, U. (2007) Intermediate filaments: from cell architecture to nanomechanics, *Nature Reviews*, **8**, 562–573.
100. Gruenbaum, Y., Margalit, A., Goldman, R.D., Shumaker, D.K., Wilson, K.L. (2005) The nuclear lamina comes of age, *Nature Reviews*, **6**, 21–31.
101. Goldman, R.D., Khuon, S., Chou, Y.H., Opal, P., Steinert, P.M. (1996) The function of intermediate filaments in cell shape and cytoskeletal integrity, *Journal Cell Biology*, **134**, 971–983.
102. Parry, D.A., Steinert, P.M. (1999) Intermediate filaments: molecular architecture, assembly, dynamics and polymorphism, *Quarterly Reviews Biophysics*, **32**, 99–187.
103. Colucci-Guyon, E., Portier, M.M., Dunia, I., Paulin, D., Pournin, S., Babinet, C. (1994) Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype, *Cell*, **79**, 679–694.
104. Eckes, B., Colucci-Guyon, E., Smola, H., Nodder, S., Babinet, C., Krieg, T., Martin, P. (2000) Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin, *Journal Cell Science*, **113** (Pt 13), 2455–2462.
105. Mor-Vaknin, N., Legendre, M., Yu, Y., Serezani, C.H., Garg, S.K., Jatzek, A., Swanson, M.D., Gonzalez-Hernandez, M.J., Teitz-Tennenbaum, S., Punturieri, A., Engleberg, N.C., Banerjee, R., Peters-Golden, M., Kao, J.Y., Markovitz, D.M. (2013) Murine colitis is mediated by vimentin, *Scientific Reports*, **3**, 1045.
106. dos Santos, G., Rogel, M.R., Baker, M.A., Troken, J.R., Urich, D., Morales-Nebreda, L., Sennello, J.A., Kutuzov, M.A., Sitikov, A., Davis, J.M., Lam, A.P., Cheresch, P., Kamp, D., Shumaker, D.K., Budinger, G.R., Ridge, K.M. (2015) Vimentin regulates activation of the NLRP3 inflammasome, *Nature Communications*, **6**, 6574.

107. Eckes, B., Dogic, D., Colucci-Guyon, E., Wang, N., Maniotis, A., Ingber, D., Merckling, A., Langa, F., Aumailley, M., Delouvee, A., Koteliansky, V., Babinet, C., Krieg, T. (1998) Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts, *Journal Cell Science*, **111** (Pt 13), 1897–1907.
108. Challa, A.A., Stefanovic, B. (2011) A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs, *Molecular Cellular Biology*, **31**, 3773–3789.
109. Krupsky, M., Kuang, P.P., Goldstein, R.H. (1997) Regulation of type I collagen mRNA by amino acid deprivation in human lung fibroblasts, *Journal Biological Chemistry*, **272**, 13864–13868.
110. Ricupero, D.A., Poliks, C.F., Rishikof, D.C., Cuttle, K.A., Kuang, P.P., Goldstein, R.H. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stabilization of alpha1(I) collagen mRNA in human lung fibroblasts, *American Journal Physiology*, **281**, C99–C105.
111. Rishikof, D.C., Kuang, P.P., Poliks, C., Goldstein, R.H. (1998) Regulation of type I collagen mRNA in lung fibroblasts by cystine availability, *Biochemical Journal*, **331** (Pt 2), 417–422.
112. Cai, L., Fritz, D., Stefanovic, L., Stefanovic, B. (2010) Binding of LARP6 to the conserved 5' stem-loop regulates translation of mRNAs encoding type I collagen, *Journal Molecular Biology*, **395**, 309–326.
113. Challa, A.A., Vukmirovic, M., Blackmon, J., Stefanovic, B. (2012) Withaferin-A reduces type I collagen expression in vitro and inhibits development of myocardial fibrosis in vivo, *PLoS One*, **7**, e42989.
114. Bargagna-Mohan, P., Hamza, A., Kim, Y.E., Khuan Abby Ho, Y., Morvaknin, N., Wendschlag, N., Liu, J., Evans, R.M., Markovitz, D.M., Zhan, C.G., Kim, K.B., Mohan, R. (2007) The tumor inhibitor and antiangiogenic agent withaferin A targets the intermediate filament protein vimentin, *Chemistry Biology*, **14**, 623–634.
115. Zhang, Y., Stefanovic, B. (2016) Akt mediated phosphorylation of LARP6; critical step in biosynthesis of type I collagen, *Scientific Reports*, **6**, 22597.